

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ADSORVENTES AGAROSE-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> E  
AGAROSE-IDA-Co<sup>2+</sup> NA ADSORÇÃO DE IgG HUMANA**

**Eng. Químico Tsai Yuan Ming**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno**

Orientadora

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas, São Paulo

Junho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -  
UNICAMP

T52e	<p>Tsai, Yuan Ming</p> <p>Estudo comparativo entre os adsorventes agarose-CM-Asp-Co<sub>2</sub><sup>+</sup> e agarose-IDA-Co<sub>2</sub><sup>+</sup> na adsorção de IgG humana / Tsai Yuan Ming. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Sônia Maria Alves Bueno. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Imunoglobulina G. 2. Quelatos. 3. Cromatografia de afinidade. 4. Cobalto. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.</p>
------	--

Título em Inglês: Comparative study of adsorbents agarose-CM-Asp-Co<sub>2</sub><sup>+</sup> e agarose-IDA-Co<sub>2</sub><sup>+</sup> in the human IgG adsorption

Palavras-chave em Inglês: IgG, Chelates, Affinity chromatography, Cobalt

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

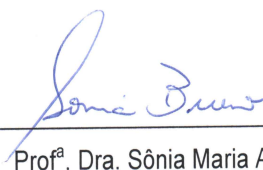
Banca examinadora: Everson Alves Miranda, Cristiane Sanchez Farinas

Data da defesa: 30-06-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

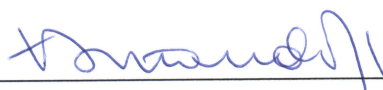
---

Dissertação de Mestrado defendida por Tsai Yuan Ming e aprovada em 30 de junho de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Prof.<sup>a</sup>. Dra. Sônia Maria Alves Bueno  
Orientadora – FEQ/UNICAMP



---

Prof. Dr. Everson Alves Miranda  
FEQ/UNICAMP

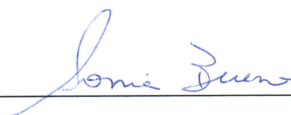


---

Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA

---

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Tsai Yuan Ming e aprovada pela comissão julgadora em 30 de junho de 2011.



---

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora – FEQ/UNICAMP

## **Agradecimentos**

A Deus pela força e amor que tem me dado nos momentos difíceis.

Ao meu pai que sempre me deu apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. A minha mãe que apesar de não poder estar mais conosco, me protegeu nesses 16 anos da sua ausência. A minha irmã que mesmo estando longe, sempre me deu apoio moral.

Aos amigos do laboratório (Gisele, Luana, Marcel e Igor) que estiveram sempre ao meu lado em todas as situações.

A professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno pela orientação e dedicação durante todas as etapas do trabalho.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Ângela Maria Moraes pela disposição dos equipamentos de seus laboratórios.

Aos Prof. Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Rosana Emi Tamagawa pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

A todos os professores e funcionários da FEQ/UNICAMP que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo principal, o estudo comparativo dos agentes quelantes CM-Asp e IDA no processo da purificação de IgG humana por cromatografia de afinidade por íon metálico cobalto imobilizado em diferentes sistemas tamponantes na presença e ausência do sal NaCl. Observou-se, para todos os sistemas tamponantes estudados, a adição de sal foi desfavorável em termos de capacidade e seletividade de adsorção de IgG para ambos os agentes quelantes. De acordo com eletroforeses SDS-PAGE e análises nefelométricas, os melhores resultados foram observados em presença de Tris-HCl 25 mmol/L, pH 7,0 para o quelato CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e fosfato de sódio 25 mmol/L com imidazol 2 mmol/L, pH 7,0 para o quelato IDA-Co<sup>2+</sup>, obtendo-se fatores de purificação de 8,1 e 4,1 e pureza de 100% e 96%, respectivamente. Foram determinadas as curvas de ruptura por meio de experimentos cromatográficos realizados a diferentes diluições do soro humano, os resultados obtidos evidenciaram uma maior eficiência em termos da capacidade de adsorção nas diluições a 5 e 10 vezes (0,89 e 1,03 mg de proteína total/mL gel) comparado a soro diluído a 2,5 vezes (0,40 mg de proteína total/mL gel), tendo estes demonstrado comportamentos similares ao apresentado em etapa cromatográfica. Os dados de adsorção de IgG foram bem representados pelo modelo de Langmuir-Freundlich, a 25°C, fornecendo valor de  $Q_m$  igual a 94,44 mg IgG/mL gel e constante de dissociação de  $8,18 \times 10^{-5}$  mol/L, ordem de grandeza característica para ligantes pseudobioespecíficos.

Palavras-chave: IgG, quelatos, IMAC, cobalto

## Abstract

In this work, we targeted the comparative study between chelating ligands agarose-CM-Asp and agarose-IDA in the purification of human IgG by Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC) with immobilized cobalt ion in different buffering systems in the presence or absence of salt. For all buffering systems the addition of salt was unfavorable in terms of adsorption capacity of IgG for both chelating ligands. The best results were obtained in the absence of salt. According to SDS-PAGE electrophoresis and nephelometric analysis, the best conditions observed were Tris-HCl 25 mmol/L, pH 7,0 for the agarose-CM-Asp and sodium phosphate 25 mmol/L with imidazole 2 mmol/L for the agarose-IDA (purification factor of 8,1 and 4,1 and purity of 100% and 96%, respectively). Chromatographic experiments were carried out with different dilutions of human serum to determine the breakthrough curves. The results showed a higher efficiency in terms of adsorption capacity at dilutions of 5 and 10 times (0.89 and 1.03 mg of protein Total / mL gel) compared to serum diluted 2.5 times (0.40 mg total protein / mL gel), these results had similar behaviors as those showed in the chromatographic stage. The adsorption data of IgG at 25°C were well represented by Langmuir-Freundlich model. Values of  $Q_m$  equal 94,44 mg of IgG/mL gel and dissociation constant of  $8,18 \times 10^{-5}$  mol/L, characteristic magnitude of pseudospecific ligands.

Key-words: IgG, quelates, IMAC, cobalt

## Lista de Figuras

- Figura 2.1: Representação esquemática da molécula de IgG. CP, cadeia pesada; CL, cadeia leve (adaptado de <http://people.cryst.bbk.ac.uk/>). 7
- Figura 2.2: Estrutura da histidina em pH neutro. 16
- Figura 2.3: Estrutura de diferentes agentes quelantes com íons metálicos hexacoordenados imobilizado. A) IDA; b) CM-Asp; c) TED; d) NTA. (Adaptado de BRESOLIN *et al.*, 2010). 18
- Figura 2.4: Esquema da ligação entre uma proteína e o íon metálico cobalto quelatado (adaptada de ZATLOUKALOVA e KUCEROVA, 2004). 22
- Figura 4.1: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 1,0 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 38
- Figura 4.2: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl a pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 39



Figura 4.3: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

43

Figura 4.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

44

Figura 4.5: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

48

Figura 4.6: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 49

Figura 4.7: gráfico comparativo entre agentes quelantes IDA e CM-Asp com o emprego dos sistemas tamponantes Tris-HCl, MOPS-imidazol e fosfato de sódio-imidazol, pH 7,0 na presença e ausência de sal com suas respectivas capacidades de adsorção e seletividade. Barra com preenchimento preto: IDA-Co<sup>2+</sup>, barra sem preenchimento: CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Escala arbitrária: (♦) nível ilustrativo da seletividade: 0 = muitas impurezas; 0,2 = quantidade razoável de impurezas; 0,5 = poucas impurezas; 1 = alto grau de pureza eletroforética. 51

Figura 4.8: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,1 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2,0 mmol/L de imidazol e 0,1 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana. 53

Figura 4.9: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de 0,1 mol/L NaCl, em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 0,1 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses

SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista C: marcador de IgG humana. 54

Figura 4.10: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,5 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 0,5 mol/L NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Coluna L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana. 56

Figura 4.11: Esquema ilustrativo do efeito do NaCl para os sistemas tamponantes fosfato de sódio-imidazol em IDA-Co<sup>2+</sup> e Tris-HCl em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. (▲) IDA-Co<sup>2+</sup>, (●) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. 58

Figura 4.12: Esquema ilustrativa de quantidade recuperada e pureza de IgG para sistemas tamponantes Tris-HCl e fosfato de sódio em adsorventes CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e IDA-Co<sup>2+</sup>. Eluições 1, 2 e 3 (E1, E2 e E3) provenientes das Tabelas 4.7 e 4.8. Barra sem preenchimento: CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, barra com preenchimento preto: IDA-Co<sup>2+</sup>, (◆) Percentagem de pureza. 61

Figura 4.13: Curvas de ruptura das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a diferentes diluições no tampão Tris-HCl pH 7,0; (■) 2,9 mL de soro diluído 2,5 vezes; (◇) 2,4 mL de soro diluído 5 vezes; (✱) 2,4 mL de soro diluído 10 vezes. 63

Figura 4.14: Perfil cromatográfico das frações de eluição e regeneração da cromatografia realizada em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a diferentes diluições de soro humano em Tris-HCl pH 7,0: (■) 2,5 vezes; (◇) 5 vezes; (✱) 10 vezes. 63

Figura 4.15: Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras a diluições do soro humano: a) 2,5 vezes; b) 5 vezes e c) 10 vezes. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Solução inicial. Pistas numeradas correspondem as frações coletadas no “flow-through”. Pista L: “pool” das frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de

Tris. Pista R: "pool" de frações da regeneração com EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Pista C: marcador de IgG humana (Aventis Behring, Alemanha). 65

Figura 4.16: Isoterma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> (◆) Pontos experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo de Langmuir. 68

Figura 4.17: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, R<sup>2</sup> = 0,89. 69

Figura 4.18: Isoterma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> (◆) Pontos experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo de Langmuir-Freundlich. 70

Figura A.1: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 1,0 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: "pool" das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: "pool" das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista R: "pool" das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 86

Figura A.2: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl a pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: "pool" das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: "pool" das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista E3: "pool" das frações de eluição a 500 mmol/L de Tris. Pista R: "pool" das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 87

Figura A.3: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano

diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

89

Figura A.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

90

Figura A.5: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

92

Figura A.6: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de

imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 93

Figura A.7: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,1 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2,0 mmol/L de imidazol e 0,1 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana. 95

Figura A.8: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de 0,1 mol/L NaCl, em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 0,1 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana. 96

Figura A.9: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,5 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 0,5 mol/L NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das

frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana. 98

Figura A.10: Isotherma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com tampão Tris-HCl, pH 7,0 utilizando o modelo de Langmuir. 100

Figura A.11: Isotherma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com tampão Tris-HCl, pH 7,0 utilizando o modelo de Langmuir-Freundlich. 101

## Lista de Tabelas

- Tabela 2.1. Predição da retenção de proteínas em matrizes contendo metais de transição quelatados a IDA, baseado em resíduos de histidina e triptofano acessíveis na superfície de proteínas (adaptada de UEDA *et al.*, 2003). 16
- Tabela 3.1. Sistemas tamponantes utilizados nas cromatografias de purificação de IgG em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença e ausência de sal (NaCl). 30
- Tabela 4.1. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão Tris-HCl pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris. 40
- Tabela 4.2. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão MOPS a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau aumento da concentração de imidazol. 45
- Tabela 4.3. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão fosfato de sódio a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol. 50
- Tabela 4.4. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença de 0,1 mol/L de NaCl, utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio-imidazol e Tris-HCl, respectivamente, a pH 7,0. Dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol e de Tris para IDA-Co<sup>2+</sup> e CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, respectivamente. 55
- Tabela 4.5. Balanço de massa da cromatografia em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio a pH 7,0 na presença de 0,5 mol/L de NaCl e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol. 57
- Tabela 4.6. Massas de proteína total e de IgG, IgM, albumina, transferrina obtidas por nefelometria, referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Sistema tamponante: Tris-HCl pH 7,0 (ausência de sal). 59
- Tabela 4.7. Massas de proteína total e de IgG, IgM, albumina, transferrina obtidas por nefelometria, referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em



agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>. Tampão de adsorção: Fosfato de sódio com 2,0 mmol/L imidazol, pH 7,0 (ausência de sal). 60

Tabela 4.8. Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a diferentes diluições de soro humano em Tris-HCl pH 7,0 e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris. 64

Tabela 4.9. Massas de proteína total e de IgG, IgM, albumina, transferrina obtidas por nefelometria, referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com soro diluído 5 vezes. Sistema tamponante: Tris-HCl pH 7,0 (ausência de sal). 67

Tabela 4.10. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. 69

Tabela 4.11. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. 71

Tabela A.1. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão Tris-HCl pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris. 88

Tabela A.2. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão MOPS a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol. 91

Tabela A.3. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão fosfato de sódio a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol. 94

Tabela A.4. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença de 0,1 mol/L de NaCl, utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio-imidazol e Tris-HCl, respectivamente, a pH 7,0. Dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol e de Tris para IDA-Co<sup>2+</sup> e CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, respectivamente. 97

Tabela A.5. Balanço de massa da cromatografia em agarose-IDA- $\text{Co}^{2+}$  utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio a pH 7,0 na presença de 0,5 mol/L de NaCl e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol. 99

Tabela A.6. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados de adsorção IgG em adsorvente CM-Asp- $\text{Co}^{2+}$ . 100

Tabela A.7. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp- $\text{Co}^{2+}$ . 101

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1: Introdução</b>	1
1.1. Anticorpos: relevância e purificação	1
1.2. Objetivo	4
<b>Capítulo 2: Revisão Bibliográfica</b>	6
2.1. Imunoglobulinas	6
2.2. Purificação de IgG humana	8
2.3. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	13
2.3.1. Princípios básicos	13
2.3.2. Escolha do íon metálico	15
2.3.3. Escolha do agente quelante	17
2.3.4. Condições de adsorção e dessorção	19
2.3.4.1. Adição de sal	21
2.3.5. Utilização do íon metálico $\text{Co}^{2+}$ em IMAC para purificação de proteínas	22
<b>Capítulo 3. Materiais e métodos</b>	25
3.1. Materiais	25
3.1.1. Fluidos empregados	25
3.1.2. Reagentes	25

3.2. Métodos	26
3.2.1. Ativação do gel com epícloridrina	26
3.2.2. Imobilização dos agentes quelantes no gel ativado com epícloridrina	27
a) Imobilização do IDA	27
b) Síntese e imobilização do CM-Asp	27
3.2.3. Determinação da densidade de ligantes	28
3.2.4. Experimentos cromatográficos	29
3.2.5. Dosagem de proteínas totais	31
3.2.6. Eletroforese SDS-PAGE	31
3.2.7. Dosagem de imunoglobulinas, albumina e transferrina	31
3.2.8. Determinação da curva de ruptura	32
3.2.9. Determinação da isoterma de adsorção	33
<b>Capítulo 4. Resultados e discussão</b>	<b>35</b>
4.1. Estudo do efeito do sal na adsorção de IgG nos quelatos IDA- $\text{Co}^{2+}$ e CM-Asp- $\text{Co}^{2+}$	35
4.1.1. Sistema tamponante Tris-HCl: eluição por aumento da concentração de Tris	36
4.1.2. Sistemas tamponantes MOPS e fosfato de sódio: eluição por aumento da concentração de imidazol	41
4.1.2.1. Sistema tamponante MOPS-imidazol	41

4.1.2.2. Sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol	45
4.2. Efeito da concentração do sal (NaCl) na purificação de IgG	52
4.3. Análise nefelométrica da purificação de IgG a partir do soro humano	58
4.4. Determinação da curva de ruptura	62
4.5. Isotermas de adsorção de IgG humana	68
<b>Capítulo 5. Conclusões</b>	<b>72</b>
<b>Capítulo 6. Sugestões para futuros trabalhos</b>	<b>74</b>
<b>Capítulo 7. Referências Bibliográficas</b>	<b>75</b>
<b>Apêndice A</b>	<b>85</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Anticorpos: relevância e purificação

Imunoglobulinas humanas são glicoproteínas que atuam no reconhecimento de antígenos. Dentre estas, destaca-se a imunoglobulina da classe G (IgG) devido a sua ampla utilização para fins terapêuticos e diagnósticos. Essas aplicações requerem IgG com alto grau de pureza, pois a presença de outros tipos de proteínas podem comprometer a eficácia do processo (DUFFY *et al.*, 1989; BURNOUF, 1995; PRASANNA e VIJAYALAKSHMI, 2010).

Para purificação de imunoglobulinas, processos tradicionais que se baseiam na precipitação por adição de sais, ou etanol e variações de temperatura e pH estão sendo substituídos por métodos mais seletivos baseados na cromatografia de adsorção (LOWE *et al.*, 2001). Verifica-se uma contribuição literária bastante ampla empregando cromatografia de afinidade para purificação de IgG, tendo ligantes bioespecíficos como as proteínas A e G como os mais utilizados (BOYLE e REIS, 1987; LEIBL *et al.*, 1993; FAHRNER e BLANK, 1999). Apesar de serem amplamente utilizados, estes ligantes apresentam alto custo e possibilidade de hidrólise a pH baixos, contaminando o produto final (ANSPACH *et al.*, 1996; BURNOUF e RADOSEVICH, 2001; DENIZLI *et al.*, 2003).

Uma alternativa para tais problemas seria a utilização de ligantes pseudobioespecíficos, pois estes apresentam baixo custo e estabilidade química e biológica maior que os ligantes bioespecíficos. Como exemplos destes ligantes pode-se citar: corantes (YAVUZ *et al.*, 2006; BAYRAMOGLU *et al.*, 2007; WONGCHUPHAN *et al.*, 2009), aminoácidos (BUENO *et al.*, 1995; ÇANAK *et al.*, 2004; PITIOT *et al.*, 2001),

agentes tiofílicos (HUTCHENS e PORATH, 1986; SERRES *et al.*, 1995; BOSCHETTI *et al.*, 2002) e íons metálicos (PORATH *et al.*, 1975; SERPA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008).

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC – “Immobilized Metal ion Affinity Chromatography”) tem sido aplicada com sucesso na purificação de imunoglobulinas de diversas fontes (HALE e BEIDLER, 1994; BODEN *et al.*, 1995; VANÇAN *et al.*, 2002; SERPA *et al.*, 2005; BAYRAMOGLU *et al.*, 2006a; BAYRAMOGLU *et al.*, 2006b; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010). Esta técnica baseia-se na afinidade existente entre íons metálicos imobilizados em matrizes sólidas e certos resíduos de aminoácidos acessíveis localizados na superfície de proteínas (PORATH *et al.*, 1975; PORATH e OLINS, 1983; GABERC-POREKAR e MENART, 2001). Os ligantes, íons metálicos quelatados a agentes quelantes polidentados possuem alta estabilidade, capacidade e especificidade (UEDA *et al.*, 2003).

Em relação ao agente quelante, o ácido iminodiacético (IDA) é tradicionalmente empregado em IMAC para purificação de anticorpos. Este ocupa três sítios de coordenação do metal, restando assim, outros três sítios livres para interação com as biomoléculas. Por sua vez, os agentes quelantes tetradentados como ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp) e ácido dinitrotriacético (NTA), quelatam os íons metálicos em quatro sítios de coordenação, disponibilizando dois sítios livres para interação com proteínas, podendo assim, aumentar a seletividade do processo (WONG *et al.*, 1991; GABERC-POREKAR e MENART, 2001, GUTIERREZ *et al.*, 2007).

Quanto aos íons metálicos, pode-se destacar o uso dos metais de transição  $\text{Cu}^{2+}$ ,

$\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , que apresentam afinidade pelos resíduos de histidina presentes na superfície de proteínas. VANÇAN e colaboradores (2002) apresentaram resultados promissores para purificação de IgG a partir do soro e plasma humano empregando-se os íons metálicos  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  imobilizados no agente quelante IDA.

Constata-se, a partir da literatura consultada, que há menos artigos publicados sobre purificação de biomoléculas por IMAC empregando-se o íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  quando comparado aos demais íons metálicos de transição acima mencionados, provavelmente devido à sua menor capacidade de adsorção.

Em IMAC, a adsorção de proteínas no suporte cromatográfico consiste na formação de ligações de coordenação destas com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados. Dessa forma, a escolha adequada do agente quelante é de fundamental importância para a eficiência do processo. Uma abordagem promissora seria o emprego do íon metálico cobalto e do agente quelante tetradentado CM-Asp visando o aumento da seletividade na adsorção de IgG. Esta seletividade é proporcionada, por um lado, pelo fato do íon metálico cobalto requerer a presença de dois resíduos de histidina especialmente localizadas em uma  $\alpha$ -hélice ou em um enovelamento, para que a proteína possa ser retida no adsorvente e, por outro lado, pelo fato do quelato CM-Asp disponibilizar apenas dois sítios livres para interação com proteínas (SULKOWSKI, 1989; CHAGA, 2001; UEDA *et al.*, 2003). Impurezas que não apresentam esta configuração ou que tem afinidade fraca pelo quelato, não seriam retidas no adsorvente, aumentando a seletividade. Uma vez que as interações entre anticorpo e íon metálico são também fortemente influenciadas pelo tipo e concentração de sal presente no tampão de adsorção, este se apresenta como um fator importante a



ser estudado na exploração do potencial deste ligante.

## 1.2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo o estudo comparativo entre os quelatos CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e IDA-Co<sup>2+</sup> imobilizados em gel agarose na adsorção de IgG a partir de soro humano utilizando-se três diferentes sistemas tamponantes, Tris-HCl, MOPS-imidazol e fosfato-imidazol, na presença e ausência de sal (NaCl). Parâmetros importantes para o entendimento da natureza de adsorção de proteínas, como a constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo quelato metálico-IgG e o fator de cooperatividade ( $n$ ), bem como o parâmetro importante para ampliação de escala, a capacidade do adsorvente ( $Q_m$ ), foram determinados.

Para atingir este objetivo, foram propostas as seguintes etapas:

- a) Realização de experimentos cromatográficos em géis de agarose contendo os quelatos CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e IDA-Co<sup>2+</sup> imobilizados, alimentando-se soro humano em diferentes sistemas tamponantes na presença e ausência de NaCl. A seleção dos tampões foi baseada na estratégia de eluição por adição de agente competitivo. Foram empregados os sistemas tamponantes fosfato-imidazol, MOPS-imidazol e Tris-HCl. Eluição por decréscimo de pH não foi avaliada, uma vez que o íon metálico cobalto se desprende do agente quelante em valores de pH ácidos (VANÇAN *et al.*, 2002). A avaliação da purificação de IgG foi feita através da determinação da pureza, do rendimento e da quantidade de IgG adsorvida;

- b) Determinação de curvas de ruptura (“breakthrough”) à diversas concentrações de soro humano, diluídos no tampão que apresentou melhor resultado nos ensaios cromatográficos de purificação de IgG, com a finalidade de determinar a capacidade dinâmica da coluna;
- c) Determinação das isotermas de adsorção de IgG à 25°C. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich foram utilizados para determinação dos parâmetros capacidade máxima do adsorvente, constante de dissociação do complexo agente quelante- $\text{Co}^{2+}$ -IgG e fator de cooperatividade.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Imunoglobulinas

Os anticorpos são proteínas pertencentes à classe das imunoglobulinas, que representam aproximadamente 20% do plasma humano (FLEISCHMAN *et al.*, 1962). Estas moléculas são produzidas em resposta a agentes estranhos ao organismo. Linfócitos B carregando receptores específicos reconhecem e se ligam a determinantes antigênicos do antígeno e isso estimula um processo de divisão e diferenciação, transformando os linfócitos B em células plasmáticas. São estas células linfóides que predominantemente sintetizam anticorpos (VLUG e REMORTEL, 1989).

Os anticorpos podem ser monoclonais (substâncias homogêneas produzidas por uma única célula ou seu clone) ou policlonais (substâncias heterogêneas produzidas por diferentes células), tendo características que os tornam uma ferramenta efetiva no desenvolvimento e na aplicação de terapias e diagnósticos (KÖHLER e MILSTEIN, 1975; AUGUSTO e OLIVEIRA, 2001).

Imunoglobulinas são glicoproteínas constituídas por quatro cadeias polipeptídicas unidas por ligações dissulfídicas: duas cadeias pesadas (CP), com massa molecular entre 50 a 70 kDa e duas cadeias leves (CL) com massa molecular de 25 kDa (Figura 1). As cadeias pesadas e leves consistem de domínios variável (V) e constante (C). O domínio variável de ambas as cadeias pesada e leve formam sítios de ligação para a interação com o antígeno. Os domínios constantes da cadeia pesada fornecem moléculas de anticorpos com diferentes funções estruturais e biológicas, tais como ligação de complemento e ligação a membranas celulares (VLUG e REMORTEL, 1989;

ROQUE *et al.*, 2007).

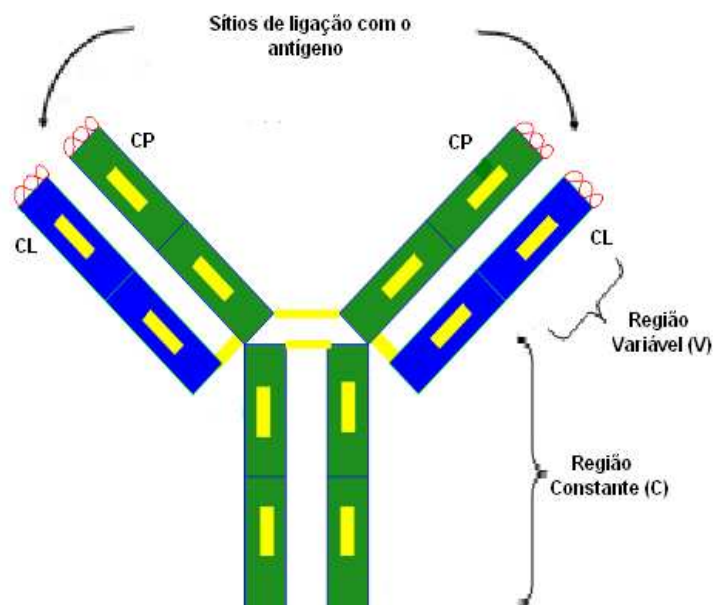


Figura 2.1: Representação esquemática da molécula de IgG. CP, cadeia pesada; CL, cadeia leve (adaptado de <http://people.cryst.bbk.ac.uk/>)

Existem cinco diferentes classes de cadeia pesada ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) que caracterizam os cinco diferentes tipos de anticorpos conhecidos como: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, respectivamente, presentes nos mamíferos e dois tipos de cadeia leve ( $\kappa$  e  $\lambda$ ). Os diferentes tipos se distinguem pelas suas propriedades biológicas, localizações funcionais e habilidade para se ligar com diferentes antígenos (VLUG e VAN REMORTEL, 1989; SALVALAGLIO *et al.*, 2009).

A imunoglobulina G (IgG), com massa molecular em torno de 150 kDa, corresponde de 70 a 75% do total de imunoglobulinas séricas, cuja concentração fisiológica média no adulto é de 11,7 g/l (VLUG e VAN REMORTEL, 1989). Esta é obtida a partir do fracionamento do plasma humano pela precipitação com etanol, de acordo com o procedimento descrito por COHN *et al.*, (1946). Para aplicações médicas,

imunoglobulinas específicas são purificadas usando uma combinação de vários métodos, principalmente precipitação e cromatografia.

A IgG humana possui quatro subclasses distintas (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), que possuem quatro cadeias pesadas que se diferenciam, principalmente, pela região flexível em termos de números de resíduos e de pontes dissulfeto intercadeias pesadas (VLUG e VAN REMORTEL, 1989).

As moléculas de IgG são de grande interesse para aplicações terapêuticas como preparação de soros, para testes diagnósticos como teste ELISA e também como ligante de afinidade para a purificação de antígenos. Essas aplicações requerem IgG de alta pureza, portanto, são requeridas técnicas eficientes para purificação e manutenção da atividade dos constituintes (TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004).

O consumo de imunoglobulina humana tem se destacado dentre todos os hemoderivados obtidos a partir do fracionamento do plasma humano, devido ao aumento da demanda no mercado, onde grandes quantidades (> 1g por paciente / ano) de proteína são exigidas para fins terapêuticos. Para atender a esta demanda crescente, as indústrias e instituições de pesquisas visam pelas melhorias de técnicas de recuperação e purificação de produtos terapêuticos a fim de minimizar os custos e aumentar os rendimentos (ANDERSEN E REILLY, 2004).

