

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

***Despirogenação de Soro Antiofídico: Adsorção
Seletiva em Membrana de Quitosana***

Eng^a Sindelia Silva de Freitas
Mestranda

Prof^a Dr^a 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
Dezembro de 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
Nº CHAMADA 1/Unicamp
F 884 d
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49414
PROC 16-831/00
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD CM00167398-3

Bibid 242792

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

F879d Freitas, Sindelia Silva de
Despirogenação de soro antiofídico: adsorção seletiva
em membrana de quitosana / Sindelia Silva de Freitas.--
Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Sônia Maria Alves Bueno.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

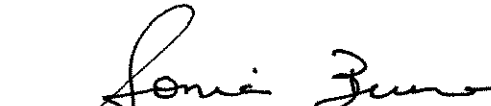
1. Endotoxina. 2. Membranas (Tecnologia). 3.
Quitosana. 4. Adsorção. I. Bueno, Sônia Maria Alves.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

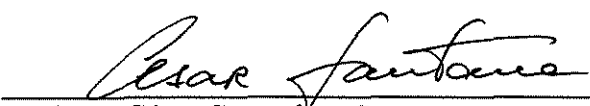
Dissertação de Mestrado:

***Despirogenação de Soro Antiofídico: Adsorção
Seletiva em Membrana de Quitosana***

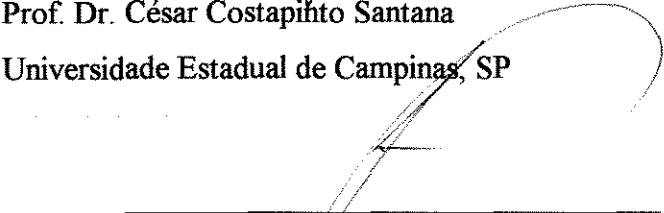
Orientadora: Dr^a Sônia Maria Alves Bueno



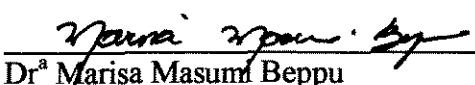
Prof.^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno
Universidade Estadual de Campinas, SP



Prof. Dr. César Costapinto Santana
Universidade Estadual de Campinas, SP



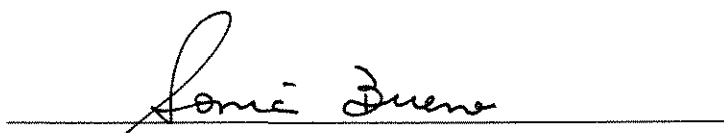
Prof. Dr. Eduardo José de Arruda
Universidade Católica Dom Bosco, MS



Dr^a Marisa Masumi Beppu
Dupont do Brasil S.A., SP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Esta versão corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng^a. Química Sindelia Silva de Freitas e aprovada pela comissão julgadora em 19 de dezembro de 2001.



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno

*Mas, como está escrito: as coisas que o
olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não
subiram ao coração do homem, são as que
Deus preparou para os que o amam.*

I Coríntios 2:9

À minha querida mãe pelo investimento depositado na minha formação e por acreditar no meu potencial; pelo amor que nunca me faltou e pelos ensinamentos que formaram o que sou hoje, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor da vida, pelo grandioso amor incondicional que não mede sacrifícios e não poupa benefícios aos seus filhos;

A meu pai e irmão, Neves e Eduardo, pelo amor e incentivo que me fizeram superar tantos obstáculos;

À profª Drª Sônia Bueno pela orientação e contribuição para o meu crescimento como profissional;

Ao Adriano, pelo apoio e pronta ajuda que eu sempre tive durante a execução dos experimentos, muito mais ainda por tornar esses três últimos meses os mais felizes que vivi aqui;

À minha amiga Chrissana, pelo companheirismo e pelas muitas gargalhadas que demos juntas e que com certeza amenizaram as dificuldades;

Ao amigo Eduardo, pelo envolvimento com este trabalho e contribuição nas etapas de síntese e caracterização da membrana;

Ao prof. Dr. César Costapinto e a Drª Marisa Beppu, pelas discussões e sugestões que muito contribuíram para o sucesso deste trabalho;

Ao amigo César Acconci, pelo apoio e pelas muitas informações que enriqueceram este trabalho;

Aos colegas de laboratório e grandes profissionais: Isa S. Duarte, Luciana Lins de Aquino, Gisele Serpa, Oselys Justo, Adriana Lage, Victor Haber Perez, Antenor Ferreira de Moraes, André Bernardo, Cristiane S. Farinas, Líbia S. Conrado, Elcimar S. de Nóbrega e Marco Garcia pela convivência e aprendizado que tive e que vou levar comigo para onde for;

Aos professores Everson Alves Miranda, César Costapinto Santana e Maria Helena Santana, Departamento de Processos Biotecnológicos (FEQ-UNICAMP), pela utilização dos recursos de seus laboratórios;

Aos profs. Marco Aurélio De Paoli e Inês Joeques, instituto de química (UNICAMP), pela utilização do equipamento e da célula para as análises de tensão, análise esta imprescindível para as etapas de síntese e caracterização da membrana;

À prof^a Dr^a Lúcia Beckman Menezes pela profissional exemplar e maravilhosa pessoa com quem tive o prazer de conviver e que muito me incentivou no início desta caminhada;

Ao CNPq pela concessão de verba através do projeto de auxílio à pesquisa;

Ao FAEP pela concessão de verba para a compra de materiais através do projeto de auxílio à pesquisa e pela concessão de uma bolsa através do auxílio ponte;

Ao CAPES pela bolsa de estudos;

Ao povo brasileiro que através de suas contribuições tem dado a oportunidade de aperfeiçoamento profissional aos estudantes deste país.

Muito Obrigada!

RESUMO

A indústria farmacêutica enfrenta dificuldades com relação a susceptibilidade de seus produtos à contaminação por endotoxinas (ETs). Estas moléculas são lipopolissacarídeos presentes na parede externa de bactérias Gram negativas e devido apresentar alta toxicidade a sua remoção é essencial para administração parenteral segura. Este trabalho visou a remoção de ETs de soro antiofídico, produto farmacêutico que consiste na única forma de tratamento de vítimas de acidentes ofídicos. A técnica utilizada foi a filtração em membrana reticulada de quitosana por esta demonstrar potencial para a interação com endotoxinas. A membrana de quitosana foi sintetizada em nosso laboratório e apresentou valores de vazão, tensão e área de adsorção ($13 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $0,81 \text{ MPa}$ e $15,9 \text{ cm}^2$, respectivamente) adequados para a execução dos experimentos.

Inicialmente, investigou-se a existência de adsorção de anticorpos do soro na membrana e notou-se que em soluções tamponantes acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 (4,25% e 4,67%, respectivamente) obteve-se uma menor adsorção. Em seguida, estudou-se a adsorção de ETs em membranas a partir das soluções tamponantes definidas anteriormente. Neste estudo verificou-se que em tampão Tris-HCl pH 7,0 foram alcançados maiores porcentagens de remoção (97,7% e 99,0% para soluções contaminadas nas concentrações de $150 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $1000 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente).

Na despirogenação de soluções de soro antiofídico contendo baixa concentração de anticorpos ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) altos valores para a remoção de endotoxinas e recuperação de anticorpos foram observados, chegando a apresentar 1% de endotoxinas remanescentes e 94,6% de proteína recuperada no produto final inicialmente contaminado com $1000 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Os resultados obtidos para a remoção de ETs de soluções de soro contendo alta concentração de anticorpos (cerca de $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), também foram significativos quanto a eficiência de remoção de ETs e recuperação de anticorpos para soluções inicialmente contaminadas com $1000 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (98,7% e 82% de ET removida e de proteína recuperada, respectivamente). Além disso, notou-se também que o aumento na concentração de anticorpos resultou em uma maior dificuldade na recuperação destes, sem contudo representar uma dificuldade ao processo de remoção por adsorção.

ABSTRACT

Contamination of therapeutic solutions by endotoxins (ET's) are of major concern in the pharmaceutical industry. The ET's are lipopolysaccharides found in the outer cell membranes of Gram-negative bacteria and are known to cause strong reactions in man after intravenous application. For this reason, the removal of ET's from therapeutic solutions is a major challenge in downstream processing.

In this work, we studied the removal of ET's from snake antivenom serum, the therapeutic employed on the treatment of snake bite accidents. The technique studied for the this removal was the membrane filtration using cross-linked chitosan membranes. We investigated the chitosan membrane synthesis that presented appropriated features of flowrate, resistance to stress and adsorption area ($13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $0,81 \text{ MPa}$ and $15,9 \text{ cm}^2$, respectively). The adsorption of proteins (antibodies) and ET's on the membrane was also investigated. The influence of three different buffer systems (Tris-HCl, sodium acetate and phosphate) on the adsorption of antibodies was studied. The best conditions found (lower antibody adsorption) were: pH 5,0 using acetate buffer, and pH 7,0 using Tris-HCl buffer (4,25% and 4,67% of antibody adsorption, respectively). The adsorption of ET's on the membrane when using the selected conditions was studied. Higher ET clearances were obtained using the Tris-HCl pH 7,0 buffer (97,7% and 99,0% for solutions containing initial ET concentrations of 150 and $1000 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively).

The membrane proved to be efficient on the removal of ET's from dilute snake antivenom serum ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of antibody concentration). ET removal efficiencies as high as 99,0% and antibody recovery of 94,6% were obtained, for a solution containing an initial ET concentration of 1000 EU/mL . The depyrogenation efficiency of high antibody concentration serum (approximately $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was also significant. The ET clearance and antibody recovery of a solution containing an initial ET concentration of $1000 \text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ were 98,7% and 82,0%, respectively. Moreover, the results indicated that antibody presence in the serum solutions was not a major obstacle for the ET removal process. However, the antibody recoveries from these high concentrated serums were significantly reduced.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Introdução.....	01
1.2. Objetivo.....	02
 CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA.....	 04
2.1. Soros antiofídicos: relevância, constituição e produção.....	04
2.2. Endotoxinas: características e métodos de remoção.....	07
2.3. Utilização de membranas de afinidade para a despirogenação de soluções protéicas.....	12
2.4. Quitosana: características e aplicações.....	13
 CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	 18
3.1. Materiais.....	18
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Obtenção da matriz adsorvente.....	19
3.2.1.1. Síntese das membranas porosas de quitosana.....	19
3.2.1.2. Planejamento experimental.....	21
3.2.1.3. Reticulação das membranas de quitosana.....	25
3.2.2. Caracterização das membranas de quitosana.....	25
3.2.2.1. Espessura da Membrana.....	25
3.2.2.2. Vazão de Água através da Membrana.....	26
3.2.2.3. Porosidade no Estado Úmido.....	26
3.2.2.4. Resistência Mecânica.....	27
3.2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
3.2.2.6. Área Superficial Específica.....	27

3.2.3. Experimentos de Adsorção de anticorpos em membrana de quitosana.....	28
3.2.3.1. Descrição do sistema de cromatografia.....	28
3.2.3.2. Adsorção de soro hiperimune em membranas de quitosana.....	29
3.2.3.3. Imunoeletroforese do soro antibotrópico.....	30
3.2.3.4. Determinação da concentração de proteínas.....	31
3.2.4. Experimentos de Adsorção de endotoxinas em membrana de quitosana.....	32
3.2.4.1. Despirogenação dos materiais.....	32
3.2.4.2. Despirogenação do sistema de filtração.....	32
3.2.4.3. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes.....	33
3.2.4.4. Remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico contaminadas artificialmente.....	34
3.2.4.5. Quantificação de endotoxinas.....	35
 CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. Síntese da matriz adsorvente.....	36
4.1.1. Planejamento Experimental.....	36
4.1.2. Síntese da membrana adsorvente.....	49
4.2. Caracterização da matriz adsorvente.....	49
4.2.1. Caracterização Física.....	49
4.2.2. Caracterização Morfológica.....	51
4.3. Experimentos de adsorção de soro antiofídico em membranas de quitosana.....	52
4.3.1. Verificação qualitativa da atividade do soro antiofídico.....	52
4.3.2. Influência da solução tamponante e do pH na adsorção de anticorpos do soro em membrana de quitosana.....	53

4.4. Experimentos de adsorção de endotoxinas em membranas de quitosana.....	56
4.4.1. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes artificialmente contaminadas.....	56
4.4.2. Remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico contendo baixa concentração de proteínas.....	59
4.4.3. Remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico contendo alta concentração de proteínas.....	62

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS...69

5.1. Conclusão.....	69
5.2. Sugestões para próximos trabalhos.....	71

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....72

ANEXO 1.....	79
---------------------	-----------

ANEXO 2.....	80
---------------------	-----------

ANEXO 3.....	82
---------------------	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Fração dos grupos aminos não protonados (α) em função do pH.....	14
Tabela 3.1: Massas de solução de quitosana para cada ensaio do Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	22
Tabela 3.2: Fatores utilizados para a realização do planejamento fracionário 2^{5-2}	20
Tabela 3.3: Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para estudar os efeitos de 5 variáveis sobre a vazão de água através da membrana porosa de quitosana.....	20
Tabela 3.4: Fatores utilizados para a realização do planejamento completo 2^2 com pontos axiais mais uma triplicata no ponto central.....	21
Tabela 3.5: Planejamento completo 2^2 com pontos axiais mais triplicata no ponto central para estudar os efeitos das variáveis massa de solução de quitosana e a proporção sílica-quitosana sobre a vazão e a tensão.....	22
Tabela 4.1: Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para estudar os efeitos de 5 variáveis sobre a vazão.....	37
Tabela 4.2: Resultado da análise dos efeitos dos fatores estudados sobre a vazão.....	38
Tabela 4.3: Planejamento completo 2^2 com pontos axiais mais triplicata no ponto central, para estudar os efeitos das variáveis massa de solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a vazão e a tensão.....	39
Tabela 4.4: Análise dos efeitos dos fatores massa inicial da solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a variável-resposta vazão.....	40

Tabela 4.5: Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 4.4.....	41
Tabela 4.6: Desvio entre os valores observados e preditos em relação a vazão.....	43
Tabela 4.7: Análise dos efeitos dos fatores massa l de solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a variável-resposta tensão.....	44
Tabela 4.8: Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 4.7.....	45
Tabela 4.9: Desvio entre os valores observados e preditos em relação a tensão.....	47
Tabela 4.10: Características físicas da membrana porosa reticulada de quitosana.....	49
Tabela 4.11: Influência do tampão na remoção de endotoxinas de soluções teoricamente contaminadas com 150 EU/mL e 1000 EU/mL.....	57
Tabela 4.12: Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 150 EU/mL.....	59
Tabela 4.13: Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 1000 EU/mL.....	60
Tabela 4.14: Concentração de endotoxinas remanescentes nas soluções de soro antiofídico em função do número de passagens das mesmas através da membrana.....	61
Tabela 4.15: Concentrações finais de endotoxinas e anticorpos nas soluções de soro definidas como Produto 1 e Produto 2.....	61

Tabela 4.16: Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 150 EU/mL.....	63
Tabela 4.17: Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 1000 EU/mL.....	63
Tabela 4.18: Concentrações de endotoxinas remanescentes nas soluções de soro antiofídico em função do número de passagens das mesmas através da membrana.....	64
Tabela 4.19: Concentrações finais de endotoxinas e anticorpos nas soluções de soro definidas como Produto 3 e Produto 4.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Ciclo de fabricação do soro antiofídico.....	5
Figura 2.2: Tratamento enzimático da molécula de IgG por pepsina.....	6
Figura 2.3: Esquema da localização das moléculas de endotoxinas na estrutura da parede das bactéria Gram negativas.....	8
Figura 2.4: Representação esquemática dos processos de despirogenação (Acconci, 1998).....	10
Figura 2.5: Esquema simplificado para a obtenção de quitosana a partir de crustáceos (Arruda, 1999).....	15
Figura 2.6: Estrutura da cadeia polimérica de quitosana (Arruda, 1999).....	14
Figura 3.1: Fluxograma genérico de preparação das membranas porosas de quitosana....	20
Figura 3.2: Representação esquemática do sistema de cromatografia utilizado para os experimentos de adsorção.....	29
Figura 3.3: Esquema do molde de um gel para imunoelektroforese.....	31
Figura 3.4: Representação esquemática do sistema de filtração utilizado para os experimentos de remoção de ETs de soluções tamponantes.....	33
Figura 3.5: Representação esquemática do sistema de filtração utilizado para os experimentos de remoção de ETs de soluções de soro antiofídico.....	34
Figura 4.1: (a) Superfície quadrática e (b) Curva de nível, descritas pela equação 4.1.....	42

Figura 4.2: (a) Superfície quadrática e (b) Curva de nível, descritas pela equação 4.2.....	46
Figura 4.3: Fluxograma de síntese da membrana reticulada de quitosana.....	50
Figura 4.4: Micrografia eletrônica de varredura da membrana porosa não reticulada (a) e reticulada (b) com epícloridrina.....	51
Figura 4.5: Imunoeletroforese do soro antibotrópico.....	52
Figura 4.6: Adsorção de anticorpos do soro antibotrópico em mg por área de membrana de quitosana nas diferentes soluções tampão e pH.....	54
Figura 4.7: Estrutura dos sais dos tampões utilizados nos experimentos de adsorção de anticorpos do soro antiofídico na membrana de quitosana.....	55
Figura 4.8: Influência da solução tamponante e do pH na remoção de endotoxinas.....	58
Figura 4.9: Influência da concentração de anticorpos na solução de injeção ao processo de remoção de endotoxinas.....	68

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Introdução e Relevância

Todo ano ocorrem no Brasil cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos, sendo que 80% destes casos são atribuídos à serpentes do gênero *Bothrops*. Em todas as ocorrências, o tratamento recomendável é a soroterapia, que consiste na rápida administração do soro antiofídico ao paciente em quantidades que dependem de seu estado clínico. Basicamente, os antivenenos são constituídos de anticorpos policlonais específicos, obtidos a partir do plasma do cavalo após sua hiperimunização com o veneno da serpente.

O soro antiofídico, por ser uma solução destinada a injeção em humanos, deve apresentar níveis de pureza, estabelecido pelas farmacopéias, para garantir uma administração segura. Medidas preventivas durante a sua produção e purificação devem ser tomadas para evitar a sua contaminação por pirogênios tais como endotoxinas.

Endotoxinas são lipopolissacarídeos encontrados na parede externa de bactérias Gram negativas. Seus efeitos são conhecidos por causarem elevação da temperatura corpórea em mamíferos quando presentes na corrente sanguínea, por isso a sua remoção de produtos farmacêuticos é de extrema importância. Dentre as técnicas empregadas para a remoção de endotoxinas de tais produtos, aquelas que se baseiam na afinidade entre duas moléculas são as mais eficazes. O princípio da afinidade entre as moléculas de endotoxinas e grupos positivamente carregados, imobilizados na estrutura de matrizes adsorventes, tem sido fortemente explorado para a despirogenação de soluções contendo biomoléculas muitas das quais constituintes de produtos com fins terapêuticos. A maioria dos trabalhos de pesquisa nessa área utiliza géis cromatográficos contendo ligantes de afinidade imobilizados. Contudo, esta técnica apresenta limitações operacionais para aplicação em larga escala, como a utilização de altas vazões. Alternativamente, a cromatografia em membrana de afinidade apresenta a vantagem da utilização de vazões mais altas, favorecida pelo transporte convectivo das moléculas através dos poros da membrana (Brandt et al., 1988; Unarska et al., 1990).

Diversos materiais têm sido utilizados para a obtenção de membranas por exemplo: celulose, álcool poli(etileno vinílico), álcool poli(vinílico), nylon recoberto com celulose, entre outros. Para a síntese de membranas, características como hidrofiliabilidade, baixa adsorção não específica e estabilidades química e física, são desejadas. Nos últimos anos, estudos têm-se intensificado na investigação do desempenho de matrizes derivadas de quitosana, visto que estas apresentam apropriadas características de hidrofiliabilidade e resistência mecânica, além da presença dos grupos hidroxila e amino disponíveis para o acoplamento de ligantes (Rinaudo e Domard, 1989; Zeng e Ruckenstein, 2000). A quitosana e seus derivados têm encontrado aplicação em diversas áreas como medicina e biotecnologia. Membranas de quitosana foram desenvolvidas por Zeng e Ruckenstein (1996) e empregadas como matrizes de afinidade para a purificação de diversas proteínas. Portanto, por apresentar uma estrutura carregada positivamente e uma afinidade por lipopolissacarídeos (Davydova, 2000), a utilização de matrizes de quitosana é promissora na remoção de moléculas negativamente carregadas como as endotoxinas.

1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de membrana porosa de quitosana e a avaliação do potencial da mesma na despirogenação de soluções de soro antiofídico. Para o estudo do processo de remoção de endotoxinas do soro hiperimune por filtração em membranas de quitosana, fez-se necessário a investigação da existência de competições entre as endotoxinas e os anticorpos do soro pelo sítio de adsorção. Desta forma, foram definidas etapas para a viabilização deste estudo que são as seguintes:

- 1) Síntese e caracterização das membranas de quitosana: a síntese foi baseada no método desenvolvido por Zeng e Ruckenstein (1996) associado a execução de dois planejamentos experimentais visando otimizar os fatores envolvidos na síntese de uma membrana que apresentasse vazão e resistência mecânica adequadas para a realização dos experimentos de filtração;

- 2) Verificação da existência de adsorção dos anticorpos do soro hiperimune nas membranas de quitosana: experimentos de adsorção de anticorpos foram realizados utilizando uma célula de ultrafiltração contendo uma membrana de quitosana suportada. Algumas soluções tamponantes a diferentes valores de pH foram estudadas;
- 3) Verificação da existência de adsorção de moléculas de endotoxinas a partir de soluções tamponantes em membranas de quitosana e determinação da solução tamponante que melhor favoreceu esta adsorção: neste estudo as soluções tamponantes acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 foram utilizadas por promoverem uma menor adsorção dos anticorpos do soro. Estas soluções tamponantes foram contaminadas artificialmente com endotoxinas em duas concentrações diferentes, 150 EU/mL e 1000 EU/mL, e utilizadas como solução de alimentação;
- 4) Despirogenação de soluções de soro antibotrópico contendo baixa concentração de anticorpos: neste estudo, as soluções foram contaminadas artificialmente com endotoxinas nas concentrações de 150 EU/mL e 1000 EU/mL e submetidas à filtração;
- 5) Despirogenação de soluções de soro antibotrópico contendo alta concentração de anticorpos. Estas soluções foram contaminadas artificialmente com endotoxinas nas concentrações de 150 EU/mL e 1000 EU/mL e submetidas à filtração.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Soro Antiofídico: relevância, constituição e produção

O soro antiofídico é o antídoto que neutraliza a ação do veneno de serpentes peçonhentas e consiste no único meio de tratamento de vítimas de acidentes ofídicos. Quando introduzido no organismo do homem ou de animais, o soro desencadeia um mecanismo de imunização passiva. Este mecanismo é utilizado quando se deseja uma resposta rápida do organismo como no caso de mordida de cobra peçonhenta, cujas toxinas do veneno injetado podem matar em pouco tempo. As serpentes peçonhentas no Brasil pertencem aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*, sendo que a maioria dos acidentes é causada pelas serpentes do gênero *Bothrops* (80 a 90%), seguido pelo *Crotalus* (10 a 20%) e pelos demais (1%).