## **2.2. Purificação de IgG humana**

A purificação de IgG a partir de plasma ou soro humano requer uma sequência de etapas, as quais envolvem uma combinação de técnicas. (TANAKA *et al.*, 1998; TANAKA

*et al.*, 2000; BURNOUF e RADOSEVICH, 2001; RADOSEVICH e BURNOUF, 2010). A escolha apropriada do método para a purificação do anticorpo depende do rendimento e grau de pureza requeridos, bem como do seu custo. Em termos de aplicações terapêuticas e testes diagnósticos, o grau de pureza exigido é bastante elevado, geralmente acima de 99%. Nestes casos, a escolha das técnicas empregadas para purificação deve ser criteriosa, pois a etapa de purificação de bioprodutos pode chegar a 80% do custo operacional total (ROQUE *et al.*, 2007).

Métodos clássicos para purificação de anticorpos têm sido baseados na combinação de diferentes técnicas, dentre estas cita-se a precipitação e as cromatografias de troca iônica, de interação hidrofóbica, de filtração em gel e de afinidade (TANAKA *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 2000; BURNOUF e RADOSEVICH, 2001, FASSINA *et al.*, 2001; TISHCHENKO *et al.*, 2002). A cromatografia de troca iônica e a precipitação apresentam baixa seletividade na purificação de imunoglobulinas, necessitando assim, de etapas adicionais para atingir a pureza desejada (HUSE *et al.*, 2002).

A cromatografia de afinidade, que se baseia na interação específica entre o ligante e a molécula alvo, é um dos métodos utilizados para a purificação de IgG (LABROU e CLONIS, 1994; CLONIS *et al.*, 2005). Esta técnica vem exibindo resultados promissores nos processos de purificação de imunoglobulinas devido ao alto grau de pureza alcançado (HUSE *et al.*, 2002; ROQUE *et al.*, 2007).

Na cromatografia de afinidade, os ligantes são classificados como bioespecíficos e pseudobioespecíficos. Os ligantes bioespecíficos são aqueles que apresentam interações de natureza funcional com biomoléculas, por exemplo: interação

antígeno-anticorpo e receptor-hormônio. Estes ligantes são altamente específicos e amplamente utilizados, garantindo grau de pureza elevada. Ligantes como proteínas A, G e L são utilizados para purificação de anticorpos de várias fontes (LEIBL *et al.*, 1993, NILSON *et al.*, 1993; FAHRNER e BLANK, 1999; DUARTE *et al.*, 2005; GHOSE *et al.*; 2007; AONO *et al.*, 2010).

A proteína A tem sido bastante empregada nos processos de purificação de anticorpos para fins terapêuticos e testes diagnósticos. Esta proteína apresenta afinidade pela região Fc da IgG, ligando-se às mesmas com diferentes intensidades, dependendo da subclasse e da origem. A proteína G apresenta afinidade por várias subclasses de IgG, ligando-se a parte Fc e Fab de IgG, além de apresentar a afinidade média por anticorpos de camundongos da subclasse IgG<sub>1</sub> e alta afinidade pelas subclasses IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub>, enquanto proteína L tem afinidade pelas cadeias leves do tipo κ das imunoglobulinas e tem sido bastante empregada como ligante para purificação de IgG e seus fragmento Fv e Fab (NILSON *et al.*, 1993). No entanto, apesar da alta seletividade desses ligantes, as proteínas A, G e L apresentam alguns inconvenientes que valem a pena levar em consideração:

(1) uma quantidade considerável dessas proteínas podem se desprender da matriz e tal contaminação não pode, naturalmente, ser tolerada em aplicações clínicas;

(2) devido à alta pureza requerida destes ligantes, o seu o custo é elevado. Eles são também suscetíveis à desnaturação (ANSPACH *et al.*, 1996; BLANK *et al.*, 2001).

Comparadas às proteínas A, G e L, ligantes pseudobioespecíficos apresentam-se como alternativas para contornar tais problemas. Estes ligantes são compostos de origem biológica ou não e ligam-se às proteínas através de uma afinidade estrutural. Estes ligantes de baixo custo apresentam maior resistência a produtos químicos, menor degradação microbiológica durante a estocagem e apresentam condições brandas de eluição (constante de dissociação entre  $10^{-6}$  e  $10^{-2}$  mol/L), porém, são menos específicos (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Como exemplos de ligantes pseudobioespecíficos empregados na purificação de IgG, pode-se citar os aminoácidos (EL-KAK e VIJAYALAKSHMI, 1991; BUENO *et al.*, 1995; ÇANAK *et al.*, 2004), peptídeos (YANG *et al.*, 2005), ligantes tiofílicos (BOSCHETTI *et al.*, 2001), corantes (YAVUZ *et al.*, 2006; BAYRAMOGLU *et al.*, 2007; WONGCHUPHAN *et al.*, 2009) e quelatos metálicos (VANÇAN *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2006; LIOU *et al.*, 2008, SERPA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010).

Um dos exemplos de aminoácido utilizado para purificação de IgG é a histidina, que, quando imobilizada em matrizes sólidas, pode interagir através dos grupamentos carboxila, amino e imidazol com as proteínas em solução, dependendo das condições de imobilização e operacionais utilizadas (VIJAYALAKSHMI, 1989). O uso deste aminoácido tem sido eficaz em processos de purificação de IgG a partir de soro humano e sobrenadante de cultura celular (BUENO *et al.*, 1995; EL-KAK e VIJAYALAKSHMI, 1991).

Quanto ao uso de peptídeos, estes têm sido utilizados como ligantes de natureza biológica para purificação de anticorpos. Mais recentemente, YANG *et al.* (2009)



empregaram peptídeos hexaméricos HYFKFD, HFRRHL e HWRGWV na purificação de IgG humana, explorando a interação do ligante com a porção Fc da proteína, obtendo excelentes resultados, principalmente com peptídeo HWRGWV, com o qual se atingiu rendimento e pureza de IgG de 94,8% e 97,7%, respectivamente, com o uso de tampão PBS com 1 mol/L NaCl.

Ligantes tiofílicos foram introduzidos por Porath *et al.* (1985). Devido ao seu baixo custo, estabilidade química e especificidade, estes têm sido empregados com sucesso na purificação de IgG. O trabalho realizado por COFFINIER e colaboradores (2002) mostrou a eficiência do uso de membranas tiofílicas de álcool polietileno vinílico (PEVA) com  $\beta$ -mercaptoethanol imobilizado na purificação de IgG, obtendo uma recuperação de 85% com menos de 1% de albumina adsorvida, evidenciando uma alta especificidade pela proteína-alvo.

Corantes tem sido muito utilizados como ligantes para purificação de proteínas. BAYRAMOGLU e colaboradores (2007) demonstraram o uso do corante Reactive Green (RG-5) imobilizado em membrana de poli (2-hidroxi-etil-metacrilato) para purificação de IgG proveniente de soro humano, obtendo uma pureza e recuperação de 81% e 67%, respectivamente, com emprego do tampão fosfato de sódio 50 mmol/L a pH 6,0.

Os quelatos metálicos são empregados como ligantes na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC – “Immobilized Metal ion Affinity Chromatography”), técnica que se baseia na interação entre proteínas e íons metálicos imobilizados por meio de ligações de coordenação, em uma interação reversível (PORATH *et al.*, 1975; SULKOWSKI, 1985; SULKOWSKI, 1989; UEDA *et al.*, 2003).

A técnica de IMAC para purificação de anticorpos tem mostrado um grande potencial em termos de purificação e seletividade (PORATH e OLIN, 1983; BODEN *et al.*, 1995; VANÇAN *et al.*, 2002; SERPA, 2005; BAYRAMOGLU *et al.*, 2006 (a); BAYRAMOGLU *et al.*, 2006(b); RIBEIRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010), o que leva a buscar novos estudos explorando diferentes condições para realização deste processo de purificação.

## **2.3. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)**

### **2.3.1. Princípios básicos**

Em 1975, Porath e colaboradores introduziram uma técnica de separação e purificação de proteínas baseada na afinidade destas por íons metálicos quelatados em matrizes sólidas. Ela foi denominada cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, IMAC, e desde então essa técnica tem sido utilizada para separação e purificação de peptídeos, proteínas, células e ácidos nucleicos, tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial (PORATH *et al.*, 1975; SULKOWSKI, 1985; SULKOWSKI, 1989, WONG *et al.*, 1991; GABERC-POREKAR e MENART, 2001; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

A técnica de IMAC tem como princípio a afinidade existente entre os íons metálicos quelatados numa matriz sólida e biomoléculas em solução. Estes suportes contendo íons metálicos, tais como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$ , são apropriados para o fracionamento de proteínas com base no seu conteúdo relativo de resíduos de histidina, cisteína, cadeias laterais aromáticas de aminoácidos e de grupos N-terminal acessíveis de aminoácidos (PORATH, 1992; GABERC-POREKAR e MENART, 2001; UEDA *et al.*,

2003; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

A adsorção de proteínas ocorre através da ligação de coordenação entre resíduos de histidina acessíveis na superfície de proteína que atuam como grupos doadores de elétrons e íons metálicos de transição imobilizados no suporte sólido acima mencionados, resultando em complexos de coordenação. Posteriormente, estas podem ser eluídas pela adição de um agente competidor ou pela protonação dos resíduos de histidina (abaixamento de pH) (WONG *et al.*, 1991; WINZERLING *et al.*, 1992; UEDA *et al.*, 2003; BOLANOS-GARCIA e DAVIES, 2006; BRESOLIN *et al.*, 2009b). Esta técnica permite não só a purificação de proteínas com base na presença destes resíduos em sua superfície como também uma análise estrutural detalhada das proteínas (GABERC-POREKAR e MENART, 2001).

Destaca-se algumas vantagens da técnica de IMAC em relação aos ligantes bioespecíficos como: estabilidade dos ligantes, alta capacidade de adsorção protéica, condições de eluição brandas e baixo custo (WONG *et al.*, 1991; WINZERLING *et al.*, 1992; UEDA *et al.*, 2003; BOLANOS-GARCIA e DAVIES, 2006; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

Para obter alta seletividade em IMAC é necessário selecionar adequadamente o agente quelante, o íon metálico, o tipo de tampão, o pH, a força iônica, dentre outros. A escolha das condições mais apropriadas para o processo de purificação é importante para que a interação entre a proteína e o íon metálico quelatado seja favorecida, resultando em alto grau de pureza da proteína-alvo (WONG *et al.*, 1991; WINZERLING *et al.*, 1992; GABERC-POREKAR e MENART, 2001; UEDA *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2006; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

### 2.3.2. Escolha do íon metálico

Qualquer íon metálico que apresente afinidade por proteínas pode ser utilizado. No entanto, quando os íons metálicos são quelatados, eles apresentam reatividades diferentes em relação às biomoléculas, que pode ser predita pelo princípio de ácidos e bases duros e moles (HSAB – *Hard and Soft Acids and Bases*) (PEARSON, 1973). Este princípio assume três tipos principais de ácidos e bases, duros, moles e intermediários.

Para ácidos duros, exemplifica-se os íons metálicos como:  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , estes coordenam às bases duras que contém átomos de oxigênio (exemplo: carboxilato), nitrogênio alifático (exemplo: asparagina e glutamina) e fósforo (ácido amino fosforilado). Ácidos moles como íons metálicos  $Ag^+$  e  $Cu^+$  se coordenam de maneira estável à bases moles, como átomos de enxofre (exemplo: cisteína). Por último, como ácidos intermediários têm-se os íons metálicos de transição, tais como  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ; estes formam ligações de coordenação com as bases intermediárias como átomos de nitrogênio aromático e com as bases moles (átomos de enxofre) (UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

Os metais de transição com caráter ácido intermediário  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Co^{2+}$  são os mais comumente empregados na purificação de proteínas que possuam resíduos acessíveis de histidina, triptofano (interações com o nitrogênio dos grupamentos imidazol e indol, respectivamente) e cisteína (interações com o enxofre do grupamento tiol) (SULKOWSKI, 1989; WONG *et al.*, 1991; WINZERLING *et al.*, 1992; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

Testes realizados por Sulkowski (1989) demonstraram que a interação entre

proteínas e os íons metálicos quelatados ao agente quelante IDA está diretamente relacionada com a presença de histidinas acessíveis na superfície da proteína. Esta propriedade se deve ao fato de haver um grupo doador de elétrons (presença de par de elétrons no nitrogênio) no anel imidazol da histidina (Figura 2.2). Outros aminoácidos também afetam a retenção de proteínas, como o triptofano e a cisteína (Tabela 2.1).

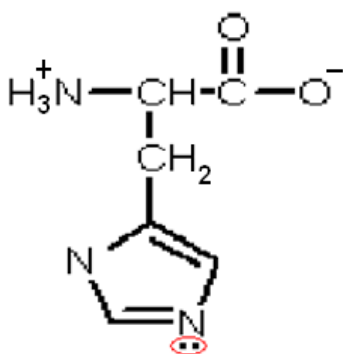


Figura 2.2 – Estrutura da histidina em pH neutro

**Tabela 2.1** – Predição da retenção de proteínas em matrizes contendo metais de transição quelatados a IDA, baseado em resíduos de histidina e triptofano acessíveis na superfície de proteínas (adaptada de UEDA *et al.*, 2003).

Ocorrência de resíduos His ou Trp na superfície de proteínas	Retenção de proteínas nos quelatos IDA – Me <sup>2+</sup>
Ausência de His ou Trp	Não há
1 His	Cu <sup>2+</sup>
> 1 His	Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup>
<i>Cluster</i> de His	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> e Co <sup>2+</sup>
Vários Trp, ausência de His	Cu <sup>2+</sup>

Me<sup>2+</sup> = metais de transição Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup>.

Segundo Sulkowski (1989), pelo menos um resíduo de histidina disponível para a coordenação é suficiente para que a proteína seja retida em IDA-Cu<sup>2+</sup>. Para que proteínas sejam adsorvidas em IDA-Ni<sup>2+</sup> é necessário que esta apresente, no mínimo, dois resíduos de histidina acessíveis, enquanto IDA-Zn<sup>2+</sup> e IDA-Co<sup>2+</sup> necessitam a presença de dois resíduos de histidina disponíveis espacialmente localizadas em uma  $\alpha$ -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos. Assim, a ordem crescente de força de retenção de proteínas contendo resíduos de histidina acessíveis em géis IDA-Me<sup>2+</sup> pode ser apresentada da seguinte forma: Cu<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup>  $\geq$  Co<sup>2+</sup> (SULKOWSKI, 1989; WONG *et al.*, 1991; WINZERLING *et al.*, 1992; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

### 2.3.3. Escolha do agente quelante

A escolha do quelante deve ser feita baseada na estabilidade do complexo formado entre o agente quelante e o íon metálico e na disponibilidade de sítios de coordenação livres para ligação com as proteínas. Quando um ligante contiver apenas um par doador de elétrons, haverá a formação de um complexo metálico, ocupando um sítio de coordenação, sendo assim, um ligante monodentado. Em casos de uma molécula ocupar mais de um sítio de coordenação de um íon metálico, ou seja, dispor de dois ou mais pares doadores de elétrons, o complexo formado passa a ser polidentado resultando em quelato metálico.

O agente quelante mais utilizado em IMAC é o tridentado ácido iminodiacético (IDA) que quelata o íon metálico ocupando três sítios de coordenação. Neste caso, a proteína pode interagir com os outros três sítios remanescentes. Agentes quelantes

tetradentados, como ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) e ácido nitrilotriacético (NTA), e pentadentados como Tris-carboximetil-etilenodiamina (TED), quelatam o íon metálico ocupando quatro e cinco sítios de coordenação, respectivamente, deixando menos sítios livres remanescentes para interagir com as proteínas. A Figura 2.3 mostra as estruturas esquemáticas dos agentes quelantes IDA, CM-Asp, NTA e TED.

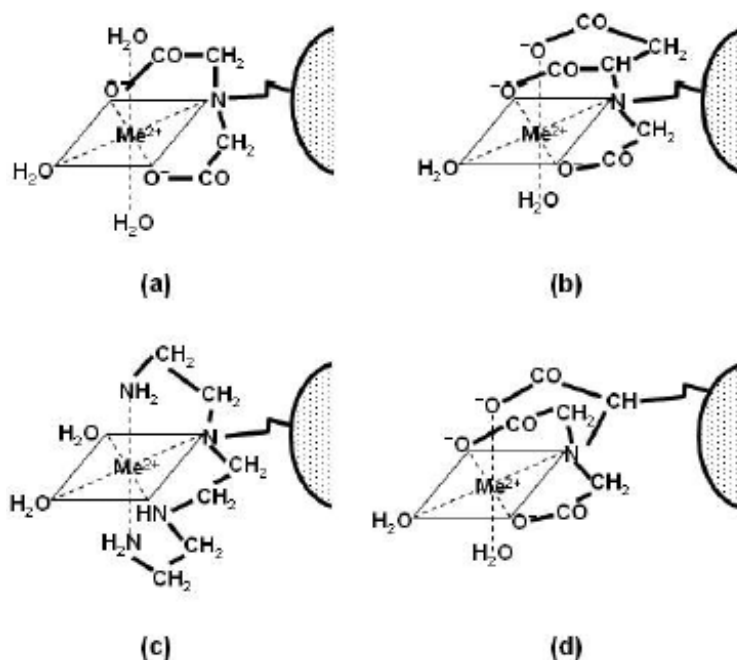


Figura 2.3 – Estrutura de diferentes agentes quelantes com íons metálicos hexacoordenados imobilizado. A) IDA; b) CM-Asp; c) TED; d) NTA (BRESOLIN *et al.*, 2010).

Normalmente, quanto mais polidentado for o agente quelante, maior é a estabilidade do complexo formado entre o agente quelante e o íon metálico, também denominado de efeito quelato. O agente quelante TED, por ser pentadentado, possui elevada estabilidade nas ligações de coordenação, podendo ser mais seletivo no processo de purificação. No entanto, por disponibilizar apenas um sítio para interação com proteínas, a capacidade de adsorção é baixa em relação aos agentes quelantes

tridentados e tetradentados. Assim, Porath (1988) apresentou uma relação em ordem decrescente de capacidade de adsorção em função do agente quelante utilizado: IDA > NTA > CM-Asp > TED.

#### **2.3.4. Condições de adsorção e dessorção**

A fim de obter uma purificação seletiva de proteínas, é de fundamental importância o conhecimento das interações físico-químicas ocorridas na etapa de adsorção, pois o emprego de diferentes condições operacionais como pH, tampão e concentração de sal podem tanto intensificar ou minimizar as interações entre a proteína e o quelato no processo de adsorção.

É comum a realização da etapa de adsorção em IMAC em pH alcalino, porém, o valor do pH ótimo depende de outros fatores envolvidos na interação entre a proteína e o quelato. Quando o valor do pH é superior ao valor do  $pK_a$  dos resíduos de aminoácidos, os grupos doadores de elétrons da proteína estarão parcialmente desprotonados, favorecendo assim, as ligações de coordenação. A faixa de pH entre 6,0 e 8,0 favorece a retenção de resíduos de histidina e cisteína. Uma faixa de valores mais ácidos ( $\approx$  pH 5,0) favorece a adsorção de proteínas ricas em ácidos carboxílicos e grupos fosfato e uma faixa de valores mais alcalinos (pH acima de 8,0), as ligações com grupos funcionais amina são favorecidas, no entanto, a seletividade diminui (WONG *et al.*, 1991; UEDA *et al.*, 2003).

Os tampões fosfato de sódio e acetato de sódio são os mais utilizados em IMAC. Citam-se também os zwitteriônicos como MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico), MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico) e HEPES (ácido



2-[N-hidroxietil] piperazina-N'-[3-etanolsulfônico]), os quais não interferem na interação entre a proteína e o metal (GOOD *et al.* 1966; WINZERLING *et al.*, 1992). Normalmente, tampões com alta força iônica (contendo 0,1 a 1,0 mol/L NaCl) são utilizados para reduzir as interações eletrostáticas não-específicas a fim de elevar a seletividade e estabilidade do complexo formado entre a proteína e o quelato imobilizado (PORATH e OLIN, 1983).

Quanto ao processo de dessorção das proteínas, diferentes condições podem ser aplicadas, podendo-se citar: alteração de valores de pH e adição de agente competidor (exemplo: imidazol) como as mais utilizadas, além de deslocamento do complexo íon metálico-proteína utilizando um agente competidor forte (exemplo: EDTA) (WINZERLING *et al.*, 1992 ; UEDA *et al.*, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2007).

É considerado um agente competidor a molécula que apresenta afinidade com o sítio de ligação em que a proteína está adsorvida, deslocando assim, a proteína para o meio aquoso, ficando o agente competidor ligado à matriz (WONG *et al.*, 1991). O agente competidor imidazol apresenta alta afinidade com os íons metálicos de transição  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  e a incorporação deste nos sistemas tamponantes tem contribuído para uma eluição seletiva de proteínas (WONG *et al.*, 1991; ZACHARIOU e HEARN, 2000; UEDA *et al.*, 2003).

Para utilização do adsorvente em um novo ciclo é necessário a realização da regeneração, na qual remove-se os íons metálicos quelatados para que a coluna possa ser reutilizada. Nesse caso, é necessário a utilização de um agente quelante forte como EDTA, para que os íons metálicos quelatados possam ser removidos da coluna (WONG *et al.*, 1991; BEITLÉ e ATAÁI, 1992).

### 2.3.4.1. Adição de sal

A presença de sal no sistema tamponante afeta de maneira significativa a capacidade de adsorção e a seletividade. Os sais mais utilizados em IMAC são cloreto e sulfato de sódio. A adição de altas concentrações de NaCl (0,5 a 1,0 mol/L) no sistema tamponante tem como finalidade a diminuição de interações eletrostáticas, favorecendo a adsorção de proteínas e o aumento da seletividade, promovendo uma maior estabilidade do complexo formado entre íon metálico e a proteína (UEDA *et al.*, 2003). Porém, estudos realizados por SERPA *et al.* (2005), RIBEIRO *et al.* (2008) e BRESOLIN *et al.* (2010) na aplicação de IMAC para purificação de anticorpos têm mostrado a eficácia da utilização do sistema tamponante de adsorção em ausência de sal, proporcionando alta seletividade, o que contraria os protocolos clássicos em IMAC.

Em casos de baixa força iônica (ausência ou baixa concentração de sal), os efeitos eletrostáticos são predominantes, assim, a interação entre o adsorvente e proteína se dá numa atração eletrostática reversível. Nessa condição, é possível que o íon metálico atue como um pseudocátion, podendo ocorrer interações mistas (forças eletrostáticas e ligações de coordenação). Estudos realizados por ZACHARIOU e colaboradores (1996, 2000) mostraram a eficiência de IMAC na adsorção de proteínas do soro (transferrina, albumina e  $\alpha_2$ -macroglobulina) com o emprego de tampões com baixa força iônica. O aumento da força iônica provoca um decréscimo na adsorção das proteínas, porém, dependendo das condições do pH, consegue-se uma adsorção de proteína seletiva (ZACHARIOU *et al.*, 1996; ZACHARIOU *et al.*, 2000).

### 2.3.5. Utilização do íon metálico $\text{Co}^{2+}$ em IMAC para purificação de proteínas

Como mencionado no item anterior, de acordo com Sulkowski (1989), a ordem crescente de força de retenção de proteínas contendo resíduos de histidina acessíveis em géis IDA- $\text{Me}^{2+}$  é de  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Co}^{2+}$ . Para o íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  é necessário que a proteína apresente dois resíduos de histidina disponíveis espacialmente localizados em uma  $\alpha$ -hélice ou em um enovelamento para que esta possa ser retida no adsorvente (SULKOWSKI, 1989). Por apresentar menor força de retenção de proteínas em relação aos outros íons metálicos, a adsorção de biomoléculas indesejadas também é menor, promovendo um aumento da seletividade. Desta forma, íon cobalto torna-se uma alternativa para uma purificação seletiva de proteínas (CHAGA *et al.*, 1999). A Figura 2.4 mostra esquematicamente a interação entre uma proteína com o íon metálico cobalto quelatado.

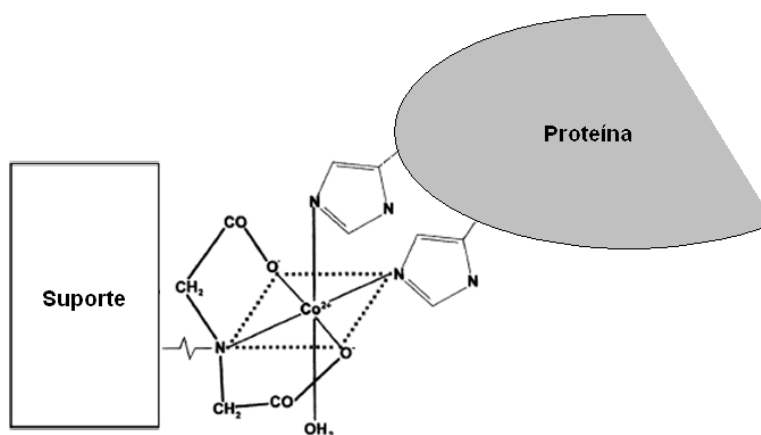


Figura 2.4 – Esquema da ligação entre uma proteína e o íon metálico cobalto quelatado (adaptada de ZATLOUKALOVA e KUCEROVA, 2004).

Estudos referentes à utilização do íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  para purificação de proteínas são mais escassos quando comparados aos outros íons metálicos de transição  $\text{Cu}^{2+}$ ,

$\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Vançan e colaboradores (2002), que realizaram um estudo da purificação de IgG humana utilizando os íons metálicos de transição  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , demonstraram a potencialidade do emprego de íon  $\text{Co}^{2+}$  na purificação de IgG a partir da IgG pré-purificada, obtendo uma recuperação de 86,7%, empregando o agente competitivo MOPS 25 mmol/L, gradiente degrau de imidazol 2 a 100 mmol/L com a presença de 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0.

A utilização do íon cobalto em IMAC também tem sido eficiente na purificação de proteínas recombinantes com cauda de histidina acoplada aos terminais N ou C das proteínas (CHAGA *et al.* 1999; PIATIBRATOV *et al.*, 2000). CHAGA e colaboradores (1999) empregaram o íon cobalto quelatado ao CM-Asp para purificação de lactato desidrogenase (LDH) proveniente de extrato de músculo de frango. O resultado mostrou alta seletividade com recuperação e pureza superior a 85% e 95%, respectivamente, evidenciando, assim, a potencialidade do emprego do  $\text{Co}^{2+}$  no processo de purificação (CHAGA *et al.* 1999).

Em 2003, PHAN e colaboradores purificaram a proteína caltrina (inibidor de transporte de cálcio) utilizando o quelato CM-Asp- $\text{Co}^{2+}$ . A proteína alvo foi recuperada de forma significativa na etapa de eluição a baixa concentração de imidazol, apresentando-se com pureza acima de 99% e um alto rendimento (PHAN *et al.*, 2003)

JIANG e colaboradores (2004) utilizaram o íon metálico cobalto para purificação do vírus da Herpes Tipo 1 (HSV-1), o qual possui aplicações em terapia genética. Sob condições otimizadas de IMAC, conseguiu-se um resultado bastante satisfatório com a alta recuperação de HSV-1 e um baixo teor (<3,5%) de proteínas contaminantes, DNA e vírus indesejados (JIANG *et al.*, 2004). No mesmo ano, ZATLOUKALOVA E KUCEROVA

apresentaram o trabalho que objetivou a separação de proteínas de diferentes massas moleculares a partir de fígado de rato utilizando IMAC com o íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  quelatado. Com o emprego da estratégia de eluição por aumento de concentração de imidazol, foi possível a separação das proteínas que possuem uma massa molecular relativa de aproximadamente 30 kDa das demais proteínas de massas moleculares distintas (ZATLOUKALOVA e KUCEROVA, 2004).