Os soros são constituídos de anticorpos e são específicos para cada tipo de veneno inoculado. Anticorpos são proteínas denominadas genericamente imunoglobulinas (Ig) e têm a função de defesa contra agentes considerados estranhos ao organismo, os antígenos. Quimicamente, as imunoglobulinas são glicoproteínas constituídas de duas cadeias polipeptídicas leves (massa molecular em torno de 23,0 kDa) e duas cadeias polipeptídicas pesadas (massa molecular em torno de 50,0 a 70,0 kDa), resultando em massa molecular em torno de 150 kDa (Roitt et al., 1987). As classes de imunoglobulinas conhecidas são: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A molécula de imunoglobulina possui duas partes denominadas Fab (fragment adsorption binding) e uma parte chamada Fc (fragment complement), ligadas por uma região flexível (ligações dissulfeto). A parte Fab possui a função de ligar-se ao antígeno e a Fc é o local de ligação de complementos e receptores e varia conforme a classe de Ig (Vlug et al., 1989).

A demanda brasileira de soro antiofídico é cerca de 300.000 doses anuais que é suprida principalmente pelo Instituto Butantan (SP), seguido pela FUNED (MG) e pelo

Hospital Vital Brasil (RJ) (O Estado de São Paulo, 2001). A metodologia de obtenção do soro antiofídico foi desenvolvida pelo médico Vital Brasil no início do século passado e é utilizada até hoje. As etapas para a obtenção do soro antiofídico podem ser visualizadas na Figura 2.1.

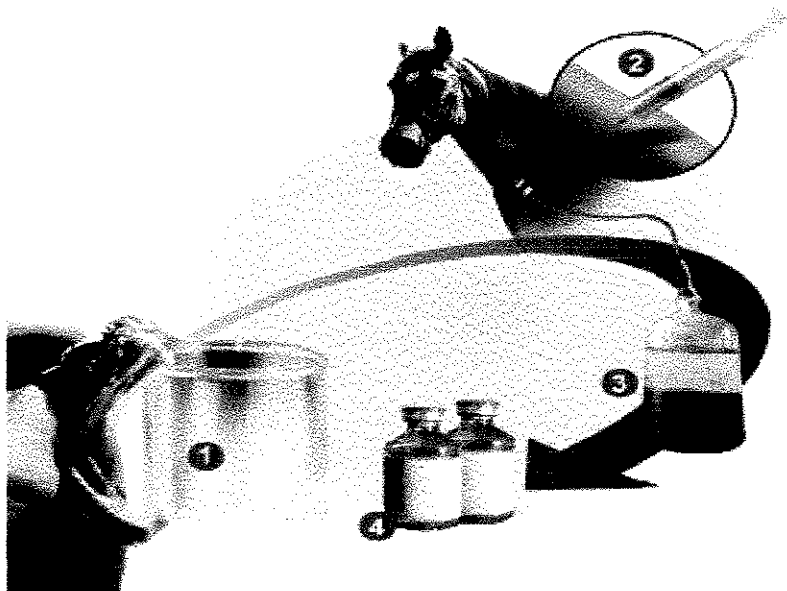


Figura 2.1: Ciclo de fabricação do soro antiofídico (Fonte: http://www.uol.com.br/novaescola/ed/141_abr01/html/comopq_ciencias.html. Acesso em: 20/11/01).

De acordo com a Figura 2.1 o soro é produzido da seguinte forma: primeiramente retira-se o veneno da serpente (1). Em seguida, injetam-se pequenas doses deste veneno no cavalo em intervalos de cinco dias (2). Passados 30 dias, o sistema imunológico do animal cria anticorpos que neutralizam a ação do veneno, sendo então retirados de 6 a 8 litros de sangue do cavalo em intervalos de 48 horas (3). Como a única parte utilizada do sangue é o plasma (solução rica em sais minerais, proteínas, hormônios e anticorpos), faz-se uma separação dos demais constituintes do sangue (hemácias e plaquetas) através de centrifugação. As moléculas de IgG presentes no plasma são tratadas com enzimas proteolíticas como a pepsina, que hidrolisam as ligações peptídicas da região flexível, produzindo um fragmento $F(ab')_2$ e vários peptídeos provenientes da hidrólise do

fragmento Fc (Figura 2.2). Finalmente, depois de uma série de etapas de purificação e formulação, o soro antiofídico, agora constituído basicamente de fragmentos $F(ab')_2$, é envasado e distribuído para os hospitais (4).

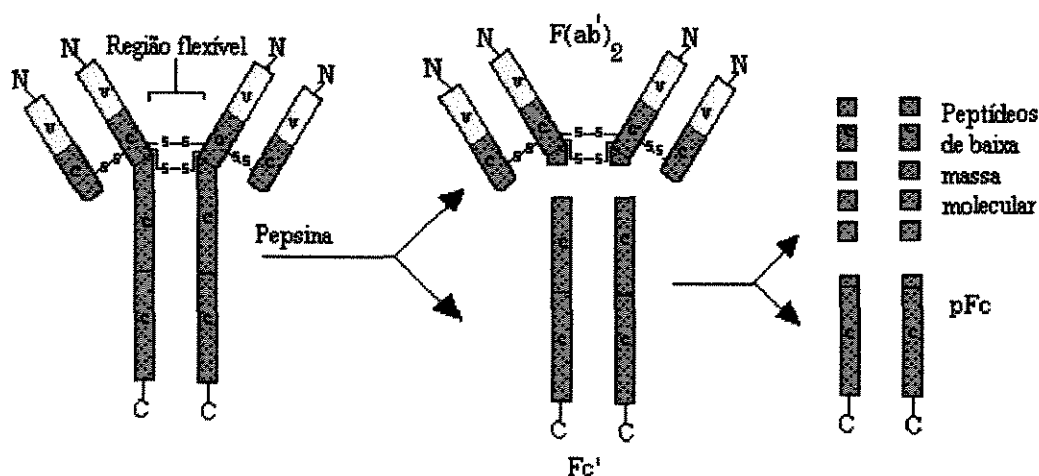


Figura 2.2: Tratamento enzimático da molécula de IgG por pepsina (Fonte: <http://ntri.tamuk.edu/immunology/ab-structure.html>. Acesso em: 26/11/01).

Apesar da eficácia comprovada, a soroterapia apresenta como inconveniente o desenvolvimento de efeitos colaterais pelo sistema imunológico das vítimas em tratamento, devido à utilização de anticorpos policlonais provenientes do soro do cavalo. Estudos para a produção de anticorpos em cultura de células através da tecnologia de hibridomas têm sido realizados. A vantagem de um produto a partir dessa tecnologia é a presença de um único tipo de molécula (anticorpo monoclonal) que é específica para o veneno da cobra (Natural Toxins Research Center, Texas A&M University, 2001).

No Brasil, uma outra forma de obtenção de soro encontra-se em estudo pelo departamento de farmacologia do Instituto Butantan juntamente com pesquisadores dos Institutos de Biociências e Ciências Biomédicas da USP (SP). Este método baseia-se na obtenção do veneno através do cultivo das células secretoras *in vitro* e posteriormente a obtenção do soro em laboratório (O Estado de São Paulo, 2001).

Durante a produção do soro antiofídico, medidas preventivas devem ser tomadas para evitar a presença indesejada de pirogênios, como endotoxinas, visando garantir uma administração segura às vítimas de acidentes ofídicos.

2.2. Endotoxinas: características e métodos de remoção

As moléculas conhecidas como endotoxinas foram descobertas há mais de 100 anos atrás, e têm demandado estudo constante da parte de pesquisadores em todo o mundo, devido a algumas peculiaridades (Petsh e Anspach, 2000). As endotoxinas (ETs) são complexos de alta massa molecular associados à membrana externa de bactérias Gram negativas, estas por sua vez se constituem na mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica.

Este pirogênio constitui em média três quartos da parede celular das bactérias e apesar de estarem firmemente ancoradas na parede celular, são continuamente liberadas nas vizinhanças da célula (Raetz, 1990). A liberação das endotoxinas acontece não só por ocasião da morte celular, mas também durante o crescimento e divisão bacterianos.

Sabe-se que as bactérias podem crescer em ambientes pobres em nutrientes, como por exemplo, a água mineral ou a água de uma piscina de natação. Por isso pode-se dizer que as endotoxinas estão presentes em praticamente todos os lugares. No entanto, altas concentrações só são encontradas em ambientes onde as bactérias se acumulam. Isto significa que suspensões bacterianas produzidas com a intenção de se obter um medicamento têm forte probabilidade de apresentar concentrações indesejáveis de endotoxinas. Quando presentes na corrente sanguínea do homem, causam efeitos adversos intensos mesmo a concentrações muito reduzidas. Sua presença pode ser devida a uma infecção bacteriana ou à aplicação intravenosa de um medicamento contaminado. No organismo, a ação das endotoxinas não se dá diretamente sobre as células ou órgãos, mas através da ativação do sistema imunológico, especialmente dos monócitos e dos macrófagos, os quais liberam mediadores, como o fator de necrose tumoral, várias interleucinas, prostaglandinas, fator de estímulo de colônias, e radicais livres (Pabst e Johnston, 1989). Os efeitos são: alteração da estrutura e função das células e órgãos, mudança das funções metabólicas, aumento da temperatura corpórea, alteração da cascata

de coagulação sanguínea e modificação da hemodinâmica causando choques, podendo levar até a morte (Martich et al, 1993).

O limite máximo da presença de endotoxinas em aplicações intravenosas em unidades de endotoxinas por quilograma de massa corpórea é de 5 EU/kg pela European Pharmacopoeia é de 0,2 EU/kg pela FDA. O termo *EU* descreve a atividade biológica de uma endotoxina sendo que para efeito de simplificação, é costume considerar 1 *EU* como 100 pg de endotoxina.

Quimicamente, as endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) que consistem de três partes diferentes, no aspecto químico e biológico, um componente heteropolissacarídeo denominado de antígeno O, um componente oligossacarídeo que fica na parte central da cadeia polimérica e um componente lipídico, denominado de lipídeo A (Petsch e Anspach, 2000). A localização e estrutura das ETs podem ser visualizadas na Figura 2.3.

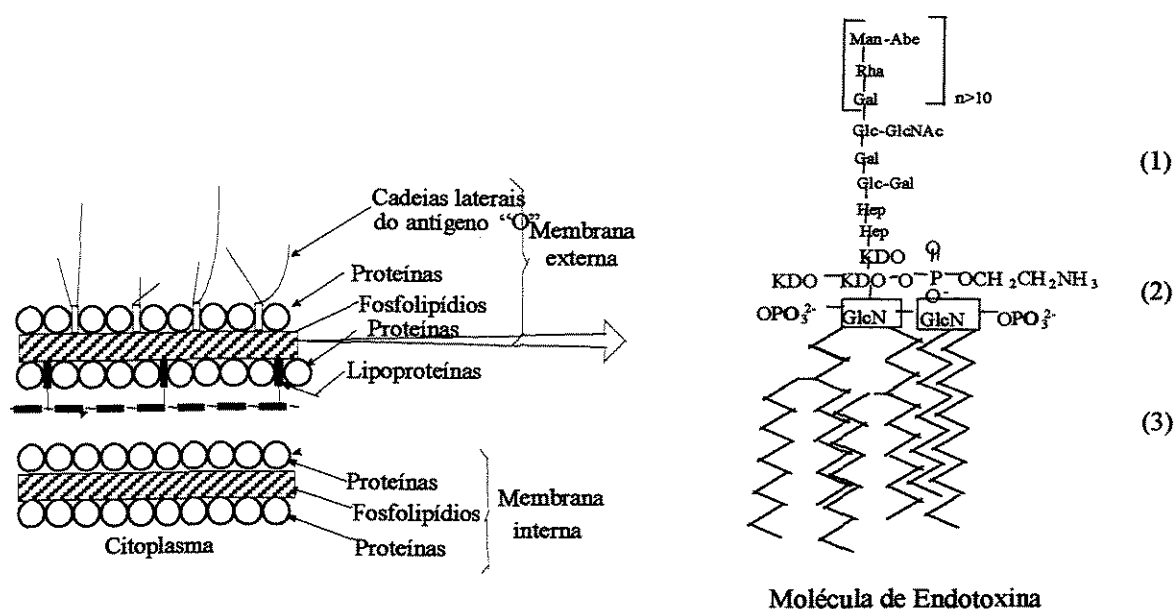


Figura 2.3: Esquema da localização das moléculas de endotoxinas na estrutura da parede das bactérias Gram negativas e estrutura química das Endotoxinas. (1) Antígeno O, (2) Oligossacarídeo central e (3) Lipídeo A.

O lipídeo A é a parte toxicamente ativa da endotoxina e salvo algumas poucas exceções (Mayer e Weckesser, 1984), apresenta estruturas muito similares em diferentes gêneros de bactéria. A região central da molécula, próxima ao lipídeo A e o próprio lipídeo

A, são parcialmente fosforilados ($pK_1 = 1,3$; $pK_2 = 8,2$, dos grupos fosfato do lipídeo A) (Hou e Zaniewski, 1990). Por isso, as endotoxinas apresentam carga líquida negativa em soluções com pH acima de 1,3.

As endotoxinas apresentam uma massa molecular cerca de 10-20 kDa, dependendo principalmente da linhagem microbiana; são moléculas termo-resistentes e praticamente insensíveis a variações no pH. Além disso, possuem a capacidade de formar agregados moleculares quando em meio aquoso tornando-se ainda mais resistentes.

A agregação dos monômeros de ETs é governada por interações não polares entre as cadeias de carbono do lipídeo A ou por pontes formadas por íons divalentes entre os grupos fosfato, formando micelas ($MM < 1000$ kDa) e vesículas ($MM > 1000$ kDa) (Anspach e Petsch, 2000; Kang e Luo, 1998). O equilíbrio entre os monômeros agregados é influenciado por detergentes e agentes quelantes, ou ainda pela presença de proteínas (Li e Luo, 1997). A agregação de endotoxinas com proteínas também pode ocorrer e irá depender das propriedades da proteína (por exemplo, carga líquida e hidrofobicidade) e das condições da solução (pH e força iônica) (Anspach e Petsch, 2000).

A interação com proteínas básicas ($pI > 7$) tais como lisozima, ribonuclease A e imunoglobulina humana, apresentam como principal força motriz as interações eletrostáticas. Com relação à interação com proteínas neutras e mesmo com proteínas ácidas ($pI < 7$) outros mecanismos de interações devem existir. Como estas interações ocorrem ainda encontra-se em estudo, pois apesar de interações hidrofóbicas com proteínas serem concebíveis, ainda não há uma forte evidência de que estas governem o mecanismo de interação (Petsch e Anspach, 2000).

Como dito anteriormente, as influências da força iônica e do pH da solução também têm desempenhado um importante papel nas interações entre proteínas e ETs. Em estudo recente, Kang e Luo (2000) investigaram os efeitos da força iônica e pH na eficiência da remoção de ETs e recuperação de proteína em cromatografia de afinidade. Em soluções de alimentação hemoglobina-ETs preparadas com solução de NaCl e com $CaCl_2$, a eficiência na remoção de ETs diminuiu quando a força iônica foi aumentada de 0 para 0,25 M para ambas as soluções. Da mesma forma o aumento no pH, promoveu uma

redução significativa na eficiência de remoção de ETs. Por outro lado, com relação a recuperação de proteínas ambos força iônica e pH não exerceram influência significativa.

De um modo geral, a capacidade de agregamento de ETs dificulta a sua remoção principalmente de soluções protéicas. As pesquisas desenvolvidas mostram que a complexação de ETs com proteínas resultam em uma baixa recuperação das proteínas, ou em uma subestimação da concentração de endotoxinas no produto. A presença dos íons, principalmente bivalentes, minimiza a perda das proteínas contudo dificulta a remoção das ETs. No caso do pH da solução, as interações dependerão do pI da proteína. Portanto, devido às implicações apresentadas a remoção de endotoxinas de soluções protéicas apresenta-se como um desafio aos pesquisadores da área e às indústrias biotecnológica e farmacêutica.

A despirogenação de produtos com finalidade terapêutica é de grande importância para garantir a administração segura em pacientes. Contudo, não tem sido uma tarefa fácil partindo-se da necessidade de remover as endotoxinas, preservando as proteínas contidas nestes produtos. O termo despirogenação refere-se de um modo geral à remoção de pirogênicos, entretanto neste trabalho será aplicado especificamente para a remoção de ETs. As técnicas utilizadas para despirogenação podem ser visualizadas na Figura 2.4.

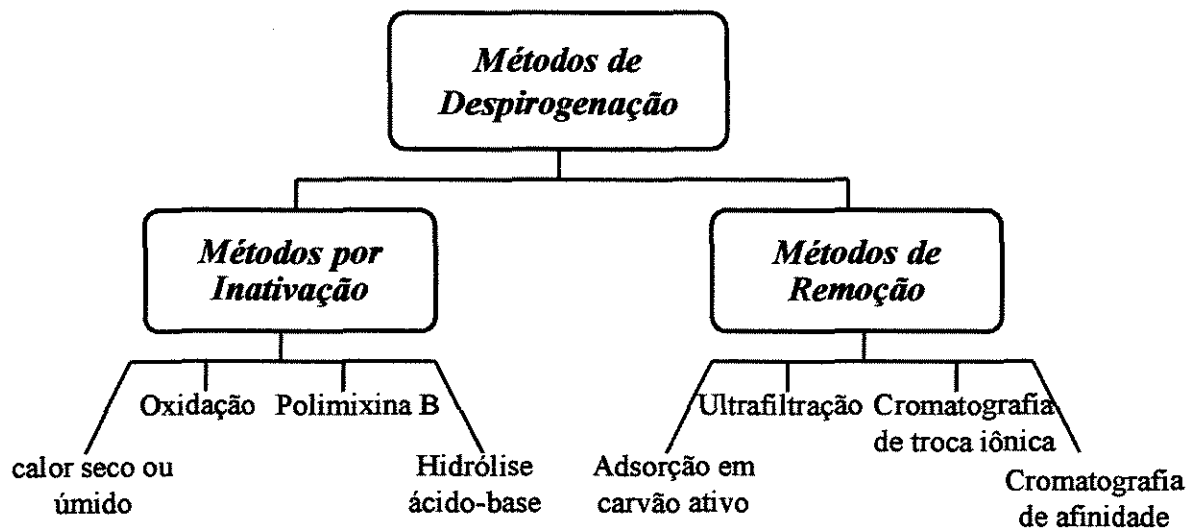


Figura 2.4: Representação esquemática dos processos de despirogenação (Acconci, 1998).

A inativação ocorre pela perda da toxicidade da molécula de LPS usando tratamentos químicos ou físicos. Esses tratamentos são geralmente utilizados para despirogenizar equipamentos ou soluções que podem ser submetidas a condições extremas (Anspach e Hilberck 1995; Nakata, 1994), entretanto tais condições não são adequadas para o caso de soluções que contenham proteínas a fim de evitar a desnaturação das mesmas.

Vários métodos podem ser empregados para a remoção de endotoxinas de soluções protéicas, os quais são baseados nas características físicas e químicas das moléculas tais como massa molecular, tamanho, hidrofobicidade, carga eletrostática ou ainda nas propriedades das endotoxinas em ligar-se a alguns tipos de moléculas quando estas são imobilizadas em suportes sólidos. A escolha adequada da técnica a ser empregada depende da molécula de interesse presente na solução contaminada, do nível de endotoxinas nesta, do custo do processo e de fatores particulares de cada solução.

A ultrafiltração apresenta bons resultados para a despirogenação de água e produtos constituídos de moléculas de baixa massa molecular, tornando-se ineficiente para o caso de formação de complexo proteína-endotoxina e para a despirogenação de produtos com moléculas de alta massa molecular como anticorpos e enzimas (Schindler e Dinarello, 1989). A cromatografia de troca iônica apresenta baixa seletividade, levando a perdas consideráveis das moléculas do produto (Neidhart et al., 1992).

O princípio da afinidade entre as moléculas de endotoxinas e grupos positivamente carregados, imobilizados na estrutura de matrizes adsorventes, tem sido fortemente explorado para a despirogenação de biomoléculas, tais como soluções de albumina de soro bovino, albumina de soro humano, IgG humana, IgG de cavalo entre outras, muitas das quais são constituintes de produtos com fins terapêuticos (Helander e Vaara, 1987; Talmadge et Siebert, 1989; Anspach e Hilbeck, 1995; Petsch et al., 1997; Minobe et al. 1988; Matsumae et al., 1990; Petsch e Anspach, 2000). Estes adsorventes, dependendo das condições operacionais empregadas, removem endotoxinas de soluções protéicas sem provocar a desnaturação ou perda significativa do produto. As técnicas empregadas com base nesse princípio são a cromatografia de afinidade e a filtração em membranas de afinidade, sendo que esta última apresenta a vantagem da utilização de vazões mais altas favorecida pelo transporte convectivo das moléculas através dos poros da membrana (Brandt et al., 1988; Unarska et al., 1990).

2.3. Utilização de membranas de afinidade para a despirogenação de soluções protéicas

O método de filtração em membranas de afinidade combina duas operações: a filtração com a adsorção. O princípio da separação consiste na adsorção da biomolécula de interesse no ligante, sendo este último imobilizado diretamente na superfície e no interior dos poros da membrana. Assim, a solução contendo a biomolécula a separar é forçada a passar através da membrana. As moléculas grandes, que não atravessam os poros, são eliminadas na linha do retido, enquanto que as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde o ligante está imobilizado. A adsorção da biomolécula representa a primeira etapa da separação, na qual todas as moléculas não adsorvidas são eliminadas na linha do filtrado. A eluição representa a segunda etapa, onde a biomolécula é dessorvida do suporte sólido, podendo ser recuperada, se ela for o produto de interesse, ou descartada, se ela for um contaminante.

Quando o fluido passa através dos poros da membrana, o transporte das moléculas da superfície ao interior dos poros é regido pela convecção e não pela difusão, ao contrário dos géis cromatográficos. Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante (Unarska et al., 1990). Portanto, a vantagem no caso das membranas é que a vazão máxima aplicada pode ser muito maior que para um gel de afinidade.

Petsch e colaboradores (1997, 1998, 2000) investigaram a despirogenação de soluções de proteínas modelo tais como BSA e lisozima utilizando membranas planas de microfiltração e membrana de fibra oca funcionalizadas com diversos ligantes tais como, histamina, histidina, poli(etileneimina), entre outros. Estes trabalhos apresentaram bons resultados para a remoção de ETs, visto que as concentrações de ETs remanescentes encontravam-se dentro do limite estipulado pela FDA. Além disso, foi observado que o pH era o mais importante fator para a otimização do processo de remoção.

Legallais e colaboradores (1997) utilizaram membranas de fibra oca de álcool poli(etileno vinílico) com histidina imobilizada (His-PEVA) para a despirogenação de soluções de IgG humana e anticorpo monoclonal anti-CD4 (MabCD4). O sistema (His-PEVA) não apresentou afinidade pelo anticorpo monoclonal, favorecendo a adsorção das

ET com a preservação dos constituintes da solução de (MabCD4). No caso das IgGs investigou-se condições de operação para favorecer a despirogenação, por ser conhecido que as moléculas de IgG humana são adsorvidas por histidina imobilizada (Bueno et al., 1995A; Bueno et al., 1995B; Bueno et al., 1996).

Em trabalho recente, Acconci e colaboradores (2000) estudaram a despirogenação de soro antiofídico em histidina imobilizada em fibras ocas de PEVA explorando a afinidade já conhecida deste ligante pela molécula de endotoxina obtendo excelentes resultados. Em condições de operação otimizadas, a remoção quase completa de ETs (99%) sem perda significativa de anticorpos do soro foi alcançada.

Em todos esses trabalhos, as membranas utilizadas foram obtidas comercialmente cujas características físicas e químicas encontram-se bem estudadas na literatura e/ou definidas pelo fabricante. Na busca de moléculas e materiais adsorventes seletivos para endotoxinas objetivando a sua remoção, a quitosana foi introduzida como material alternativo para esta finalidade.

2.4. Quitosana: características e aplicações

A quitosana, poli(2-amino-2-deoxi-D-glicose), é um polímero natural que corresponde a forma pouco acetilada da quitina, esta por sua vez é o segundo biopolímero mais abundante na natureza. Atualmente a quitina é obtida, principalmente, de carapaças externas de crustáceos tais como caranguejo e camarão (Chandrkachang e Wanichpongpan, 2000). Ao contrário da quitina, a quitosana é solúvel em ácidos orgânicos diluídos como o ácido fórmico, acético, oxálico, cítrico, entre outros, o que favorece a sua utilização a partir de uma forma solúvel. A solubilidade da quitosana obtida está relacionada aos variáveis graus de desacetilação da quitina utilizada, por exemplo, quitosanas com grau de desacetilação abaixo de 40% são solúveis na faixa de pH de 4 a 9, enquanto que quitosanas com maior grau de desacetilação precipitam entre pH 6,5 e 7,5 (Varum et al., 1994). Um processamento típico de obtenção da quitosana é mostrado na Figura 2.5.

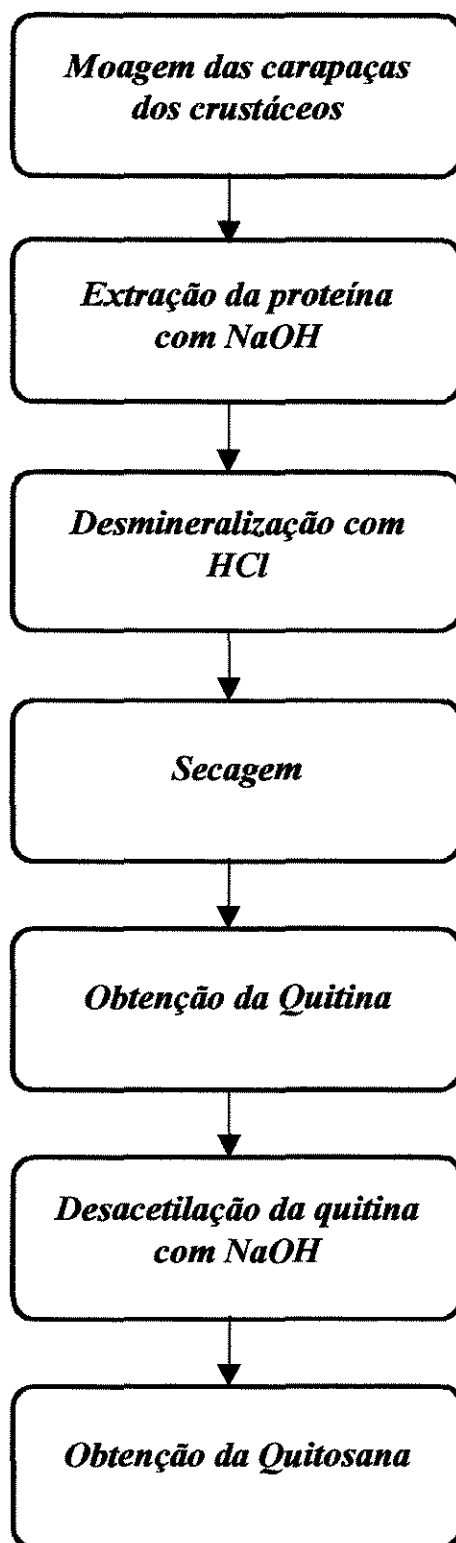


Figura 2.5: Esquema simplificado para obtenção de quitosana a partir de carapaças de crustáceos (Arruda, 1999).

Tabela 2.1. Fração dos grupos aminos não protonados (α) em função do pH.

pKa	α			
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
6,3	0,04	0,33	0,83	0,98
7,0	0,01	0,1	0,5	0,91

A aplicação da quitosana e seus derivados é bastante vasta. Na área médica, por exemplo, tem-se: bandagens hemostáticas, fibras para sutura, lentes de contato, sistema para liberação controlada de drogas, entre outros (Arruda, 1999).

Propriedades da quitosana como não toxicidade, habilidade floculante e afinidade por metais pesados, favorecem a sua aplicação em processos de tratamento de rejeitos (Lalov et al., 2000), e como quelante natural de metais pesados e radioativos.

A aplicação da quitosana na área de purificação de biomoléculas, como matrizes para a imobilização de ligantes tem sido explorada desde a década de 70, sendo que o interesse por este biopolímero intensificou-se nos últimos anos. Isto se deve à sua hidrofiliabilidade e presença de uma grande quantidade de grupos OH e NH₂, os quais podem ser ativados e reagir com ligantes de origem biológica ou não. Os grupos amino-reativos presentes ao longo da cadeia polimérica conferem à quitosana características policatiônicas a valores de pH mais baixos (Rinaudo e Domard, 1989; Zeng e Ruckenstein, 1999) (pKa na faixa de pH de 6,3 a 7,0). Quanto a hidrofiliabilidade, embora seja uma característica desejada para síntese ou recobrimento de adsorventes, a resistência mecânica deste material é baixa quando úmido (Wei et al., 1992). Esta dificuldade tem sido superada através da reticulação por agentes bifuncionais, sob condições adequadas. Boas características mecânicas de matrizes de quitosana têm sido alcançadas através da reticulação com glutaraldeído, epícloridrina, etileno glicol diglicidil éter, entre outros (Beppu, 1999; Arruda, 1999; Zeng e Ruckenstein, 1996; Zeng e Ruckenstein, 1998b).

A síntese de membranas porosas de quitosana tem sido desenvolvida por diversos autores para finalidades específicas. Membranas obtidas por coagulação em NaOH e modificadas com glutaraldeído, ou pela adição de poli(ácido acrílico), foram elaboradas

para estudos de calcificação de quitosana *in vitro* (Beppu, 1999). Estas membranas apresentaram uma porosidade razoavelmente controlada. Chandrkrachang e Wanichpongpan (2000) desenvolveram um método de obtenção de membranas de quitosana para utilização em processos de ultrafiltração, utilizando glutamato monossódico como agente formador de poros. As membranas apresentaram boas características mecânicas e de porosidade. Membranas macroporosas de quitina e quitosana com porosidade controlada e boas propriedades mecânicas, foram desenvolvidas pelos pesquisadores Zeng e Ruckenstein (1996), utilizando sílica gel como agente formador de poros. O desempenho destas membranas foi observado como suporte para imobilização de ligantes de afinidade com a finalidade de separar diversas proteínas, tais como albumina, tripsina e lisozima (Zeng e Ruckenstein, 1996b; Zeng e Ruckenstein, 1998a; Zeng e Ruckenstein, 1998b).

Além das características já apresentadas, estudos recentes mostraram que a interação entre quitosana e endotoxinas está além da natureza eletrostática. Segundo Davydova e colaboradores (2000), a quitosana revela uma afinidade para LPS principalmente quando quitosanas de baixa massa molecular são utilizadas. O mecanismo de interação é bastante complicado e depende tanto da organização macromolecular da ET quanto do grau de polimerização da quitosana. A diferença na interação entre ETs e quitosana de baixa e alta massa molecular é explicada pelas diferenças conformacionais.

Portanto, a hidrofilicidade, resistência mecânica, a presença de numerosos grupos amino-reativos e a afinidade por LPS tornam essa membrana promissora na tarefa de remover ETs em condições de pH apropriadas (Zeng e Ruckenstein, 1999). Considerando as características citadas e a ausência de informações na literatura sobre a utilização de membranas de quitosana como suporte adsorativo para a essa finalidade, a motivação deste trabalho encontra-se em investigar a aplicação destas membranas em processos de despirogenação, visando contribuir com as pesquisas desenvolvidas nessa área.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é dividido em duas seções: 1) listagem dos principais materiais utilizados e 2) Descrição dos métodos aplicados neste trabalho. A seção de métodos apresenta quatro subdivisões que são: 1) Obtenção do adsorvente, 2) Caracterização do adsorvente e 3) Experimentos de adsorção de proteínas do soro e 4) Experimentos de adsorção de endotoxinas de soluções artificialmente contaminadas.

3.1. Materiais

Quitosana de carapaças de caranguejo (85% desacetilada), sílica gel para HPLC (99% de pureza) com tamanho médio 15-40 μm , anti-soro total de cavalo, anti-IgG de cavalo e agarose (reagente para eletroforese, EEO:0,09-0,13) foram obtidos da Sigma (EUA). Ácido acético glacial foi adquirido da Ecibra (Brasil), Coomassie Brilliant Blue R 250 foi adquirido da Bio-Rad (EUA). Filme plástico de preparação do gel para imunoeletroforese foi obtido da Pharmacia (EUA). Álcool etílico absoluto foi obtido da VETEC (Brasil). Fosfato de sódio monobásico e dibásico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e cloreto de sódio foram adquiridos da Synth (Brasil). Soro antibotrópico apirogênico foi adquirido do Instituto Butantan (Brasil). Epicloridrina, trishidroximetil amino metano (Tris) e acetato de sódio anidro adquiridos da Merck (Alemanha), foram utilizados. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (Millipore, EUA).

Os experimentos de adsorção foram realizados utilizando membranas de quitosana obtidas em nosso laboratório. A membrana apresentava um diâmetro de 4,5 cm e era suportada em uma célula de ultrafiltração AMICON, modelo 8050 (Millipore, EUA). Placas de Petri da marca ANUMBRA (Brasil) com diâmetro interno de 7,0 cm e altura de 1,0 cm foram utilizadas como molde para a obtenção das membranas. Nos experimentos com endotoxinas, as soluções foram preparadas com água apirogênica para injeção da marca ARISTON. O kit QCL-1000 para quantificação de endotoxinas foi adquirido da BioWhittaker (EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção da matriz adsorvente

O procedimento desenvolvido por Zeng e Ruckenstein (1996a) para a obtenção de membrana porosa de quitosana foi utilizado como base para a obtenção das membranas porosas de quitosana utilizadas neste trabalho. Neste procedimento utiliza-se sílica gel com tamanho médio de partículas de 15 a 40µm como o agente formador de poros.

3.2.1.1. Síntese das membranas porosas de quitosana

As membranas foram preparadas a partir de uma solução de quitosana 1% em massa. Flocos de quitosana foram adicionados a uma solução de ácido acético 1% e dispersos por agitação. A solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por um período de 24 a 48 horas para a completa solubilização dos flocos. A solução foi filtrada em filtro de placa sinterizada G1 para a remoção dos insolúveis. A esta solução adicionou-se uma massa de sílica gel correspondente a uma proporção final desejada de massa de sílica em relação a massa de quitosana existente na solução. Em seguida, a solução foi aquecida entre 40 e 50°C e desgaseificada a vácuo. A solução foi agitada vigorosamente para promover a dispersão da sílica e imediatamente espalhada em placas de vidro com 7,0 cm de diâmetro. As placas foram colocadas em dessecador sob condição de vácuo até o desaparecimento completo das bolhas de ar existentes (aproximadamente 15 minutos). As membranas foram secas em estufa a 80°C por 5 horas e neutralizadas por imersão em uma solução de NaOH com concentração de 0,5 a 2,0 M a uma temperatura entre 60 e 100°C por um período de 1 a 3 horas. Essa condição de neutralização é para promover tanto a neutralização da membrana quanto a dissolução da sílica gerando assim os poros.

As membranas porosas foram lavadas com água destilada até a completa remoção do NaOH e em seguida foram armazenadas em água ultrapura sob refrigeração. A Figura 3.1 apresenta o esquema genérico de preparação das membranas.

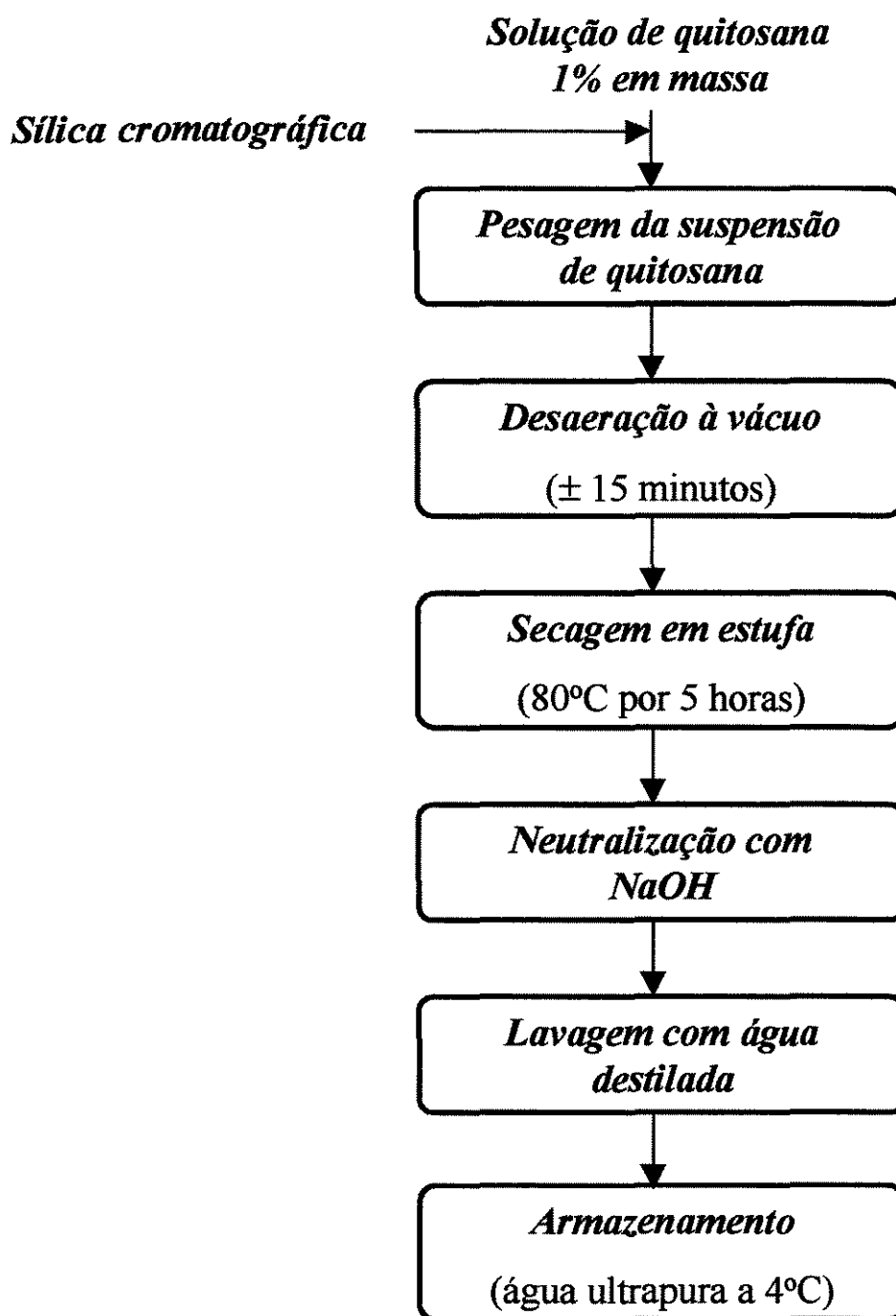


Figura 3.1: Fluxograma genérico de preparação das membranas porosas de quitosana.

3.2.1.2. Planejamento experimental

Com a finalidade de se conhecer as condições adequadas de preparação das membranas fez-se um estudo estatístico em 2 etapas. A primeira etapa foi a execução de um planejamento fatorial fracionário para a determinação das variáveis que exerciam efeitos significativos na síntese das membranas mais 3 ensaios no ponto central para permitir o cálculo do erro experimental (erro puro). Para isso, foram selecionados 5 fatores que exerciam influência na síntese das membranas e fixados 2 níveis para estudo. Um planejamento fatorial completo com 5 variáveis e 2 níveis gera 132 (2^5) experimentos para investigar todas as combinações possíveis de fatores. A fim de se estudar a influência das 5 variáveis escolhidas realizando um número mínimo de experimentos utilizou-se um fatorial fracionário 2^{5-2} , reduzindo a superfície de estudo a 8 experimentos ($2^{5-2}=2^3$) de acordo com Barros Neto et al. (1995). Realizou-se nesta etapa um total de 11 experimentos, sendo 8 experimentos referentes ao planejamento fatorial fracionário e 3 ensaios no ponto central. Os fatores estudados foram: tempo de neutralização (t_{Neut}), temperatura de neutralização (T_{Neut}), massa inicial de solução de quitosana (M_i), concentração da solução de NaOH (C_{NaOH}) e quantidade de sílica adicionada a solução em relação a massa de quitosana (S:Q) presente na mesma. Foram mantidos constantes os fatores: tempo de secagem e temperatura de secagem. A resposta analisada foi a vazão (mL/min). A morfologia das membranas foi acompanhada por microscopia eletrônica de varredura para a visualização da estrutura porosa.

Nos ensaios preliminares utilizou-se placas molde com 4,5 cm de diâmetro e neste caso a membrana obtida era utilizada inteiramente. Contudo, visando aproveitar somente a região central da membrana que apresentava uma maior homogeneidade, decidiu-se fazer uma membrana com uma área maior utilizando placas molde de 7,0 cm de diâmetro. A determinação da nova massa foi feita por regra de três simples levando em consideração a quantidade de solução necessária para formar uma membrana com a mesma espessura que as anteriores. Na Tabela 3.1 são mostradas as massas preliminares e as massas finais para cada ensaio do planejamento experimental.

As condições determinadas para os fatores constantes e variáveis estão apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.1. Massa de solução de quitosana referente aos ensaios do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} .

Ensaio	Espessura (μm)	Massa preliminar* (g)	Massa final* (g)
1	132,5	3,0	7,3
2	162,5	3,0	7,3
3	130,0	3,0	7,3
4	167,5	3,0	7,3
5	125,0	7,0	17,0
6	140,0	7,0	17,0
7	182,5	7,0	17,0
8	157,5	7,0	17,0
9	155,0	5,0	12,0
10	152,5	5,0	12,0
11	155,0	5,0	12,0

*Massa preliminar: membranas produzidas em placas de 4,5 cm de diâmetro

*Massa final: membranas produzidas em placas de 7,0 cm de diâmetro

Tabela 3.2. Fatores utilizados para a realização do planejamento fracionário 2^{5-2} .

Fatores	Condição	Valores
Tempo de secagem	Constante	5 horas
Temperatura de secagem	Constante	80°C
Tempo de neutralização	Variável	1 a 3 horas
Temperatura de neutralização	Variável	60 a 100°C
Massa inicial da solução de quitosana	Variável	3 a 7 g
Concentração de NaOH	Variável	0,5 a 2,0 M
Proporção sílica-quitosana	Variável	2:1 a 16:1

A designação dos níveis inferior e superior para os valores das variáveis é representada pelos sinais (-) e (+), respectivamente. Para os valores do ponto central utiliza-se a conotação de zero (0) como visto na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para estudar os efeitos de 5 fatores sobre a variável-resposta Vazão.

Ensaio	t_{Neut}	T_{Neut}	M_i	C_{NaOH}	S:Q
1	1,0(-)	60(-)	7,3(-)	0,5(-)	16:1(+)
2	3,0(+)	60(-)	7,3(-)	2,0(+)	2:1(-)
3	1,0(-)	100(+)	7,3(-)	2,0(+)	2:1(-)
4	3,0(+)	100(+)	7,3(-)	0,5(-)	16:1(+)
5	1,0(-)	60(-)	17,0(+)	2,0(+)	16:1(+)
6	3,0(+)	60(-)	17,0(+)	0,5(-)	2:1(-)
7	1,0(-)	100(+)	17,0(+)	0,5(-)	2:1(-)
8	3,0(+)	100(+)	17,0(+)	2,0(+)	16:1(+)
9	2,0(0)	80(0)	12,0(0)	1,25(0)	9:1(0)
10	2,0(0)	80(0)	12,0(0)	1,25(0)	9:1(0)
11	2,0(0)	80(0)	12,0(0)	1,25(0)	9:1(0)

Na segunda etapa executou-se um planejamento fatorial completo 2^2 (níveis -1 e +1) com pontos axiais $-\alpha$ e $+\alpha$ (configuração estrela) mais uma triplicata no ponto central (nível 0). Para a determinação dos pontos axiais utilizou-se a equação 3.1. O planejamento completo ajusta o experimento a um modelo linear, a triplicata no ponto central permite o cálculo do erro experimental (erro puro) e o planejamento estrela ajusta o experimento a um modelo quadrático, para um determinado intervalo de confiança. Realizou-se nesta etapa um total de 11 experimentos, sendo 4 experimentos referentes ao planejamento completo, 3 ensaios no ponto central e 4 referentes ao planejamento estrela. Os fatores estudados foram a massa inicial da solução de quitosana (M_i) e a proporção sílica-quitosana (S:Q), mantendo-se os demais fatores constantes. Nesta etapa estudou-se a influência destes fatores sobre duas variáveis-resposta, a vazão e a tensão. Na Tabela 3.4 são apresentadas as condições para os fatores bem como os valores determinados para estes. Os valores dos níveis dos fatores estudados neste planejamento são apresentados na Tabela 3.5.

$$\alpha = 2^{n/4} \quad (3.1)$$

onde n é o número de variáveis estudadas.

Tabela 3.4. Fatores estudados no planejamento completo 2^2 com pontos axiais.

Fatores	Condição	Valores
Tempo de secagem	Constante	5 horas
Temperatura de secagem	Constante	80°C
Tempo de neutralização	Constante	2 horas
Temperatura de neutralização	Constante	80°C
Massa inicial da solução de quitosana	Variável	3 a 5 g
Concentração de NaOH	Constante	1,25 M
Proporção sílica-quitosana	Variável	12:1 a 20:1

Tabela 3.5. Planejamento completo 2^2 com pontos axiais para estudar os efeitos da massa inicial da solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a Vazão e a Tensão.

Ensaio	M_i	S:Q
1	8,0(-)	13,2:1(-)
2	11,4(+)	13,2:1(-)
3	8,0(-)	18,8:1(+)
4	11,4(+)	18,8:1(+)
5	9,7(0)	16:1(0)
6	9,7(0)	16:1(0)
7	9,7(0)	16:1(0)
8	7,3(-2 ^{1/2})	16:1(0)
9	9,7(0)	20:1(+2 ^{1/2})
10	12,0(+2 ^{1/2})	16:1(0)
11	9,7(0)	12:1(-2 ^{1/2})

A análise dos fatores, nas duas etapas do planejamento, foi realizada através do programa Statistica versão 5.0 da Microsoft. A validação dos modelos propostos a partir da análise dos efeitos foi feita através de uma análise de variância (ANOVA). Esta análise, consiste na determinação do valor $F_{\text{calculado}}$, pela razão entre a média quadrática devido a regressão e a média quadrática residual (MQ_R/MQ_r), e da comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para os mesmos valores de graus de liberdade da regressão, graus de

liberdade dos resíduos e nível de confiança. Para que o modelo seja considerado significativo estatisticamente e preditivo, o $F_{\text{calculado}}$ deve ser pelo menos 4 vezes maior que o F_{tabelado} .