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Fluidos empregados**

O soro humano (“human serum from male AB plasma, sterile-filtered”, H4522) foi adquirido da Sigma (EUA) e IgG humana ( $\gamma$ -globulina) foi obtida da Aventis Behring (Alemanha).

##### **3.1.2. Reagentes**

O gel de agarose (Sepharose 4B<sup>®</sup>, 4% de reticulação, tamanho de partículas entre 45 e 165  $\mu\text{m}$  e faixa de fracionamento de 60 a 20.000 kDa) foi obtido da GE Healthcare (EUA). Ácido iminodiacético (IDA), ácido aspártico, ácido bromoacético, sulfato de cobalto, etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico (EDTA), Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), formaldeído e isopropanol foram adquiridos da Merck (Alemanha). Ácido clorídrico, ácido acético, ácido cítrico, carbonato de sódio, metanol e etanol foram obtidos da Synth (Brasil). Acrilamida, bis-Acrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS), glicina e N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) foram adquiridos da Bio-Rad (EUA). Persulfato de amônio, glicerol e albumina de soro bovino (BSA, 98% de pureza) foram obtidos do Sigma (EUA). Para eletroforese utilizou-se marcador de imunoglobulina G (IgG) preparado a partir de IgG humana obtida da Aventis Behring (Alemanha) e marcador de massa molecular da GE Healthcare (EUA) contendo as seguintes proteínas: miosina 212 kDa,  $\alpha$ 2-macroglobulina 170 kDa,  $\beta$ -galactosidase 116 kDa, transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica 53 kDa.

Outros reagentes foram todos de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura obtida com o equipamento Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Ativação do gel com epicloridrina**

O gel de agarose foi ativado com epicloridrina de acordo com o protocolo descrito por Hemdan e Porath (1985). Inicialmente, o gel embebido em água foi desgaseificado para remover o ar presente nos poros, utilizando uma bomba de vácuo. Em capela, montou-se o experimento para a ativação, onde um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 g de gel úmido foi colocado em um agitador orbital. Adicionou-se ao gel um volume de 5,0 mL do agente ativador epicloridrina e 50,0 mL de NaOH 2 mol/L contendo 0,266 g de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). Esta suspensão (gel e solução) foi deixada sob moderada agitação (50 rpm) à temperatura de 25 °C durante 15 min. Após este tempo de reação, foram gotejados, simultaneamente, 50 mL de NaOH e 23,3 mL de epicloridrina, a uma vazão de 0,27 e 0,13 mL/min, respectivamente, para evitar o aumento de temperatura durante a reação. A seguir, a suspensão foi deixada sob agitação por 16 h (BRESOLIN, 2006) a 25 °C, tempo suficiente para a reação ser completada. Após este período, em capela, o gel foi lavado com água até que o valor de pH da água pós-lavagem fosse o mesmo da água antes da lavagem, evidenciando que todo o excesso de solução (solução com epicloridrina, NaOH e  $\text{NaBH}_4$  com pH em torno de 10,0) foi removido.

### **3.2.2. Imobilização dos agentes quelantes no gel ativado com epícloridrina**

#### **a) Imobilização do IDA**

A imobilização do ácido iminodiacético (IDA) foi realizada como descrito por Porath e Olin (1983). Uma solução de 26 g de IDA adicionados a 65 mL de NaOH 2,0 mol/L foi preparada, tendo o seu pH ajustado para 10,0 com pastilhas de NaOH. Simultaneamente, preparou-se outra solução, contendo 27,56 g de carbonato de sódio em 65 mL de água. As duas soluções foram, então, misturadas e adicionadas ao gel já lavado (20g); a suspensão permaneceu em um agitador orbital a 65 °C sob agitação por 24 h. Após esta imobilização, o gel foi lavado com água, até que o pH da água pós-lavagem fosse o mesmo da água antes da lavagem. O gel obtido foi denominado de agarose-IDA.

#### **b) Síntese e imobilização do CM-Asp**

A síntese do ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por Mantovaara *et al.* (1991) em duas etapas. Primeiramente, imobilizou-se o ácido L-aspártico na matriz previamente ativada seguida do processo da carboximetilação.

#### ***Imobilização do ácido L-aspártico***

Seguiu-se o mesmo protocolo para a imobilização do ligante a partir de um grupamento amino em matriz ativada contendo oxirano. A matriz foi lavada com uma



solução de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,0 mol/L para retirar toda a água contida na matriz. A massa de 8,0 g de ácido L-aspártico foi adicionada a 50,0 mL de uma solução aquosa de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,0 mol/L, tendo o pH ajustado para 11,5, com pastilhas de NaOH foi, então, adicionada à matriz ativada e mantida sob agitação durante a noite. Após a imobilização, o gel foi lavado com água, até que o pH da água de lavagem fosse igual ao pH da água ultrapura.

### ***Carboximetilação***

O gel contendo o ácido L-aspártico imobilizado foi lavado com uma solução de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,0 mol/L, pH 10,5. Simultaneamente preparou-se uma solução contendo 12,6 g de ácido bromoacético em 30 mL de NaOH 4,0 M e o pH foi ajustado para 10,5 com pastilhas de NaOH. A solução foi adicionada ao gel contendo o ácido L-aspártico imobilizado e permaneceu sob agitação por no mínimo 6 h ou *overnight*. Após a carboximetilação, o gel foi lavado com água até verificação do mesmo valor de pH da água. O gel obtido foi denominado agarose-CM-Asp.

### **3.2.3. Determinação da densidade de ligantes**

A determinação da quantidade de íon cobalto quelatado na matriz foi determinada conforme descrito em Silva (2007). Alimentou-se uma coluna cromatográfica (contendo 3,0 mL de gel) com solução de sulfato de cobalto a 50 mmol/L até a saturação. O gel foi lavado com água seguido do tampão Tris-HCl a pH 7,0 contendo 700 mmol/L ou MOPS ou fosfato a pH 7,0 contendo 500 mmol/L de imidazol com o objetivo de retirar o íon metálico fracamente quelatado. A remoção do íon metálico do adsorvente foi feita com solução EDTA (ácido etileno-dinitrilo-tetraacético) a

100 mmol/L, pH 7,0. As frações de eluição foram recolhidas em volumes de 1,0 mL e analisadas por espectrometria UV-VIS.

### **3.2.4. Experimentos cromatográficos**

Empacotou-se uma coluna cromatográfica modelo C 10/10 de 10 mm de diâmetro interno x 10 cm de altura (GE Healthcare, EUA) com 3,0 mL de gel de agarose-IDA ou agarose-CM-Asp, que foi então conectada ao sistema de cromatografia de baixa pressão (Äkta Prime Plus, GE Healthcare ou BioLogic LP, Bio-Rad). Com uma vazão de 0,5 mL/min alimentou-se a coluna com a solução de sulfato de cobalto 50 mmol/L até a saturação e, em seguida, a coluna foi lavada com água e com tampão de mais alta concentração de agente competitivo (conforme o experimento) com o objetivo de retirar o íon metálico fracamente quelatado. A coluna contendo o adsorvente foi, então, equilibrada à temperatura ambiente com o tampão de adsorção (tampão de equilíbrio).

Conforme o experimento foram utilizados na etapa de adsorção os tampões MOPS e fosfato de sódio a 25 mmol/L e pH 7,0 contendo 2,0 mmol/L de imidazol e Tris-HCl a 25 mmol/L e pH 7,0, todos os tampões com ou sem 1,0 mol/L de NaCl a fim de estudar o efeito do sal na purificação de IgG. A coluna foi alimentada com 200 µl de soro humano diluído 5 vezes no tampão de adsorção. Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna. A eluição foi realizada, conforme o experimento, por gradiente do tipo degrau de adição de imidazol (20 a 500 mmol/L de imidazol) ou de Tris (de 100 a 700 mmol/L de Tris) ao tampão de adsorção e, em seguida, regenerada

com solução de EDTA a 100 mmol/L a pH 7,0.

A corrente de saída foi coletada durante todas as etapas cromatográficas em frações de volume de 1,0 mL. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford (proteína total, Bradford, 1976), aquelas situadas nos picos de proteína foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e quantificadas por nefelometria (dosagem de IgG, IgM, albumina e transferrina). Os experimentos foram realizados em duplicata, no mínimo.

Os sistemas tamponantes a 25 mmol/L e pH 7,0 utilizados nos experimentos realizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Sistemas tamponantes utilizados nas cromatografias de purificação de IgG em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença e ausência de sal (NaCl)

Etapas	Tampões utilizados
Adsorção	Tris-HCl MOPS contendo 2 mmol/L imidazol Fosfato de sódio contendo 2 mmol/L imidazol
Eluição	Aumento da concentração de Tris: 100, 300, 500 e 700 mmol/L Aumento da concentração de imidazol: 20, 100 e 500 mmol/L
Regeneração	EDTA 100 mmol/L, pH 7,0

### **3.2.5. Dosagem de proteínas totais**

As concentrações de proteína total nas amostras foram determinadas utilizando a metodologia de Bradford (1976), tendo albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência.

### **3.2.6. Eletroforese SDS-PAGE**

As frações obtidas nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA), utilizando gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida), conforme protocolo apresentado por Laemmli (1970), na concentração de 7,5%. As amostras foram previamente tratadas com tampões contendo SDS em condições desnaturantes e não-redutoras (sem a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100 °C por 10 min. Alíquotas de 10  $\mu$ L de cada amostra, 10  $\mu$ L de marcador de alta massa molecular e 10  $\mu$ L de marcador de IgG foram aplicadas nos géis e estes submetidos à uma voltagem de 180 V em cuba vertical. A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata conforme Morrissey (1981).

### **3.2.7. Dosagem de imunoglobulinas, albumina e transferrina**

A dosagem das concentrações de imunoglobulinas G e M, albumina e transferrina presentes nas frações cromatográficas foram determinadas por nefelometria, conforme descrito no manual do nefelômetro Array 360 System (Beckman Coulter, EUA).

### 3.2.8. Determinação da curva de ruptura

A determinação das curvas de ruptura tem como objetivo avaliar a seletividade e a capacidade dinâmica do adsorvente. Para isso, foram realizados experimentos cromatográficos com injeção de soro humano diluído em tampão Tris-HCl até a saturação do adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, devido ao fato de ter sido o adsorvente que apresentou melhor seletividade na adsorção de IgG. O ponto de ruptura foi determinado como sendo o ponto no qual o valor de C/Co atingiu o valor de 0,1, conforme Charcosset e colaboradores (1995), onde C é a concentração de proteínas totais na saída da coluna e Co é a concentração inicial de proteínas totais na solução de alimentação.

O experimento cromatográfico foi realizado de forma similar aos realizados anteriormente. Após a etapa de equilíbrio da coluna, esta foi alimentada com soro humano diluído a 2,5, 5 e 10 vezes no tampão 25 mmol/L Tris-HCl pH 7,0 até a saturação para determinação das curvas de ruptura. Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção até que todas as proteínas não adsorvidas fossem removidas da coluna. A eluição foi realizada por gradiente do tipo degrau de Tris (de 100 a 700 mmol/L de Tris) ao tampão de adsorção. A regeneração foi feita com EDTA a 100 mmol/L a pH 7,0.

A corrente de saída foi coletada durante todas as etapas cromatográficas em frações de volume de 1,0 mL. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford (1976) e foram feitos “pools” das frações de alimentação, lavagem, eluição e regeneração que tiveram maiores concentrações de proteínas para análise de eletroforese SDS-PAGE e nefelometria.

### 3.2.9. Determinação das isotermas de adsorção

Os experimentos para determinação das isotermas de adsorção foram realizados na temperatura de 25°C, em duplicata, com soluções de IgG humana de alta pureza (Aventis Behring, Alemanha) em tampão Tris-HCl, pH 7,0, por ter este apresentado o melhor resultado na adsorção de IgG. Em tubos do tipo Eppendorf de capacidade de 2,0 mL, 50 mL de gel foram previamente equilibrados com o tampão de adsorção e, em seguida, o tampão de adsorção foi esgotado. Adicionou-se então a cada tubo, 1,0 mL de solução de IgG em tampão de adsorção a diferentes concentrações (0,75 a 30,0 mg/mL). Os tubos foram deixados sob agitação orbital durante 3 h, tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido (tempo a partir do qual a concentração de IgG permanece constante no sobrenadante, determinado experimentalmente). Completado este tempo, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado por espectrofotometria a 280 nm para determinar a concentração de proteína (IgG) no equilíbrio ( $C^*$ ). A quantidade de proteína adsorvida em termos de miligrama por mililitro de adsorvente ( $Q^*$ ) foi calculada pela Equação 3.1:

$$Q^* = \frac{(C - C^*) \cdot V}{V_{Ads}} \quad (3.1)$$

sendo  $C$  a concentração inicial de IgG,  $C^*$  a concentração de IgG após o equilíbrio ser atingido,  $V$  o volume de solução e  $V_{ads}$  o volume de adsorvente.

Com o conjunto de valores de  $Q^*$  e  $C^*$ , foram ajustados parâmetros dos modelos de Langmuir (Equação 3.2) (LANGMUIR, 1913) e Langmuir-Freundlich (Equação 3.3) (SHARMA e AGARWAL, 2001). Foram determinados os parâmetros capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo

proteína-ligante imobilizado, além do parâmetro  $n$  apresentado no modelo de Langmuir-Freundlich, que classicamente é um indicativo do tipo de cooperatividade presente na adsorção. No caso de  $n = 1$ , não há cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios são independentes. Para  $n > 1$ , cooperatividade positiva é sugerida e cooperatividade negativa é observada quando  $0 < n < 1$  (SHARMA e AGARWAL, 2001).

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{(K_d + C^*)} \quad (3.2)$$

$$Q^* = \frac{Q_m (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (3.3)$$

Para a validação do modelo de Langmuir, fez-se a linearização do modelo segundo a equação 3.4, na forma de gráfico  $Q^*/C^*$  em função de  $Q^*$  (gráfico de Scatchard) (SHARMA e AGARWAL, 2001):

$$\frac{Q^*}{C^*} = \frac{Q_m}{K_d} - \frac{Q^*}{K_d} \quad (3.4)$$

## 4. Resultados e discussão

Neste capítulo, os resultados e discussão apresentados referem-se ao estudo do efeito do NaCl na purificação de IgG a partir de soro humano por cromatografia em gel agarose com íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  imobilizado aos agentes quelantes IDA e CM-Asp, em sistemas tamponantes Tris-HCl, MOPS-imidazol e fosfato de sódio-imidazol. As eluições foram realizadas pela adição de agente competidor (Tris-HCl ou imidazol) no tampão de adsorção. A comparação entre os sistemas tamponantes foi feita com base nos balanços de massa e seletividade apresentadas pelos perfis eletroforéticos de cada cromatografia. Em seguida, foram selecionadas as melhores condições tamponantes para análise nefelométrica, objetivando determinar a pureza de IgG e fator de purificação. A melhor condição apresentada na etapa cromatográfica foi utilizada para determinar as curvas de ruptura e as isotermas de adsorção.

### 4.1. Estudo do efeito do sal (1,0 mol/L NaCl) na adsorção de IgG nos quelatos IDA- $\text{Co}^{2+}$ e CM-Asp- $\text{Co}^{2+}$

A seletividade e a capacidade de adsorção de IgG a partir do soro humano foram avaliadas na presença dos seguintes sistemas tamponantes a pH 7,0 na ausência e presença de sal (1,0 mol/L de NaCl): Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0; MOPS 25 mmol/L, imidazol 2,0 mmol/L pH 7,0 e fosfato de sódio 25 mmol/L, imidazol 2,0 mmol/L pH 7,0. As etapas de eluição foram realizadas, dependendo do sistema tamponante utilizado, pelo aumento da concentração de agentes competidores Tris-HCl ou imidazol.

O quelato metálico imobilizado se encontra altamente solvatado em meio aquoso,



tendo, assim, um número de grupos hidroxila ao seu redor constituindo uma rede de cargas negativas. Neste caso, pode ocorrer uma indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos positivamente carregados, na associação da proteína com o quelato. Segundo a recomendação de PORATH e colaboradores (1975), a adição de sal, normalmente 1,0 mol/L de NaCl e condições de pH particulares (pH no qual os resíduos histidina estejam desprotonados) fazem com que estas interações sejam reprimidas.

Segundo Zachariou e Hearn (2000), em condições de baixa força iônica os íons metálicos imobilizados podem atuar como pseudocátions, podendo se ligar às proteínas por combinação de interações eletrostáticas e ligações de coordenação, porém sendo difícil determinar suas contribuições relativas.

#### **4.1.1. Sistema tamponante Tris-HCl: eluição por aumento da concentração de Tris**

A escolha do sistema tamponante Tris-HCl foi devido à sua característica de competir com a proteína pelo sítio de interação no íon metálico, promovendo, em muitos casos, aumento da seletividade na purificação de proteínas. Devido ao seu caráter competitivo, o aumento de sua concentração favorece a dessorção de biomoléculas (SERPA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010a).

As Figuras 4.1 e 4.2, apresentam os perfis cromatográficos e eletroforéticos dos experimentos realizados em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando sistema tamponante Tris-HCl a pH 7,0 em presença de 1,0 mol/L de NaCl e na ausência deste sal, respectivamente. Os balanços de massa das cromatografias são apresentados na Tabela 4.1.

Observa-se pela Figura 4.1a (perfil eletroforético da cromatografia em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>) que, além da adsorção de IgG, houve a adsorção de outras proteínas do soro humano, como transferrina e outras imunoglobulinas (adsorção de 0,31 mg de proteína total/mL de gel). Por outro lado, para agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, a IgG não foi detectada nas frações eluídas, e praticamente todas as proteínas injetadas na coluna foram removidas nas frações de lavagem (adsorção de somente 0,02 mg de proteína total/mL de gel), evidenciando um resultado não satisfatório na purificação.

Na ausência de sal, ambos os agentes quelantes apresentaram capacidade de adsorção de proteínas maiores que nos experimentos realizados com adição do sal no tampão Tris-HCl. Para o agente quelante IDA, a capacidade de adsorção de proteínas foi em torno de duas vezes e meia maior que aquela apresentada na presença de sal (0,88 mg de proteína total/mL de gel). No entanto, o comportamento é similar ao observado na presença de sal no que se refere à adsorção de impurezas.

Em condições da ausência de sal, agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> apresentou capacidade de adsorção de 0,23 mg de proteína total /mL de gel, sendo menor quando comparado a agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> (0,88 mg de proteína total /mL de gel), estando de acordo com a ordem de capacidade de adsorção proposta por PORATH e colaboradores (1975) de que IDA maior que CM-Asp. No entanto, a baixa capacidade de adsorção está associada à maior seletividade, (frações de eluição revelaram-se eletroforeticamente livre de impurezas, Figura 2b). Na condição de pH neutro, as principais impurezas albumina (pI = 4,9) e transferrina (5,2 < pI < 5,9) encontram-se

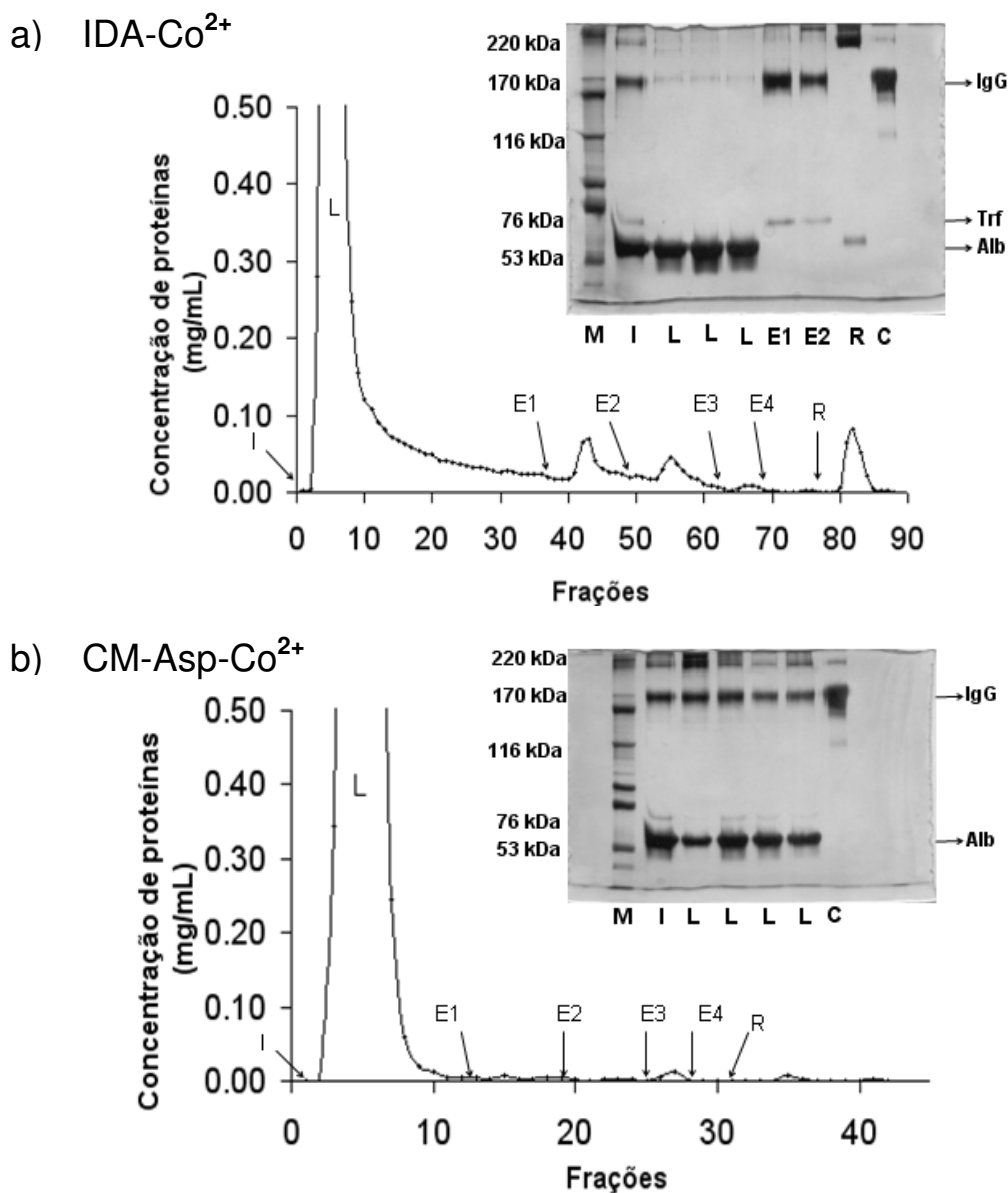


Figura 4.1: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 1,0 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

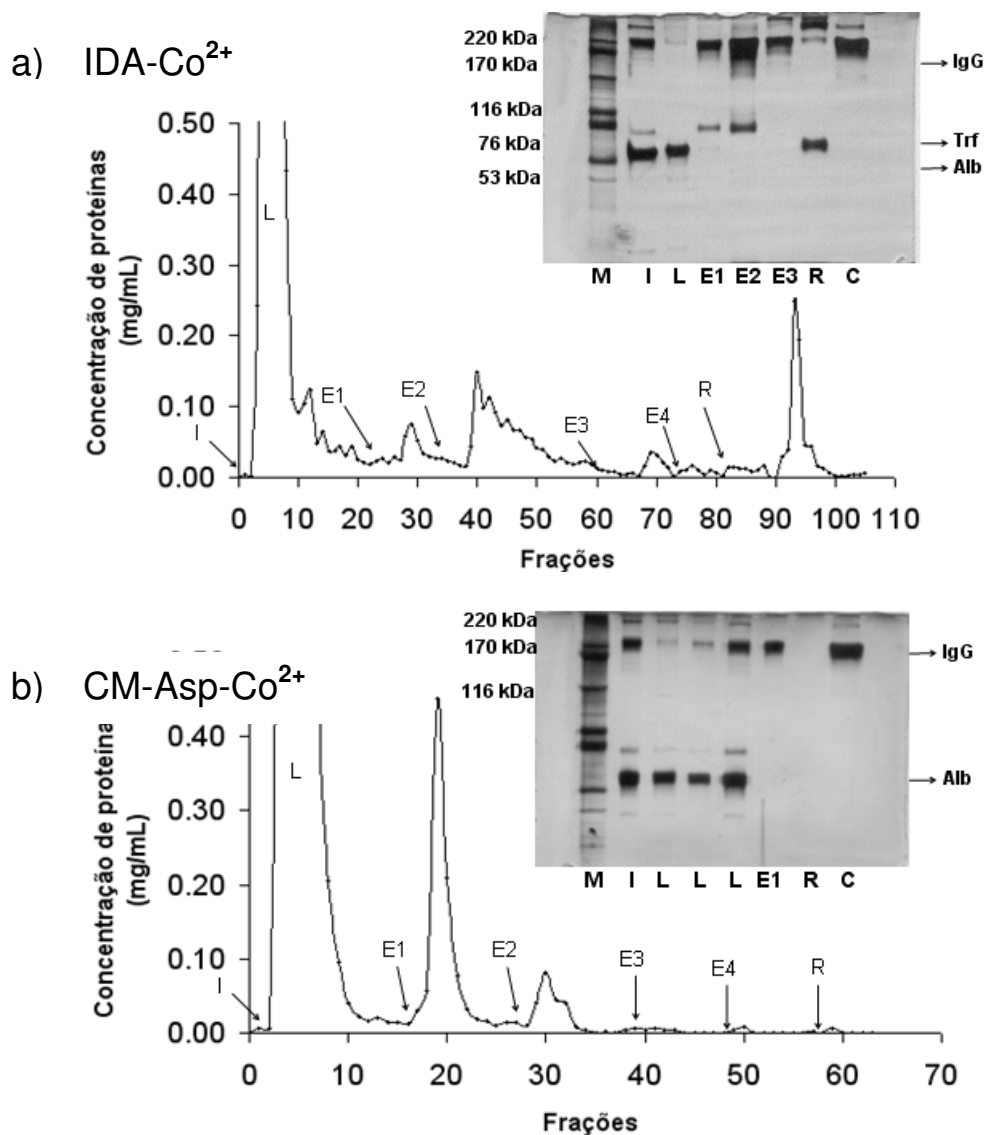


Figura 4.2: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl a pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela 4.1. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão Tris-HCl pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris.

Fração	Molaridade de Tris (mmol/L)	Adição de sal no tampão				Ausência de sal no tampão			
		Quelato				Quelato			
		IDA-Co <sup>2+</sup>		CM-Asp-Co <sup>2+</sup>		IDA-Co <sup>2+</sup>		CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	
		mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Injeção	25	6,35	100,0	7,88	100,0	10,85	100,0	9,71	100,0
Lavagem	25	6,38	100,4	8,03	101,9	10,8	99,5	10,42	107,3
Eluição	100	0,40	6,3	0,03	0,3	0,41	3,8	0,62	6,4
	300	0,26	4,0	0,01	0,2	1,28	11,8	0,03	0,3
	500	0,04	0,6	0,02	0,2	0,20	1,9	0,01	0,1
	700	0,01	0,1	0,00	0,0	0,08	0,8	0,00	0,0
Regeneração <sup>a</sup>		0,23	3,7	0,01	0,2	0,68	6,2	0,03	0,3
Recuperação		7,31	115,1	8,10	102,8	13,44	123,9	11,11	114,5

<sup>a</sup>100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup>Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup>Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

negativamente carregadas (PUTNAM, 1975), enquanto a IgG (7,0 < pI < 9,95) está carregada positivamente (PRIN *et al.*, 1995) Nessas condições, IDA-Me<sup>2+</sup> apresenta carga líquida nula (PORATH *et al.*, 1975) e CM-Asp-Me<sup>2+</sup> apresenta carga líquida negativa (GABERC-POREKAR e MENART, 2001), podendo este último interagir eletrostaticamente com a IgG e não com as impurezas albumina e transferrina, aumentando a seletividade do processo.

Como mencionado anteriormente, adição de sal favorece ligações de coordenação e reprime as interações eletrostáticas, o que pode ter causado a baixa adsorção do sistema CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença de sal.

Pelos resultados apresentados com sistema tamponante Tris-HCl, mostrou-se o

potencial do emprego do agente quelante CM-Asp complexado com o íon metálico cobalto na ausência de NaCl em que favoreceu a adsorção seletiva de IgG, havendo a recuperação desta proteína livre de contaminantes em fração de eluição.

#### **4.1.2. Sistemas tamponantes MOPS e fosfato de sódio: eluição por aumento da concentração de imidazol**

##### **4.1.2.1. Sistema tamponante MOPS-imidazol**

O tampão MOPS, por apresentar caráter zwitteriônico na condição de pH neutro ( $pK_a = 7,2$ ), apresenta-se com carga líquida próximo a zero. Desta forma, interações não específicas de natureza eletrostática entre tampão-íon metálico e tampão-proteína podem ser evitadas, podendo-se estudar unicamente o efeito do agente competidor imidazol na purificação da proteína alvo.

As Figuras 4.3 e 4.4, apresentam os perfis cromatográficos e eletroforéticos dos experimentos realizados em agarose-IDA- $Co^{2+}$  e agarose-CM-Asp- $Co^{2+}$  utilizando sistema tamponante MOPS contendo 2,0 mmol/L de imidazol a pH 7,0 em presença de 1,0 mol/L de NaCl e na ausência deste sal, respectivamente. Os balanços de massa das cromatografias são apresentados na Tabela 4.2.

Na presença de sal observa-se baixa capacidade de adsorção para ambos agentes quelantes IDA e CM-Asp (0,29 e 0,03 mg de proteína total/mL gel, respectivamente, Tabela 4.2), quando comparado aos dados obtidos na ausência de sal (0,62 e 0,19 mg de proteína total/mL gel, para IDA- $Co^{2+}$  e CM-Asp- $Co^{2+}$ , respectivamente). A baixa

capacidade de adsorção na presença de sal está associada ao desfavorecimento de interações eletrostáticas entre os quelatos estudados e as proteínas do soro. Observa-se que o agente competidor imidazol adicionado ao tampão de equilíbrio na presença de sal afetou a adsorção de proteínas de maneira similar àquela observada com o uso de Tris como agente competidor em que houve uma diminuição na quantidade de proteínas adsorvidas para ambos os agentes quelantes (Tabela 4.1).

Na ausência de sal a matriz agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> apresentou seletividade na adsorção de IgG (Figura 4.4b), uma vez que as frações eluídas a 100 mmol/L e 500 mmol/L se encontram apenas com traços de albumina. Agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>, apesar de apresentar maior capacidade de adsorção de proteína (0,62 mg de proteína total/mL de gel) nesta condição tamponante, apresentou transferrina em suas frações de eluição (Figura 4.4a), evidenciando seletividade inferior àquela apresentada pela agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>.

Agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> apresentou adsorção de IgG acompanhada de impurezas, tanto na presença quanto na ausência de sal, refletindo a baixa seletividade do adsorvente (Figura 4.3a e 4.4a). Em relação à força de retenção de proteínas no adsorvente agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>, foi verificada diminuição da força de interação entre o quelato metálico e proteínas com a adição de 1,0 mol/L de NaCl, pois na presença deste, concentrações baixas de imidazol (20 mmol/L) foram suficientes para eluir 73,6% do total de proteínas adsorvidas, enquanto que na ausência de sal, somente 33,3% das proteínas do soro foram eluídas com a mesma concentração.

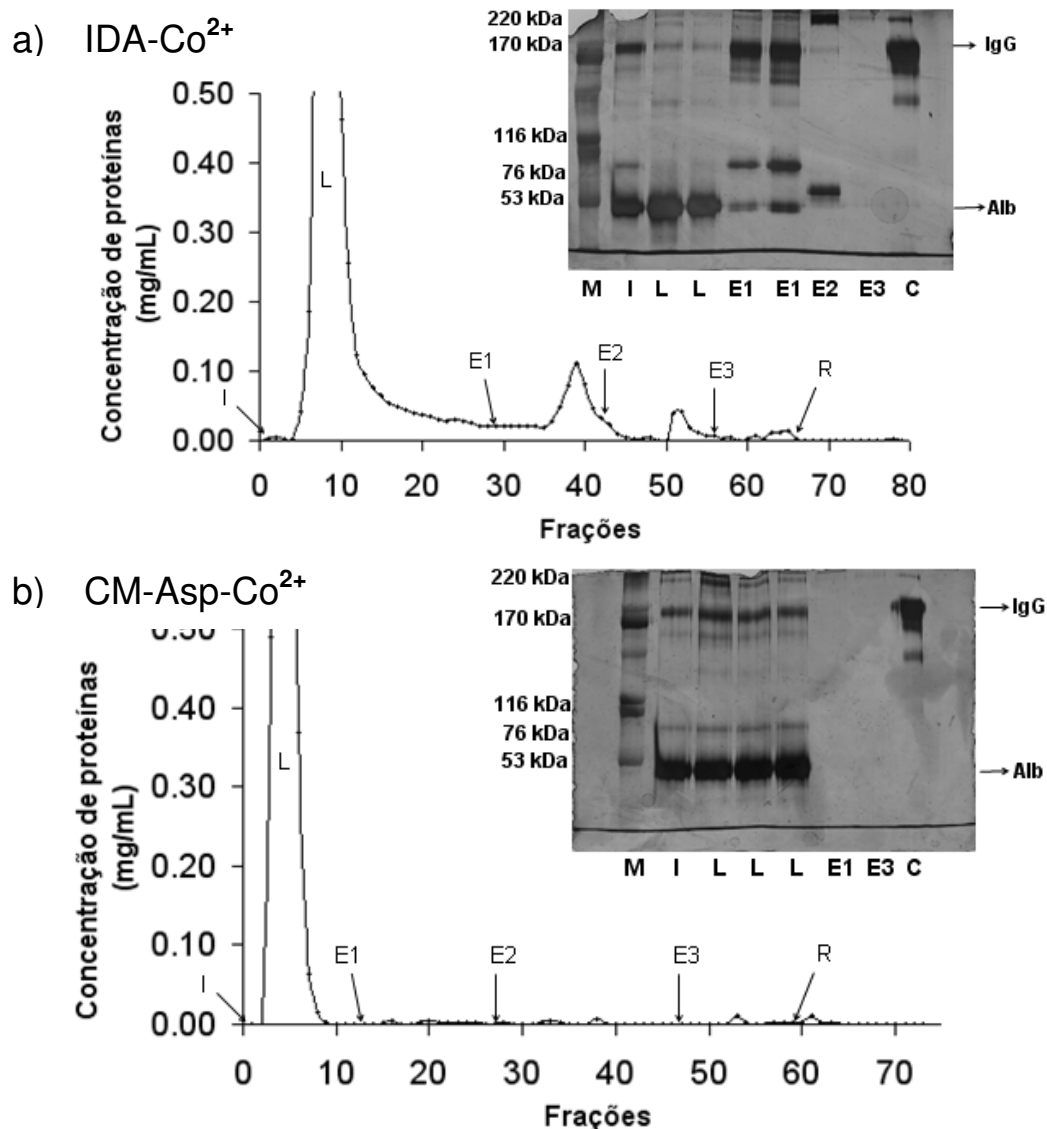


Figura 4.3: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.



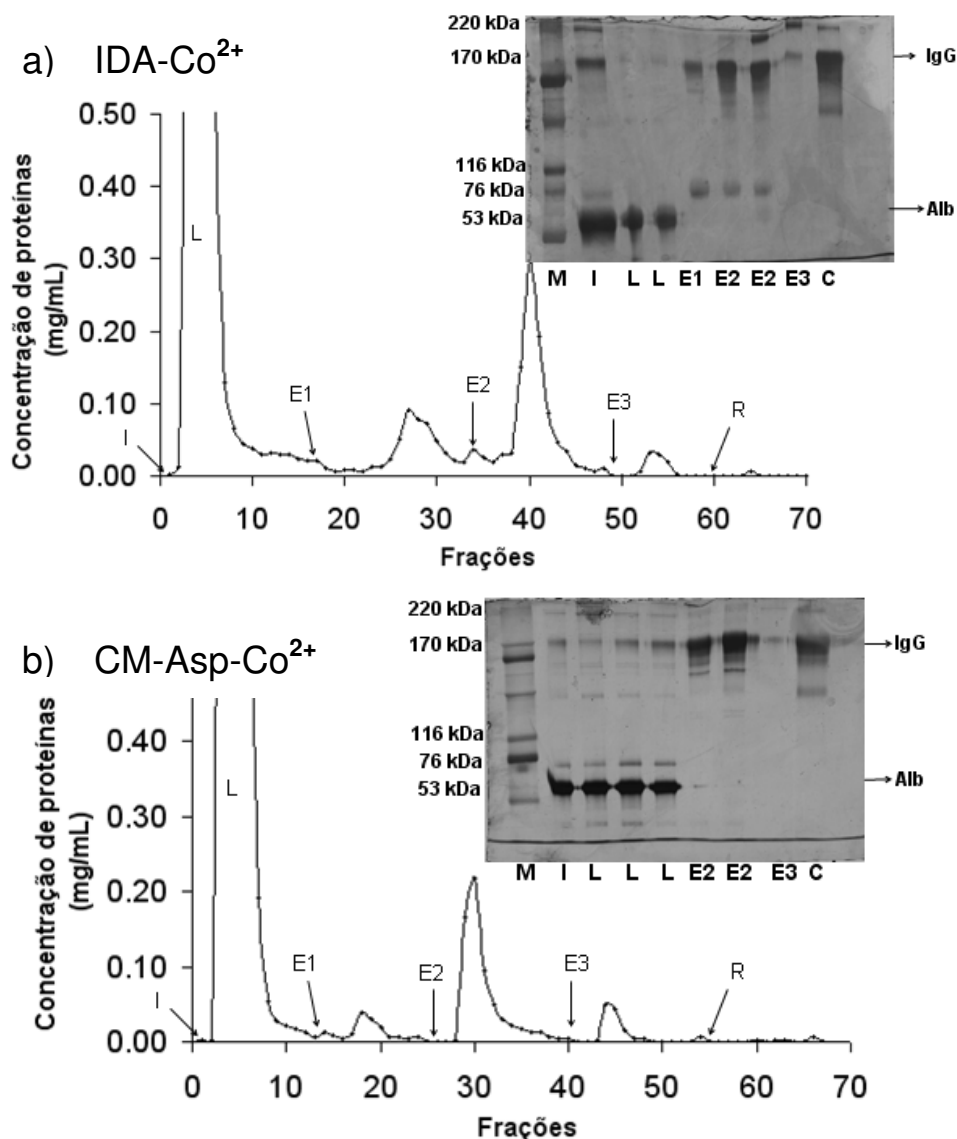


Figura 4.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela 4.2. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão MOPS a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol

Fração	Molaridade de imidazol (mmol/L)	Adição de sal no tampão				Ausência de sal no tampão			
		Quelato				Quelato			
		IDA-Co <sup>2+</sup>		CM-Asp-Co <sup>2+</sup>		IDA-Co <sup>2+</sup>		CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	
		mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Injeção	2,0	5,61	100,0	5,42	100,0	8,13	100,0	8,59	100,0
Lavagem	2,0	5,01	89,3	5,31	97,9	6,60	81,1	7,31	85,1
Eluição	20	0,65	11,6	0,03	0,5	0,61	7,5	0,03	0,3
	100	0,17	3,0	0,02	0,3	1,05	12,9	0,43	5,0
	500	0,06	1,1	0,04	0,7	0,16	1,9	0,12	1,4
Regeneração <sup>a</sup>		0,00	0,1	0,00	0,0	0,03	0,3	0,00	0,1
Recuperação		5,88	105,0	5,39	99,4	8,44	103,8	7,89	91,9

<sup>a</sup> 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Pelos resultados apresentados, destaca-se a utilização do adsorvente agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com tampão MOPS-imidazol na condição de ausência de sal, eletroforéticamente constatou-se apenas a presença de traços de albumina nas frações de eluições a 100 mmol/L imidazol. As frações eluídas a 100 e 500 mmol/L imidazol correspondem a 95% das proteínas eluídas, indicando uma adsorção seletiva da IgG.

#### 4.1.2.2. Sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol

O tampão fosfato de sódio ( $pK_{a1} = 2,1$  e  $pK_{a2} = 7,2$ ) atua como competidor fraco em IMAC, podendo interagir com os íons metálicos imobilizados através de ligações de coordenação. Conforme as definições ácido-base de Lewis, o fosfato de sódio é

classificado como base dura e o íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  como ácido intermediário, formando, assim, complexos de coordenação pouco estáveis por estes não apresentarem o mesmo caráter (LEWIS, 1923; UEDA *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

Os perfis cromatográficos e eletroforéticos para o sistema tamponante fosfato de sódio contendo imidazol na presença e ausência de sal utilizando os quelatos IDA- $\text{Co}^{2+}$  e CM-Asp- $\text{Co}^{2+}$  estão apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6, respectivamente, e os balanços de massa para estes experimentos encontram-se na Tabela 4.3.

Na ausência de sal ambos adsorventes foram seletivos na adsorção de IgG, apesar da presença de traços de albumina detectadas nas bandas de eluição das cromatografias em agarose-IDA- $\text{Co}^{2+}$  (Figura 4.6a). O comportamento deste adsorvente em tampão fosfato foi similar ao observado para os sistemas tamponantes Tris-HCl e MOPS, onde as quantidades adsorvidas de proteínas totais (0,88 mg/mL gel e 0,62 mg/mL gel, respectivamente) têm sido maiores que àquelas apresentadas na presença de NaCl. No entanto, a capacidade de adsorção de proteínas de agarose-IDA- $\text{Co}^{2+}$  na presença de fosfato-imidazol cerca de foi 50% mais baixa (0,38 mg/mL gel) que a média obtida nas cromatografias realizadas com os sistemas tamponantes Tris-HCl e MOPS-imidazol (0,75 mg/mL gel).

Quanto à capacidade de adsorção, o efeito do NaCl na purificação de IgG utilizando fosfato-imidazol foi similar ao observado com o emprego dos sistemas tamponantes Tris-HCl e MOPS-imidazol, onde observou-se a baixa capacidade de adsorção de proteínas na presença de sal. Para o sistema tamponante fosfato-imidazol, a redução na capacidade de adsorção em presença de sal foi de 50% para

agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> (0,13 e 0,25 mg de proteína total/mL de gel na presença e ausência de sal, respectivamente) e de 78% para adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup> (0,02 e 0,09 mg de proteína total /mL de gel na presença e ausência de sal, respectivamente).

Para agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>, o sal proporcionou diminuição na força de retenção de proteínas, sendo que na primeira eluição 78% das proteínas adsorvidas foram eluídas, enquanto que na ausência de sal, 53% de proteínas foram eluídas nesta mesma etapa.

Observa-se na eletroforese da Figura 4.5a a presença de uma banda indicando a presença de uma proteína de massa molecular superior à da IgG nas frações eluídas com 100 mmol/L de imidazol, que, segundo o perfil eletroforético, foi a única proteína desorvida nesta condição. O resultado indica que a utilização do adsorvente agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> com o sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol pode ser promissor para purificação desta proteína com alta massa molecular, podendo esta ser uma IgM.

Com base nos resultados apresentados, destaca-se o emprego do sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na ausência de sal, que apresentou boa seletividade para ambos adsorventes aliado à maior capacidade de adsorção quando comparado ao sistema com adição de sal.

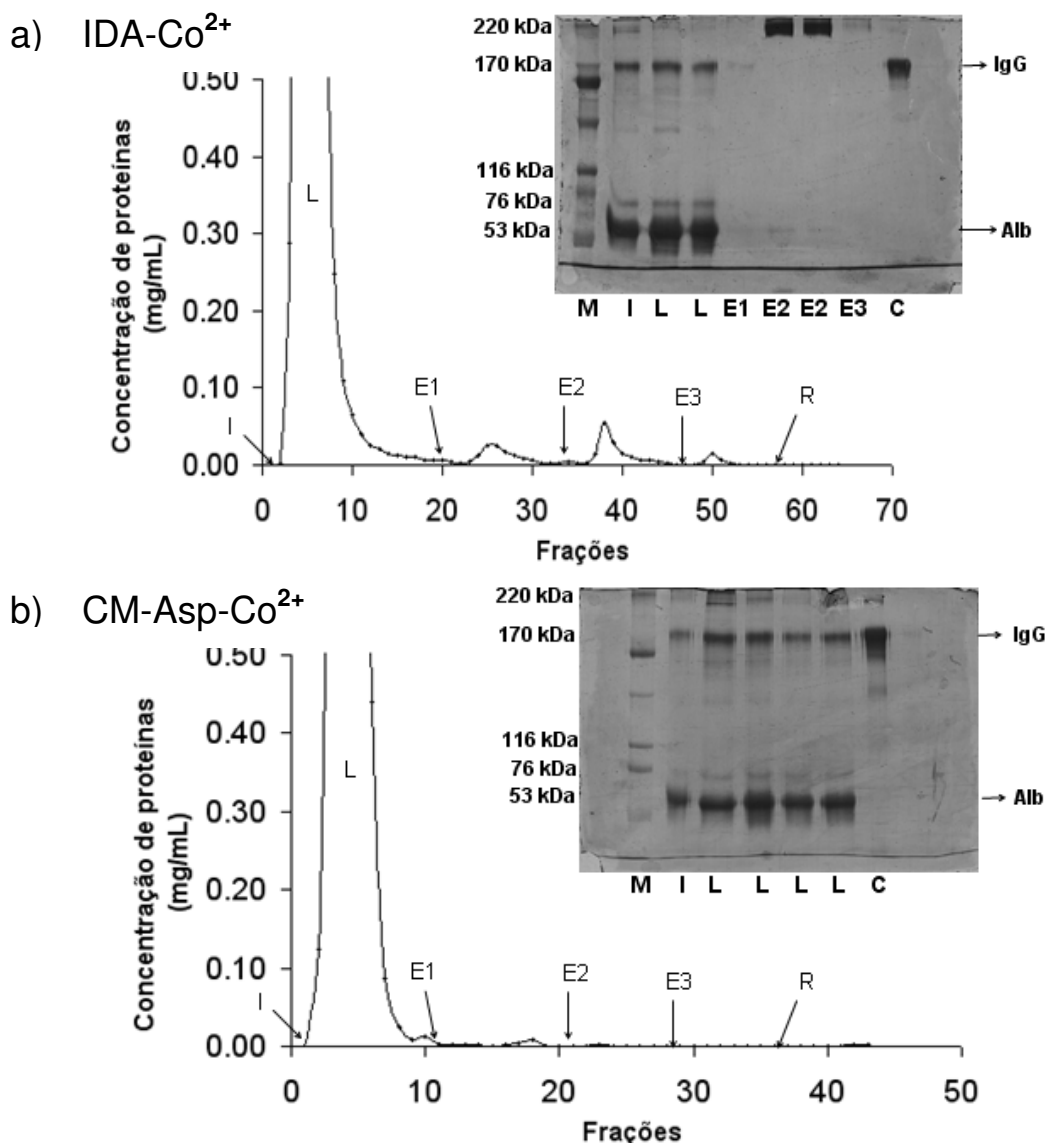


Figura 4.5: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

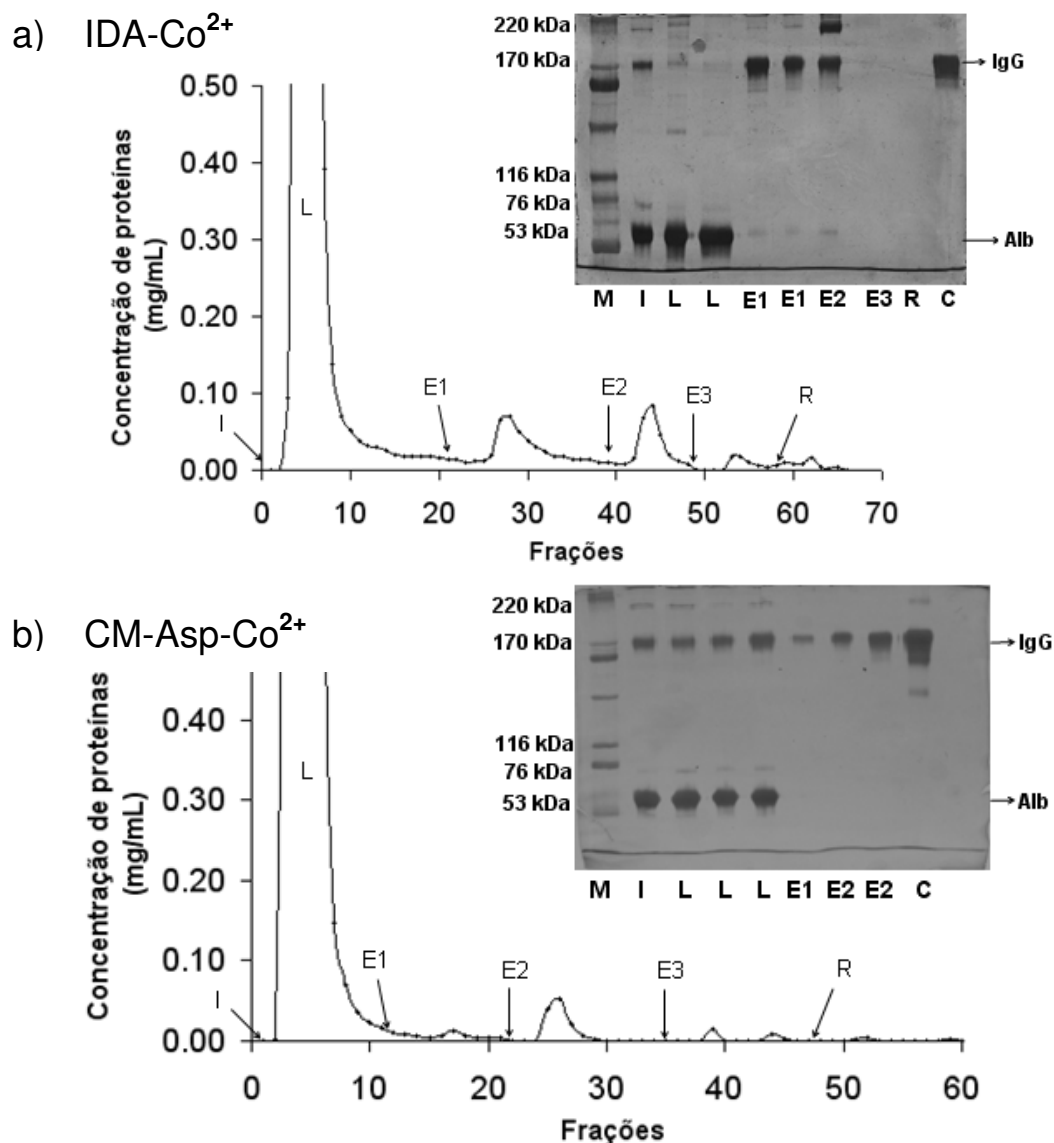


Figura 4.6: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela 4.3. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão fosfato de sódio a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol.

Fração	Molaridade de imidazol (mmol/L)	Adição de sal no tampão				Ausência de sal no tampão			
		Quelato		Quelato		Quelato		Quelato	
		IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>
		mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Injeção	2,0	7,72	100,0	9,66	100,0	8,01	100,0	8,34	100,0
Lavagem	2,0	7,68	99,5	7,13	73,9	7,32	91,3	8,38	100,5
Eluição	20	0,30	3,9	0,01	0,1	0,38	4,7	0,07	0,8
	100	0,06	0,8	0,03	0,3	0,11	1,4	0,17	2,0
	500	0,02	0,3	0,02	0,2	0,22	2,7	0,02	0,3
Regeneração <sup>a</sup>		0,00	0,0	0,00	0,0	0,05	0,6	0,00	0,0
Recuperação		8,06	104,4	7,18	74,4	8,07	100,7	8,63	103,5

<sup>a</sup> 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Por fim, para uma análise global dos resultados obtidos, o conjunto dos sistemas tamponantes utilizados na purificação de IgG humana nos quelatos IDA-Co<sup>2+</sup> e CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, na presença e ausência de NaCl, com respectivos valores de proteína total adsorvida e seletividade é apresentada na Figura 4.7.

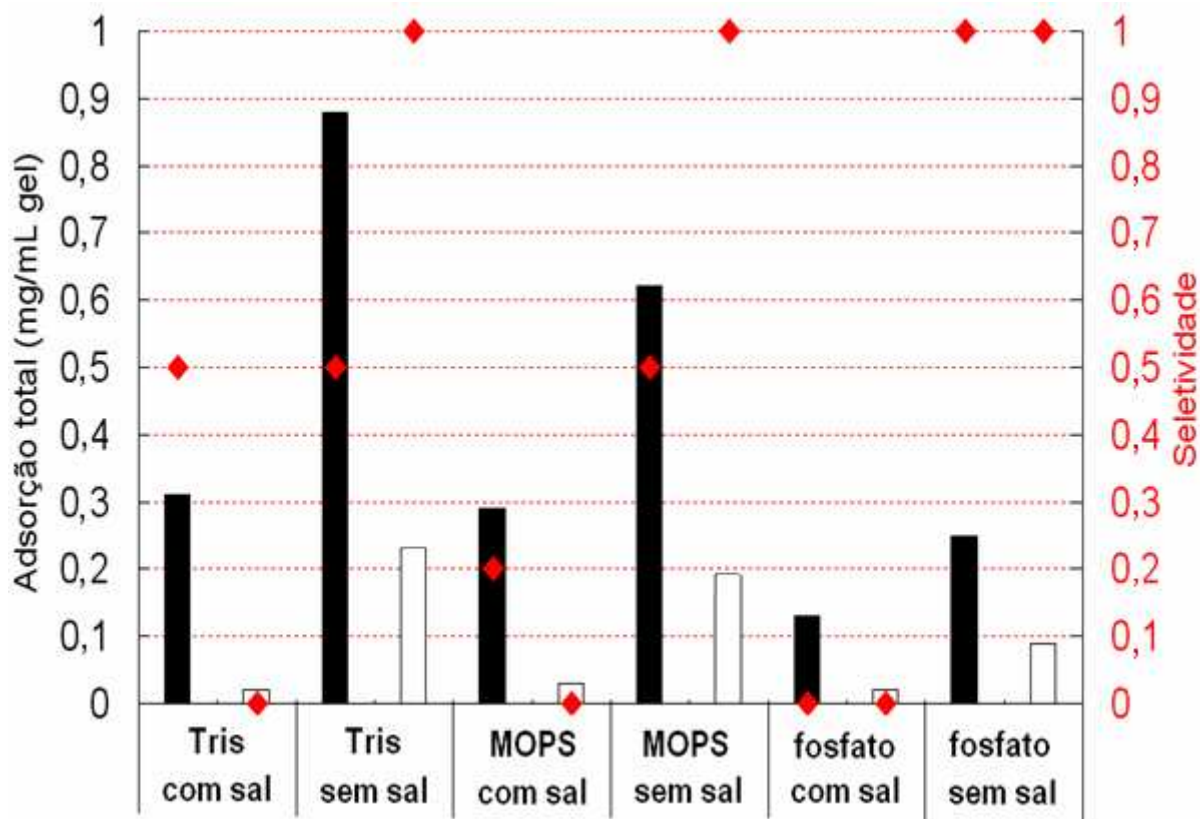


Figura 4.7: gráfico comparativo entre agentes quelantes IDA e CM-Asp com o emprego dos sistemas tamponantes Tris-HCl, MOPS-imidazol e fosfato de sódio-imidazol, pH 7,0 na presença e ausência de sal com suas respectivas capacidades de adsorção e seletividade. Barra com preenchimento preto: IDA-Co<sup>2+</sup>, barra sem preenchimento: CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Escala arbitrária: (♦) nível ilustrativo da seletividade: 0 = muitas impurezas; 0,2 = quantidade razoável de impurezas; 0,5 = poucas impurezas; 1 = alto grau de pureza eletroforética.

Conclui-se, a partir da Figura 4.7, que os melhores resultados de seletividade (baseados nas observações de pureza eletroforética) foram alcançados na ausência de sal nos sistemas tamponantes Tris-HCl, MOPS-imidazol e fosfato-imidazol para o quelato CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e fosfato-imidazol para o quelato IDA-Co<sup>2+</sup>.