3.2.1.3. Reticulação das membranas de quitosana

Na purificação de biomoléculas por cromatografia, é comum utilizar-se a diminuição do pH do tampão para a eluição de moléculas adsorvidas, portanto é desejada uma estabilidade química da matriz e do ligante a serem utilizados. As membranas de quitosana são muito estáveis em pH neutro ou alcalino, contudo são solúveis em meios ácidos, por isso para a sua utilização em cromatografia, torna-se necessário a sua reticulação por agentes bifuncionais. A reticulação melhora consideravelmente a resistência química de materiais poliméricos e a resistência física de filmes úmidos de quitosana (Mayer e Kaplan, 1991). O inconveniente é a diminuição dos grupos funcionais e, conseqüentemente, a diminuição da densidade de ligantes. A quitosana apresenta dois grupos funcionais reativos que são OH e NH_2 , sendo este último o mais importante para a finalidade deste trabalho. Existem diversos agentes bifuncionais de reticulação como glutaraldeído (Beppu, 1999) e epícloridrina (Zeng e Ruckenstein, 1996), onde cada reticulante, dependendo das condições do meio reacional, reagirá mais facilmente com um ou com outro grupo da matriz.

O agente reticulador utilizado neste trabalho foi a epícloridrina como sugerido por Wei et al. (1992) pelo fato de em condições básicas brandas, reagir mais intensamente com os grupos OH, preservando assim os grupos amino-reativos. As membranas foram imersas em uma solução 0,01 M de epícloridrina contendo 0,067 M de NaOH (pH 10). A solução contendo a membrana ficou sob uma leve agitação por 2 h a 50°C. Em seguida as membranas foram lavadas com água destilada (até a condição de pH próximo ao da água destilada) e armazenadas em água ultrapura a 4°C.

3.2.2. Caracterização da matriz adsorvente

3.2.2.1. Espessura

A espessura das membranas de quitosana foi medida utilizando-se um micrômetro manual DIGIMESS (0 a 25mm). Fez-se quatro medições, de 90° em 90°, ao longo da

extensão da membrana. A espessura final foi determinada pela média aritmética dos valores obtidos.

3.2.2.2. Vazão de água através da membrana de quitosana

A vazão de água através das membranas foi medida com a finalidade de verificar o desempenho da membrana de quitosana na operação de filtração. Esta medida foi utilizada como parâmetro de resposta dos planejamentos experimentais realizados. A membrana foi suportada em uma célula de ultrafiltração AMICON (modelo 8050). Um volume de 15 mL de água ultrapura foi alimentado ao sistema de filtração e o efluente foi coletado em um bécker. O tempo gasto para a passagem desse volume através da membrana foi determinado. Os experimentos foram realizados em bancada à pressão atmosférica. As medidas foram feitas em triplicata e para cada lado da membrana, lado imediatamente em contato com a solução neutralizante e lado em contato com a placa molde.

3.2.2.3. Porosidade no estado úmido

A porosidade foi determinada de modo indireto conforme Zeng e Ruckenstein (1996). A membrana, retirada da água (armazenagem), foi levemente seca em papel absorvente por aproximadamente 1 minuto e pesada. Este valor corresponde à massa no estado úmido. Em seguida, foi colocada em um filtro de placa sinterizada e submetida a sucção por aproximadamente 3 minutos. Este tempo refere-se ao ponto até onde não se observou alguma alteração visual na estrutura da membrana. Cita-se como exemplo de uma alteração visual o aparecimento de pontos brancos na área próxima às bordas e o enrugamento das mesmas. Após este tempo, a membrana foi novamente pesada e este correspondeu à massa no estado seco. O experimento foi realizado em triplicata. A porosidade foi calculada aplicando-se a equação 3.2.

$$Porosidade(\%) = \left(\frac{M_2 - M_1}{d_{H_2O}} \right) \times \frac{1}{V} \times 100 \quad (3.2)$$

onde:

M_1 = massa da membrana no estado seco

M_2 = massa da membrana no estado úmido

d_{H_2O} = densidade da água a 20°C

V = volume da membrana no estado úmido

3.2.2.4. Resistência mecânica

As propriedades mecânicas podem ser utilizadas para fornecer dados a pesquisa e desenvolvimento de projeto de engenharia bem como o controle de qualidade e especificação de materiais (ASTM, 1995). As membranas de quitosana foram submetidas a testes de tensão e deformação de acordo com o método ASTM D882-95a que cobre a determinação de propriedades mecânicas de plásticos na forma de fina placa, incluindo filmes com espessura menor que 1,0 mm. As análises foram desenvolvidas na Máquina Universal de ensaios, modelo DL-2000, série 066-EMIC do Instituto de Química (IQ-UNICAMP). Utilizou-se uma célula de carga de 10 N. O ensaio foi desenvolvido a uma taxa de 10mm/min com uma distância entre as garras de 20 mm. O resultado para cada ensaio foi obtido pelo rompimento de cinco corpos de prova. Cada corpo de prova apresentava 8 mm de largura e encontravam-se no estado úmido.

3.2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das membranas natural e reticulada foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram liofilizadas, fraturadas a frio com nitrogênio líquido e metalizadas através de deposição de uma fina camada de metal. A visualização foi feita no microscópio JEOL JXA-840 A Electron Probe Microanalyzer do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM-UNICAMP). Devido a natureza não condutiva das amostras foi utilizado uma condição branda de 10 kV.

3.2.2.6. Área superficial específica

A área superficial das membranas foi medida por adsorção de nitrogênio no estado gasoso e é expressa em unidade de área por massa de material. A representação do comportamento de adsorção é feita por isotermas. O equipamento utilizado apresenta o

resultado a partir de ajuste a dois modelos: Langmuir e BET. O modelo de Langmuir é o mais simples e assume que apenas uma monocamada de moléculas é adsorvido, existência de sítios de adsorção bem definidos e que a colisão entre gás e sólido é inelástica (equação 3.3) (Gotoh, 1997). O modelo de BET é uma extensão do de Langmuir, corrigindo o comportamento para a adsorção de mais de uma camada de moléculas de gás. Duas outras considerações são feitas: as forças responsáveis pela adsorção de mais camadas de moléculas são as mesmas que atuam na condensação do gás e a taxa de condensação e evaporação são iguais (equação 3.4). As análises foram feitas no equipamento Gemini produzido pela Micromeritics Instrument Corporation (DTF-FEQ-UNICAMP). As amostras foram previamente liofilizadas e as medidas foram feitas em triplicata.

$$\frac{P}{V_a} = \frac{1}{V_m b} + \frac{P}{V_m} \quad (3.3)$$

$$\frac{P}{V_a(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c-1}{V_m c} \left(\frac{P}{P_0} \right) \quad (3.4)$$

onde:

P: pressão

P₀: pressão relativa (a pressão de saturação do gás é utilizada)

V_a: volume adsorvido a pressão P

V_m: volume adsorvido quando toda a superfície está recoberta

b: constante empírica

c: constante proporcional ao produto dos calores de adsorção e de liquefação do gás

3.2.3. Experimentos de adsorção de proteínas em membrana de quitosana

3.2.3.1. Descrição do Sistema de Cromatografia

Os experimentos de adsorção do soro antiofídico em membrana de quitosana foram realizados no sistema de cromatografia mostrado na Figura 3.2. O sistema constituía-se de uma célula de ultrafiltração (AMICON) conectada a uma bomba peristáltica Gilson (França) que succionava a fase móvel na vazão correspondente a cada etapa (injeção, lavagem, eluição e regeneração). A linha de saída da bomba peristáltica seguia para um

monitor de medida de absorvância (Econo UV Monitor–Bio-Rad) o qual enviava os sinais a um registrador (Modelo 1327–Bio-Rad) que traçava um cromatograma como resposta aos sinais elétricos recebidos. A linha de saída do monitor de absorvância era conectada a um coletor de frações (Modelo 2110–Bio-Rad). As frações eram coletas em volumes diferentes levando-se em consideração a extensão de cada etapa.

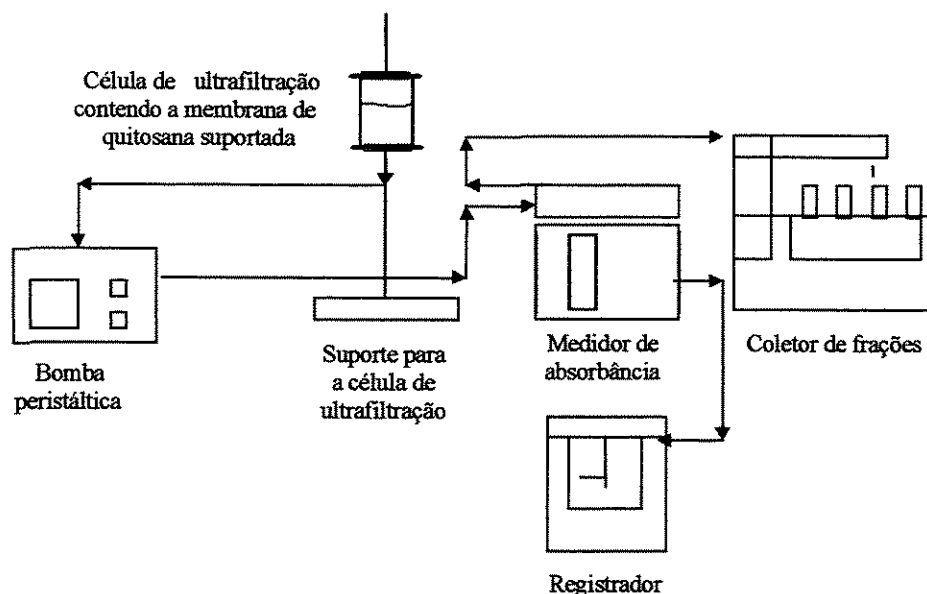


Figura 3.2: Representação esquemática do sistema de cromatografia utilizado nos experimentos de adsorção de proteínas do soro antiofídico.

3.2.3.2. Adsorção de soro hiperimune em membranas de quitosana

As cromatografias foram realizadas com diferentes soluções tamponantes a fim de se verificar se os anticorpos do soro antibotrópico adsorveriam na membrana de quitosana e determinar a condição na qual haveria uma menor adsorção. Os tampões testados foram: tampão fosfato (pH 6,0-8,0), tampão acetato (pH 5,0-6,0) e tampão Tris-HCl (pH 7,0-8,5), todas a uma concentração de 25 mM. As vazões da fase móvel eram de 1 mL/min para a injeção, 5 mL/min para a lavagem e 2 mL/min para as etapas de eluição e regeneração. Inicialmente, equilibrava-se o sistema com uma solução tamponante e em seguida, alimentava-se a célula com uma solução de soro antibotrópico diluído 20 vezes no mesmo tampão. A massa de proteína na solução de injeção foi mantida constante e igual a 12,2 mg.

Ao fim da injeção, fazia-se a lavagem utilizando o tampão de equilíbrio a fim de eliminar as proteínas não adsorvidas. As frações da lavagem forneciam o primeiro pico. As proteínas adsorvidas eram eluídas aumentando-se a força iônica do tampão com a introdução de NaCl. Utilizaram-se soluções com concentrações de 0,5 M e 1 M deste sal. Ao fim da eluição, fazia-se a regeneração da membrana com solução de NaOH 1M. A condição da regeneração remove de forma drástica as proteínas adsorvidas por interações de origem não eletrostáticas obtendo-se desta forma o quarto pico. O fim de cada etapa foi monitorado através da absorbância das frações medida a 280 nm até que estivesse em torno de 0,005 de densidade ótica ou menor, considerada como linha de base. O volume das frações coletado era de 1 mL, 5 mL, 2 mL e 3 mL para as etapas de injeção, lavagem, eluição e regeneração, respectivamente. A absorbância de cada fração foi medida em um espectrofotômetro (Beckman DU 650) a 280 nm. Após a cromatografia, as frações de cada pico eram reunidas e determinadas as concentrações de proteína das mesmas através do método de Bradford (1976).

3.2.3.2. Imunoeletroforese do soro antibotrópico

A reação específica entre um antígeno e seu anticorpo correspondente, conhecida como reação de precipitação, constitui a base para a técnica de imunoeletroforese. Esta técnica é aplicada para determinação de um único antígeno e identificação de componentes em uma mistura complexa, exame de uma sequência de frações provenientes de um processo de separação, ou ainda, a verificação da integridade dos anticorpos de uma solução após um processo de purificação.

Para a confecção do gel, dissolveu-se a agarose em solução tampão Tris-HCl 0,5M (pH 8,6) de forma a se obter uma solução de agarose 1%. O filme de preparação do gel ("gel bond") possui um lado hidrofóbico e outro hidrofílico. No lado hidrofílico foi espalhado 5 mL da solução de Tris-HCl-agarose de forma a se obter um gel uniforme de $\approx$ 1mm de espessura. Após a geleificação da solução foram feitos canaletas e poços a partir de um molde como mostrado na Figura 3.3.

Finalizada a confecção, o gel foi colocado na cuba eletroforética modelo Sub-cell agarose gel, Bio-Rad (EUA), ficando os poços localizados próximos da região catódica. A

solução a ser analisada foi acrescida de bromofenol, para permitir o acompanhamento de sua migração através do gel. Um volume de 5 μ L foi colocado nos poços e iniciada a corrida. A voltagem foi fixada em 100V durante o experimento. Terminada a migração do soro, o gel foi retirado da cuba e colocou-se nas canaletas o anti-soro total de cavalo e o anti-IgG de cavalo para que os mesmos se difundissem no gel e houvesse a formação de um arco de precipitação caso encontrasse o anticorpo ou proteína correspondente. Em seguida, o gel foi colocado em uma câmara úmida fechada para evitar o seu ressecamento. O tempo de duração desta etapa foi de 24 horas.

Após esse período, o gel foi retirado da câmara úmida e colocado em uma solução 0,15 M de NaCl durante 24 horas, para a remoção do excesso dos anti-soros. Ao término da lavagem com NaCl, o gel foi deixado em água ultrapura por 2 horas e posteriormente seco para que fosse realizada a coloração por Coomassie Blue. A solução de coloração foi preparada da seguinte forma: misturou-se 180 mL de etanol (95%), 40 mL de ácido acético glacial e 180 mL de água destilada. Em 200 mL desta solução dissolveu-se 1g de Coomassie Blue R 250. O filme foi imerso nesta solução de coloração por 5 minutos e em seguida foi lavado cuidadosamente com água destilada. Finalmente, o gel foi novamente seco com um jato de ar quente e seco e armazenado.

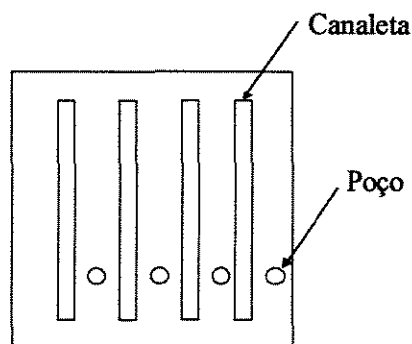


Figura 3.3: Esquema do molde de um gel para imunoeletroforese.

3.2.3.3. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas do soro antibotrópico e da soma das frações correspondentes às etapas de lavagem, eluição com 0,5 M de NaCl, eluição com 1,0 M de NaCl e regeneração das cromatografias foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína de referência.

3.2.4. Experimentos de adsorção de endotoxinas em membranas de quitosana

Nesta etapa realizou-se a remoção de ET de soluções tamponantes e de soluções de soro antiofídico. Os experimentos de adsorção de ETs a partir de solução tamponante foram realizados utilizando as soluções definidas anteriormente, acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0, no intuito de definir a condição onde se obteria uma maior remoção. Definida a solução onde se obteve maior eficiência de remoção, experimentos com soluções do soro antiofídico contaminadas artificialmente foram realizados. Todos os experimentos de despirogenação de soluções, tampão ou de soro, foram precedidos pelas etapas de despirogenação da vidraria (Acconci, 1998), das linhas do sistema e da membrana (Petsch et al., 1997) visando assegurar uma condição apirogênica desde o preparo das soluções garantindo assim a confiabilidade no momento da quantificação.

3.2.4.1. Despirogenação dos materiais

Os experimentos de adsorção de endotoxinas eram precedidos pela etapa de despirogenação de todos os materiais envolvidos na execução do experimento, visando minimizar ao máximo a influência de fatores externos no momento da quantificação. A vidraria era deixada imersa em solução de NaOH 1,5M pelo período de uma noite em seguida lavada extensivamente com água ultrapura e deixada em sonificador por 20 min para facilitar a remoção do NaOH. Após secagem em estufa a aproximadamente 50°C, a vidraria era embalada em sacos de alumínio previamente preparados sendo então levados a estufa a uma temperatura de aproximadamente 180°C durante 12 horas. Esta última condição foi utilizada para garantir a eficiência na despirogenação. Os materiais eram mantidos embalados até a sua utilização. Este processo tem uma validade de aproximadamente uma semana (Acconci, 2001) e após esse período o processo foi repetido mesmo com materiais não utilizados.

3.2.4.2. Despirogenação do sistema de filtração

O sistema de filtração utilizado nesta etapa foi despirogenizado como sugerido por Petsch et al. (1997). A despirogenação da célula de filtração era feita com uma solução de KOH 2 M. A despirogenação da membrana e das linhas do sistema era feita pela passagem

consecutiva de duas soluções, NaOH 0,1 M contendo 20% de etanol e solução de NaCl 1,5M. O volume injetado e a vazão das soluções eram de 15 mL e 2 mL/min, respectivamente. Ao final, injetava-se água apirogênica até a completa remoção das soluções anteriores.

3.2.4.3. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes

Os experimentos de adsorção de endotoxinas eram realizados em um sistema de filtração como mostrado na Figura 3.4. Antes da injeção o sistema era equilibrado com 15 mL de solução tampão e em seguida 15 mL da solução de equilíbrio contaminada com endotoxinas era injetada manualmente na célula de filtração. Esta solução era succionada por uma bomba a uma vazão de 2 mL/min. O filtrado era coletado em um erlenmeyer sob uma constante e vigorosa agitação. No caso da solução de acetato de sódio pH 5,0, a filtração foi feita sob pressão (0,5 kgf/cm²) devido a uma diminuição dos poros da membrana, provocada pelo contato desta com a solução de pH ácido.

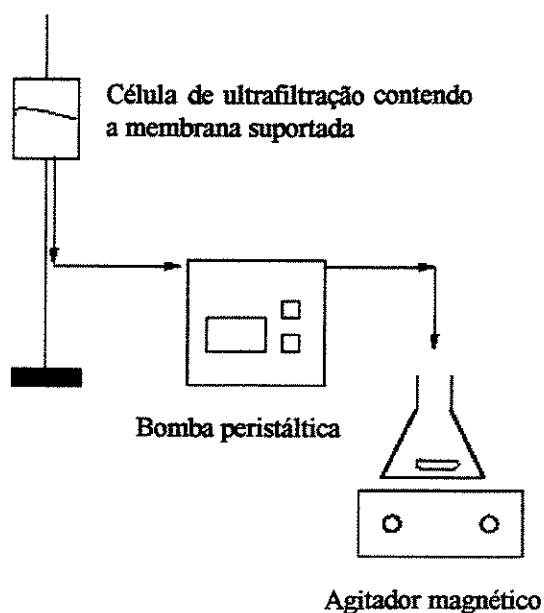


Figura 3.4: Representação esquemática do sistema de filtração utilizado no experimento de remoção de endotoxinas de soluções tamponantes.

3.2.4.4. Remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico contaminadas artificialmente

Nesta etapa, investigou-se a influência presença de proteínas e a concentração de solução de soro ao processo adsorptivo. Soluções de soro foram preparadas com concentração em torno de 1 mg/mL e 15mg/mL com tampão Tris-HCl pH 7,0, condição esta onde se percebeu uma maior remoção de ETs. O soro antiofídico utilizado para o preparo das soluções foi o tipo antibotrópico (concentração de anticorpos em torno de 24 mg/mL) obtido do Instituto Butantã. Os experimentos cromatográficos foram desenvolvidos em um sistema como apresentado na Figura 3.5. A solução inicial era injetada manualmente, sendo succionada por uma bomba peristáltica a uma vazão de 2 mL/min. A solução passava por um monitor de absorbância e era coletada em erlenmeyers. As frações coletadas foram: filtrado1, lavagem e filtrado 2, onde a fração denominada de filtrado 1 é aquela imediatamente obtida da passagem da solução de injeção e o filtrado 2 corresponde a fração obtida da passagem do filtrado1 através da membrana. As vazões utilizadas foram de 2mL/min para os filtrados e 5 mL/min para a etapa de lavagem.

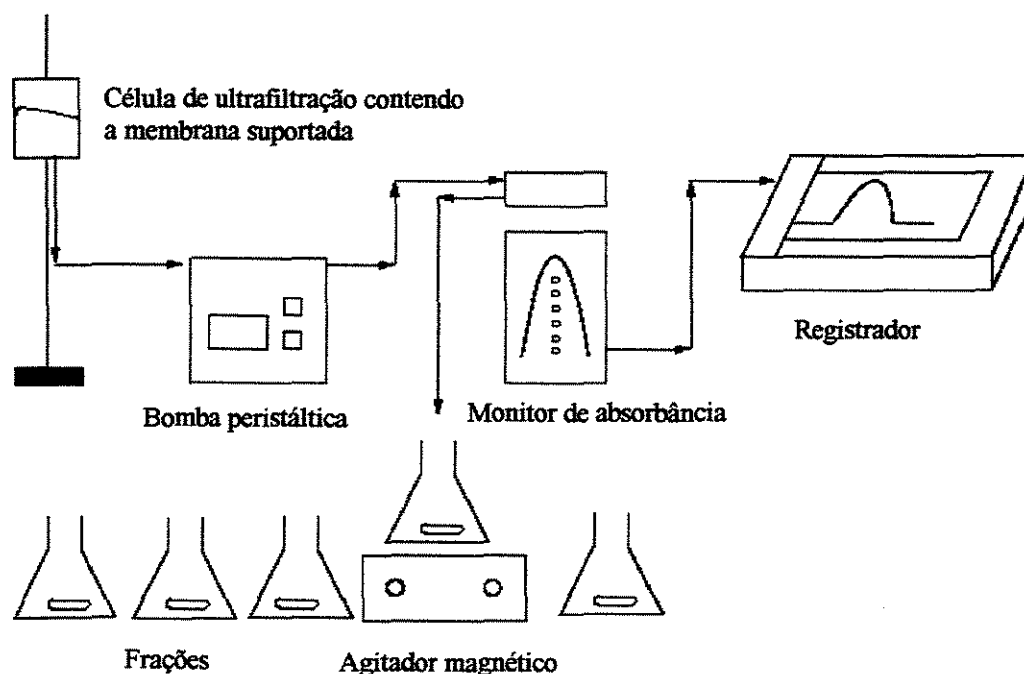


Figura 3.5: Representação esquemática do sistema de filtração utilizado nos experimentos de despirogenação de soluções de soro antiofídico.

3.2.4.5. Quantificação de endotoxinas

A concentração de endotoxinas presentes nas amostras dos experimentos realizados foi determinada através do método cromogênico LAL. O LAL é um método quantitativo para a detecção de endotoxinas de bactérias Gram negativas. O kit contém um frasco de endotoxinas de baixa concentração, dois frascos de substrato cromogênico, cinco frascos de lisado de amebócito de *Limulus* e dois frascos de água apirogênica. Os compostos contidos nos frascos apresentavam-se liofilizados. Em linhas gerais, a amostra é misturada com o LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) fornecido no kit e, em seguida, incubada a 37°C por 10 minutos. Após esse tempo, 100µL da solução de substrato cromogênico é adicionado a mistura amostra-LAL e, a solução incubada por 6 minutos. A reação é interrompida pela adição do reagente de parada ao meio reacional. A absorbância da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente a 405-410 nm e é diretamente proporcional a quantidade de endotoxinas presentes na amostra. A concentração de ET é calculada com base na curva padrão traçada para o kit em uso.

A determinação da curva padrão segue as seguintes etapas: reconstituição dos reagentes fornecidos no kit, preparação das soluções referentes aos pontos da curva a partir de uma solução de endotoxina padrão e a execução do teste propriamente dito (ocorrência da reação enzimática). A relação entre a absorbância da concentração de endotoxina é linear e está entre 0,1 e 1,0 EU/mL. Estas etapas foram realizadas conforme instruções contidas no manual que acompanha o kit de detecção.

Quantificação de endotoxinas presentes em soluções protéicas

Na execução do teste LAL, alguns compostos podem induzir ou fornecer resultados falso positivo ou negativo devido a uma inibição não específica durante a reação. Como exemplo destes compostos tem-se: produtos provenientes do sangue, polinucleotídeos e soluções contendo metais pesados ou surfactantes. Por isso, com o intuito de evitar uma interferência na detecção de endotoxinas nas amostras contendo anticorpos, fez-se a desnaturação da proteína contida nestas amostras. As alíquotas referentes às frações a serem analisadas eram colocadas em um banho a 70°C por 10 min (Friberger et al., 1982) antes da execução do teste.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese da matriz adsorvente

A síntese da matriz adsorvente utilizada neste trabalho baseou-se em um método proposto por Zeng e Ruckenstein (1996a) para a obtenção de membranas de quitosana com porosidade controlada. Este método é constituído de 3 etapas que são: preparo da solução de quitosana em meio ácido, evaporação do solvente (formação das membranas) e a neutralização das membranas. Devido à ausência de informações do processo de obtenção da membrana como um todo, decidiu-se executar um planejamento experimental para o levantamento destas informações.

4.1.1. Planejamento Experimental

Visando a definição das condições de preparação da membrana porosa de quitosana utilizou-se o planejamento experimental como ferramenta para a verificação dos fatores significativos e a possibilidade de minimização do número de experimentos. A primeira etapa foi a execução de um planejamento fracionário 2^{5-2} . Os fatores estudados neste planejamento foram: o tempo de neutralização (t_{Neut}), temperatura de neutralização (T_{Neut}), concentração da solução neutralizante (C_{NaOH}), massa inicial da solução de quitosana (M_i) e proporção sílica-quitosana (S:Q). A escolha das variáveis foi feita da seguinte forma: a massa inicial de solução de quitosana não foi informada na literatura de base, logo esta surgiu como o fator totalmente desconhecido do método. Para a determinação da faixa de estudo, ensaios preliminares foram feitos com massa variando de 2 a 10 g, utilizando placas de vidro de 4,5 cm de diâmetro como molde. Através destes ensaios foi possível observar que 2 g não eram suficientes para cobrir o fundo da placa e que no caso das massas acima de 7 g obtinha-se membranas com uma superfície visivelmente heterogênea. A proporção sílica-quitosana foi estudada em função de dois motivos: 1) a sílica ser o responsável pela formação dos poros e 2) a vazão de água através da membrana ter sido definida como a variável-resposta, uma vez que uma maior

quantidade de sílica provavelmente geraria um aumento na vazão. As condições de neutralização que são a concentração da solução alcalina, o tempo e a temperatura de neutralização, embora tenham sido informadas pelo autor, foram analisadas em função da variação da massa de solução e da proporção sílica-quitosana, já que além de neutralizar a condição ácida da membrana, tem a função de remover as partículas de sílica. Os valores utilizados pelo autor foram colocados no ponto central deste planejamento por serem condições já estabelecidas no seu trabalho. A matriz do planejamento, contendo os valores dos fatores variáveis e as vazões referentes a cada ensaio, está apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para estudar os efeitos de 5 variáveis sobre a vazão.

Ensaio	t_{Neut} (horas)	T_{Neut} (°C)	M_i (g)	C_{NaOH} (M)	S:Q	Vazão (mL/min)
1	1,0 (-)	60 (-)	7,3 (-)	0,5 (-)	16:1(+)	14,0
2	3,0 (+)	60 (-)	7,3 (-)	2,0 (+)	2:1(-)	0
3	1,0 (-)	100 (+)	7,3 (-)	2,0 (+)	2:1(-)	4,0
4	3,0 (+)	100 (+)	7,3 (-)	0,5 (-)	16:1(+)	15,0
5	1,0 (-)	60 (-)	17,0 (+)	2,0 (+)	16:1(+)	11,0
6	3,0 (+)	60 (-)	17,0 (+)	0,5 (-)	2:1(-)	0
7	1,0 (-)	100 (+)	17,0 (+)	0,5 (-)	2:1(-)	0
8	3,0 (+)	100 (+)	17,0 (+)	2,0 (+)	16:1(+)	9,5
9	2,0 (0)	80 (0)	12,0 (0)	1,25 (0)	9:1(0)	12,0
10	2,0 (0)	80 (0)	12,0 (0)	1,25 (0)	9:1(0)	15,0
11	2,0 (0)	80 (0)	12,0 (0)	1,25 (0)	9:1(0)	17,0

Verifica-se na Tabela 4.1 que as membranas correspondentes aos ensaios 2, 6 e 7, e ensaio 3 apresentaram vazão zero ou muito baixa à pressão atmosférica, respectivamente. Em todos esses experimentos a proporção sílica-quitosana foi de 2:1, demonstrando que nesta condição ou os poros não foram formados (densificação da membrana) ou eram muito pequenos onde seria necessário o uso de uma pressão maior que a atmosférica para que a vazão fosse verificada.

A análise estatística dos fatores t_{Neut} , T_{Neut} , C_{NaOH} , M_i e S:Q através do programa Statistica apresentou como efeito significativo a 95% de confiança somente o fator proporção de sílica-quitosana (resultado não apresentado). Analisando-se os valores de probabilidade dos efeitos, observou-se que a variável massa de solução apresentou um valor de probabilidade ($p=0,064$) próximo do nível de significância de 0,05, não sendo adequado o seu descarte. Reduziu-se o intervalo de confiança para um valor de 90%. Os efeitos principais e interações entre os fatores, juntamente com os valores dos coeficientes de regressão obtidos pela análise dos efeitos, são apresentados na Tabela 4.2. Os resultados de $t(2)$ e p são referentes aos testes de significância dos fatores realizados pelo programa Statistica.

Tabela 4.2. Análise dos efeitos dos cinco fatores estudados sobre a variável-resposta vazão.

Fatores	Efeitos	Coefficientes de regressão	$t(2)$	p
Média	11,40182*	11,4018	23,9280	0,0017
(1) Tempo	-1,4525	-0,7625	-1,2997	0,3233
(2) Temperatura	0,7125	0,3562	0,6376	0,5890
(3) Massa	-4,1775*	-2,0887	-3,7382	0,0647
(4) Concentração	-2,0125	-1,0062	-1,8009	0,2135
(5) Proporção S-Q	16,0475*	8,0237	14,3601	0,0048
(1) x (3)	0,7875	0,3937	0,7047	0,5540
(1) x (4)	-1,3775	-0,6887	-1,2326	0,3429

* fatores significativos a 90% de confiança.

Na Tabela 4.2 observa-se que somente os fatores massa inicial de solução e proporção sílica-quitosana exercem efeito significativo sobre a vazão para um intervalo de confiança de 90% (Figura 1 do Anexo 1). O sinal negativo para o fator massa e o sinal positivo para o fator proporção sílica-quitosana indicam que a vazão é afetada de forma inversa e direta, respectivamente, para variações nesses fatores. Nota-se ainda que os valores de probabilidade (p) de efeitos dos demais fatores estão distantes do nível de significância de 0,1, podendo-se portanto descartá-los. O coeficiente de correlação para este

ajuste foi de 0,78, demonstrando a falta de ajuste do modelo linear aos dados da Tabela 4.1. Os fatores tempo de neutralização, temperatura de neutralização e concentração de NaOH foram mantidos constantes, por não terem apresentado efeito significativo sobre a vazão. Os valores desses fatores correspondem aos valores do ponto central que são: 5 horas, 80°C e 1,25 M para o tempo de neutralização, a temperatura de neutralização e a concentração de NaOH, respectivamente.

Devido à significativa falta de ajuste obtida no planejamento fracionário, partiu-se para um segundo planejamento a fim de se determinar modelo e a superfície de resposta para a vazão em relação aos fatores considerados significativos pelo planejamento fracionário (M_i e S:Q). Nesta segunda etapa executou-se um planejamento completo 2^2 com pontos axiais ($-\alpha$ e $+\alpha$) e uma triplicata no ponto central. Visando determinar, a membrana que apresentasse características adequadas de vazão e resistência mecânica, a análise dos efeitos dos fatores foi feita em relação a duas variáveis-resposta, vazão e tensão. A Tabela 4.3 apresenta a matriz do planejamento com os valores massa de solução de quitosana, proporção sílica-quitosana, vazão e tensão para cada ensaio.

Tabela 4.3. Planejamento completo 2^2 com pontos axiais e triplicata no ponto central para estudar os efeitos das variáveis massa de solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a vazão e a tensão.

Ensaio	M_i	S:Q	Vazão (mL/min)	Tensão (MPa)
1	8,0(-)	13,2:1(-)	17,5	0,70
2	11,4(+)	13,2:1(-)	14,5	0,79
3	8,0(-)	18,8:1(+)	20,4	0,62
4	11,4(+)	18,8:1(+)	14,7	0,61
5	9,7(0)	16:1(0)	16,6	0,52
6	9,7(0)	16:1(0)	16,7	0,55
7	9,7(0)	16:1(0)	17,0	0,54
8	7,3($-2^{1/2}$)	16:1(0)	21,4	0,55
9	9,7(0)	20:1($+2^{1/2}$)	16,9	0,59
10	12,0($+2^{1/2}$)	16:1(0)	13,8	0,64
11	9,7(0)	12:1($-2^{1/2}$)	12,9	0,81

Os principais efeitos, as interações entre as variáveis e os valores dos coeficientes de regressão obtidos pela análise dos efeitos em relação à vazão estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Análise dos efeitos dos fatores massa inicial da solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a variável-resposta vazão.

Fatores	Efeitos	Coeficientes de regressão	t(2)	p
Média	16,74322*	16,74322	126,6473	0,000062
(1) Massa (L)	-4,85776*	-2,4288	-29,9996	0,001109
Massa (Q)	1,1697*	0,58485	6,0683	0,026098
(2) Proporção S-Q (L)	2,19123*	1,09561	13,5321	0,005417
Proporção S-Q (Q)	-1,57613*	-0,78806	-8,1767	0,014629
(1) x (2)	-1,345*	-0,67250	-5,8783	0,027782

* fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança.

(L): termo linear do modelo.

(Q): termo quadrático do modelo.

Todos os fatores analisados apresentaram efeitos significativos sobre a vazão a um nível de confiança de 95%, obtendo-se, de acordo com os valores dos coeficientes de regressão da Tabela 4.4, o modelo empírico codificado dado pela equação 4.1.

$$Vazão = 16,74 + 0,58M^2 - 0,788P^2 - 2,43M + 1,1P - 0,67MP \quad (4.1)$$

onde:

M : massa de solução de quitosana

P : proporção sílica-quitosana

Uma análise de variância (ANOVA) foi determinada com o intuito de verificar a validade do modelo da equação 4.1. O resultado da ANOVA para o ajuste do modelo quadrático aos fatores considerados significativos encontra-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 4.4.

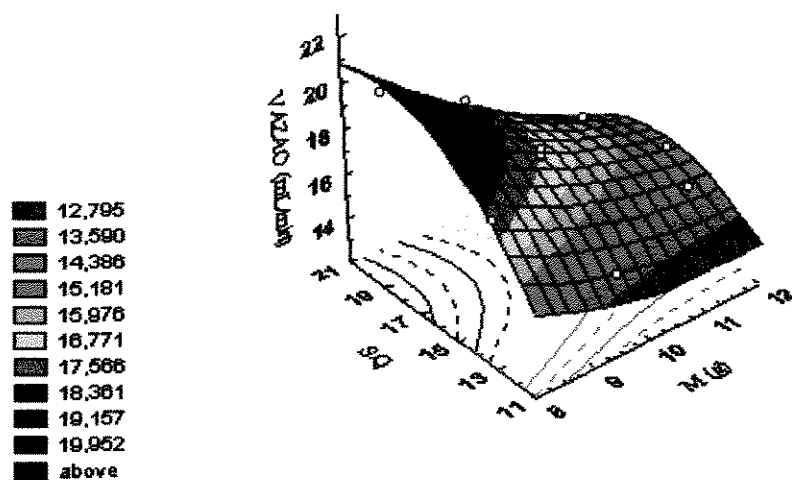
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Regressão	64,03	5	12,806	32,60
Resíduos	1,964	5	0,3928	
Falta de ajuste	1,86	3		
Erro puro	0,104	2		
Total	65,994	15		

$F_{\text{tabelado}}(0,95;5;5) = 5,05$

Os valores obtidos para o R^2 e F_{tabelado} a 95% de confiança foram respectivamente 0,971 e 5,05. O valor de R^2 indica que 97% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. O $F_{\text{calculado}}$ é 6,5 vezes maior que o F_{tabelado} , indicando que o modelo é significativo a 95% de confiança. As faixas otimizadas através do modelo apresentado na equação 4.1 podem ser visualizadas na Figura 4.1.

Na Figura 4.1 nota-se que o maior valor encontrado para a vazão, dentro da faixa estudada, foi de aproximadamente 20,0 mL/min (faixa escura em vermelho). Este valor que corresponde à membrana do ensaio 8 cujos valores para a massa de solução de quitosana e a proporção sílica-quitosana são 7,3 g e 16:1 (em valores não codificados), respectivamente. Uma outra membrana também encontrada nessa faixa é aquela referente ao ensaio 3 (8 g e 18:8,1). Observa-se ainda uma tendência de maiores vazões para menores valores de massa de solução e para maiores valores de proporção sílica-quitosana.

(a)



(b)

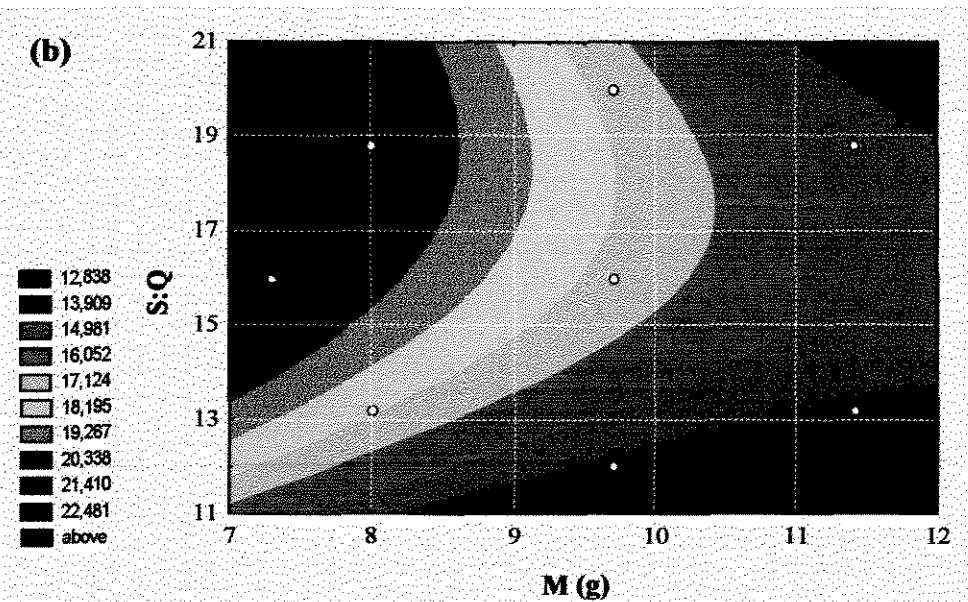


Figura 4.1: (a) Superfície quadrática e (b) Curva de nível da superfície quadrática, descritas pela equação 4.1.

Com a finalidade de ratificar a análise de variância para o modelo proposto na equação 4.1, fez-se uma análise do desvio dos valores de vazão observados experimentalmente com relação àqueles preditos pelo modelo da equação 4.1. Os desvios foram calculados utilizando a equação 4.2.

$$D = \frac{V_{obs} - V_{pred}}{V_{obs}} 100 \quad (4.2)$$

onde:

V_{obs} = valor observado experimentalmente

V_{pred} = valor predito pelo modelo

O desvio calculado para cada ensaio do planejamento proposto na Tabela 4.3 em relação à vazão encontra-se apresentado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Desvio entre os valores observados experimentalmente e os preditos pelo modelo em relação à vazão para cada ensaio do planejamento experimental.

Ensaio	M_i	S:Q	Valor observado (mL/min)	Valor predito (mL/min)	Desvio (%)
1	-1	-1	17,5	17,21	1,6
2	+1	-1	14,5	13,70	5,5
3	-1	+1	20,4	20,75	1,7
4	+1	+1	14,7	14,54	1,0
5	0	0	16,6	16,74	0,8
6	0	0	16,7	16,74	0,2
7	0	0	17,0	16,74	1,5
8	$-2^{1/2}$	0	21,4	21,37	0,1
9	0	$+2^{1/2}$	17,0	16,71	1,1
10	$+2^{1/2}$	0	14,0	14,50	5,1
11	0	$-2^{1/2}$	13,0	13,61	5,5

Nota-se que a diferença entre os valores preditos e os observados encontra-se em torno de 5%. Sabendo-se que o erro experimental (desvio padrão) para cada ensaio em relação ao valor médio é de no máximo 5% (ver Tabela 1 do Anexo 2), os desvios apresentados podem ser considerados aceitáveis.

Com relação à variável-resposta tensão, a análise dos efeitos para avaliar a significância dos fatores estudados, também desenvolvida pelo programa Statistica, forneceu os resultados apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Análise dos efeitos dos fatores massa de solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a variável-resposta tensão.

Fatores	Efeitos	Coefficientes de regressão	t(2)	p
Média	0,5385*	0,5385	57,65	0,0003
(1) Massa (L)	0,0504*	0,0252	4,4022	0,0479
Massa (Q)	0,0742*	0,0371	5,4527	0,0320
(2) Proporção S-Q (L)	-0,1413*	-0,0706	-12,3481	0,0065
Proporção S-Q (Q)	0,1788*	0,0894	13,1280	0,0057
(1)x(2)	-0,0515	-0,0257	-3,1832	0,0861

* fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Nota-se que todos os fatores analisados apresentaram efeitos significativos sobre a tensão máxima, com exceção do efeito de interação dos termos linear e quadrático para o fator massa de solução. Desta forma, o modelo proposto pela análise dos efeitos, descartando-se apenas o efeito secundário (1) x (2), é dado pela equação 4.3.

$$Tensão = 0,54 + 0,037M^2 + 0,09P^2 + 0,025M - 0,07P \quad (4.3)$$

onde:

M: massa de solução de quitosana

P: proporção sílica-quitosana

A validade do modelo foi verificada pela análise de variância, cujos resultados para o ajuste do modelo quadrático aos fatores considerados significativos estão apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 4.7.

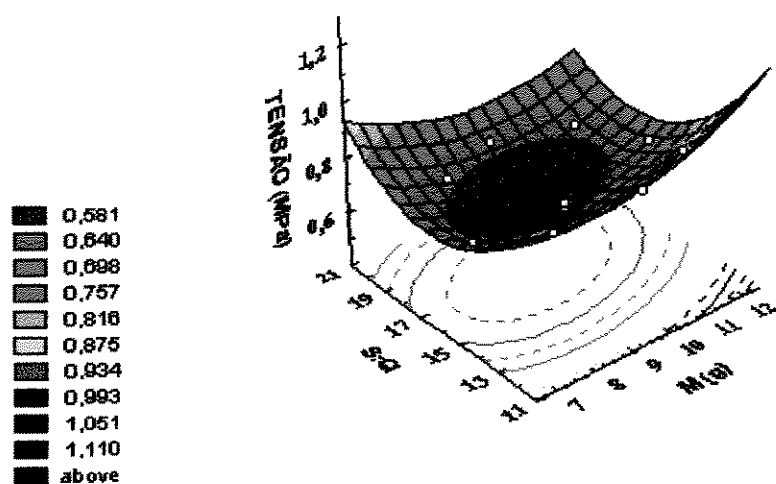
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F
Regressão	0,098	4	0,0245	27,22
Resíduos	0,0054	6	0,0009	
Falta de ajuste	0,0049	4		
Erro puro	0,0005	2		
Total	0,1034	16		

$$F_{\text{tabelado}}(0,95;4;6) = 6,16$$

Observa-se na Tabela 4.8 que o modelo quadrático não exibe falta de ajuste significativa no nível de confiança de 95%. Os valores obtidos para o R^2 e F_{tabelado} foram respectivamente 0,944 e 6,16. O valor de R^2 indica que 94% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. O $F_{\text{calculado}}$ é 4,4 vezes maior que o F_{tabelado} , demonstrando que o modelo é significativo. A superfície de resposta e as curvas de contorno obtidas a partir do modelo da equação 4.3 estão ilustradas na Figura 4.2.

Na Figura 4.2 observa-se que o maior valor para a tensão encontrado dentro da faixa estudada foi de aproximadamente 0,82 MPa (faixa de cor verde claro). Dentre os ensaios do planejamento, dois apresentam resultados próximos a este valor que são: o ensaio 2 (11,4 g e 13,2:1 para a massa de solução de quitosana e proporção sílica-quitosana, respectivamente.) e o ensaio 11 (9,7 g e 12:1 para a massa de solução de quitosana e proporção sílica-quitosana, respectivamente).

(a)



(b)

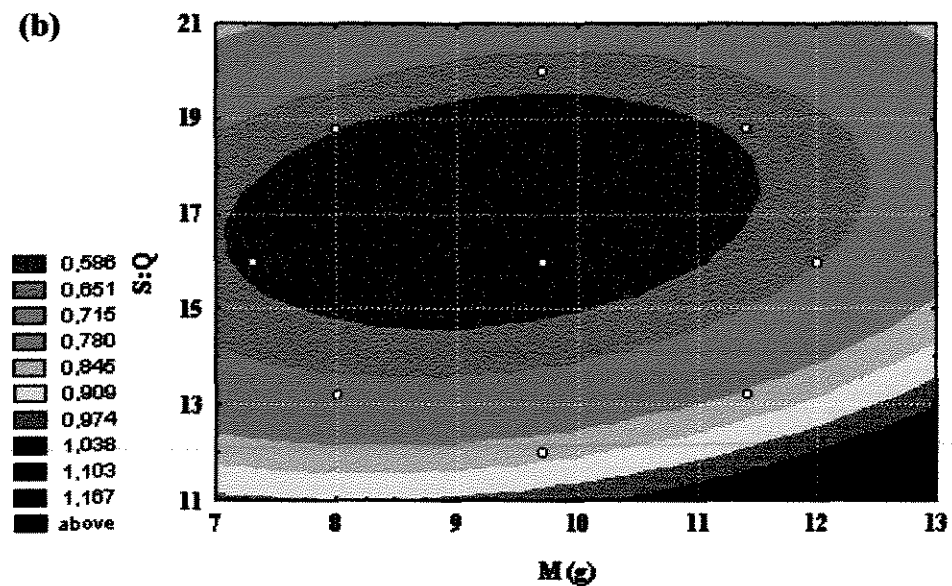


Figura 4.2: (a) Superfície de resposta e (b) Curva de nível da superfície quadrática, descritas pela equação 4.3.