## 4.2. Efeito da concentração do NaCl na purificação de IgG

O cloreto de sódio (1,0 mol/L) adicionado em todos os sistemas tamponantes estudados causou diminuição na capacidade de adsorção de proteínas e na seletividade para ambos adsorventes (Figura 4.7). A fim de avaliar se baixas concentrações deste sal também afetavam a capacidade e seletividade dos adsorventes estudados, foram realizados experimentos cromatográficos alimentando-se soro humano diluído em sistema tamponante contendo NaCl 0,1 e 0,5 mol/L. Para realização destes experimentos, selecionou-se para cada adsorvente, os sistemas tamponantes que favoreceram, na ausência de sal, a melhor pureza de IgG baseado nos perfis eletroforéticos de proteínas: fosfato de sódio-imidazol para agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e Tris-HCl para CM-Asp-Co<sup>2+</sup>.

Primeiramente, foi avaliada a adição de 0,1 mol/L de NaCl nos tampões acima mencionados. Os resultados cromatográficos e eletroforéticos estão apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9 e os respectivos balanços de massa encontram-se na Tabela 4.4.

A adição de 0,1 mol/L de NaCl no sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol proporcionou uma queda de 41% na capacidade de adsorção de proteínas totais para agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> comparada ao mesmo sistema tamponante na ausência de sal (0,25 e 0,15 mg de proteína total adsorvida/mL de gel, na presença de 0,1 mol/L de sal e ausência de sal, respectivamente). Observa-se, pelo perfil eletroforético, IgG livre de impurezas na frações eluídas a 20 mmol/L de imidazol e traços de albumina nas frações eluídas a 100 mmol/L imidazol (Figura 4.8).

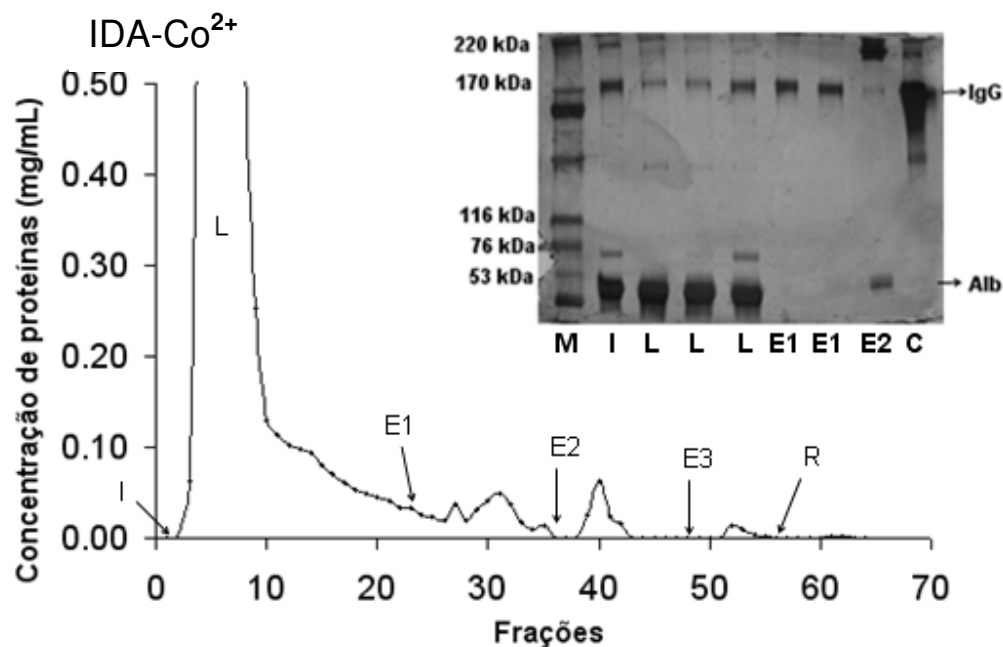


Figura 4.8: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,1 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2,0 mmol/L de imidazol e 0,1 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

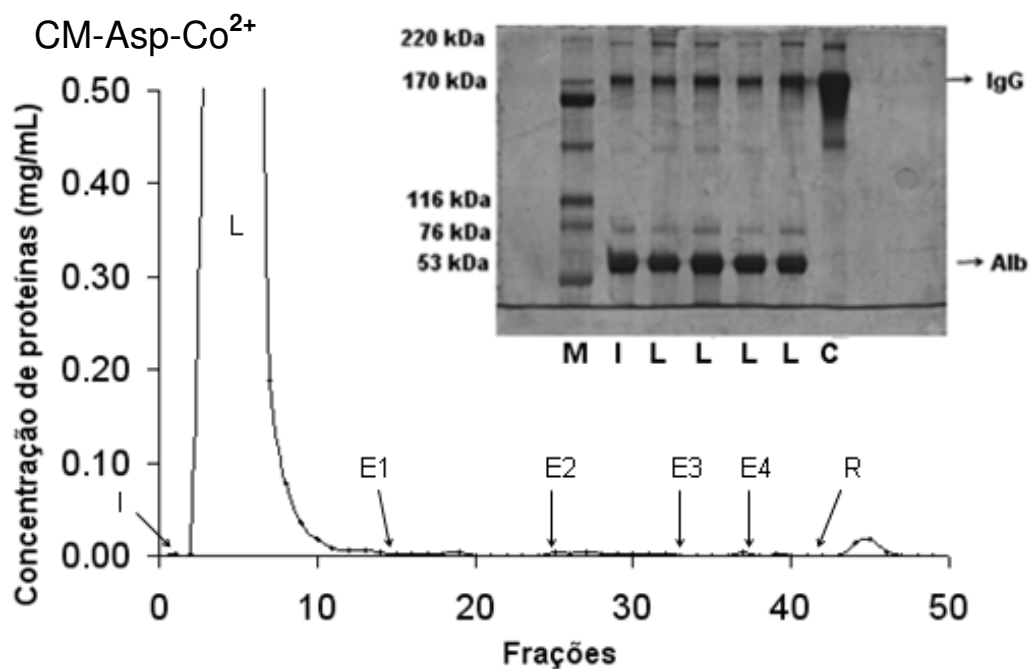


Figura 4.9: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de 0,1 mol/L NaCl, em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 0,1 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista C: marcador de IgG humana.

Para o agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, observa-se comportamento de adsorção de proteína similar àquele apresentado com a adição de 1,0 mol/L de NaCl, no qual praticamente todas as proteínas foram eluídas durante a etapa da lavagem. A pequena quantidade de sal adicionada (0,1 mol/L) já foi suficiente para desfavorecer a adsorção de proteínas, possivelmente devido a minimização das interações eletrostáticas. Conclui-se, para o agente quelante CM-Asp, que a interação proteína-íon metálico seja favorecida apenas na ausência de sal. Em pH neutro, a IgG apresenta

carga líquida nula e positiva (pI entre 7,0 e 9,0 segundo VLUG e REMORTEL, 2001) e são adsorvidas em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> (negativamente carregado) por interações eletrostáticas.

Tabela 4.4. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença de 0,1 mol/L de NaCl, utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio-imidazol e Tris-HCl, respectivamente, a pH 7,0. Dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol e de Tris para IDA-Co<sup>2+</sup> e CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, respectivamente.

Fração	IDA-Co <sup>2+</sup>			CM-Asp-Co <sup>2+</sup>		
	Tampão: Fosfato de sódio			Tampão: Tris-HCl		
	Imidazol (mmol/L)	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	Tris-HCl (mmol/L)	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Injeção	2,0	7,61	100,0	25	8,19	100,0
Lavagem	2,0	6,98	91,8	25	8,55	104,3
Eluição	20	0,28	3,6	100	0,01	0,1
	100	0,13	1,7	300	0,02	0,2
	500	0,03	0,4	500	0,00	0,0
				700	0,00	0,0
Regeneração <sup>a</sup>		0,00	0,1		0,04	0,5
Recuperação		7,42	97,6		8,62	105,2

<sup>a</sup> 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Com base nos resultados obtidos, realizou-se outra cromatografia adicionando-se 0,5 mol/L de NaCl ao sistema tamponante fosfato-imidazol a fim de avaliar se o aumento da concentração de sal (de 0,1 para 0,5 mol/L) afetaria a pureza eletroforética de IgG e a capacidade de adsorção de proteínas em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>.

Os perfis cromatográfico e eletroforético estão apresentados na Figura 4.10 e o balanço de massa apresentado na Tabela 4.5.

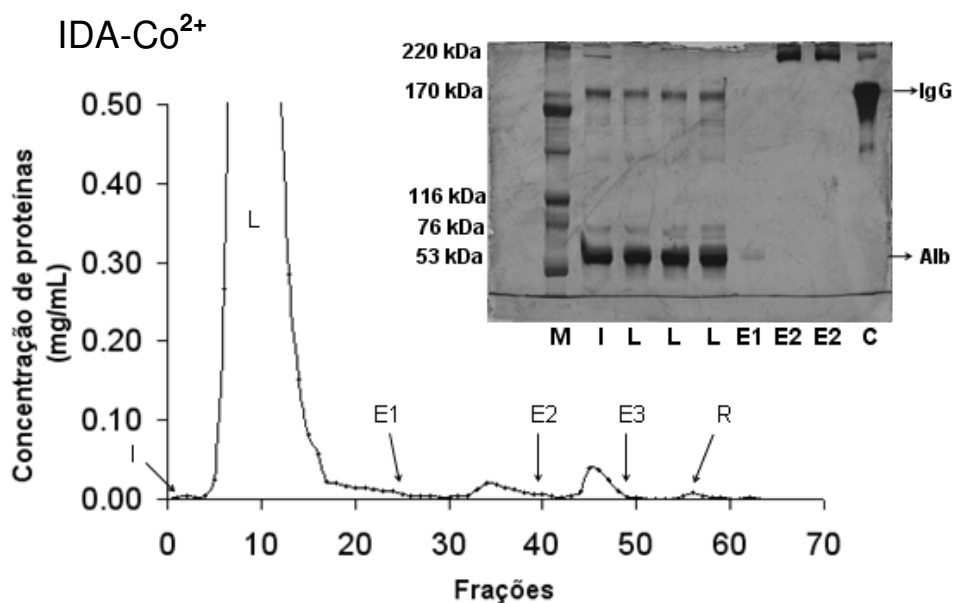


Figura 4.10: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,5 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 0,5 mol/L NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Coluna L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

Nesta condição, observa-se diminuição da capacidade de adsorção, além da não-adsorção de IgG, resultado este similar ao obtido para o mesmo sistema tamponante com adição de 1,0 mol/L de NaCl. Como em todas as concentrações de sal, observa-se a presença da proteína com alta massa molecular na eluição a 100 mmol/L, sendo uma condição a ser estudada para identificação e a purificação desta proteína.

Tabela 4.5. Balanço de massa da cromatografia em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio a pH 7,0 na presença de 0,5 mol/L de NaCl e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol.

Fração	IDA-Co <sup>2+</sup>		
	Tampão: Fosfato de sódio		
	Molaridade de imidazol (mmol/L)	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Injeção	2,0	8,49	100,0
Lavagem	2,0	8,47	99,3
Eluição	20	0,11	1,3
	100	0,14	1,7
	500	0,02	0,3
Regeneração <sup>a</sup>		0,00	0,0
Recuperação		8,75	103,1

<sup>a</sup> 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Observa-se que, conforme a Figura 4.11, à medida que aumenta a concentração de NaCl, a capacidade de adsorção tende a diminuir para ambos sistemas tamponantes empregados, sendo que para tampão Tris-HCl, houve uma redução de 91,3% na capacidade de adsorção quando adicionado 0,1 mol/L NaCl, e com tampão fosfato de sódio ocorreu uma redução gradual na adsorção de proteínas com adição de 0,1 e 0,5 mol/L de NaCl (redução de 40% e 64%, respectivamente).

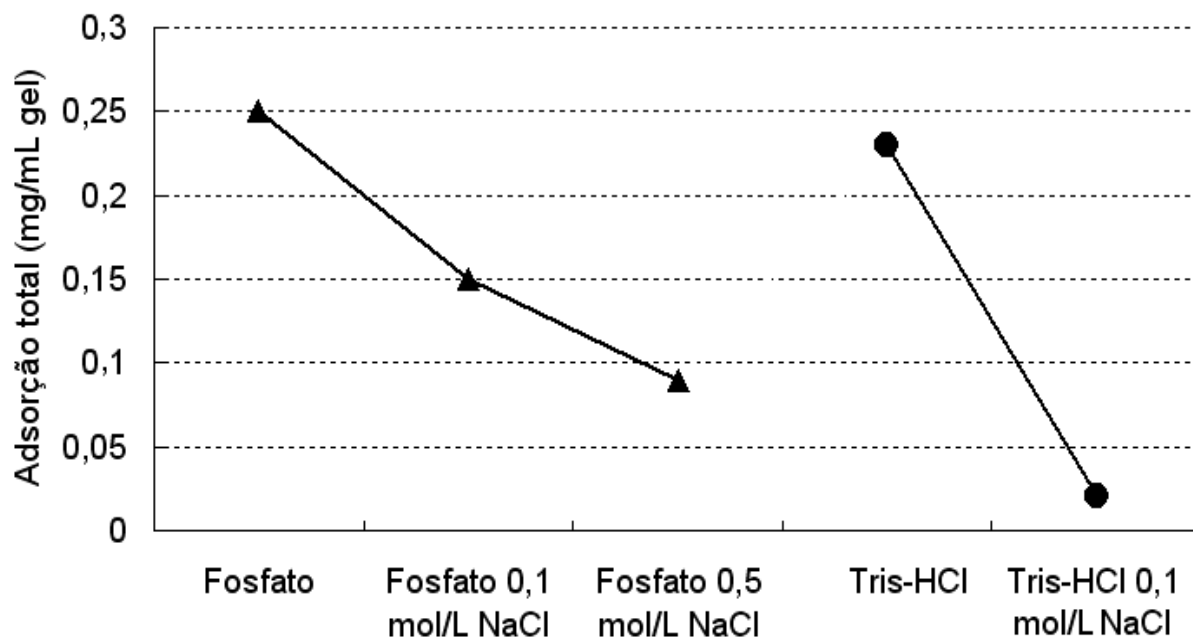


Figura 4.11: Esquema ilustrativo do efeito do NaCl para os sistemas tamponantes fosfato de sódio-imidazol em IDA-Co<sup>2+</sup> e Tris-HCl em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. (▲) IDA-Co<sup>2+</sup>, (●)CM-Asp-Co<sup>2+</sup>.

#### 4.3. Análise nefelométrica da purificação de IgG a partir do soro humano

Como observado para todos os sistemas tamponantes, a presença de sal não favoreceu a seletividade de IgG e as capacidades de adsorção nestas condições foram baixas. Para as análises nefelométricas, foram selecionadas as condições tamponantes que propiciaram maior seletividade para cada adsorvente na purificação de IgG: Tris-HCl para agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e fosfato de sódio-imidazol para agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> em condição de ausência de NaCl. Apesar dos resultados de purificação de IgG em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com o sistema tamponante MOPS-imidazol terem se mostrado promissores, a escolha do tampão Tris-HCl foi baseada na quantidade de proteínas adsorvidas (2,65 mg), que foi maior comparada ao tampão MOPS-imidazol (1,85 mg).

Com base nas análises nefelométricas e medidas de proteína total para ensaios cromatográficos com sistemas tamponantes mencionados, determinou-se a pureza de IgG e o fator de purificação (Tabelas 4.6 e 4.7). A Figura 4.12 apresenta as percentagens de IgG recuperada e sua respectiva pureza nas frações de eluição para Tris-HCl (CM-Asp-Co<sup>2+</sup>) e fosfato de sódio-imidazol (IDA-Co<sup>2+</sup>).

Tabela 4.6: Massas de proteína total e de IgG, IgM, albumina, transferrina obtidas por nefelometria, referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Sistema tamponante: Tris-HCl pH 7,0 (ausência de sal).

	Agarose-CM-Asp-Co <sup>2+</sup>												
	PT <sup>a</sup>		IgG		IgM		Alb.		Trf.		Pureza <sup>b</sup>		FP <sup>c</sup>
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	IgG (%)		
Injeção	16,18	100,0	3,60	100,0	0,38	100,0	15,20	100,0	1,20	100,0	22,3	1,0	
Lavagem	13,77	85,1	1,60	44,4	0,20	54,0	11,67	76,8	0,89	74,1	11,6	0,5	
Eluição 1 <sup>d</sup>	0,56	3,4	1,10	30,6	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	180,8	8,1	
Recuperação Total	14,33	88,6	2,70	75,0	0,20	54,0	11,67	76,8	0,89	74,1	-	-	

<sup>a</sup> Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

<sup>b</sup> Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT<sup>a</sup> de cada etapa multiplicado por 100.

<sup>c</sup>FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

<sup>d</sup>Eluição 1: 100 mmol/L Tris.

n.d.: abaixo do limite de detecção do nefelômetro (0,93 mg/mL para IgG, 0,69 mg/mL para IgM, 0,62 mg/mL para Alb. e 0,35 mg/mL para Trf).

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 µmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 µmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.



Tabela 4.7: Massas de proteína total e de IgG, IgM, albumina, transferrina obtidas por nefelometria, referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup>. Tampão de adsorção: Fosfato de sódio com 2,0 mmol/L imidazol, pH 7,0 (ausência de sal).

	Agarose-IDA-Co <sup>2+</sup>												
	PT <sup>a</sup>		IgG		IgM		Alb.		Trf.		Pureza <sup>b</sup>		FP <sup>c</sup>
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	IgG (%)		
Injeção	16,45	100,0	3,89	100,0	0,41	100,0	16,42	100,0	1,29	100,0	23,7	1,0	
Lavagem	16,25	98,8	1,88	48,3	0,31	75,7	14,91	90,6	1,05	81,3	11,6	0,5	
Eluição 1 <sup>d</sup>	0,92	5,6	0,64	16,5	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	69,9	3,0	
Eluição 2 <sup>e</sup>	0,08	0,5	0,08	2,0	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	96,2	4,1	
Eluição 3 <sup>f</sup>	0,07	0,4	0,03	0,6	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	34,7	1,5	
Recuperação Total	17,32	105,3	2,62	67,37	0,31	75,7	14,91	90,6	1,05	81,3	-	-	

<sup>a</sup> Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (1976).

<sup>b</sup> Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT<sup>a</sup> de cada etapa multiplicado por 100.

<sup>c</sup>FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

<sup>d</sup>Eluição 1: 20 mmol/L imidazol.

<sup>e</sup>Eluição 2: 100 mmol/L imidazol.

<sup>f</sup>Eluição 3: 500 mmol/L imidazol.

n.d.: abaixo do limite de detecção do nefelômetro (0,93 mg/mL para IgG, 0,69 mg/mL para IgM, 0,62 mg/mL para Alb. e 0,35 mg/mL para Trf).

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Para o sistema tamponante Tris-HCl, verificou-se a adsorção de 1,1 mg de IgG na fração de eluição a 100 mmol/L de imidazol, correspondente a 30,6% da IgG alimentada. Segundo as análises nefelométricas de IgM, albumina e transferrina e dosagem de proteína total, a IgG foi obtida livre de impurezas na fração eluída a 100 mmol/L de Tris, o que evidenciou a alta seletividade da agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> nesta condição. A pureza

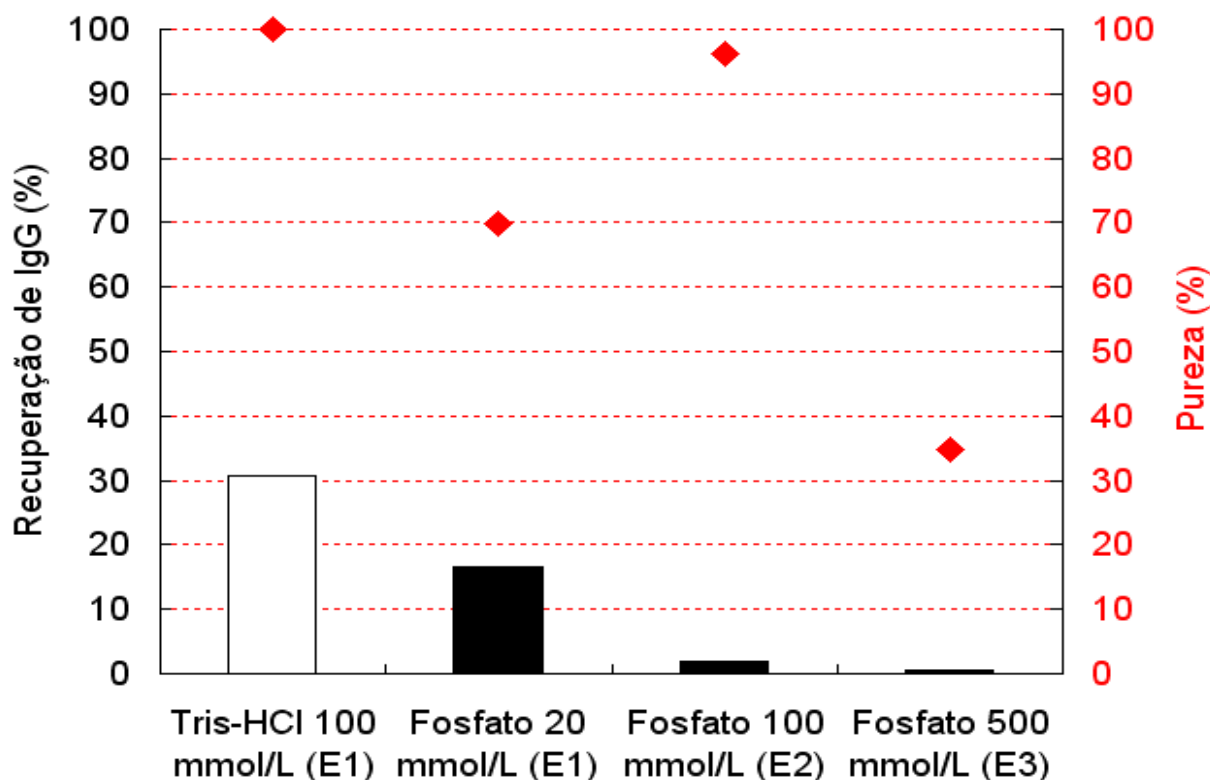


Figura 4.12: Esquema ilustrativo de quantidade recuperada e pureza de IgG para sistemas tamponantes Tris-HCl e fosfato de sódio em adsorventes CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e IDA-Co<sup>2+</sup>. Eluições 1, 2 e 3 (E1, E2 e E3) provenientes das Tabelas 4.7 e 4.8. Barra sem preenchimento: CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, barra com preenchimento preto: IDA-Co<sup>2+</sup>, (♦) percentagem de pureza.

obtida acima de 100% pode ser explicada pela diferença de método de quantificação de proteínas. O método de Bradford foi utilizado para quantificação de proteínas totais, o qual apresenta grande variação de resposta, dependendo da proteína dosada. Este método é mais sensível à albumina e menos sensível à IgG, sendo assim, concentração de IgG é subestimada por este método. Na análise nefelométrica, método de quantificação de proteína específica, obtém-se a quantidade real de IgG na amostra (Tabela 4.7).

Para a cromatografia realizada agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> em sistema tamponante fosfato

de sódio-imidazol, observa-se adsorção seletiva da IgG nas frações de eluição, totalizando 19,1% da IgG injetada. Segundo as análises nefelométricas de IgM, albumina e transferrina e dosagem de proteína total, obteve-se IgG com alta pureza somente na fração eluída a 100 mmol/L de imidazol (96,2% de pureza, Tabela 4.7).

De acordo com os resultados obtidos de análise nefelométrica, para todos os sistemas tamponantes e adsorventes estudados, as proteínas IgM, albumina e transferrina estiveram abaixo do limite de detecção do nefelômetro nas frações de eluição. Destaca-se o tampão Tris-HCl, pois nesta condição IgG foi obtida com alto grau de pureza (Figura 4.12) mostrando a potencialidade deste tampão para purificação de IgG humana em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>.

#### **4.4. Determinação da curva de ruptura**

Foram realizados experimentos para determinação da curva de ruptura com o emprego do adsorvente agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> e soro humano diluído em tampão Tris-HCl pH 7,0, por ter-se obtido com este sistema tamponante os melhores resultados em termos de capacidade e seletividade na adsorção de IgG.

O soro humano “in natura” apresenta condutividade de 10,88 mS/cm e pH 7,30. Quando diluído 2,5, 5 e 10 vezes com o tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,00, este apresentou condutividade de 5,70, 3,29 e 2,67 mS/cm, respectivamente, e pH de 7,15, pH 7,00 e 6,96, respectivamente. As curvas de rupturas realizadas com soro humano nas diluições de 2,5, 5 e 10 vezes são apresentados na Figura 4.13 e os resultados do balanço de massa na Tabela 4.8. As frações de eluição e regeneração estão apresentadas na Figura 4.14.

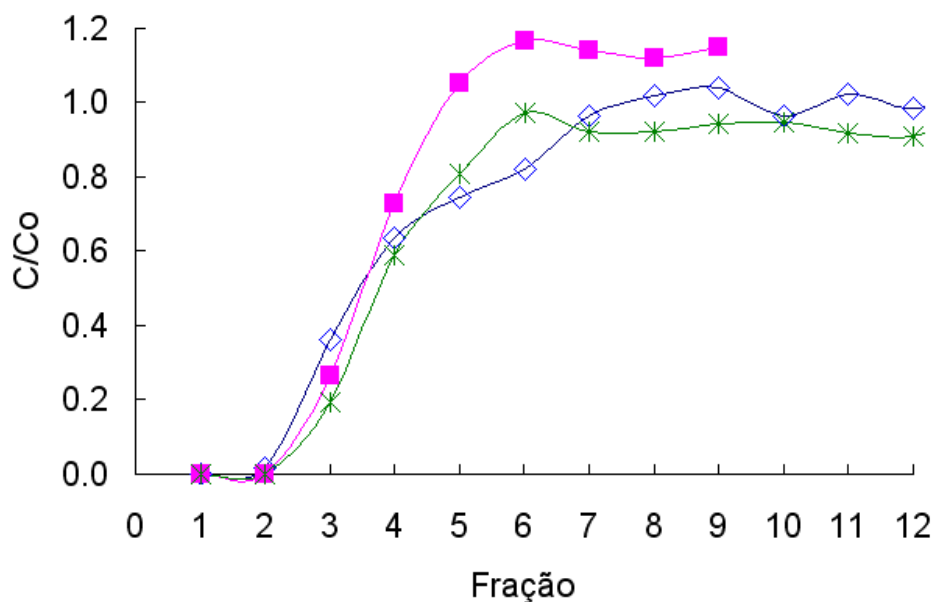


Figura 4.13: Curvas de ruptura das cromatografias em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a diferentes diluições no tampão Tris-HCl pH 7,0; (■) 2,9 mL de soro diluído 2,5 vezes; (◇) 2,4 mL de soro diluído 5 vezes; (✱) 2,4 mL de soro diluído 10 vezes.

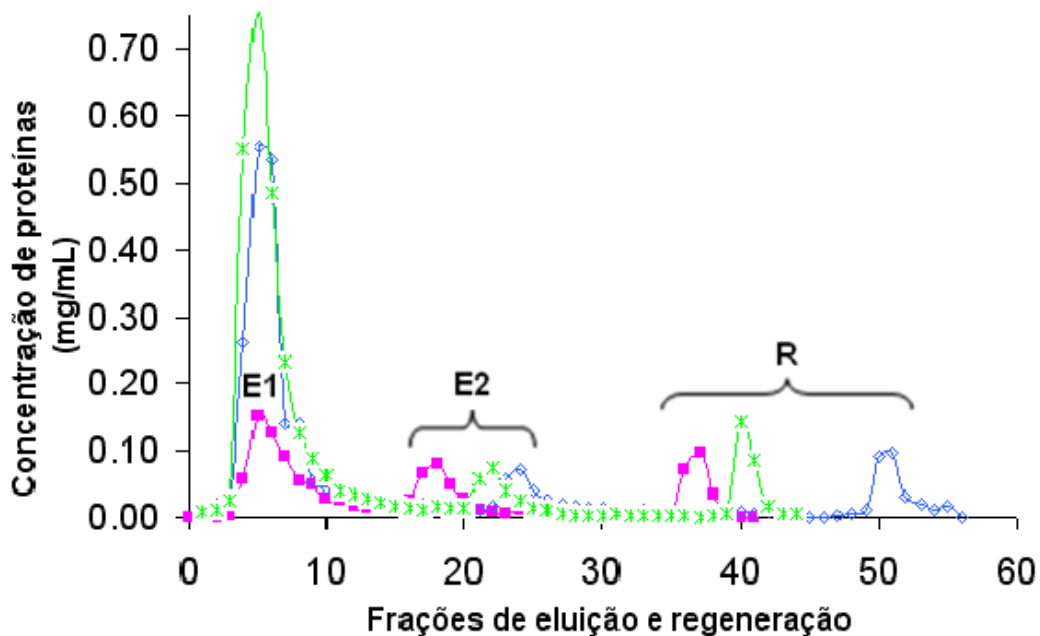


Figura 4.14: Perfil cromatográfico das frações de eluição e regeneração da cromatografia realizada em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a diferentes diluições de soro humano em Tris-HCl pH 7,0: (■) 2,5 vezes; (◇) 5 vezes; (✱) 10 vezes.

Tabela 4.8 – Balanço de massa da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a diferentes diluições de soro humano em Tris-HCl pH 7,0 e dessorção por gradiente de grau de aumento da concentração de Tris.

Fração	Molaridade de Tris (mmol/L)	Fator de diluição					
		2,5 vezes		5 vezes		10 vezes	
		mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Solução inicial	25	95,31	100,0	92,43	100,0	97,38	100,0
“Flow-through”	25	57,62	60,5	66,06	71,5	80,18	82,4
Lavagem	25	45,91	48,2	22,57	24,4	11,42	11,7
Eluição	100	0,62	0,7	2,01	2,2	2,52	2,6
	300	0,30	0,3	0,33	0,4	0,27	0,3
	500	0,05	0,1	0,04	0,1	0,02	0,0
	700	0,02	0,0	0,00	0,0	0,01	0,0
Regeneração <sup>a</sup>		0,21	0,2	0,29	0,3	0,27	0,3
Recuperação		104,73	109,9	91,30	98,8	94,68	97,2
PT <sup>d</sup> ads. (mg)		1,19	1,3	2,68	2,9	3,08	3,2

<sup>a</sup> 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

<sup>d</sup> PT: proteína total.

Volume de leite: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 µmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 µmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Os resultados das eletroforeses das frações do “flowthrough” e dos “pools” de frações das etapas de lavagem, eluição e regeneração estão apresentadas na Figura 4.15.

Pela análise das curvas de ruptura da Figura 4.13, verifica-se para todas as diluições, que após a terceira fração, C/Co foi superior a 0,1, o qual caracteriza o ponto de ruptura, segundo Charcosset *et al.* (1995). Quando a concentração da alimentação é aproximadamente igual à concentração de saída (C/Co ≈ 1,0), o sistema atinge o estado estacionário, a coluna é saturada e nenhuma proteína é mais adsorvida. A saturação da coluna foi observada após a fração de 5, 7 e 6 de soro humano diluídos a 2,5, 5 e 10 vezes, respectivamente.

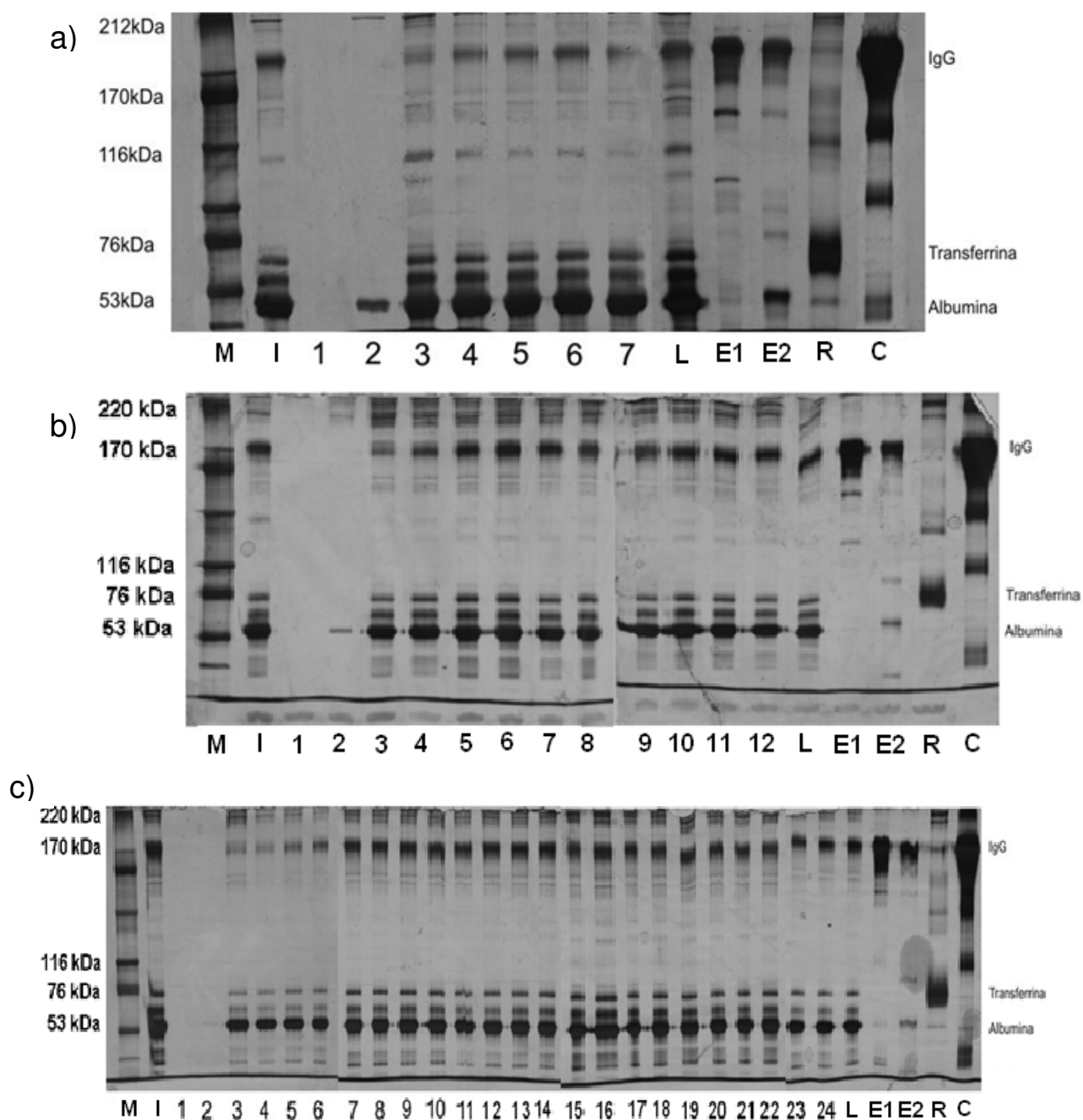


Figura 4.15 – Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras a diluições do soro humano de: a) 2,5 vezes; b) 5 vezes e c) 10 vezes. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Solução inicial. Pistas numeradas correspondem as frações coletadas no “flow-through”. Pista L: “pool” das frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” de frações da regeneração com EDTA 100mmol/L pH 7,0. Pista C: marcador de IgG humana (Aventis Behring, Alemanha).

De acordo com os resultados da Tabela 4.8, quanto mais diluído o soro maior a quantidade de proteína adsorvida: 1,19 mg, 2,68 mg e 3,08 mg, para alimentação com soro diluído 2,5, 5 e 10 vezes, respectivamente. Essa baixa capacidade de adsorção de proteínas para diluição do soro 2,5 vezes está, provavelmente, ligada a condutividade e pH do meio. Conforme citado anteriormente, o soro diluído 2,5 vezes apresenta uma condutividade maior em relação às outras diluições, o que dificulta a adsorção de proteínas, assim como o pH da solução, que quanto mais próximo do valor de 7,0, a adsorção de proteínas tende a ser mais eficiente.

Nos perfis eletroforéticos apresentados na Figura 4.15, observa-se alta concentração de IgG no “pool” das frações da primeira eluição (E1) com Tris-HCl a 100 mmol/L, tendo, assim, alta seletividade, exceto para diluição de 2,5 vezes, que observa-se a presença de albumina. Pode-se concluir que diluições do soro humano acima de 5 vezes já é suficiente para purificação de IgG em agarose- CM-Asp-Co<sup>2+</sup>.

Com a condição de soro diluído 5 vezes apresentando melhor resultado na purificação de IgG, esta foi selecionada para análise nefelométrica. Os resultados da nefelometria e balanço de proteína total são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Massas de proteína total e de IgG, IgM, albumina, transferrina obtidas por nefelometria, referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com soro diluído 5 vezes. Sistema tamponante: Tris-HCl pH 7,0 (ausência de sal).

Agarose-CM-Asp-Co(II) (Diluição do soro: 5x)												
	PT <sup>a</sup>		IgG		IgM		Alb.		Trf.		Pureza <sup>b</sup>	FP <sup>c</sup>
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)	IgG (%)	
Injeção	92,43	100,0	14,70	100,0	2,07	100,0	81,72	100,0	5,84	100,0	15,9	1,0
"Flow-through"	66,06	71,5	4,76	32,4	0,92	44,4	54,48	66,7	3,08	52,7	7,2	0,5
Lavagem	22,57	24,4	1,63	11,1	0,65	31,4	17,05	20,9	1,14	19,5	7,2	0,5
Eluição 1 <sup>d</sup>	2,01	2,2	1,93	13,1	0,09	4,4	nd.	nd.	nd.	nd.	96,0	6,0
Eluição 2 <sup>e</sup>	0,33	0,4	0,17	1,2	0,03	1,5	nd.	nd.	nd.	nd.	51,5	3,2
Regeneração	0,29	0,3	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	-	-
Recuperação												
Total	91,36	98,8	8,49	57,8	1,69	81,6	71,53	87,5	4,22	72,3	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (1976).

<sup>b</sup> Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT<sup>a</sup> de cada etapa multiplicado por 100.

<sup>c</sup>FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado

<sup>d</sup>Eluição 1: 100 mmol/L Tris-HCl.

<sup>e</sup>Eluição 2: 300 mmol/L Tris-HCl.

n.d.: abaixo do limite de detecção do nefelômetro (0,93 mg/mL para IgG, 0,69 mg/mL para IgM, 0,62 mg/mL para Alb. e 0,35 mg/mL para Trf).

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

Os resultados da análise nefelométrica mostram a adsorção de 2,10 mg de IgG nas frações eluídas a 100 e 300 mmol/L de Tris, correspondente a 14,3% da IgG injetada, apresentando pureza de 94% (baseado nas medidas de IgG, IgM, albumina e transferrina) e fator de purificação de 6,0. O valor de IgG recuperada foi menor que aquela apresentado por RIBEIRO (2006), que obteve (nas mesmas condições de tampão e pH) nas frações eluídas da filtração do plasma em modo tangencial em membranas de fibras ocas de PEVA-CM-Asp-Ni<sup>2+</sup>, uma recuperação em torno de 20% da IgG injetada. Essa diferença pode ter sido causada pelo fato do íon cobalto



apresentar menor capacidade de adsorção em relação ao íon níquel.

#### 4.5. Isotermas de adsorção de IgG humana

Experimentos para determinação de isotermas de adsorção foram realizados conforme o procedimento descrito no item 3.2.9., visando determinar a capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo CM-Asp-Co<sup>2+</sup>-IgG. Os resultados obtidos para a adsorção de IgG com base no modelo de Langmuir são apresentados na Figura 4.16. Os valores de  $Q_m$  e  $K_d$ , obtidos para este modelo estão apresentados na Tabela 4.10.

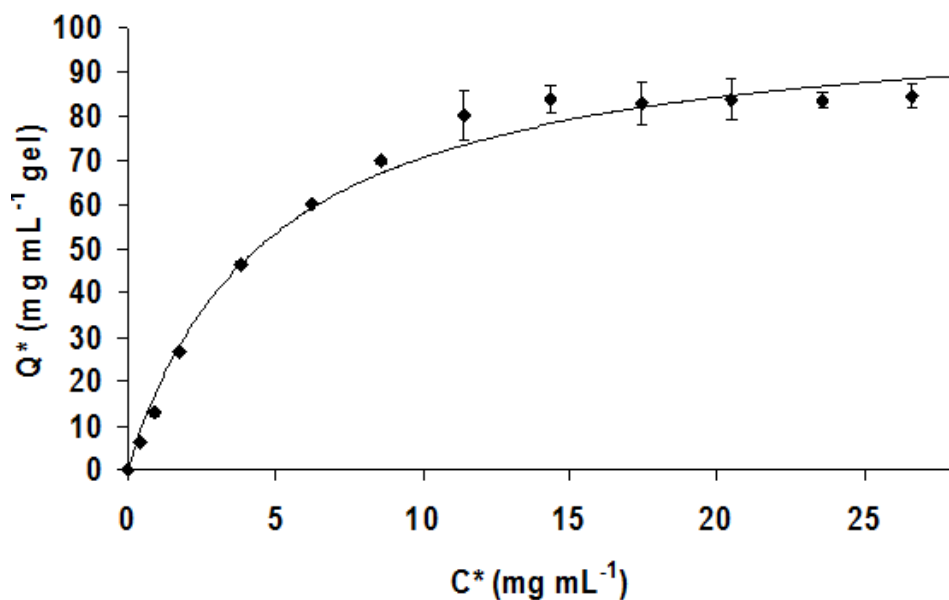


Figura 4.16: Isoterma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a 25°C utilizando tampão Tris-HCl. (◆) Pontos experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo de Langmuir.

Tabela 4.10. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>

Parâmetros	Langmuir
Q <sub>m</sub> (mg/mL gel)	104,42 ± 3,68
K <sub>d</sub> (mol/L)	(7,23 ± 0,88) x 10 <sup>-5</sup>
n	-
r <sup>2</sup>	0,989
Chi <sup>2</sup>	12,44

Observa-se que o coeficiente de correlação foi próximo de 1,0, evidenciando um bom ajuste dos parâmetros do modelo aos dados experimentais. Pode-se ainda avaliar a validade do modelo de Langmuir através do gráfico de Scatchard representado pela equação 3.4, onde pode indicar cooperatividade na adsorção de proteínas (Figura 4.17).

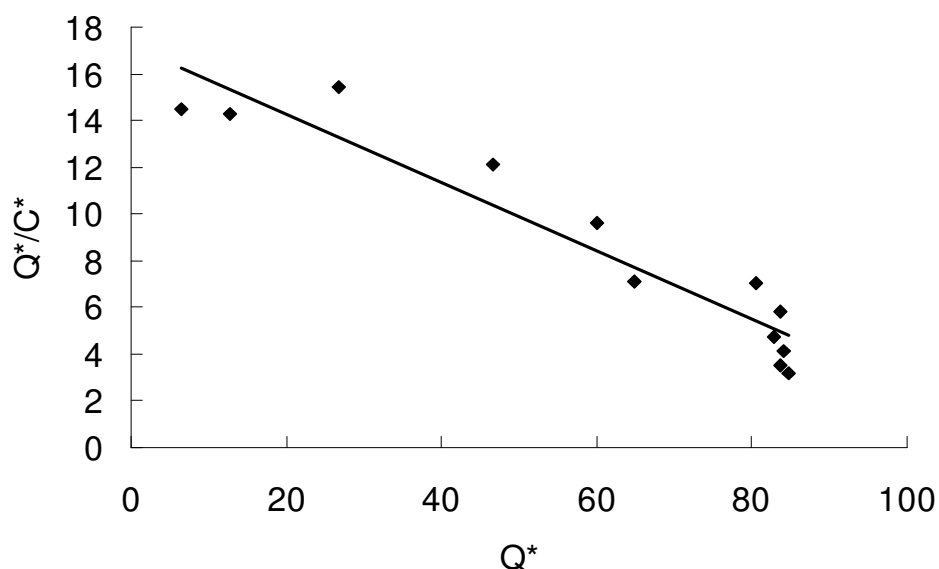


Figura 4.17: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, R<sup>2</sup> = 0,89.

Pelo gráfico de Scatchard, verifica-se que a reta apresentou coeficiente de correlação de 0,89, o que indica a existência de desvios do modelo de Langmuir,

provavelmente devido às interações cooperativas entre proteínas e também de outras interações existentes entre a matriz e grupos funcionais das proteínas.

Com isso, aplicou-se o modelo semi-empírico de Langmuir-Freundlich (equação 3.3) para ajuste de parâmetros. O parâmetro  $n$  é indicativo de cooperatividade no processo de adsorção. Os resultados obtidos para a adsorção de IgG com base no modelo de Langmuir-Freundlich são apresentados na Figura 4.18. Os parâmetros de  $Q_m$ ,  $K_d$  e  $n$  obtidos para este modelo estão apresentados na Tabela 4.11.

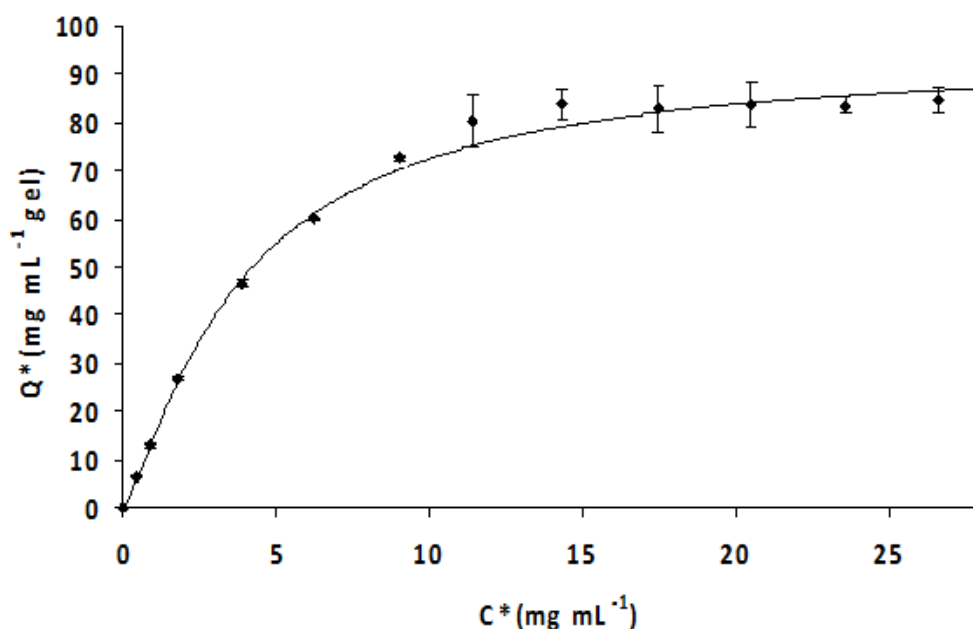


Figura 4.18: Isotherma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> a 25°C utilizando tampão Tris-HCl. (◆) Pontos experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo de Langmuir-Freundlich.

Tabela 4.11. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>

<b>Parâmetros</b>	<b>Langmuir-Freundlich</b>
Q <sub>m</sub> (mg/mL gel)	94,44 ± 4,12
K <sub>d</sub> (mol/L)	(8,18 ± 1,09) x 10 <sup>-5</sup>
n	1,25 ± 0,13
r <sup>2</sup>	0,993
Chi <sup>2</sup>	9,19

De acordo com o modelo de Langmuir-Freundlich, o valor de n obtido foi maior que 1, caracterizando uma cooperatividade positiva, em que a adsorção de uma molécula de IgG favorece a adsorção de outra.

O valor de Q<sub>m</sub> obtido no presente trabalho (94,44 mg de IgG humana/mL gel) se encontra relativamente baixo quando comparado ao valor determinado por RIBEIRO (2006), que obteve Q<sub>m</sub> igual a 306,07 mg de IgG humana /mL de membrana (membranas de fibras ocas de álcool polietileno vinílico - PEVA-CM-Asp-Ni<sup>2+</sup>). O alto valor de Q<sub>m</sub> do adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni<sup>2+</sup> se deve, possivelmente, ao fato do íon metálico Ni<sup>2+</sup> apresentar maior capacidade de adsorção em relação ao íon Co<sup>2+</sup>. Outra hipótese para explicar a baixa capacidade de adsorção de agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> é que a ativação da agarose com epiclorigrina pode ter resultado em um “crosslinking” do gel, diminuindo a acessibilidade da proteína ao ligante.

Os valores de K<sub>d</sub> obtido para adsorção de IgG em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> foi da ordem de 10<sup>-5</sup> mol/L, da mesma ordem de grandeza apresentada por RIBEIRO (2006); estes valores são característicos para ligantes pseudobioespecíficos, em que se encontram na faixa de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-7</sup> mol/L, evidenciando uma afinidade média entre IgG e adsorvente.

## 5. Conclusões

Pelos resultados obtidos, observou-se menor capacidade de adsorção de IgG, em ambos adsorventes estudados, quando a soro humano diluído foi cromatografado com os sistemas tamponantes contendo o sal NaCl. Na ausência de sal, foram obtidos os melhores resultados para purificação de IgG em termos da capacidade de adsorção e seletividade. Para o adsorvente agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença dos tampões Tris-HCl obteve-se um fator de purificação de 8,1 e alta pureza da IgG na fração eluída a 100 mmol/L Tris (dados baseados nas medidas nefelométricas). A melhor condição observada quando na utilização do agente quelante IDA foi na presença do tampão fosfato de sódio com imidazol, onde obteve fator de purificação de 4,1 e pureza de IgG de 96% (dados baseados nas medidas nefelométricas).

Quanto às curvas de ruptura, observou-se o efeito de diferentes diluições do soro humano na adsorção de IgG. Quando o soro humano foi diluído 2,5 vezes, a capacidade de adsorção de CM-Asp-Co<sup>2+</sup> foi 60% menor que àquelas observadas nas diluições a 5 e 10 vezes (0,40, 0,89 e 1,03 mg de proteína total/mL gel, para diluições 2,5, 5 e 10 vezes, respectivamente), provavelmente em virtude das diferenças de condutividades e pH, os quais afetam diretamente a adsorção de proteínas. Quanto menor a condutividade e o pH mais próximo da neutralidade, a adsorção de proteínas tende a ser maior e o adsorvente é mais seletivo. Análises nefelométricas realizadas na condição de soro diluído 5 vezes indicaram um fator de purificação de 6,0, atingindo-se pureza de IgG de 96%.

Em relação às isotermas de adsorção, obteve-se um melhor ajuste de parâmetros pelo modelo de Langmuir-Freundlich aos dados experimentais, fornecendo valor de  $Q_m$

igual a 94,44 mg de IgG/mL gel, valor baixo comparado a adsorção de IgG humana em PEVA-CM-Asp-Ni<sup>2+</sup>, apresentados na literatura. O valor de  $K_d$  da ordem de grandeza de  $10^{-5}$  mol/L é típico de sistemas de pseudobioafinidade.

Os resultados demonstraram a potencialidade da utilização de íon metálico cobalto em IMAC na purificação de IgG, nas condições da ausência de sal, destacando-se o adsorvente agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, que apresentou alta seletividade em todos os sistemas tamponantes estudados. Foi possível também obter o comportamento da adsorção de proteínas em diferentes diluições de soro humano, um fator importante para o escalonamento do processo.

## 6. Sugestões para futuros trabalhos

O presente trabalho mostrou a potencialidade do emprego da técnica de cromatografia de afinidade por íon cobalto imobilizado para purificação de IgG a partir de soro humano, com isso, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Assim, sugere-se para futuros trabalhos:

- Testar a utilização de outros íons metálicos como  $Ni^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  quelatados a CM-Asp para purificação de IgG humana em géis de agarose;
- Utilizar outros sistemas tamponantes (Mes, Hepes) para investigar a eficiência em purificação de anticorpos;
- Utilizar outros tipos de matrizes como as colunas monolíticas para purificação de anticorpos;
- Identificar a proteína de alta massa molecular presente nas Figuras 4.5a e 4.10.

## 7. Referências Bibliográficas

ALTINTAS, E.B., TUZMEN, N., UZUN, L., DENIZLI, A., Immobilized metal affinity adsorption for antibody depletion from human serum with monosize beads. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 46, p. 7802-7810, 2007.

ALVAREZ, C.I., STRUMIA, M.C., BERTORELLO, H.E. Preparation of adsorbents applicable to pseudobiospecific ligand affinity chromatography using different spacers and ligands. *Reactive & Functional Polymers*, v. 34, p. 103-111, 1997.

ANDERSEN, D.C., REILLY, D.E. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 15, p. 456-462, 2004.

ANSPACH, F.B., PETSCH, D., DECKWER, W.D. Purification of murine IgG<sub>1</sub> on group specific affinity sorbents. *Bioseparation*, v. 6, p. 156-184, 1996.

AONO, H., WEN, D., ZANG, L., HOUDE, D., PEPINSKY, R.B., EVANS, D.R.H. Efficient on-column conversion of IgG<sub>1</sub> trisulfide linkages to native disulfides in tandem with Protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 5225-5232, 2010.

AUGUSTO, E.F.P., OLIVEIRA, M.S. Biotecnologia Industrial, Volume 3 – Processos Fermentativos e Enzimáticos. Editado por LIMA U.A., AQUARONE E., BORZANI W., SCHMIDELL, W. 1ª edição, Cap. 24: Processos com células animais, p. 547-582, 2001.

BAYRAMOGLU, G., CELIK, G., ARICA, M.Y. Immunoglobulin G adsorption behavior of L-histidine ligand attached and Lewis metal ions chelated affinity membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 287, p. 75–85, 2006(a).

BAYRAMOGLU, G., SENEL, A.U., ARICA, M.Y. Effect of spacer-arm and Cu(II) ions on performance of L-histidine immobilized on poly(GMA/MMA) beads as an affinity ligand for separation and purification of IgG. *Separation and Purification Technology*, v. 50, p. 229–239, 2006(b).

BAYRAMOGLU, G., OKTEM, H.A., ARICA, M.Y. A dye-ligand immobilized poly(2-hydroxyethylethacrylate) membrane used for adsorption and isolation of immunoglobulin G. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 147-155, 2007.

BEITLÉ, R.R., ATAAL, M.M. Immobilized metal affinity chromatography and related



techniques, *AIChE Symposium Series*, v. 88, p. 34-43, 1992.

BLANK, G.S., ZAPATA, G., FAHRNER, R., MILTON, M., YEDINAK, C., KNUDSEN, H., SCHMELZER, C. Expanded bed adsorption in the purification of monoclonal antibodies: a comparison of process alternatives. *Bioseparation*, v. 10, p. 65-71, 2001.

BODEN, V., WINZERLING, J.J., VIJAYALAKSHMI, M., PORATH, J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*, v. 181, p. 225-232, 1995.

BOLANOS-GARCIA, V.M., DAVIES, O.R. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta-generals Subjects*, v. 1760, p. 1304-1313, 2006.

BOSCHETTI, E. Antibody separation by hydrophobic charge induction chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 20, p. 333-337, 2002.

BOYLE, M.D.P., REIS, K.J. Bacterial Fc Receptors. *Nature Biotechnology*, v. 5, n. 7, p. 697-703, 1987.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESOLIN, I.T.L., MIRANDA, E.A., BUENO, S.M.A. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Química Nova*, v. 32, p. 1288-1296, 2009b.

BRESOLIN, I.T.L., RIBEIRO, M.B., TAMASHIRO, W.M.S.C., AUGUSTO, E.F.P., VIJAYALAKSHMI, M.A., BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for IgG<sub>1</sub> monoclonal antibodies purification: the effect of chelating ligand and support. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, p. 2148-2165, 2010.

BUCHACHER, A., IBERER, G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma – aspects of yield and virus safety. *Biotechnology Journal*, v. 1, p. 148-163, 2006.

BUENO, S.M.A., HAUPT, K., VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in

hollow fiber membranes. *Journal of Chromatography*, v. 667, p. 57-67, 1995.

BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *Journal of Chromatography B*, v. 664, p. 3-15, 1995.

BURNOUF, T., RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 575-586, 2001.

ÇANAK, Y., OZKARA, S., AKGOL, S., DENIZLI, A. Pseudo-specific bioaffinity chromatography of immunoglobulin G. *Reactive & Functional Polymers*, v. 61, p. 369-377, 2004.

CHAGA, G., HOPP, J., NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography on  $\text{Co}^{2+}$ -carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 29, p. 19-24, 1999.

CHAGA, G. Twenty-five years of immobilized metal ions affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 313-334, 2001.

CHARCOSSET, C., SU, Z., KAROOR, S., DAUN, G., COLTON, C. Protein A immunoaffinity hollow fiber membrane for immunoglobulin G purification: experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 415-427, 1995.

CLONIS, Y.D., Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop. *Journal of Chromatography A*, v. 1101, p. 1-24, 2005.

COFFINIER, Y., LEGALLAIS, C., VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of IgG from human plasma using thiophilic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 208, p. 13-22, 2002.

COHN, E.J., STRONG, L.E., HUGHES Jr, W.L., MULFORD, D.J., ASHWORTH, J.N., MELIN, M., TAYLOR, H.L. Preparation and properties of serum and plasma protein. IV. A system for the separation into protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *Journal of American Chemical Society*, v. 8, p. 459-475, 1946.

DENIZLI, A., ALKAN, M., GARIPCAN, B., OZKARA, S., PISKIN, E. Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma. *Journal of*

*Chromatography B*, v. 795, p. 93-103, 2003.

DUARTE, I.S., ZOLLNER, R.L., BUENO, S.M.A. Protein L-agarose for adsorption of autoantibodies: a potential tool for extracorporeal treatment. *Artificial Organs*, v. 29, n. 4, p. 313-323, 2005.

DUFFY, S.A., MOELLERING, B.J., PRIOR, G.M., DOYLE, K.R., PRIOR, C.P. Recovery of Therapeutic-Grade Antibodies. *BioPharm*, p. 46–50, 1989.

EL-KAK, A., VIJAYALAKSHMI, M.A. Study of the separation of mouse monoclonal antibodies by pseudobioaffinity chromatography using matrix-linked histidine and histamine. *Journal of Chromatography – Biomedical Applications*, v. 570, p. 29-41, 1991.

FAHRNER, R.L., BLANK, G.S., ZAPATA, G.A. Expanded bed protein A affinity chromatography of a recombinant humanized antibody: process development, operation and comparison with a packed bed method. *Journal of Biotechnology*, v. 75, p. 273-280, 1999.

FASSINA, G., RUVO, M., PALOMBO, G., VERDOLIVA, A., MARINO, M. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 481-490, 2001.

FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R.H., PORTER, R.R. Reduction of  $\gamma$ -globulins. *Biochemistry and Biophysics*, suppl. 1, p. 174, 1962.

GABERC-POREKAR, V., MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 49, p. 335-360, 2001.

GHOSE, S., HUBBARD, B., CRAMER, S.M. Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatography materials. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 96, p. 768-779, 2007.

GOOD, N.E., WINGER, G.D., WINTER, W., CONNOLLY, T.N., IZAWA, S., SINGH, R.M.M. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, v. 5, p. 467-477, 1966.

GUTIÉRREZ, R., MARTÍN DEL VALLE, E.M., GALÁN, M.A. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. *Separation and Purification Reviews*, v. 36, p. 71-111, 2007.

HALE, J.E., BEIDLER, D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 222, p. 29-33, 1994.

HEMDAN, E.S., PORATH, J. Development of immobilized metal affinity chromatography. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. *Journal of Chromatography*, v. 323, p. 255-264, 1985.

HUSE, K., BÖHME, H.J., SCHOLZ, G.H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 51, p. 217-231, 2002.

HUTCHENS, T.W., PORATH, J. Thiophilic adsorption of immunoglobulins- analysis of conditions optimal for selective immobilization and purification. *Analytical Biochemistry*, v. 159, p. 217-226, 1986.

JIANG, C.P., WECHUCK, J.B., GOINS, W.F., KRISKY, D.M., WOLFE, D., ATAAI, M.M., GLORIOSO, J.C. Immobilized cobalt affinity chromatography provides a novel, efficient method for herpes simplex virus type 1 gene vector purification. *Journal of Virology*, v. 78, p. 8994-9006, 2004.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, p. 495-497, 1975.

KRACALIKOVA, K., TISHCHENKO, G., BLEHA, M. Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni<sup>2+</sup>-iminodiacetic acid complexes on retention of IgG<sub>1</sub>. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 67, p. 7-25, 2006.

LABROU, N., CLONIS, Y. D., The affinity technology in downstream process. *Journal of Biotechnology*, v. 36, p. 95-119, 1994.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANGMUIR, I. The effect of space charge and residual gases on thermoionic currents in high vacuum. *Physics Review*, v. 2, p. 450-486, 1913.

LEWIS, G.N. Valence and the Structure of Atoms and Molecules, *The Chemical Catalog Company, Inc.*: New York, 1923.

LEIBL, H., ERBER, W., EIBL, M.M., MANNHALTER, J.W. Separation of

polysaccharide-specific human immunoglobulin G subclasses using a protein A superpose column with a pH gradient elution system. *Journal of Chromatography A*, v. 639, p. 51-56, 1993.

LIU, C.L., CHEN, Y.C., LIN, S.C. A poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based immobilized metal affinity chromatography adsorbent for protein purification. *Journal of The Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, p. 329-336, 2008.

LOW, D., O'LEARY, R., PUJAR, N.S. Future of antibody purification. *Journal of Chromatography B*, v. 848, p. 48-63, 2006.

LOWE, C.R., LOWE, A.R., GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 561-574, 2001.

MANTOVAARA, T., PERTOFT, H., PORATH, J. Carboxymethylated aspartic acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 13, p. 315-322, 1991.

MARTINS, S., KARMALI, A., ANDRADE, J., SERRALHEIRO, M.L. Immobilized metal affinity chromatography of monoclonal immunoglobulin M against mutant amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biotechnology*, v. 33, p. 103-113, 2006.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.

NILSON, B.H.K., LOGDEMB, L., KASTERN, W., BJÖRK, L., AKERSTRÖM, B. Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *Journal of Immunological Methods*, v. 164, p. 33-40, 1993.

PEARSON, R.G. Hard and soft acids and bases. Part II. Underlying theories. *Journal of Chemical Education*, v. 45, p. 643-659, 1968(b).

PHAN, T.C.A., NOWAK, K.J., AKKARI, P.A., ZHENG, M.H., XU, J.K. Expression of caltrin in the baculovirus system and its purification in high yield and purity by cobalt (II) affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, v. 29, p. 284-290, 2003.

PIATIBRATOV, M., HOU, S.B., BROOUN, A., YANG, J.S., CHEN, H.Y., ALAM, M. Expression and fast-flow purification of a polyhistidine-tagged myoglobin-like aerotaxis transducer. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1524, p. 149-154, 2000.

PITOT, O., NEDONCHELLE, E., LEGALLAIS, C., VIJAYALAKSHMI, M. Protein adsorption on histidyl-aminohexyl-Sepharose 4B II. Application to the negative one-step affinity purification of human  $\beta$ 2-microglobulin and immunoglobulin G. *Journal of Chromatography B*, v. 758, p. 173-182, 2001.

PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v. 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J., OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630, 1983.

PORATH, J. IMAC – Immobilized metal ion affinity based chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 7, p. 254-259, 1988.

PORATH, J. Immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, v. 3, p. 263-281, 1992.

PRASANNA, R.R., VIJAYALAKSHMI, M.A. Characterization of chelate methacrylate nonolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 3660-3667, 2010.

PRIN, C., BENE, M.C., GOBERT, B., MONTAGNE, P., FAURE, G.C. Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1243, p. 287-290, 1995.

PUTNAM, F.W. The plasma protein: structure, function and genetic control. Ed. Academic Press. New York, p. 1-55, 1975.

RADOSEVICH, M., BURNOUF, M. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. *Vox Sanguinis*, v. 98, p. 12-28, 2010.

RIBEIRO, M.B. Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 148p. Dissertação (Mestrado).

RIBEIRO, M.B., VIJAYALAKSHMI, M.A., TODOROVA-BALVAY, D., BUENO, S.M.A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of

human IgG with immobilized nickel affinity membranes. *Journal of Chromatography B*, v. 861, p. 64-73, 2008.

ROQUE, A.C.A., LOWE, C.R., TAIPA, M.A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 639-654, 2004.

ROQUE, A.C.A., SILVA, C.S.O., TAIPA, M.A. Affinity based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. *Journal of Chromatography A*, v. 1160, p. 44-55, 2007.

SALVALAGLIO, M., ZAMOLO, L., BUSINI, V., MOSCATELLI, D., CAVALLOTTI, C. Molecular modeling of Protein A affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 8675-8686, 2009.

SERPA, G., AUGUSTO, E.F.P., TAMASHIRO, W.M.S.C., RIBEIRO, M.B., MIRANDA, E.A., BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G<sub>1</sub> monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, v. 816, p. 259-268, 2005.

SERRES, A., MULLER, D., JOZEFONVICZ, J. Purification of monoclonal antibodies on dextran-coated silica support grafted by thiophilic ligand. *Journal of Chromatography A*, v. 771, p. 151-157, 1995.

SHARMA, S., AGARWAL, G.P. Interactions of protein with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherms models. *Analytical Biochemistry*, v. 3288, p. 126-140, 2001.

SILVA, P.T. Purificação da glicoproteína G (GPV) recombinante do vírus da raiva produzida por células de *Drosophila melanogaster* S2 através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 105 p. Dissertação (mestrado).

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, v. 3, p. 1-11, 1985.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. *Bio Essays*, v. 10, p. 170-75, 1989.

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography: Imidazole proton pump and chromatographic sequale. 1. Proton pump. *Journal of Molecular Recognition*, v. 9, p.

389-393, 1996.

TANAKA, K., SAWATANI, E., DIAS, G.A., SHIGUEOKA, E.M., CAMPOS, T.C.X.B., NAKAO, H.C., ARASHIRO, F. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 27-30, 2000.

TANAKA, K., SAWATANI, E., SHIGUEOKA, E.M., CAMPOS, T.C.X.B., NAKAO H.C., DIAS, G.A., FUGITA, R.K., ARASHIRO, F. A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1375-1381, 1998.

TISHCHENKO, G., DYBAL, J., MESZAROSOVA, K., SEDLAKOVA, Z., BLEHA, M. Purification of the specific immunoglobulin G<sub>1</sub> by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters). Effect of polymer structure. *Journal of Chromatography A*, v. 954, p. 115–126, 2002.

TISHCHENKO, G., HODROVA, B., SIMUNEK, J., BLEHA, M. Nickel and copper complexes of a chelating methacrylate sorbent in the purification of chitinases and specific immunoglobulin G<sub>1</sub> by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 983, p. 125–132, 2003.

TODOROVA-BALVAY, D., PITIOT, O., BOURHIM, M., SRIKRISHNAN, T., VIJAYALAKSHMI, M.A. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 57-62, 2004.

TSAI, S.Y., LIN, S.C., SUEN, S.Y., HSU, W.H. Effect of number of poly(His) tags on the adsorption of engineered proteins on immobilized metal affinity chromatography adsorbents. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2058-2067, 2006.

UEDA, E.K.M., GOUT, P.W., MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal-ion protein binding. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 1-23, 2003.

VANÇAN, S., MIRANDA, E.A., BUENO, S.M.A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 573-579, 2002.

VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, p. 71-76, 1989.



VLUG, A., VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. *American Clinical Laboratory*, v. 8, p. 28-36, 1989.

WILCHEK, M., MIRON, T. Thirty years of affinity chromatography. *Reactive & Functional Polymers*, v. 41, p. 263-268, 1999.

WINZERLING, J.J., BERNA, P., WANG, N.H.W. How to use immobilized metal ion affinity chromatography. *Methods*, v. 4, p. 4-13, 1992.

WONG, J., ALBRIGTH, R.L., WANG, N.H.W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) – chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*, v. 20, p. 49-106, 1991.

WONGCHUPHAN, R., TEY, B.T., TAN, W.S., TAIP, F.S., KAMAL, S.M.M., LING, T.C. Application of dye-ligands affinity adsorbent in capturing of rabbit immunoglobulin G. *Biochemical Engineering Journal*, v. 45, p. 232-238, 2009.

YANG, H., GURGEL, P.V., CARBONELL, R.G. Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G. *Journal of Peptide Research*, v. 66, p. 120-137, 2005.

YANG, H., GURGEL, P.V., CARBONELL, R.G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 910-918, 2009.

YAVUZ, H., AKGÖL, S., SAY, R., DENIZLI, A. Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 39, p. 303-309, 2006.

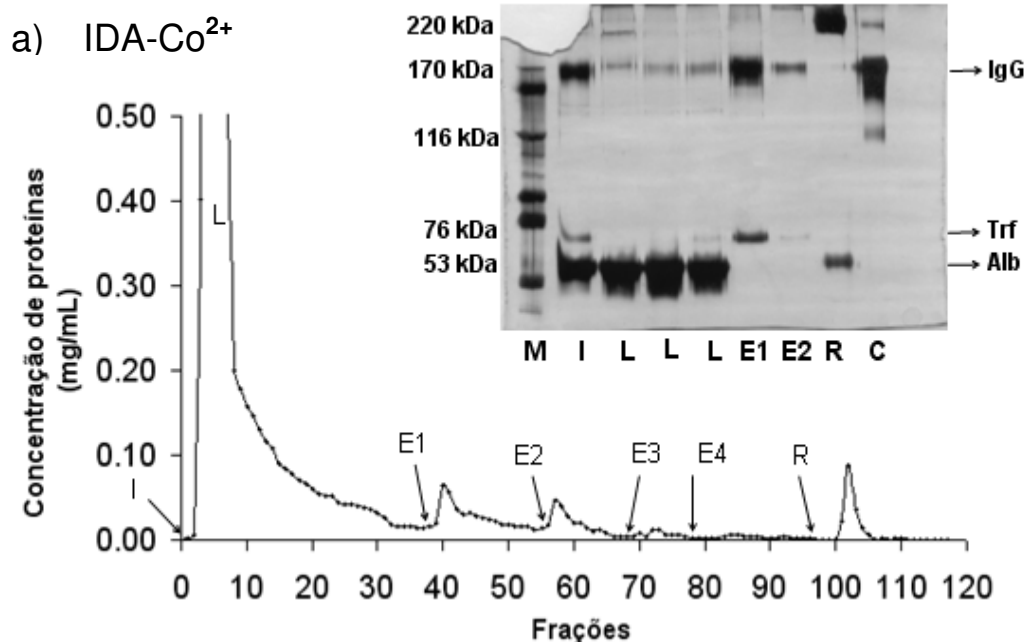
ZACHARIOU, M., HEARN, M.T.W. Application of immobilized metal ion chelate complexes as pseudocation exchange adsorbents for protein separation. *Biochemistry*, v. 35, p. 202-211, 1996.

ZACHARIOU, M., HEARN, M.T.W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilized hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. *Journal of Chromatography A*, v. 890, p. 95-116, 2000.

ZATLOUKALOVA, E., KUCEROVA, Z. Separation of cobalt binding proteins by immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 99-103, 2004.

## Apêndice A

Duplicatas dos perfis cromatográficos e eletroforéticos dos experimentos realizados em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando sistema tamponante Tris-HCl a pH 7,0, MOPS 25 mmol/L e imidazol 2 mmol/L e fosfato de sódio 25 mmol/L e imidazol 2 mmol/L, na presença de 1,0 mol/L de NaCl e na ausência deste sal e os respectivos balanços de massa.



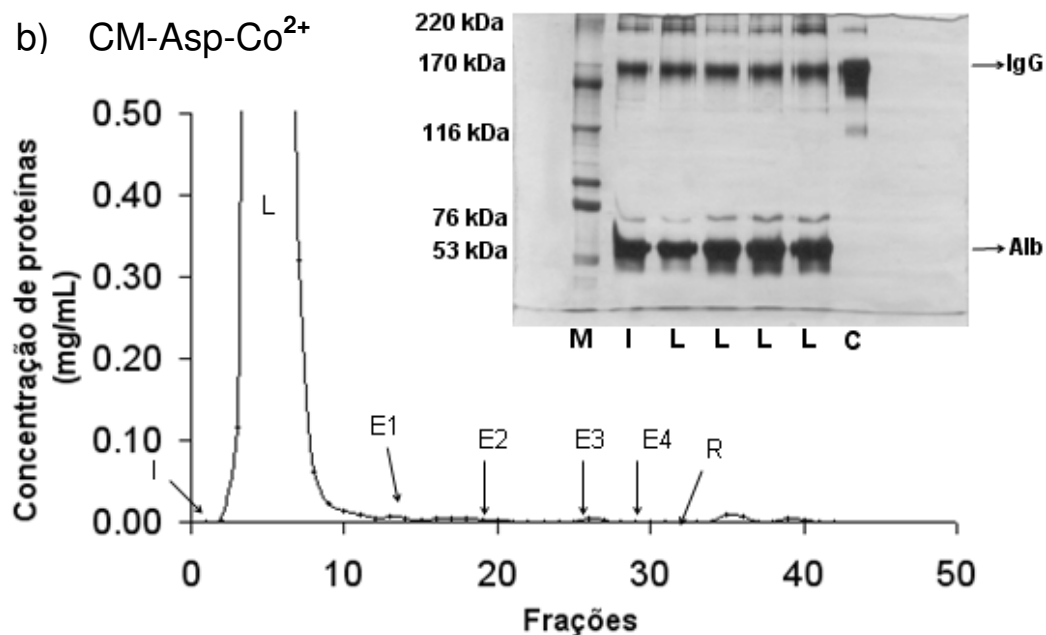


Figura A.1: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 1,0 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

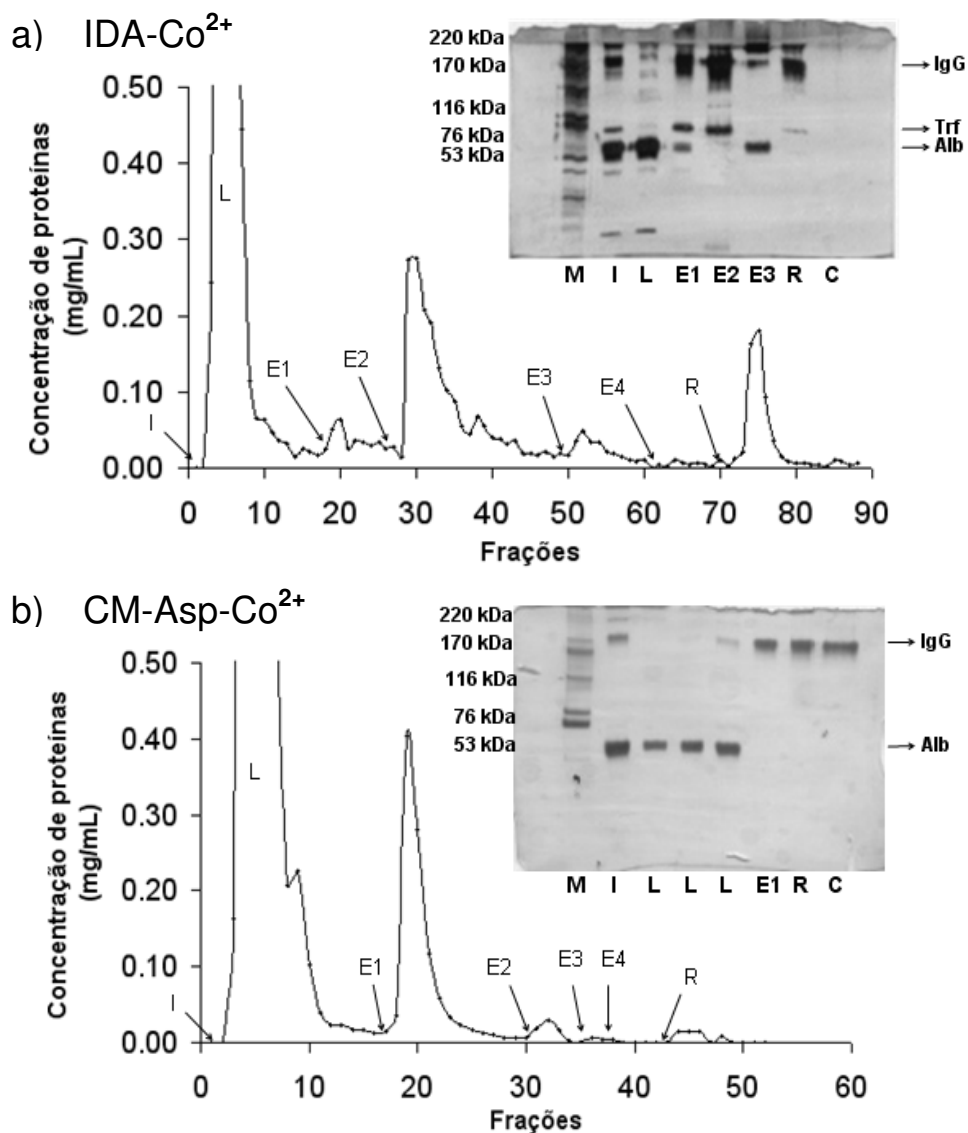


Figura A.2: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl a pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de Tris. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 300 mmol/L de Tris. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de Tris. Pista R: “pool” das frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela A.1. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão Tris-HCl pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de Tris

Fração	Molaridade de Tris (mmol/L)	Adição de sal no tampão				Ausência de sal no tampão			
		Quelato				Quelato			
		IDA-Co <sup>2+</sup>		CM-Asp-Co <sup>2+</sup>		IDA-Co <sup>2+</sup>		CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	
		mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>
Injeção	25	6,35	100,0	8,25	100,0	9,10	100,0	9,71	100,0
Lavagem	25	6,62	104,3	8,18	99,1	8,80	96,8	10,12	104,2
Eluição	100	0,46	7,3	0,03	0,4	0,30	3,3	0,50	5,1
	300	0,27	4,0	0,01	0,1	1,45	15,9	0,08	0,9
	500	0,07	1,1	0,01	0,1	0,19	2,1	0,01	0,1
	700	0,06	0,9	0,00	0,0	0,02	0,3	0,00	0,0
Regen. <sup>a</sup>		0,17	2,7	0,02	0,3	0,35	3,8	0,05	0,5
Recup. <sup>b</sup>		7,64	120,2	8,25	100,0	11,11	122,1	10,76	110,8

<sup>a</sup>Regen.: solução de regeneração 100 mmol/L de EDTA.

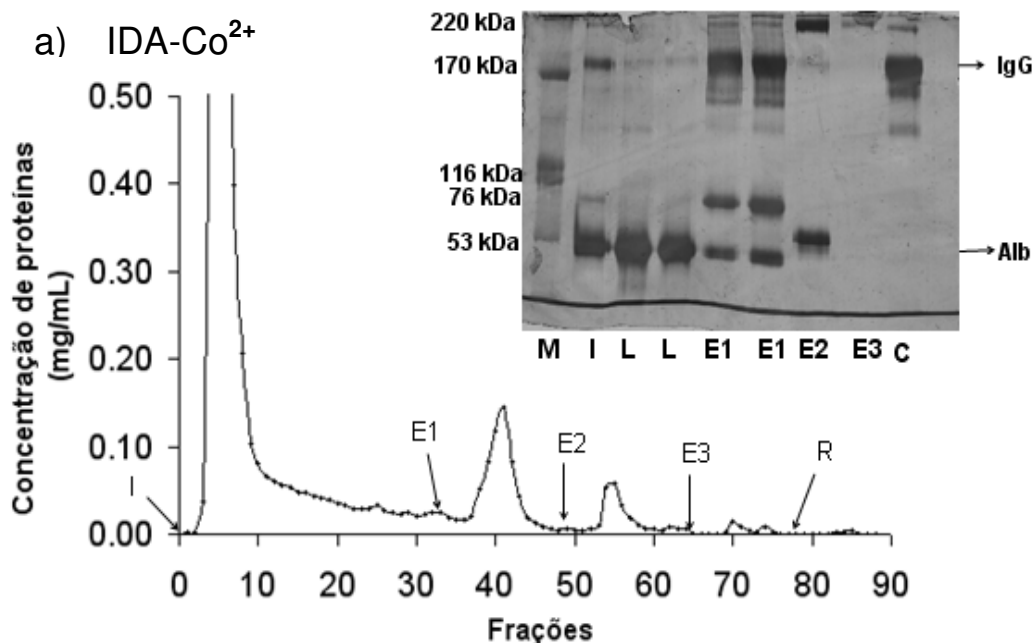
<sup>b</sup>Recup.: recuperação

<sup>c</sup>Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>d</sup>Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.



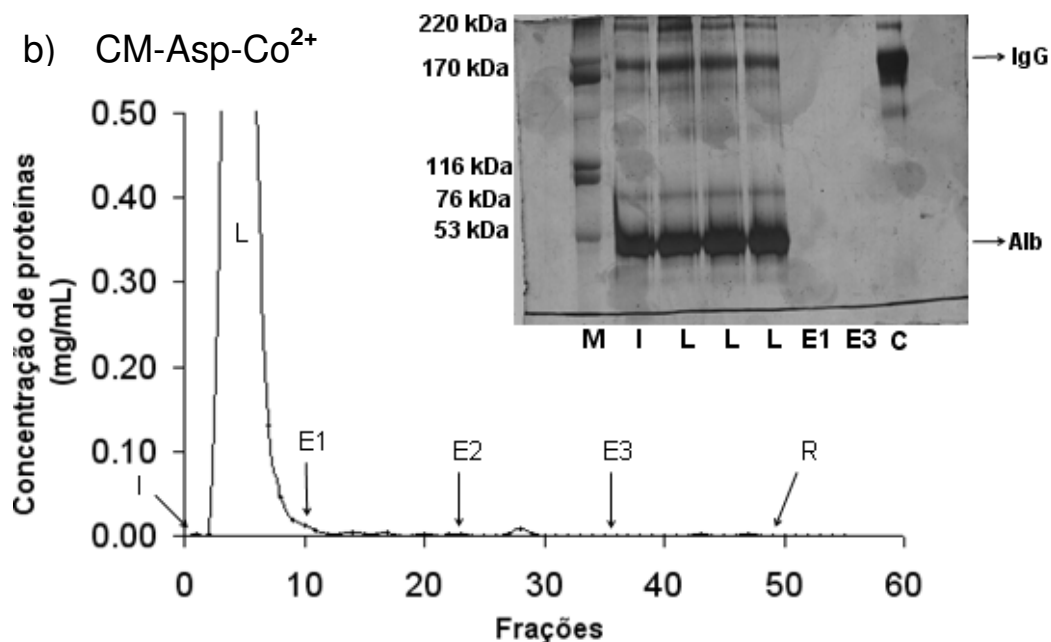


Figura A.3: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

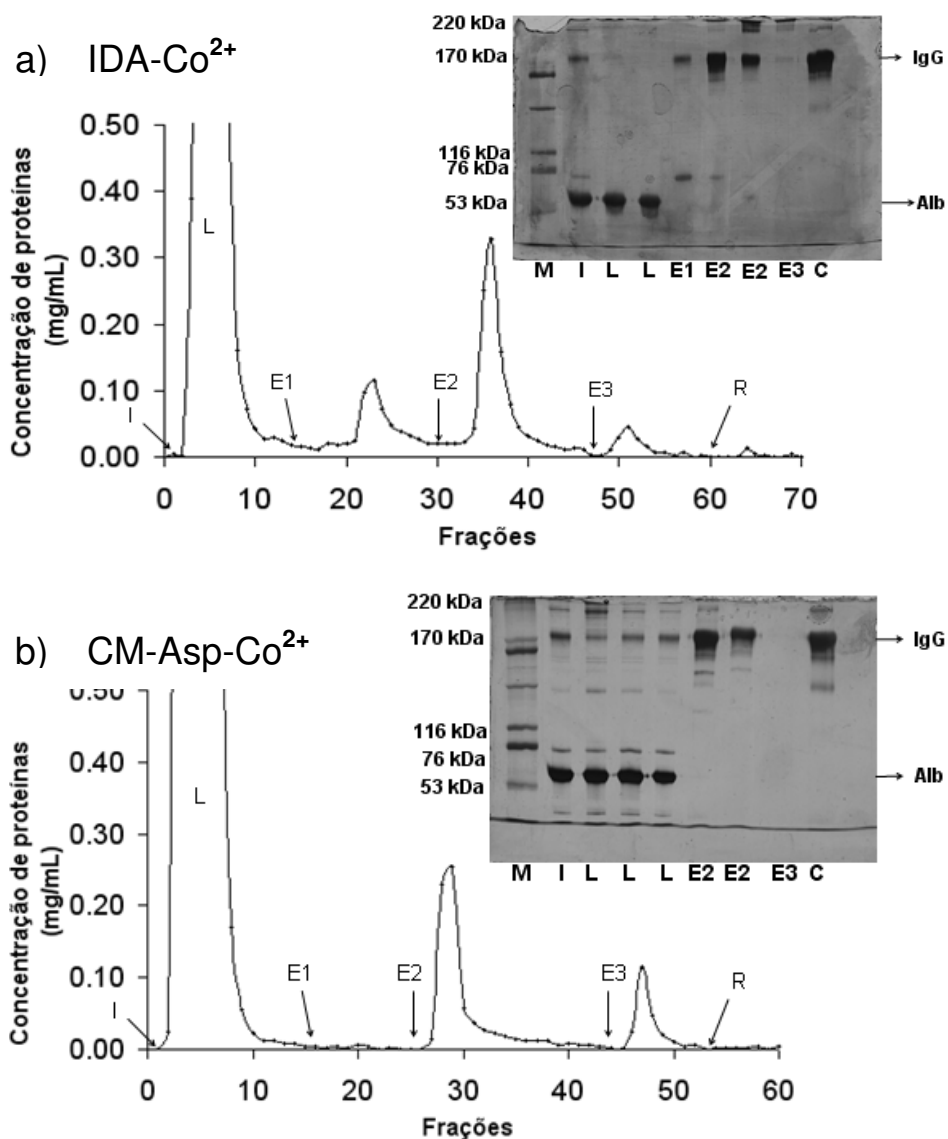


Figura A.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante MOPS-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão MOPS a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela A.2. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão MOPS a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol

Fração	Molaridade de imidazol (mmol/L)	Adição de sal no tampão				Ausência de sal no tampão			
		Quelato		Quelato		Quelato		Quelato	
		IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>
		mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>
Injeção	2,0	5,61	100,0	5,42	100,0	8,13	100,0	8,37	100,0
Lavagem	2,0	4,86	86,6	5,19	95,8	6,44	79,2	7,17	85,6
Eluição	20	0,64	11,5	0,03	0,5	0,41	5,1	0,02	0,2
	100	0,23	4,1	0,01	0,3	0,95	11,7	0,37	4,4
	500	0,03	0,6	0,01	0,1	0,09	1,1	0,12	1,4
Regen. <sup>a</sup>		0,01	0,2	0,00	0,0	0,01	0,1	0,00	0,0
Recup. <sup>b</sup>		5,77	102,9	5,24	96,7	7,90	97,2	7,68	91,6

<sup>a</sup> Regen.: solução de regeneração 100 mmol/L de EDTA.