Analisando a Figura 4.2a nota-se que a partir do ponto central (ponto de mínimo) existem duas tendências a valores máximos de tensão. Uma delas é o deslocamento em direção ao decréscimo da proporção sílica-quitosana. Esta tendência já era esperada, visto que uma menor massa de sílica implica em uma menor quantidade de poros o que leva a uma resistência maior a tensão. A outra tendência é o deslocamento em direção ao aumento da proporção sílica-quitosana. Isto pode talvez ser explicado pela possibilidade de uma orientação das fibras da quitosana pela presença da sílica. Sendo assim, embora o agente porogênico seja removido no final do processamento, as fibras orientadas mantêm-se mais resistentes (Arruda, 2001).

Como realizado no estudo referente à vazão, fez-se uma análise do desvio entre os valores observados experimentalmente e aqueles preditos pelo modelo da equação 4.3 com relação à variável-resposta tensão. Os desvios foram calculados utilizando a equação 4.2 e o resultado está apresentado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Desvio entre os valores observados experimentalmente e os preditos pelo modelo em relação à tensão para cada ensaio do planejamento experimental.

Ensaio	M _i	S:Q	Valor observado (MPa)	Valor predito (MPa)	Desvio (%)
1	-1	-1	0,70	0,71	1,5
2	+1	-1	0,79	0,76	3,7
3	-1	+1	0,62	0,57	8,2
4	+1	+1	0,61	0,62	1,5
5	0	0	0,52	0,54	3,5
6	0	0	0,55	0,54	2,1
7	0	0	0,54	0,54	0,3
8	-2 ^{1/2}	0	0,55	0,57	4,9
9	0	+2 ^{1/2}	0,59	0,62	4,6
10	+2 ^{1/2}	0	0,64	0,65	1,2
11	0	-2 ^{1/2}	0,81	0,82	0,8

Os desvios entre os valores preditos e os experimentais encontram-se em torno de 8%, valor ainda aceitável visto que o erro associado a esta análise encontra-se em torno de 9% (ver Tabela 2 do Anexo 2). Para um resultado mais consistente, faz-se necessário a ruptura de um número maior de corpos de prova, por exemplo 15 corpos de prova.

Para facilitar o entendimento, optou-se por fazer a análise dos resultados obtidos para a vazão e a tensão, resultados estes apresentados na Tabela 4.3, paralelamente.

Nota-se que os resultados das vazões alcançadas pelas membranas estudadas apresentam diferenças pequenas entre os seus valores, levando-se a supor que qualquer uma das membranas estudadas poderia ser escolhida satisfatoriamente, caso fosse considerada apenas essa variável-resposta.

Os resultados obtidos para a tensão também não apresentam valores tão diferentes sendo difícil dizer qual seria o melhor ensaio. Contudo, como as curvas de ruptura, traçadas a partir dos ensaios mecânicos das membranas, apresentaram um perfil característico de materiais duros e frágeis (Nielsen, 1974), acredita-se que para este caso essas pequenas diferenças podem ser determinantes para a escolha da membrana. Comparando-se os resultados obtidos por este estudo com o resultado obtido por Zeng e Ruckenstein (1996), cujo valor da tensão suportada foi 0,9 MPa, verifica-se que membrana correspondente ao ensaio 11 foi a que apresentou um melhor resultado (0,81 MPa). Considerando que o aumento da tensão suportada pelas membranas desloca-se para o sentido da diminuição da proporção sílica-quitosana e aumento da massa de solução, estatisticamente a membrana escolhida seria aquela referente ao ensaio 11, que tem massa de solução de quitosana igual a 9,7 g e proporção sílica-quitosana igual a 12:1. Além disso, observou-se que esta membrana após a síntese apresentou as seguintes características observadas visualmente: aparência mais homogênea, forma arredondada bem definida e não enrugamento das bordas quando retirada da água, o que facilitou o seu manuseio durante as etapas de preparação para as análises.

Visto que os resultados para a vazão foram de um modo geral satisfatórios, a escolha da membrana baseou-se na análise estatística feita para a tensão e no fator econômico. Optou-se por utilizar a membrana referente ao ensaio 11 por apresentar bons resultados de vazão e tensão, e por utilizar menos massa de sílica gel, que tem um custo relativamente alto e poderia onerar o processo de obtenção da membrana.

Com base na análise estatística dos planejamentos experimentais executados, definiu-se finalmente as melhores condições de síntese da membrana dentro da faixa estudada, são elas: temperatura de secagem de 80°C, tempo de secagem de 5 horas, concentração da solução neutralizante (NaOH) de 1,25 M, massa da solução de quitosana de 9,7 g e proporção sílica-quitosana de 12:1.

4.1.2. Síntese da membrana de quitosana

Realizados os planejamentos experimentais, a etapa de síntese foi considerada concluída. A Figura 4.3 apresenta o fluxograma de preparação da membrana de quitosana, contendo as condições definidas pelos planejamentos experimentais.

4.2. Caracterização da matriz adsorvente

A caracterização física e morfológica da membrana escolhida pelo planejamento experimental (massa de solução 9,7 g e proporção de sílica-quitosana 12:1) foi feita com o intuito de levantar dados sobre a sua microestrutura.

4.2.1. Caracterização Física

As determinações físicas foram: espessura, diâmetro, volume, porosidade, tamanho médio de poros, área superficial efetiva e área superficial de adsorção cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Características físicas da membrana porosa reticulada de quitosana.

Espessura no estado úmido	300 μm
Diâmetro no estado úmido	4,5 cm
Porosidade no estado úmido	67%
Volume no estado úmido	0,48 cm^3
Tamanho médio dos poros no estado seco	18 μm
Área superficial específica no estado seco	41,5 m^2/g
Área efetiva para adsorção no estado úmido	15,9 cm^2

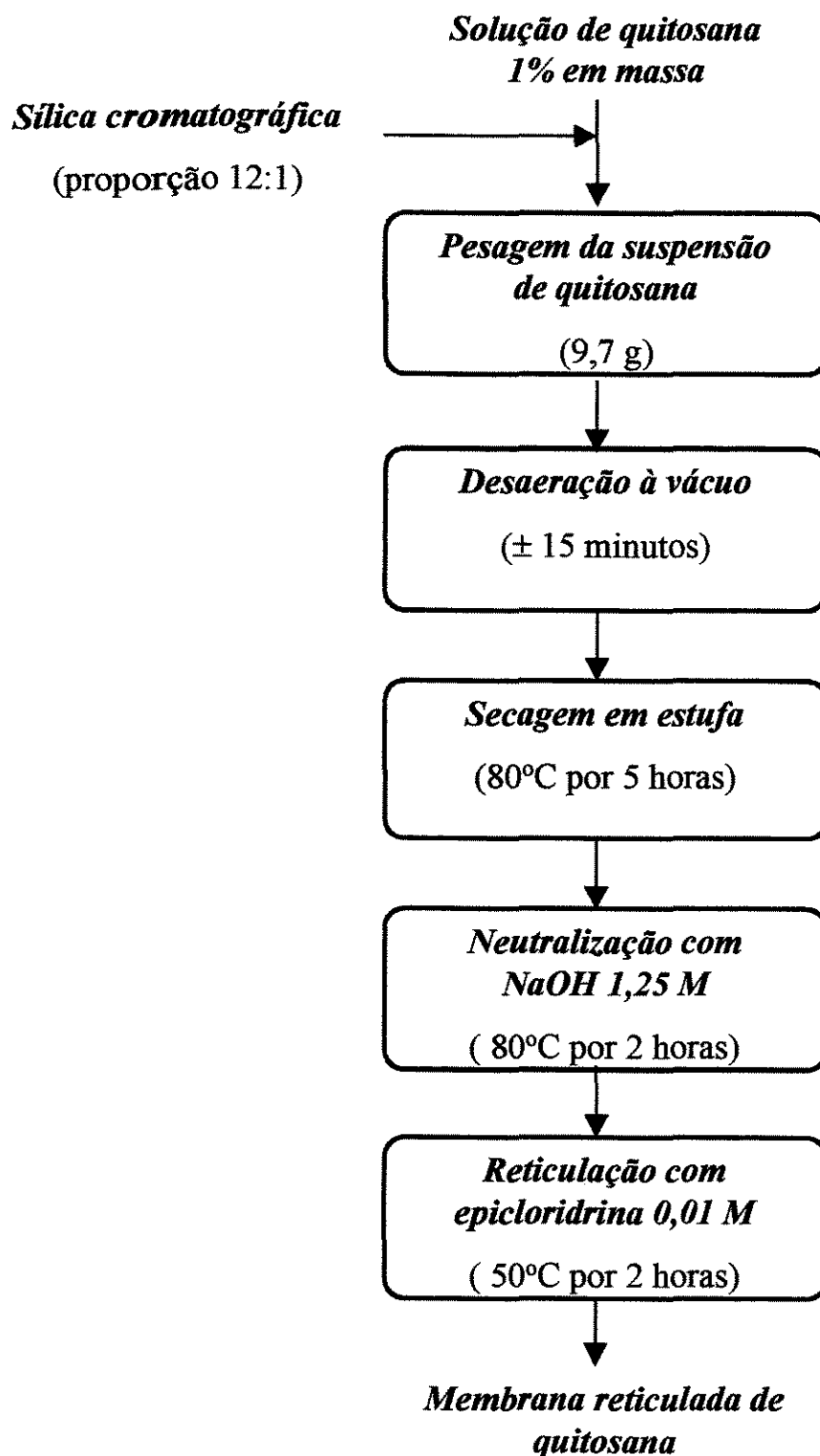


Figura 4.3: Fluxograma de síntese da membrana reticulada de quitosana.

Os resultados apresentados na Tabela 4.10 são coerentes a literatura (Zeng e Ruckenstein, 1996a, 1998b), exceto o resultado da área superficial específica, que apresentou diferença significativa. Os pesquisadores Zeng e Ruckenstein (1998b) obtiveram $1,6 \text{ m}^2/\text{g}$ (Tabela 1 do Anexo 3), ou seja, um resultado aproximadamente 26 vezes menor que o valor encontrado neste trabalho. O equipamento utilizado neste trabalho para esta determinação mede a adsorção de moléculas de nitrogênio pelo material e ajusta os resultados obtidos para o volume adsorvido de gás por dois modelos, BET e Langmuir. Os valores obtidos para três amostras foram semelhantes entre si e os resultados médios foram $25,9 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET) e $41,5 \text{ m}^2/\text{g}$ (Langmuir). Contudo, as estranhas variações nos valores do parâmetro c (item 3.2.2.6 do Capítulo 3) levaram a não confiabilidade do resultado para o ajuste por BET, apesar dos excelentes valores para o coeficiente de correlação (0,98). Por isso, o resultado obtido pelo modelo de Langmuir ($41,5 \text{ m}^2/\text{g}$) foi considerado como a melhor resposta, assumindo-se que a adsorção de nitrogênio na membrana de quitosana ocorre como previsto por este modelo. Contudo, uma investigação mais aprofundada desta análise deve ser feita para a certificação deste resultado.

4.2.2. Caracterização morfológica

A morfologia da matriz adsorvente foi determinada por microscopia eletrônica de varredura. Esta análise forneceu resultados quanto a presença dos poros e sua distribuição. As micrografias das membranas não reticulada e reticulada são mostradas na Figura 4.4.

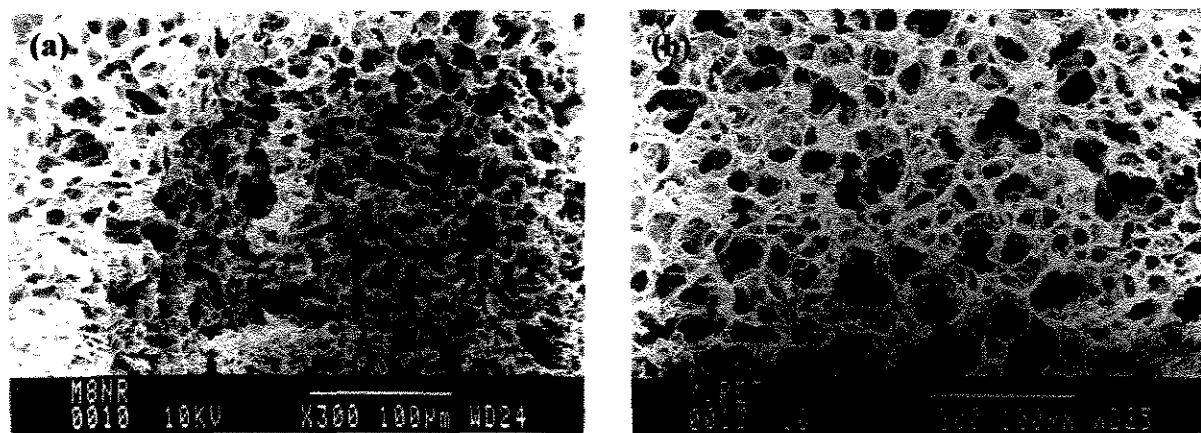


Figura 4.4: Micrografia da membrana de quitosana não reticulada (a) e reticulada com epícloridrina (b). A barra corresponde a $100\mu\text{m}$.

Observando a Figura 4.4, percebe-se que, que os poros encontram-se distribuídos uniformemente indicando a eficiência na dispersão da sílica na solução ácida de quitosana. Nota-se também, que a reticulação com epícloridrina melhorou a microestrutura da membrana reticulada em relação à arquitetura da membrana sem reticulação (ver Figuras 4.4 a,b), haja vista que a membrana não reticulada (Figura 4.4 a) sofreu colapso dos poros na liofilização, enquanto que a membrana reticulada manteve-se intacta ou sofreu poucas variações em relação a estrutura original. O mesmo fato foi observado por Zeng e Ruckenstein (1996a) e por outros pesquisadores como Arruda (1999), Beppu (1999), entre outros, mesmo com agentes reticulantes diferentes.

4.3. Experimentos de adsorção de soro antiofídico em membranas de quitosana

4.3.1. Verificação da atividade do soro antiofídico através de imunoeletroforese

Realizou-se uma imunoeletroforese para verificar a existência de atividade dos anticorpos do soro antibotrópico, adquirido do Instituto Butantan para os experimentos de adsorção. O resultado da corrida eletroforética encontra-se apresentado na Figura 4.5.

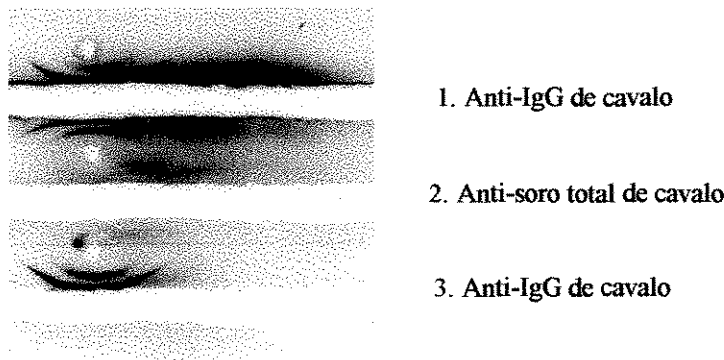


Figura 4.5: Imunoeletroforese do soro antibotrópico.

Nota-se na Figura 4.5 a formação do arco de precipitação gerado pelo encontro da IgG do soro com o seu antígeno (canaletas 1 e 3), demonstrando que os fragmentos $(Fab')_2$ do soro estão ativos. Verifica-se a presença de um outro arco de precipitação nas canaletas

1 e 3 onde foi injetado o anti-IgG de cavalo. Esta ocorrência pode ser explicada pela possibilidade do soro antiofídico utilizado conter IgG intacta e não somente os fragmentos $F(ab')_2$ como esperado. Como a massa molecular da IgG é maior, conseqüentemente apresenta maior dificuldade de difusão no gel, por isso o arco formou-se um pouco acima do arco referente à presença do fragmentos $F(ab')_2$ em todas as canaletas. Na canaleta 2 verifica-se a presença de outros arcos de precipitação que correspondem a presença de outras proteínas do soro do cavalo. A presença da IgG intacta e destas outras proteínas representam contaminações ao soro já que este deveria conter apenas fragmentos $F(ab')_2$ das imunoglobulinas.

4.3.2. Influência da solução tamponante e do pH na adsorção de anticorpos do soro em membrana de quitosana

A investigação da influência de diferentes tampões e pH na adsorção de anticorpos do soro na membrana foi realizada com a finalidade de definir as condições em que se obteria maior adsorção de endotoxinas e menor perda dos fragmentos $F(ab')_2$ do soro. As soluções tamponantes testadas foram: Fosfato de sódio (pH 7,0-8,0), Acetato de sódio (pH 5,0-6,0) e Tris-HCl (pH 7,0-8,5). A concentração das soluções tamponantes eram iguais a 25 mM.

Os experimentos foram realizados utilizando uma célula de ultrafiltração contendo uma membrana de quitosana suportada. Uma mesma membrana era utilizada durante oito filtrações com ciclos completos de adsorção, dessorção e regeneração, visto que esta se apresentou estável e mantinha sua capacidade de adsorção durante neste período. A solução de injeção continha uma massa inicial constante igual a 12,2 mg de proteína para todas as condições testadas. O fluxo de saída da célula foi monitorado por um monitor de absorbância UV. As absorbâncias das frações coletadas para cada etapa (lavagem, eluição e regeneração) foram medidas a 280 nm e a quantidade de proteína adsorvida foi determinada por balanço de massa. Todos os balanços de massa calculados forneceram uma perda menor que 10%. A Figura 4.6 mostra a quantidade de fragmento $F(ab')_2$ adsorvida por área de membrana de quitosana em relação à cada solução tamponante e pH estudados.

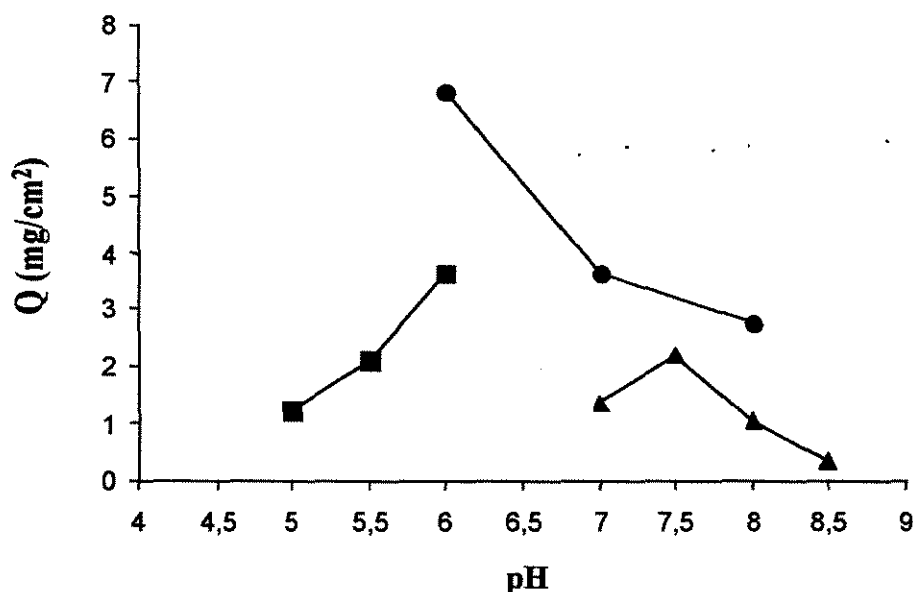


Figura 4.6: Adsorção de anticorpos do soro antibotrópico em membrana de quitosana nas diferentes soluções tamponantes e pH. Q: massa de IgG adsorvida por área total de membrana de quitosana. (■) Acetato de sódio (pH 5,0 a 6,0), (●) Fosfato de sódio (pH 6,0 a 8,0), e (▲) Tris-HCl (pH 7,0 a 8,5).

Observa-se na Figura 4.6 que o fragmento $F(ab')_2$ do soro pode ser adsorvido em todas as condições de meio estudadas (tampão e pH citados acima). Contudo, a maior adsorção ocorre em tampão fosfato pH 6,0 (aproximadamente 7 mg/cm^2). Neste estudo nota-se que, o aumento do pH do tampão a partir do pH 6,0 favorece a uma menor adsorção de anticorpos. Sabendo-se que o pK_a da membrana encontra-se na faixa de pH 6,5-7,0 (Zeng e Ruckenstein, 1999) com o aumento do pH espera-se uma desprotonação dos grupamentos amino e, conseqüentemente uma diminuição na capacidade de adsorção. Para a análise da adsorção em cada tampão a estrutura dos tampões utilizados nestes experimentos (Figura 4.7) servirá como suporte na discussão.

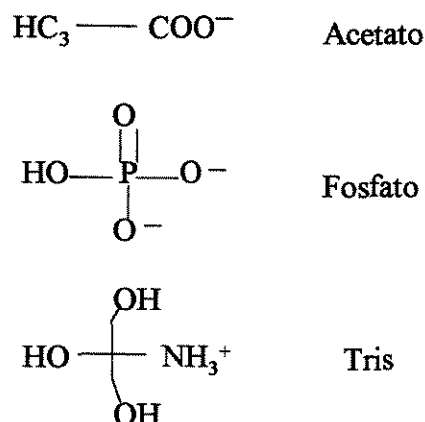


Figura 4.7: Estrutura dos sais dos tampões utilizados nos experimentos de adsorção de anticorpos do soro antiofídico na membrana de quitosana.

Os perfis apresentados em tampão fosfato de sódio e Tris-HCl é justificado pela desprotonação da membrana (pH 7,0 a 8,5, como visto na Tabela 2.1 do capítulo 2, secção 2.4) permitindo que a proteína passe livremente. O perfil apresentado em tampão acetato de sódio é justificado pela mudança de carga da proteína que normalmente tende a ficar com uma maior densidade de cargas positivas a valores mais baixos de pH (sentido da diminuição do pH).

O tampão fosfato em toda a sua faixa estudada adsorveu mais anticorpos do soro em comparação aos tampões acetato de sódio (presença de 1 carga negativa) e Tris-HCl (1 carga positiva). Uma hipótese para explicar esse resultado é a formação de pontes entre o anticorpo e a membrana através dos íons PO_4^{2-} (presença de 2 cargas para ligação). Uma outra hipótese é a interação dos íons fosfato com alguma região positivamente carregada da molécula do anticorpo, tornando aquele sítio de repulsão descartado permitindo que uma outra região contendo cargas negativas interagisse com o adsorvente. Estas são duas possibilidades dentre muitas que poderiam explicar o resultado da adsorção de proteínas em tampão fosfato por esse adsorvente, contudo seriam necessários estudos a nível molecular para uma afirmação segura.

As condições de menor adsorção foram: tampão Tris-HCl pH 8,5, tampão Tris-HCl pH 7,0 e tampão acetato de sódio pH 5,0, sendo que a massa adsorvida nas duas últimas condições foi praticamente a mesma ($1,34 \text{ mg/cm}^2$ e $1,23 \text{ mg/cm}^2$,

respectivamente). O resultado favorável obtido com o tampão acetato pH 5,0 também foi encontrado por Legallais et al. (1997) em um estudo desenvolvido visando a despirogenação de soluções de IgG, utilizando histidina imobilizada em membranas de fibra oca. Em Tris-HCl pH 8,5 a massa de fragmento $F(ab')_2$ adsorvida pela membrana de quitosana em tampão é mínima ($0,35 \text{ mg/cm}^2$) em relação às demais condições, chegando a ser 10 vezes menor que a quantidade adsorvida em tampão fosfato de sódio pH 6,0 (condição de maior adsorção). Aparentemente, esta apresenta-se como a condição ótima para a despirogenação do soro antiofídico devido à minimização da perda de proteínas. Entretanto, considerando o pKa da membrana de quitosana, deduz-se que a pH 8,5 esta encontra-se desprotonada, não apresentando condições favoráveis inclusive para a adsorção de endotoxinas. Com base nestes resultados, definiu-se que os tampões acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl 7,0 apresentaram-se como as melhores condições para a despirogenação do soro antiofídico, devido a menor perda de anticorpos. A competição entre as endotoxinas e as moléculas do anticorpo pelo sítio ativo da membrana é esperada nas duas condições escolhidas.