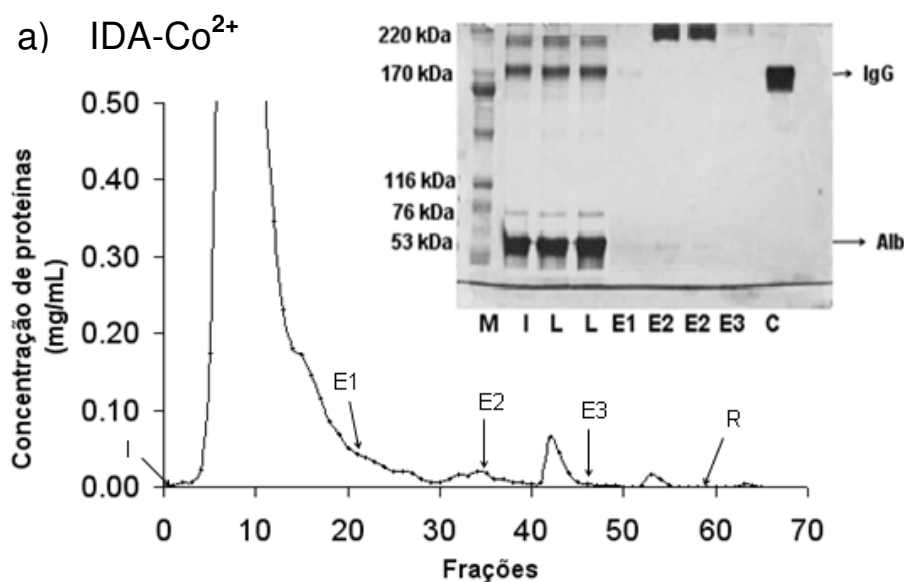
<sup>b</sup> Recup.: recuperação

<sup>c</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>d</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leite: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.





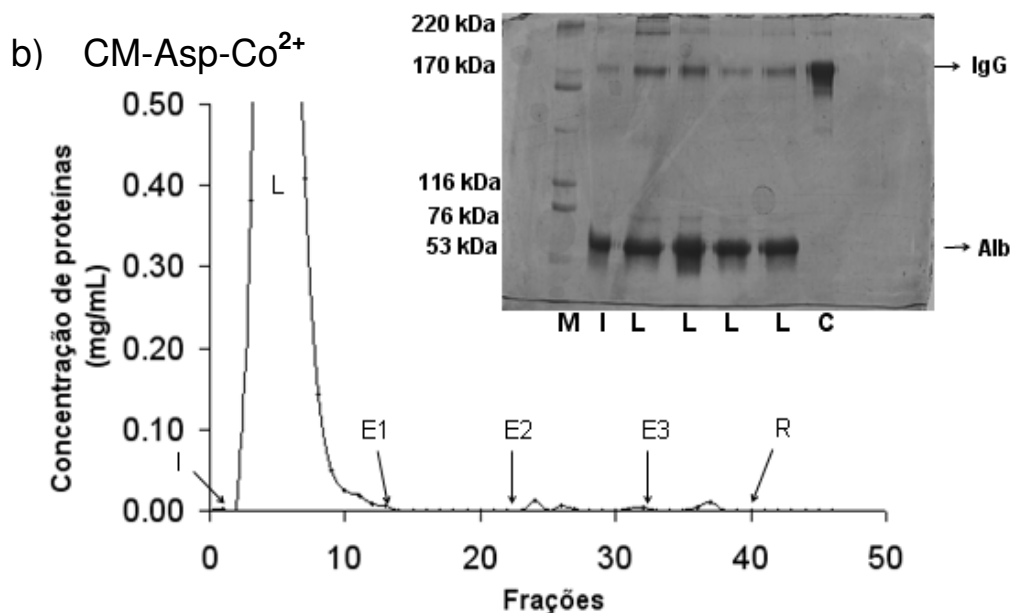


Figura A.5: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 1,0 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

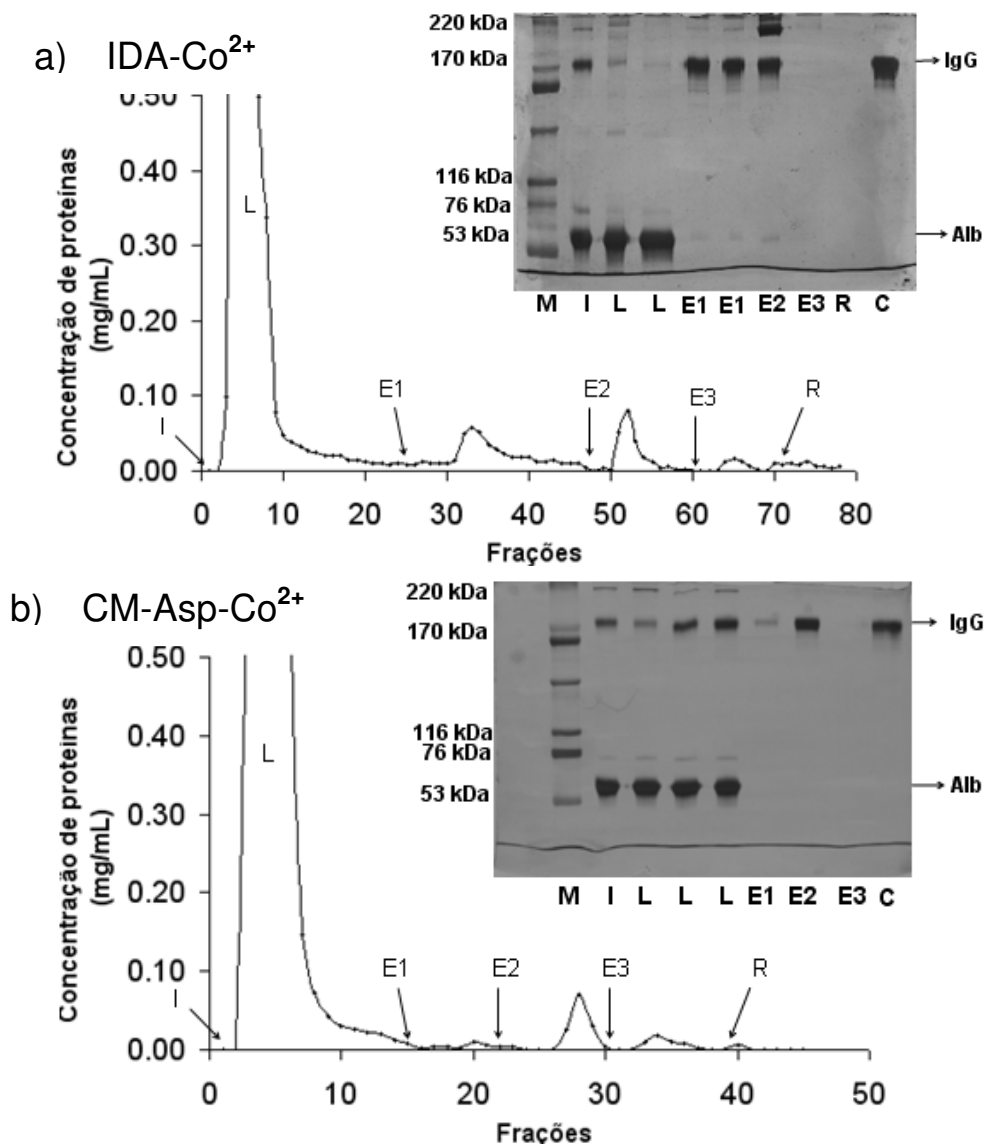


Figura A.6: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol em ausência de sal, em (a) IDA-Co<sup>2+</sup>, (b) CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista E3: “pool” das frações de eluição a 500 mmol/L de imidazol. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela A.3. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão fosfato de sódio a pH 7,0 na presença e ausência de sal e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol.

Fração	Molaridade de imidazol (mmol/L)	Adição de sal no tampão				Ausência de sal no tampão			
		Quelato		Quelato		Quelato		Quelato	
		IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>	IDA-Co <sup>2+</sup>	CM-Asp-Co <sup>2+</sup>
		mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>
Injeção	2,0	7,16	100,0	10,04	100,0	8,01	100,0	9,22	100,0
Lavagem	2,0	6,11	85,4	7,29	72,6	6,76	84,4	9,00	97,5
Eluição	20	0,33	4,6	0,02	0,2	0,45	5,6	0,06	0,6
	100	0,04	0,6	0,00	0,0	0,28	3,5	0,12	1,3
	500	0,01	0,1	0,00	0,1	0,06	0,7	0,02	0,3
Regen. <sup>a</sup>		0,00	0,0	0,00	0,0	0,06	0,7	0,01	0,1
Recup. <sup>b</sup>		6,49	90,7	7,31	72,9	7,60	94,9	9,20	99,8

<sup>a</sup> Regen.: solução de regeneração 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Recup.: recuperação

<sup>c</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>d</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leite: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

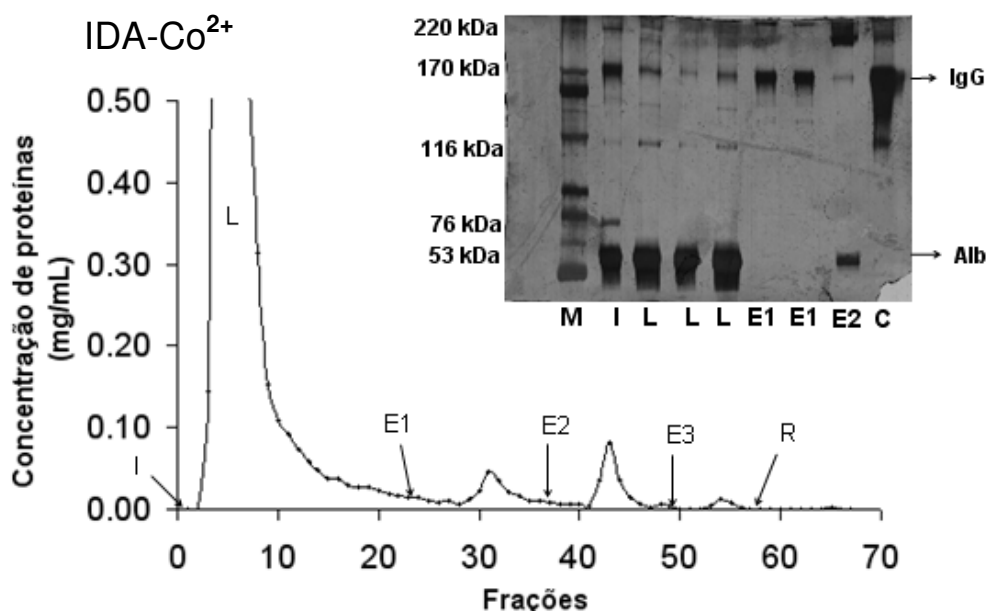


Figura A.7: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,1 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,2 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2,0 mmol/L de imidazol e 0,1 mol/L de NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

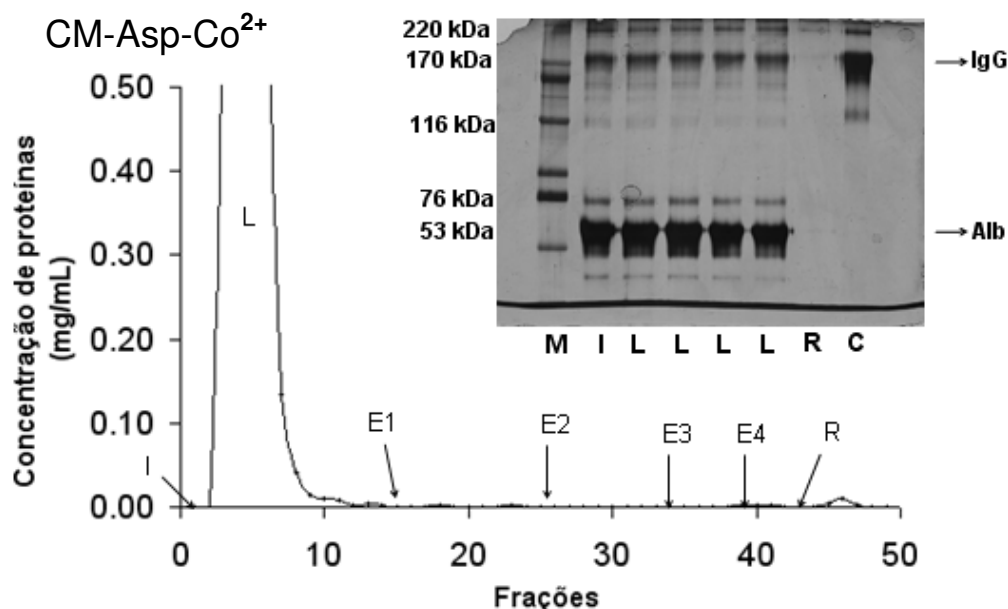


Figura A.8: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante Tris-HCl na presença de 0,1 mol/L NaCl, em CM-Asp-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão Tris-HCl contendo 0,1 mol/L NaCl pH 7,0; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 100 mmol/L de Tris; E2: 300 mmol/L de Tris; E3: 500 mmol/L de Tris; E4: 700 mmol/L de Tris; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista R: frações de regeneração. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela A.4. Balanços de massa das cromatografias em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> e agarose-CM-Asp-Co<sup>2+</sup> na presença de 0,1 mol/L de NaCl, utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio-imidazol e Tris-HCl, respectivamente, a pH 7,0. Dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol e de Tris para IDA-Co<sup>2+</sup> e CM-Asp-Co<sup>2+</sup>, respectivamente.

Fração	IDA-Co <sup>2+</sup>			CM-Asp-Co <sup>2+</sup>		
	Tampão: Fosfato de sódio			Tampão: Tris-HCl		
	Imidazol (mmol/L)	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>	Tris-HCl (mmol/L)	mg <sup>c</sup>	(%) <sup>d</sup>
Injeção	2,0	7,99	100,0	25	7,98	100,0
Lavagem	2,0	7,74	96,8	25	8,36	104,7
Eluição	20	0,22	2,8	100	0,00	0,0
	100	0,21	2,6	300	0,00	0,0
	500	0,03	0,4	500	0,00	0,0
				700	0,01	0,1
Regen. <sup>a</sup>		0,00	0,0		0,02	0,2
Recup. <sup>b</sup>		8,20	102,6		8,38	105,0

<sup>a</sup> Regen.: solução de regeneração 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Recup.: recuperação

<sup>c</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>d</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante: 26,95 ± 1,73 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para IDA e 6,97 ± 0,55 μmol Co<sup>2+</sup>/mL gel para CM-Asp.

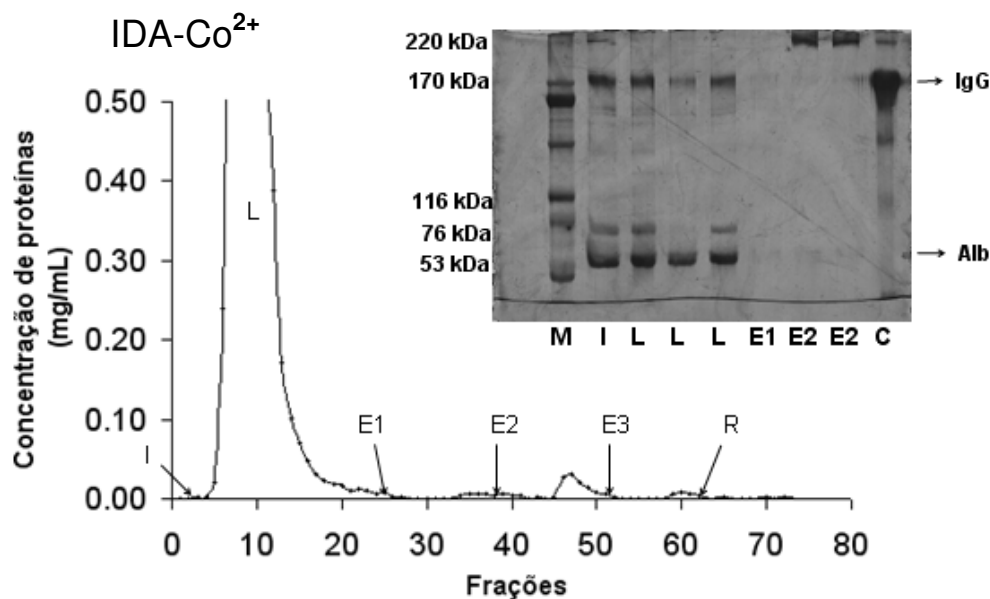


Figura A.9: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de IgG a partir de solução de soro humano utilizando sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol na presença de 0,5 mol/L de NaCl, em IDA-Co<sup>2+</sup>. Vazão: 0,5 mL/min. I: injeção de 0,24 mL de soro humano diluído 5 vezes em tampão fosfato de sódio a pH 7,0 com 2 mmol/L de imidazol e 0,5 mol/L NaCl; L: lavagem com tampão de equilíbrio; E1: 20 mmol/L de imidazol; E2: 100 mmol/L de imidazol; E3: 500 mmol/L de imidazol; R: regeneração com 100 mmol/L de EDTA. Eletroforese SDS-PAGE sob condições não redutoras. Pista M: marcadores de massa molecular. Pista I: Injeção. Pista L: frações de lavagem. Pista E1: “pool” das frações de eluição a 20 mmol/L de imidazol. Pista E2: “pool” das frações de eluição a 100 mmol/L de imidazol. Pista C: marcador de IgG humana.

Tabela A.5. Balanço de massa da cromatografia em agarose-IDA-Co<sup>2+</sup> utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio a pH 7,0 na presença de 0,5 mol/L de NaCl e dessorção por gradiente degrau de aumento da concentração de imidazol.

Fração	IDA-Co <sup>2+</sup>		
	Tampão: Fosfato de sódio		
	Molaridade de imidazol (mmol/L)	mg <sup>b</sup>	(%) <sup>c</sup>
Injeção	2,0	7,07	100,0
Lavagem	2,0	6,76	95,6
Eluição	20	0,02	0,4
	100	0,13	1,8
	500	0,03	0,3
Regeneração <sup>a</sup>		0,01	0,2
Recuperação		6,95	98,3

<sup>a</sup> 100 mmol/L de EDTA.

<sup>b</sup> Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

<sup>c</sup> Percentagem relativa à massa de proteína total injetada.

Volume de leito: 3,0 mL

Quantidade de ligante:  $26,95 \pm 1,73$   $\mu\text{mol Co}^{2+}/\text{mL}$  gel para IDA e  $6,97 \pm 0,55$   $\mu\text{mol Co}^{2+}/\text{mL}$  gel para CM-Asp.

## Curvas de ruptura

As duplicatas das curvas de ruptura com soro diluído a 2,5, 5 e 10 vezes foram realizados pelo aluno de iniciação científica Igor Maciel de Oliveira e Silva.

## Isotermas de adsorção

Duplicatas dos experimentos para determinação de isotermas de adsorção para determinação da capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo CM-Asp-Co<sup>2+</sup>-IgG, para modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich.



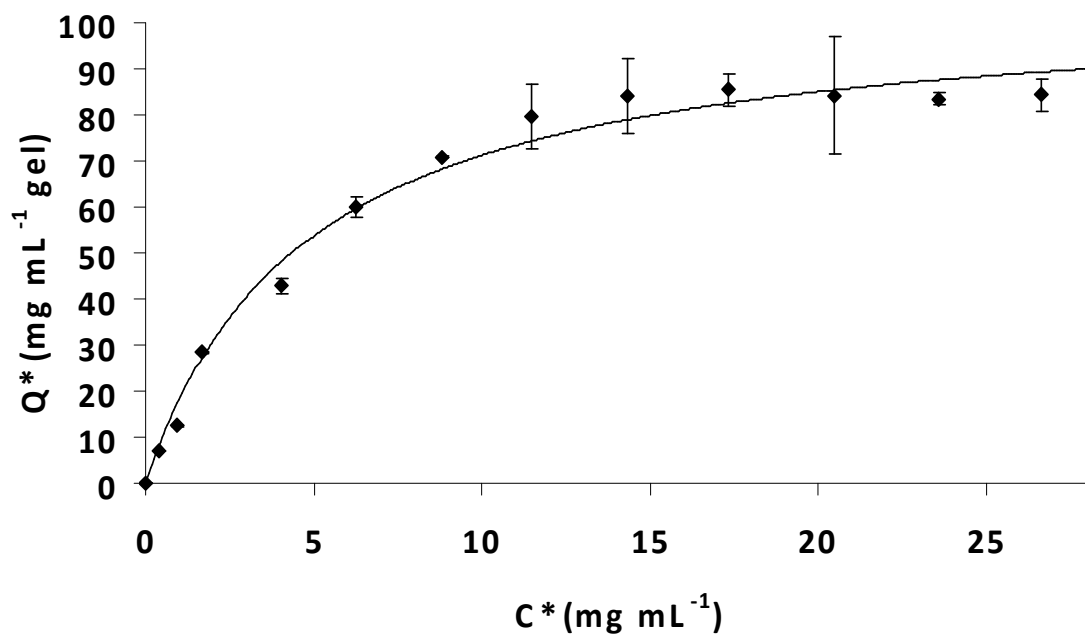


Figura A.10: Isotherma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com tampão Tris-HCl, pH 7,0 utilizando o modelo de Langmuir.

Tabela A.6 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>

Parâmetros	Langmuir
Q <sub>m</sub> (mg/mL gel)	105,44 ± 4,10
K <sub>d</sub> (mol/L)	(7,28 ± 0,98) × 10 <sup>-5</sup>
n	-
r <sup>2</sup>	0,987
Chi <sup>2</sup>	15,18

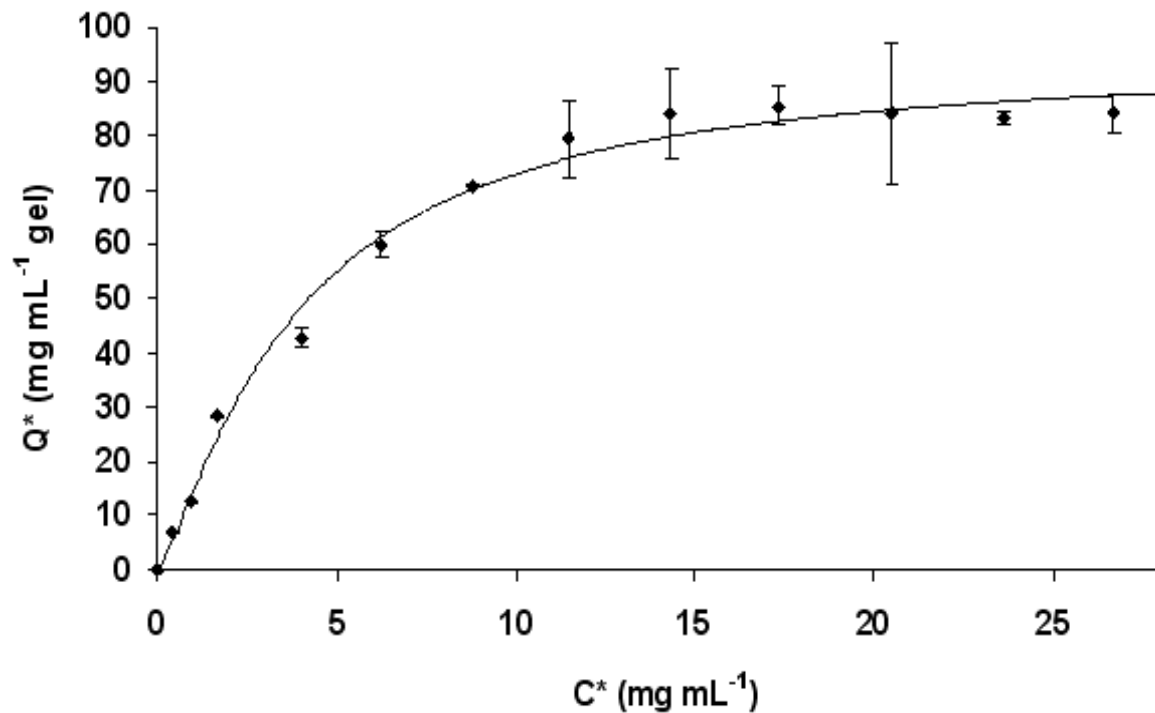


Figura A.11: Isoterma de adsorção de IgG humana em CM-Asp-Co<sup>2+</sup> com tampão Tris-HCl, pH 7,0 utilizando o modelo de Langmuir-Freundlich.

Tabela A.7 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG em adsorvente CM-Asp-Co<sup>2+</sup>

Parâmetros	Langmuir-Freundlich
Q <sub>m</sub> (mg/mL gel)	95,41 ± 4,64
K <sub>d</sub> (mol/L)	(8,43 ± 1,29) × 10 <sup>-5</sup>
n	1,26 ± 0,14
r <sup>2</sup>	0,991
Chi <sup>2</sup>	11,74