4.4. Experimentos de adsorção de endotoxinas em membranas de quitosana

Concluída a investigação de adsorção de proteínas do soro na matriz adsorvente e definidas as condições onde se observou uma menor perda destas proteínas, iniciou-se os experimentos de despirogenação das soluções tamponantes acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 e, posteriormente, de soluções de soro antiofídico. Neste último caso, estudou-se a influência do aumento da concentração de anticorpos na solução contaminada ao processo adsorativo. Em todos os casos, as soluções eram contaminadas artificialmente com ETs em duas concentrações, baixa e alta, a fim de se verificar a influência da concentração de ETs à remoção.

4.4.1. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes artificialmente contaminadas

Os tampões acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 foram contaminados com ETs nas concentrações de 150 EU/mL (condição 1) e 1000 EU/mL (condição 2). Os resultados para estes experimentos encontram-se na Tabela 4.11. Estes resultados estão

expressos em termos de concentração (EU/mL) e porcentagem de endotoxinas removidas ($E\%$) em relação a solução de injeção.

Tabela 4.11. Influência do tampão na remoção de endotoxinas de soluções tamponantes teoricamente contaminadas com 150 EU/mL e 1000 EU/mL.

	Acetato de sódio pH 5,0		Tris-HCl pH 7,0	
	Condição 1	Condição 2	Condição 1	Condição 2
Volume inicial (mL)	14,9	14,9	14,9	14,9
Concentração inicial (EU/mL)	162,0	1031,2	149,0	1004,3
Concentração final (EU/mL)	34,0	35,1	3,5	10,4
$E\%$ (%)	79,0	96,6	97,7	99,0

$E\%$: porcentagem de endotoxinas removidas em relação a solução de injeção.

Os resultados apresentados na Tabela 4.11 demonstram que a adsorção de endotoxinas a partir das soluções tamponantes estudadas foi possível e significativa principalmente para as soluções com maior concentração de endotoxinas (quantidade de ETs remanescentes de 3,4% e 1,0% para as soluções acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0, respectivamente).

Nota-se que o aumento do nível de contaminação influenciou na quantidade de ETs removida, visto que para soluções contaminadas com 1000 EU/mL a quantidade de ETs removida é aproximadamente 8 vezes maior quando comparada ao resultado obtido para soluções com 150 EU/mL, fato este verificado para os dois tampões estudados. Isto pode ser explicado pelo fato de que quando a molécula de interesse encontra-se em uma solução diluída, o contato desta com a matriz é dificultado, diminuindo as chances de ocorrer a interação. Esta é uma constatação comum quando se trata de processos adsortivos. Além disso, a detecção quantitativa de endotoxinas em baixas concentrações exige uma alta sensibilidade (Petsch e Anspach, 2000).

Quanto a influência da solução tamponante no processo de remoção, a solução Tris-HCl pH 7,0 foi a condição que favoreceu uma maior adsorção, embora fosse esperado um melhor resultado em tampão acetato de sódio pH 5,0. Uma explicação para este resultado pode ser obtida observando-se a estrutura dos tampões utilizados (Figura 4.7). Os

tampões apresentam grupos com carga de sinais opostos e, levando-se em consideração que a membrana de quitosana encontra-se positivamente carregada em todos os experimentos, pode-se dizer que em tampão acetato de sódio a competição pelo sítio ativo entre os grupos negativos do tampão e as endotoxinas tenha ocorrido. Em contrapartida, em tampão Tris-HCl os sítios ativos presentes encontravam-se completamente livres possibilitando a adsorção.

Os resultados para os experimentos de despirogenação discutidos anteriormente (Tabela 4.11) encontram-se novamente apresentados, sendo que na forma de gráfico (Figura 4.8), a fim de promover uma melhor visualização dos mesmos.

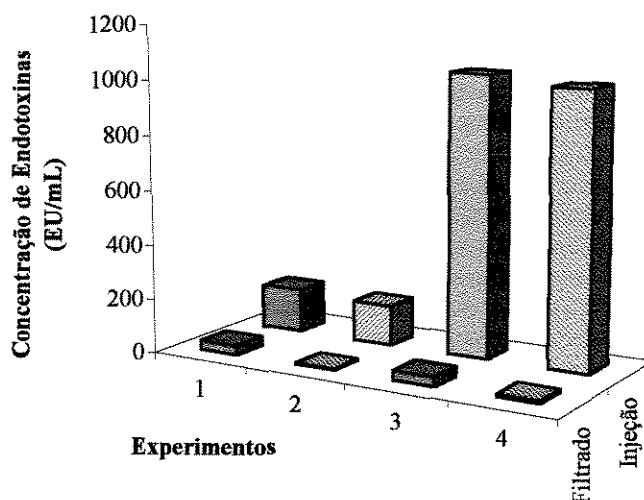


Figura 4.8: Influência da solução tamponante e do pH na remoção de endotoxinas. Barras 1 e 3: Tampão acetato de sódio pH 5,0. Barras 2 e 4: Tampão Tris-HCl pH 7,0. As soluções de injeção apresentam concentrações de 150 EU/mL e 1000 EU/mL. As barras anteriores correspondem às soluções de injeção e as posteriores, às obtidas no filtrado.

Com base nesses resultados, o tampão Tris-HCl pH 7,0 foi a solução escolhida para ser utilizada nos experimentos de despirogenação de soluções de soro antiofídico, por ser a condição que favoreceu a maior eficiência na remoção de endotoxinas sem perda significativa dos anticorpos do soro.

4.4.2. Remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico contendo baixa concentração de proteínas

A despirogenação de soluções de soro contendo baixa concentração de anticorpos foi realizada visando verificar o desempenho do adsorvente quando em contato com a mistura. A solução de injeção apresentou uma concentração em torno de 1,0 mg/mL (soro antibotrópico aproximadamente 24 vezes diluído em tampão Tris-HCl pH 7,0) contaminada com endotoxinas nas concentrações de 150 EU/mL (condição 1) e 1000 EU/mL (condição 2). As frações analisadas foram: injeção, Filtrado1 e lavagem. A etapa de lavagem foi realizada porque ensaios preliminares mostraram que a massa de anticorpos no filtrado correspondia a apenas 60% da inicial, sendo necessário aumentar a recuperação. Os resultados obtidos nestes experimentos encontram-se nas Tabelas 4.12 e 4.13. Estes resultados estão expressos em termos da concentração de ETs (C) e unidades de ETs (U) referentes a cada fração, porcentagem de endotoxinas removidas (E%) referente ao filtrado 1 e porcentagem de proteína recuperada (P%) referente às frações filtrado 1 e lavagem. Os balanços de massa apresentaram um erro de no máximo 5%.

Tabela 4.12. Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico com concentração de 1mg/mL contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 150 EU/mL.

Frações	Volume (mL)	Endotoxinas			Proteína		
		C (EU/mL)	U (EU)	E% (%)	C (mg/mL)	massa (mg)	P% (%)
Injeção	14,6	115,3	1683,4	-	1,1	15,3	-
Filtrado1	14,0	6,6	92,4	94	0,70	10,0	65
Lavagem	18,5	3,8	70	-	0,15	3,0	18

E%: porcentagem de endotoxinas removidas

P%: porcentagem de anticorpos recuperados

Tabela 4.13. Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico (1mg/mL) contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 1000 EU/mL.

Frações	Volume (mL)	Endotoxinas			Proteína		
		C (EU/mL)	U (EU)	E _% (%)	C (mg/mL)	massa (mg)	P _% (%)
Injeção	14,6	1184,5	17294,0	-	1,0	15,0	-
Filtrado1	14,0	34,2	479,0	97,0	0,83	11,6	79,0
Lavagem	20	4,3	86,0	-	0,13	2,6	17,3

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.12 e 4.13 demonstram que a remoção de endotoxinas foi possível e significativa para as duas condições investigadas (90% e 97% para as concentrações de 150 EU/mL e de 1000 EU/mL, respectivamente), sendo que a porcentagem de remoção total de ETs foi calculada considerando as unidades de ETs remanescentes no Filtrado 1 e na Lavagem. A recuperação de anticorpos total, considerando a massa presente no filtrado1 e na lavagem, também representa um bom resultado (83,0% e 96,3% para as soluções contaminadas com 150 EU/mL e 1000 EU/mL, respectivamente).

Visando aumentar a eficiência na remoção a solução referente ao Filtrado 1 foi injetada novamente no sistema e a solução coletada denominada de Filtrado 2. As concentrações de ETs remanescentes e proteína recuperada nos dois filtrados foram determinadas (Tabela 4.14). Para uma visualização mais clara, os resultados para o filtrado 1 (primeira passagem da solução através da membrana) estão novamente apresentados. Os resultados apresentados na Tabela 4.14 mostram que a eficiência no processo de remoção foi melhorada pelo aumento do contato da solução contaminada com a matriz adsorvente (97 % e 99,7 % de remoção para as contaminações de 150 EU/mL e 1000 EU/mL, respectivamente). Tendo-se em vista que os valores de remoção alcançados foram próximos aos obtidos com soluções que não continham proteína (Tabela 4.11), é possível dizer que a presença dos anticorpos em baixa concentração não influenciou no processo de despirogenação. Observa-se ainda que não houve perda significativa de anticorpos após a segunda passagem da solução através da membrana, provavelmente pelo alto fator de diluição desta solução (62% e 77% de recuperação de anticorpos após a segunda passagem para as contaminações iniciais de 150 EU/mL e 1000 EU/mL, respectivamente).

Tabela 4.14. Concentração de endotoxinas nas soluções de soro antiofídico em função do número de passagens das mesmas através da membrana.

	Condição 1		Condição 2	
	Filtrado 1	Filtrado 2	Filtrado 1	Filtrado 2
Volume (mL)	14,0	12,7	14,0	12,7
C (EU/mL)	6,6	3,4	34,2	4,2
ETs remanescente (%)	5,5	3,0	3,0	0,3
Concentração de anticorpos (mg/mL)	0,70	0,75	0,83	0,90
*Anticorpos recuperados (%)	65,0	62,0	79,0	77,0

*valores em relação a concentração da solução de injeção inicial

Obtido o Filtrado 2 para cada condição, estes foram somados a fração da lavagem formando duas outras soluções denominadas de Produto1 e Produto 2. A soma dessas frações foi feita visando compor um produto hipotético que inicialmente apresentava uma concentração de 1mg/mL de anticorpos e contaminação inicial de 150 e 1000 EU/mL submetido a um processo de despirogenação. Isto foi feito para uma verificação final da eficiência do processo de despirogenação para soluções de injeção contendo baixa concentração de anticorpos. A concentração final de endotoxinas presentes e a de anticorpos do soro foram determinadas e os resultados para as soluções Produto 1 e Produto 2 encontram-se apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15. Concentrações finais de endotoxinas e anticorpos das soluções de soro definidas como Produto1 e Produto 2.

Amostra	Volume (mL)	Endotoxinas			Anticorpos		
		C (EU/mL)	U (EU)	Remanescente (%)	C (mg/mL)	Massa (mg)	Recuperado (%)
Produto 1	31	3,6	113	7,0	0,42	13,0	85
Produto 2	33	4,0	133,3	1,0	0,43	14,2	94,6

Produto 1: mistura das frações Filtrado 2 e Lavagem para a contaminação inicial de 150 EU/mL

Produto 2: mistura das frações Filtrado 2 e Lavagem para a contaminação inicial de 1000 EU/mL

Os resultados da Tabela 4.15 demonstram altos valores para a remoção de ETs (93% e 99% para os produtos 1 e 2, respectivamente) bem como para a recuperação de anticorpos (85% e 94,6% para os produtos 1 e 2, respectivamente).

Embora a recuperação de proteínas tenha sido considerável, observa-se que para a solução menos contaminada a perda de anticorpos foi alta (15%). Uma hipótese para este resultado é a interação ET-proteína. Segundo Petsch e Anspach (2000) as ETs demonstram uma notável capacidade para interagir com outras substâncias incluindo proteínas, sendo que a adsorção com proteínas básicas é regida por forças de natureza eletrostáticas. Embora o pI do anticorpo (fragmentos $F(ab')_2$) não seja conhecido, o seu comportamento adsorptivo sugere que em pH 7,0 haja uma presença expressiva de cargas positivas favorecendo a interação eletrostática com moléculas de ETs. Ocorrida a complexação entre ET e $F(ab')_2$ e a adsorção da ET pela membrana, os anticorpos complexados são perdidos. A dificuldade de recuperação de proteínas quando soluções com baixa contaminação de ETs são injetadas foi também observada por outros pesquisadores (Anspach e Petsch, 2000; Kang e Luo 2000). Outra hipótese é que a presença de endotoxinas em menor concentração implica em mais sítios disponíveis para a adsorção dos anticorpos, por isso a perda de proteínas é menor quando altas concentrações de endotoxinas estão presentes.

4.4.3. Remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico contendo alta concentração de proteínas

A remoção de endotoxinas a partir de soluções contendo proteínas do soro em alta concentração foi realizada visando verificar o desempenho do adsorvente em uma condição mais próxima de concentração final deste produto (24 mg/mL). A solução de injeção apresentou uma concentração em torno de 15 mg/mL (soro antibotrópico diluído em tampão Tris-HCl pH 7,0). As concentrações de ETs nestes experimentos foram também de 150 EU/mL e 1000 EU/mL (condições 1 e 2, respectivamente). As frações obtidas nestes experimentos foram: filtrado 1, lavagem 1, lavagem 2 e filtrado 2. A etapa de lavagem foi dividida em duas etapas devido a maior concentração de proteínas, bem como para evitar uma alta diluição da solução de injeção. Os balanços de massa fecharam com um erro máximo de 10%. As Tabelas 4.16 e 4.17 apresentam os resultados obtidos nos experimentos para as condições 1 e 2.

Tabela 4.16. Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 150 EU/mL.

Frações	Volume (mL)	Endotoxinas			Anticorpos		
		C (EU/mL)	U (EU)	E% (%)	C (mg/mL)	massa (mg)	P% (%)
Injeção	14,5	43,7	633,7	-	13,7	198,6	-
Filtrado1	14,0	8,7	122,0	80,7	5,3	74,2	37,4
Lavagem1	17,6	4,2	73,9	-	4,5	79,2	40,0
Lavagem2	15,0	-	-	-	0,03	0,45	0,23

E%: porcentagem de endotoxinas removidas em relação a solução de injeção

P%: porcentagem de anticorpos recuperados

Tabela 4.17. Remoção de endotoxinas de solução de soro antiofídico contaminada artificialmente com endotoxinas na concentração teórica de 1000 EU/mL.

Frações	Volume (mL)	Endotoxinas			Anticorpos		
		C (EU/mL)	U (EU)	E% (%)	C (mg/mL)	massa (mg)	P% (%)
Injeção	14,5	1263,0	18313,5	-	18,6	269,7	-
Filtrado1	14,0	33,3	466,2	97,4	12,6	176,4	65,4
Lavagem1	17,6	8,5	150,0	-	4,25	75	27,8
Lavagem2	16,0	-	-	-	0,04	0,64	0,24

E%: porcentagem de endotoxinas removidas em relação a solução de injeção

P%: porcentagem de anticorpos recuperados

Nas Tabelas 4.16 e 4.17 not-se que a lavagem 2 apresentou uma concentração insignificante de proteínas (em torno de 0,03 mg/mL) para as duas condições estudadas, por isso não foi analisada quanto a concentração de endotoxinas.

Como pode ser visto na Tabela 4.16, a concentração inicial detectada foi de 43,7 EU/mL para uma contaminação prevista de 150 EU/mL. Esta diferença pode ser explicada pela interferência causada devido a presença de alta concentração de proteína na solução. Neste experimento, a diluição necessária (200X) para a determinação da concentração de ETs não foi suficiente para diminuir a concentração de proteína a um nível que evitasse a interferência no método de determinação de ETs (subestimação da

concentração). Além disso, após a etapa de desnaturação da alíquota notou-se a formação de um precipitado protéico, que pode ter arrastado parte das endotoxinas presentes na solução.

Como feito no item 4.4.2, a solução referente ao filtrado 1 foi injetada novamente no sistema e a solução coletada foi denominada de filtrado 2. As concentrações de ETs remanescentes e proteína recuperada nos dois filtrados foram determinadas e os resultados encontram-se na Tabela 4.18. Para uma visualização mais clara, os resultados para o Filtrado 1 (primeira passagem da solução através da membrana) estão novamente apresentados.

Tabela 4.18. Concentrações de endotoxinas remanescentes nas soluções de soro antiofidico em função do número de passagens das mesmas através da membrana.

	Condição 1		Condição 2	
	Filtrado 1	Filtrado 2	Filtrado 1	Filtrado 2
Volume (mL)	14,0	13,0	14,0	13,0
C (EU/mL)	8,7	5,6	33,3	6,8
ETs remanescente (%)	19,3	11,5	2,6	0,5
Concentração de anticorpos (mg/mL)	5,3	3,2	12,6	11,2
Anticorpos recuperados (%)	37,4	21,0	65,4	54,0

Os resultados apresentados na Tabela 4.18 mostram que a remoção de ETs continua alta, sendo que melhores para 1000 EU/mL. Entretanto o aumento da concentração de proteína leva a altas perdas dos anticorpos, onde se vê que o fator de recuperação é duas vezes menor que os apresentados no item 4.4.2. A eficiência na remoção de ETs foi melhorada com a passagem do filtrado 1 através da membrana ratificando o que foi observado na secção anterior. Isto sugere que, para esta membrana, um maior tempo de contato da solução com a matriz possibilitaria uma remoção a níveis mais baixos. A vazão utilizada neste trabalho foi baseada no trabalho desenvolvido por Petsch e Anspach (1998), onde 2 mL/min seria suficiente para alcançar os níveis de despirogenação desejáveis para produtos aplicados intravenosamente (0,2 EU/kg segundo a FDA), resultando em um tempo de contato de 15 seg. O tempo de contato foi calculado pela razão

entre o volume da membrana ($0,5 \text{ cm}^3$) e a vazão do filtrado (2 mL/min). No caso da membrana de quitosana esta condição não permitiu que a eficiência máxima de adsorção fosse alcançada.

Observa-se ainda que a eficiência na despirogenação da solução menos contaminada (150 EU/mL) foi relativamente baixa. Na primeira passagem obteve-se uma remoção total de 69% (considerando as unidades de ETs remanescentes no Filtrado 1 e na Lavagem1) e na segunda passagem um resultado de 79% (considerando as unidades de ETs remanescentes no Filtrado 2 e na Lavagem1). Contudo, como este resultado está relacionado com a quantidade detectada na injeção ($43,7 \text{ EU/mL}$) e tendo em vista que a concentração foi subestimada devido a interferência da proteína, é possível supor que a quantidade adsorvida foi maior que o valor apresentado nesta tabela. Por conseguinte, considerando uma injeção igual a 150 EU/mL (2175 EU) e relacionando com as unidades endotóxicas remanescentes nos filtrados e na lavagem (valores da Tabela 4.16) os valores de remoção alcançados seriam iguais a 91% e 94% para a primeira e segunda passagens respectivamente. Quanto a recuperação dos anticorpos do soro pode-se dizer que a alta perda observada (23%) pode ser explicada pela formação dos complexos proteína-ETs como explicado no sub-seção anterior.

Os resultados obtidos para a solução contendo maior concentração de ETs (1000 EU/mL) foram expressivos chegando a alcançar 98% de remoção de ETs e 93% de recuperação após a segunda passagem através da membrana, considerando as unidades de ETs remanescentes e proteínas presentes no Filtrado 2 e na Lavagem 1.

Obtido o Filtrado2 para as condições 1 e 2, estes foram somados a fração da Lavagem1 para cada condição de contaminação, formando duas outras soluções denominadas de Produto 3 e Produto 4. A explicação para a soma destas duas frações é a mesma citada na seção 4.4.2. Estas soluções foram analisadas quanto a concentração de ETs e anticorpos do soro antiofidico, visando verificar a eficiência total do processo de despirogenação de soluções de soro contendo alta concentração de anticorpos. Os resultados das análises para as soluções Produto 3 e Produto 4 encontram-se apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19. Concentrações finais de endotoxinas e anticorpos nas soluções de soro definidas como Produto 3 e Produto 4.

Amostra	Volume (mL)	Endotoxinas			Anticorpos		
		U (EU)	C (EU/mL)	Remanescente (%)	Massa (mg)	C (mg/mL)	Recuperado (%)
Produto 3	30,6	194,8	6,4	30,7	121,0	3,95	61
Produto 4	30,6	238,4	7,8	1,3	220,6	7,2	82

Produto 3: mistura das frações Filtrado 2 e Lavagem 1 para a contaminação de 150 EU/mL.

Produto 4: mistura das frações Filtrado 2 e Lavagem 1 para a contaminação de 1000 EU/mL.

Na Tabela 4.19 nota-se que a despirogenação e a recuperação de anticorpos foi eficiente principalmente para a solução contendo alta concentração de ETs, onde os resultados para remoção e recuperação alcançados foram de 98,7% e 82%, respectivamente.

Em nenhum dos experimentos realizados com soluções de soro, quer seja em alta ou baixa concentração de anticorpos, foi alcançada uma despirogenação de 100%. Para uma aplicação intravenosa dos produtos finais obtidos (Produto 1, Produto 2, Produto 3 e Produto 4) seria necessário submetê-los a outras etapas de despirogenação.

Os resultados apresentados neste trabalho quando comparados àqueles desenvolvidos por Petsch e colaboradores (1997, 1998 e 2000), que apresentava sistema de filtração semelhante ao deste trabalho, nota-se que a grande diferença nos fatores de purificação, cerca de 300 vezes, deve-se a alta concentração de injeção, em torno de 6000 EU/mL, concentração esta que favorece a eficiência na remoção como discutido anteriormente.

Analisando o trabalho desenvolvido por Legallais e colaboradores (1997), onde concentrações de ETs mais próximas às estudadas nesse trabalho, observa-se que a remoção em soluções com contaminações baixa e alta (80,7% e 72,1%, respectivamente) estão em concordância com os resultados obtidos neste trabalho. Por outro lado, observou-se uma maior capacidade do adsorvente His-PEVA para remover ETs em baixa concentração quando comparado a membrana de quitosana.

Na despirogenação de soro antiofídico por adsorção em His-PEVA realizado por Acconci (1998) observa-se que para um nível de contaminação mais alto (1000 EU/mL) a membrana de quitosana apresentou um melhor desempenho (92% e 98% de remoção para as membranas His-PEVA e quitosana, respectivamente). Entretanto, para níveis mais baixos de contaminação a membrana His-PEVA apresentou uma diferença de 20% acima na eficiência de remoção em relação a membrana de quitosana. Duas diferenças importantes entre os sistemas utilizados por Acconci (1998) e Legallais (1997) em relação ao sistema deste trabalho são: a área de adsorção do leito de fibras ocas cortadas em relação a membrana de quitosana (cerca de 3 vezes maior) e o tempo de contato da solução com o adsorvente (solução recirculada em circuito fechado durante 1 hora).

É válido ressaltar que a membrana de quitosana foi utilizado em um sistema não otimizado (uma única membrana suportada em uma célula de ultrafiltração) sem o acoplamento de ligantes específicos ou pseudobioespecíficos para a adsorção de ETs, explorando-se simplesmente os grupos amino-reativos presentes na sua estrutura. Uma parcela de contribuição nos resultados obtidos deve ser atribuída a afinidade entre a quitosana e as ETs, como relatado por Davydova et al. (2000). Em vista disso, os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios para o objetivo ao qual se propôs.

Análise da influência do aumento da concentração de proteínas no processo de remoção de endotoxinas

Para a despirogenação de soluções contendo proteínas é necessário que se estabeleça um compromisso entre a eficiência na remoção do pirogênio e a recuperação das proteínas constituintes da solução. A influência da concentração de anticorpos do soro ao processo de despirogenação, foi estudada com exclusividade neste tópico. Para isso, os resultados obtidos nos experimentos de remoção realizados com soluções contaminadas a 1000 EU/mL foram analisados na Figura 4.9. A remoção alcançada encontra-se expressa em unidades endotóxicas adsorvidas por área de membrana (Q') a diferentes concentrações de anticorpos nas soluções de injeção. Para fins de comparação, os resultados de massa adsorvida referem-se àqueles obtidos na primeira passagem da solução através da membrana (924 EU/cm², 1057,5 EU/cm² e 1115,5 EU/cm² para as soluções sem proteína, contendo 1 mg/mL de soro e 18,6 mg/mL de soro, respectivamente).

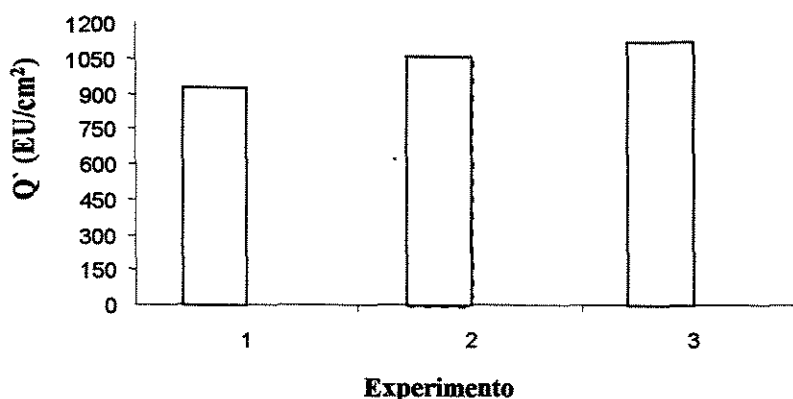


Figura 4.9: Influência da concentração de anticorpos ao processo de remoção de endotoxinas. (1): quantidade de ETs removida a partir de tampão Tris-HCl pH 7,0. (2): quantidade de ETs removida a partir de solução de soro com concentração de 1mg/mL. (3): quantidade de ETs removida a partir de solução de soro com concentração de 18,6 mg/mL.

Na Figura 4.9 verifica-se que a adsorção de ETs na membrana de quitosana não foi afetada pela concentração de anticorpos na solução de injeção, ainda que em altas concentrações. Com base nas condições de pH do sistema membrana e solução (soro antiofídico, tampão Tris HCl e endotoxinas) em contato com a membrana, pode-se dizer que os grupos funcionais da membrana que estiverem protonados estarão com carga positiva (pK_a 6,3–7,0), as endotoxinas estarão negativamente carregadas (pI em torno de 2,0 (Pearson, 1985)) e a condição dos fragmentos $F(ab')_2$ do soro não é conhecida, podendo conter carga líquida positiva e/ou negativa com maior probabilidade de ser positiva. Logo, se a competição pelo sítio ativo da matriz adsorvente ocorreu, as endotoxinas preferencialmente eram adsorvidas. Por outro lado, se ocorreu a competição entre os grupos reativos da membrana e os fragmentos $F(ab')_2$ do soro pela ET, preferencialmente a interação ocorreu com a membrana. Portanto, seria possível deduzir que a partir de uma determinada concentração do anticorpo e endotoxinas em uma mistura, a remoção de endotoxinas não seria afetada ou apresentaria pequenas variações com o aumento da concentração de anticorpos na solução a ser filtrada. Infelizmente, os mecanismos de interação e/ou competição na adsorção de endotoxinas e anticorpos do soro na membrana de quitosana não são conhecidos em literatura. O levantamento dos dados de isotermas de adsorção para essas moléculas em soluções puras e em uma mistura faz-se necessário para uma discussão mais aprofundada.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. Conclusão

A matriz adsorvente sintetizada neste trabalho foi desenvolvida com o objetivo de ser aplicada em processos de despirogenação de soro antiofídico. A etapa de obtenção da membrana de quitosana foi dividida em síntese e caracterização.

A síntese da membrana foi desenvolvida com base em método proposto na literatura e na execução de dois planejamentos experimentais. No primeiro planejamento foi investigada a influência das variáveis tempo de neutralização, temperatura de neutralização, concentração de NaOH, massa inicial da solução de quitosana e proporção sílica-quitosana, sobre a vazão. A análise estatística dos efeitos das variáveis demonstrou que somente a massa inicial da solução de quitosana e a proporção sílica-quitosana exerceram efeito significativo sobre a vazão.

O segundo planejamento, onde se estudou a influência dos fatores Massa inicial da solução e a proporção sílica-quitosana sobre as variáveis Vazão e Tensão, a fim de se obter uma membrana com características de vazão e resistência física adequadas aos experimentos. A análise estatística dos efeitos demonstrou que os dois fatores estudados exerciam efeito significativo. A análise de variância para os modelos obtidos em relação a Vazão e a Tensão foram considerados válidos e preditivos, visto que a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e o F_{tabelado} foi de 6,16. A escolha da membrana a ser utilizada nos experimentos de adsorção foi baseada na análise estatística feita para a Tensão e no fator econômico. A membrana escolhida foi a que apresentou 13 mL/min de vazão e 0,81 MPa de tensão. Desta forma, como as informações encontradas na literatura foram insuficientes para a reprodução da membrana, o planejamento experimental foi uma importante ferramenta na definição das condições de síntese de uma membrana que apresentasse características adequadas para a finalidade deste trabalho. Finalizada a síntese, a caracterização física permitiu verificar que a membrana de quitosana escolhida apresentou características semelhantes às aquelas apresentadas na literatura.

Após a síntese e caracterização, a membrana foi utilizada em experimentos de adsorção primeiramente de anticorpos do soro e em seguida de endotoxinas presentes em soluções tamponantes e em soluções de soro antiofídico. A investigação da influência da solução tamponante e do pH na adsorção de anticorpos do soro nas membranas permitiu verificar que os tampões acetato de sódio pH 5,0 e Tris-HCl pH 7,0 favoreceram uma menor perda dos anticorpos, bem como uma possível condição de menor competição pelo sítio de adsorção.

A despirogenação de soluções tamponantes, previamente definidas, foi realizada com soluções contaminadas artificialmente em dois níveis de contaminação: 150 EU/mL e 1000 EU/mL. Os resultados demonstraram que a solução Tris-HCl pH 7,0 foi a que favoreceu uma maior adsorção de endotoxinas, onde se obteve 97,7% e 99,0% de remoção para soluções contaminadas com 150 EU/mL e 1000 EU/mL, respectivamente.

Definida a solução tamponante, esta foi utilizada nos experimentos despirogenação de soluções de soro antiofídico. Estes experimentos foram realizados com soluções de baixa e alta concentração de proteínas. Verificou-se que, para soluções de soro contaminadas com ETs contendo baixa concentração de proteínas (1 mg/mL) obteve-se altos valores para a porcentagem de remoção (93% e 99% para os produtos inicialmente contaminados com 150 EU/mL e 1000 EU/mL, respectivamente). Da mesma forma a recuperação de anticorpos foi bastante significativa, tendo-se obtido nos produtos finais 85% e 94,6% de anticorpos em soluções inicialmente contaminadas com 150 EU/mL e 1000 EU/mL, respectivamente.

No caso de soluções contendo alta concentração de anticorpos de soro antiofídico, os fatores de remoção de ETs (98,7%) e recuperação dos anticorpos (82%) foram bastante expressivos para solução contaminada com 1000 EU/mL. Em contra partida, para a solução contaminada a 150 EU/mL notou-se uma perda significativa de anticorpos (recuperação de 61% no produto final). Este resultado deveu-se, provavelmente, à complexação ETs-proteínas e/ou a uma maior quantidade de sítios livres devido a baixa concentração de ETs. Nesta condição de contaminação além da alta perda de anticorpos alcançou-se também a menor eficiência na remoção de ETs (69,3%). A baixa remoção deveu-se possivelmente à interferência no método de quantificação, causada pela presença de proteínas em alta concentração. Nos experimentos com soluções de soro antiofídico, contendo baixa e alta

concentração de anticorpos, notou-se também que os fatores de remoção foram melhorados quando a solução foi filtrada mais de uma vez, ou seja, a eficiência máxima de adsorção da membrana não foi alcançada com as concentrações de endotoxinas utilizadas neste trabalho.

Finalmente, pode-se concluir que a membrana de quitosana desenvolvida neste trabalho foi eficiente quando aplicada em processos de remoção de endotoxinas de soluções de soro antiofídico, podendo ter sua aplicação expandida para a despirogenação de outras soluções protéicas.

5.2. Sugestões para próximos trabalhos

Para o aprofundamento e complementação deste trabalho, sugere-se estudar em futuros trabalhos os seguintes itens:

- Obter dados de equilíbrio pela construção de isotermas de adsorção utilizando solução tampão e solução de soro puras e contaminadas com endotoxinas;
- Estudar outras condições tamponantes para maximizar a adsorção de endotoxinas e minimizar a perda de anticorpos;
- Otimizar o sistema de filtração pela montagem de um cartucho contendo um número de membranas, aumentando desta forma a área de adsorção;
- Otimizar as condições como vazão e tempo de contato da solução contaminada com o adsorvente ;
- Estudar o efeito da força iônica, pela introdução de um sal na solução, sobre a eficiência na remoção de endotoxinas;
- Desenvolver experimentos utilizando a membrana de quitosana derivatizada com um ligante de afinidade ou pseudoafinidade.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCONCI, C., LEGALLAIS, C., VIJAYALAKSSHMI, M., BUENO, S. M. A. Depyrogenation of snake antivenom serum solutions by hollow fiber-based pseudobioaffinity filtration. **Journal of Membrane Science**, v. 173, p. 235-245, 2000.
- ACCONCI, C. **Processo de remoção de endotoxinas de soros hiperimunes: Filtração em membranas de afinidade**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 78 p. Tese (Mestrado).
- ACCONCI, C. Comunicação Pessoal, agosto, 2001.
- ANSPACH, F.B.; PETSCH, D. Membrane adsorbers for selective endotoxin removal from protein solutions. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1005-1012, 2000.
- ANSPACH, F.B.; HILBECK, O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. **Journal of Chromatography A**, n. 711, p. 81-92, 1995.
- ANTHONSEN, M.W.; SMIDSRØD, O. Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced ¹H-NMR chemical shifts. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 303-305, 1995.
- ARRUDA, E.J. **Concentração e purificação de β -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999, 202 p. Tese (Doutorado).

ARRUDA, E.J. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por freitas@feq.unicamp.br em 13 Ago. 2001.

ASTM: Standard test method for tensile properties os thin plastic sheeting. Designation 882-95a, 1995.

BARROS NETO, B.; SACARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**; São Paulo, Campinas: editora da UNICAMP, 1995.

BEPPU, M.M. **Estudo da calcificação *in vitro* de quitosana**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 121 p. Tese (Doutorado).

BRADFORD, M.M.; A rapid 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.

BRANDT, S.; GOFFE, R.A.; KESSLER, S.B.; O'CONNOR, J.L.; ZALE, S.E. Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications. **Biotechnology**, v. 6, p. 780-782, 1988.

BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Experimental kinetic aspects of hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from humam plasma. **Journal of Membrane Science**, v. 117, p. 45-56, 1996.

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 fibre membranes. **Journal of Chromatography B**, v. 667, p.57-67, 1995b.

- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. *In vitro* removal of human IgG by pseudobiospecific affinity membrane filtration on a large scale. A preliminary report. **The international Journal of Artificial Organs**, v. 18, p.392-398, 1995a.
- CHANDRKRACHANG, S.; WANICHPONGPAN, P. Preparation and characterization of controlling pore size chitosan membranes. **Advances in Chitin Science**, v. 4, p. 349-354, 2000.
- DAVYDOVA, V.N.; YERMAK, I.M.; GORBACH, V.I., KRASIKOVA, I.N., SOLOV'EVA, T.F. Interaction of bacterial endotoxins with chitosan. Effect of endotoxin structure, chitosan molecular mass, and ionic strength of the solution on the formation of the complex. **Biochemistry** (Moscow), v. 65, n. 9, p. 1082-1090, 2000.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA, 1997, 3 ed.
- FRIBERGER, P.; KNOS, M.; MELLSTAM, L. Endotoxin and their detection with the Limulus Amebocyte Lysate Test. Alan R. Liss, New York, p. 195-206, 1982.
- GOTOH, K.; MASUDA, H.; HIGASHITANI, K. **Powder Technology Handbook**. New York: Marcel Dekker, 1997.
- HELANDER, I.M.; VAARA, M. Reversible binding of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides by immobilized protamine. **European Journal of Biochemistry**, v. 163, p. 51-55, 1987.
- HOU, K. C. & ZANIEWSKI, R. Depyrogenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge. **Journal of Parenterals Science Technology**, v.44, p. 204-209, 1990a.

- KANG, Y.; LUO, R. G. Effects of ionic strength and pH on endotoxin removal efficiency and protein recovery in an affinity chromatography. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 85-92, 2000.
- KANG, Y.; LUO, R. G. Chromatographic removal of endotoxin from hemoglobin preparations effects of solution conditions on endotoxin removal efficiency and protein recovery. **Journal of Chromatography A**, v. 809, p. 13-20, 1998.
- LALOV, I.G.; GUERGINOV, I.I.; KRYSTEVA, M.A.; FARTSOV, K. Treatment of waste water from distilleries with chitosan. **Water Research**, v. 34, n. 5, p. 1503-1506, 2000.
- LEE, Y.M.; PARK, H.B.; NAM, S.Y. Effect of desacetylation degree in chitosan composite membranes on pervaporation performance. **Separation Science and Technology**, v. 33, n. 9, p. 1255-1269, 1998
- LEGALLAIS, C.; ANSPACH, F.B.; BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Strategies for the depyrogenation of contaminated immunoglobulin G solutions by histidine-immobilized hollow fiber membrane. **Journal of Chromatography B**, v. 691, p. 33-41, 1997.
- LI, L.; LUO, R. G. Protein concentration effect on protein-lipopolysaccharide (LPS) binding and endotoxin removal. **Biotechnol. Lett.**, v. 19, p. 135-138, 1997.
- MAYER, H.; WECKESSER, J. "Unusual" lipid A's: structures, taxonomical relevance and potential value for endotoxin research. In: Riestschel, E. Th. (Ed.), **Handbook of Endotoxin**, Elsevier, Amsterdam, v. 1, p. 221-247, 1984.
- MARTICH, G. D.; BOUJOUKUS, A.J.; SUFREDINI, A.F. Response of man to endotoxin. **Immunobiology**, v. 187, p. 403-416, 1993.

- MATSUMAE, H.; MINOBE, S.; KINDAN, K.; WATANABE, T.; SATO T. E TOSA, T. Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 129-140, 1990.
- MINOBE, S.; WATANABE, T.; SATO, T.; TOSA, T. Characteristics and applications of adsorbents for pyrogen removal. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.10, p.143-153, 1988.
- NAKATA, T. Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 59-63, 1994.
- NATURAL TOXINS RESEARCH CENTER, TEXAS A&M UNIVERSITY, KINGSVILLE: Monoclonal Antibody Production. Disponível em: <<http://ntri.tamuk.edu/monoclonal.html>>. Acesso em: 26 nov 2001.
- NEIDHARDT, E.A.; LUTHERAND, M.A.; RECNY, M.A. Rapid, two-step purification process for the preparation of pyrogen-free murine immunoglobulin G₁ monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography A**, v. 590, p. 255-261, 1992.
- O Estado de São Paulo: Editoriais. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/editoriais.html>>. Acesso em: 21 nov 2001.
- PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B. Bacterial LPS: a mediator of inflammation. **Handbook of Inflammation**, v. 6, Elsevier, Amsterdam, p. 361-393, 1989.
- PEARSON, F.C. **Pyrogens**. Marcel Dekker, New York, p. 119-220 (capítulos 9-11), 1985.
- PETSCH, D.; ANSPACH, F. B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 97-119, 2000.

- PETSCH, D.; DECKWER, W.D; ANSPACH, F.B.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M. Endotoxin removal with poly(ethyleneimine)-immobilized adsorbers: sepharose 4b versus flat sheet and hollow fibre membranes. **Journal of Chromatography B**, v. 707, p 121-130, 1998.
- PETSCH, D.; BEESKOW, T.C.; ANSPACH, F.B.; DECKWER, W.D. Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin. **Journal of Chromatography B**, v. 693, p 79-91, 1997.
- RAETZ, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. **Ann. Rev. Biochem**, v. 59, p. 129-170, 1990.
- RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. in: **Chitin and Chitosan**, (eds) Skjaek-Braek, G. et al., Elsevier Applied Science, p. 71-86, 1989.
- ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo, Manole Ltda, 1999.
- SCHINDLER, R.; DINARELLO, C.A. A method for removing interleukin-1 and tumor necrosis factor-inducing substances from bacterial cultures by ultrafiltration with polysulfone. **Journal of Immunological Methods**, v. 116, p. 159-165, 1989.
- TALMADGE K.W.; SIEBERT, C.J. Efficient endotoxin removal with a new sanitizable affinity column: affi-prep polymyxin. **Journal of Chromatography A**, v. 476 , p. 175-185, 1989
- UNARSKA, M.; DAVIES, P.A.; ESNOUF, M.P.; BELHOUSE, B.J. Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems; **Journal of Chromatography A**, v. 519, p. 53-67, 1990.
- VARUM, K.M.; OTTOY, M.H.; SMIDSRØD, O. Water-solubility of partially N acetylated chitosans as a function of pH: effected of chemical composition and depolymerisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 65-70, 1994.

- VLUG, A.; VAN REMORTEL, P. The structure and function of IgG subclasses. **American Clinical Laboratory**, v. 8, p. 28-36, 1989.
- WEI, Y. C.; HUDSON, S. M.; MAYER, J. M.; KAPLAN, D. L. The crosslinking of chitosan fibers. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 30, p. 2187-2193, 1992.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Membrane chromatography: Preparation and applications to protein separation. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1003-1019, 1999.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Cross-linked macroporous chitosan anio-exchange membranes for protein separations. **Journal of Membrane Science**, v. 117, p. 195-205, 1998b.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Trypsin purification by *p*-aminobenzamidine immobilized on macroporous chitosan membranes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 37, p. 159-165, 1998a.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption. **Journal of Membrane Science**, v. 117, p. 271-278, 1996b.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 35, p. 4169-4175, 1996a.

ANEXO 1

A Figura 1 apresenta os efeitos dos fatores temperatura de neutralização, tempo de neutralização, concentração de NaOH, massa inicial da solução de quitosana e proporção sílica-quitosana sobre a vazão no planejamento fracionário 2^{5-2} .

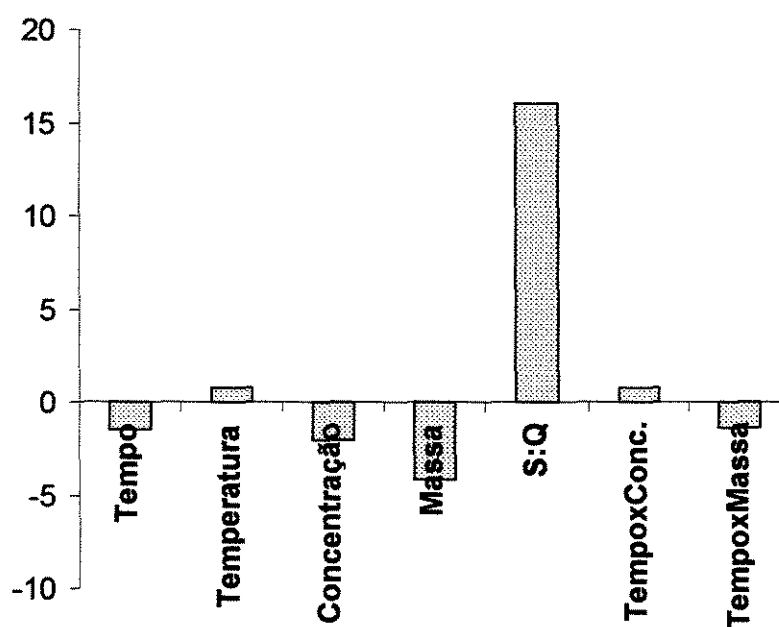


Figura 1. Efeitos dos fatores estudados no planejamento fracionário 2^{5-2} sobre a Vazão.

ANEXO 2

As tabelas abaixo apresentam os valores dos desvios padrões referentes às medidas experimentais da Vazão (Tabela 1) e Tensão (Tabela 2). Os desvios foram calculados utilizando as equações A.1, A.2 e A.3.

Tabela 1. Desvio padrão entre as medidas das vazões para cada experimento.

Experimento	Vazão média (mL/min)	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão (%)
1	17,6	0,59	0,77	4,4
2	14,5	0,16	0,4	2,8
3	20,5	0,21	0,46	2,2
4	14,8	0,06	0,24	1,6
5	21,4	0,75	0,86	4,0
6	16,9	0,23	0,48	2,8
7	13,8	0,04	0,21	1,5
8	12,9	0,31	0,56	4,3
PC1	16,6	0,42	0,64	3,9
PC2	16,7	0,70	0,84	5,0
PC3	16,7	0,09	0,3	1,8

PC: ponto central

Tabela 2. Desvio padrão entre as medidas das tensões para cada experimento.

Experimento	Tensão média (mL/min)	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão (%)
1	0,70	0,001	0,032	4,5
2	0,79	0,004	0,06	7,6
3	0,62	4×10^{-4}	0,02	3,4
4	0,61	9×10^{-4}	0,03	5,0
5	0,55	9×10^{-3}	0,095	17,1
6	0,59	$3,5 \times 10^{-3}$	0,059	9,1
7	0,64	5×10^{-4}	0,022	3,4
8	0,81	2×10^{-3}	0,045	5,5
PC1	0,52	$1,8 \times 10^{-3}$	0,042	8,0
PC2	0,55	$1,5 \times 10^{-3}$	0,038	7,0
PC3	0,54	2×10^{-3}	0,045	8,3

Cálculo do desvio individual:

$$d_i = v_i - v_m \quad (\text{A.1})$$

onde:

v_i : valor individual, sendo que i varia de 1 a 3 (referente a cada medida da triplicata)

v_m : valor médio entre os valores individuais

Cálculo da variância:

$$s^2 = \frac{\sum d_i^2}{3} \quad (\text{A.2})$$

Cálculo do desvio padrão:

$$s = \sqrt{s^2} \quad (\text{A.3})$$

ANEXO 3

A Tabela 1 apresenta as características físicas da membrana reticulada de quitosana do trabalho desenvolvido por Zeng e Ruckenstein (1996a) e aplicada na separação de proteínas.

Tabela 1. Características físicas da membrana porosa reticulada de quitosana utilizada por Zeng e Ruckenstein (1998b).

Espessura no estado úmido	500 μm
Diâmetro no estado úmido	4,5 cm
Porosidade no estado úmido	62%
Volume no estado úmido	0,7 cm^3
Tamanho médio dos poros no estado seco	18 μm
Área superficial específica no estado seco	1,6 m^2/g
Área efetiva para adsorção no estado úmido	13,8 cm^2