

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**EFEITO DO ÍON METÁLICO, DO SISTEMA TAMPONANTE E DO SAL (NaCl) NA
ADSORÇÃO DE IgG HUMANA EM FIBRAS OCAS DERIVATIZADAS COM CM-Asp**

Eng^a Gisele Luiza Pavan

Mestranda

Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

Dissertação 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

Julho de 2011

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

P288e Pavan, Gisele Luiza
Efeito do íon metálico, do sistema tamponante e do sal (NaCl) na adsorção de IgG humana em fibras ocas derivatizadas com CM-Asp / Gisele Luiza Pavan. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. Imunoglobulina G. 2. Cobalto. 3. Níquel. 4. Sal. I. Bueno, Sônia Maria Alves . II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Effect of metal ion, buffer system and salt (NaCl) on adsorption of human IgG in hollow fiber derivatized with CM-Asp

Palavras-chave em Inglês: Immunoglobulin G, Cobalt, Nickel, Salt

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

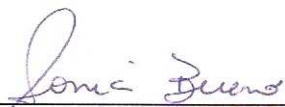
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Elisabeth de Fátima Pires Augusto, Marisa Masumi Beppu

Data da defesa: 12/07/2011

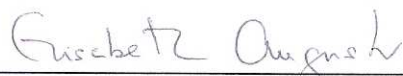
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Gisele Luiza Pavan e aprovada em 12 de Julho de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



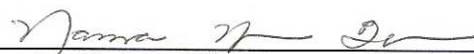
Prof^a. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora: FEQ/UNICAMP



Dra. Elisabeth de Fátima Pires Augusto

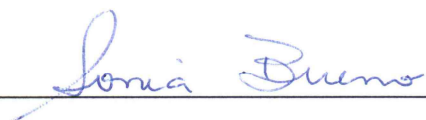
IPT/SP



Prof^a. Dra. Marisa Masumi Beppu

FEQ/UNICAMP

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Gisele Luiza Pavan e aprovada pela comissão julgadora em 12 de julho de 2011.

A handwritten signature in blue ink, reading "Sônia Bueno", is positioned above a horizontal line.

Prof^a. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora: FEQ/Unicamp

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Kemp Pavan e Vanderli Galdino Pavan por todo o amor e dedicação, por terem sido peça fundamental para que eu tenha me tornado a pessoa que sou.

Agradecimentos

A Deus pelo amor, paz e força que tem me concedido.

A minha família que sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amigo e namorado, Ulisses, que esteve comigo com muito amor, carinho e paciência.

A professora Dr^a Sônia Maria Alves Bueno pela orientação, experiência e paciência no decorrer deste trabalho.

Aos amigos sempre presentes em minha vida: Michelly, Natália, Priscila, Carolina e Samuel.

Aos meus amigos em Deus, presença viva d'Ele em minha vida.

Aos amigos e colegas de laboratório Luana, Marcel, Vanessa, Yuan, Cecília, Itiara, Ana, Walter, Nemailla, Gisele, Max, Naimy, Igor e Iara, pelo companherismo e amizade no decorrer destes anos.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dr^a. Ângela Maria Moraes por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios.

Aos professores Dr. Adriano Azzoni e Dr^a Marisa Beppu pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

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

Ao CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Ele fez tudo apropriado ao seu tempo. Também pôs no coração do homem o anseio pela eternidade; mesmo assim este não consegue compreender inteiramente o que Deus fez.” (Eclesiastes 3:11)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XVI
Resumo	XX
Abstract	XXI
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo	3
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Imunoglobulina G	5
2.2. Purificação de IgG	7
2.3. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	11
2.3.1. Matriz cromatográfica	12
2.3.2. Agente quelante	13
2.3.3. Íon metálico	14
2.3.4. Adsorção e dessorção	16
2.3.4.1. Adsorção	16
2.3.4.2. Dessorção	18
2.4. Membranas de afinidade	19

CAPÍTULO 3: MATERIAS E MÉTODOS	24
3.1. Materiais	24
3.1.1. Reagentes	24
3.1.2. Matriz	24
3.2. Métodos	25
3.2.1. Ativação das membranas com epicloridrina	25
3.2.2. Síntese e imobilização do CM-Asp	26
3.2.3. Experimentos cromatográficos em membranas de afinidade	27
3.2.4. Quantificação de proteínas totais	28
3.2.5. Eletroforese SDS – PAGE	28
3.2.6. Quantificação de IgG, IgM, Trf e Alb	28
3.2.7. Determinação das isotermas de adsorção	29
3.2.8. Determinação da curva de ruptura	30
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Estudo do efeito do sistema tamponante, do íon metálico e da remoção do sal NaCl na purificação de IgG a partir do soro humano utilizando os adsorventes PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co ²⁺	35
4.2. Isoterma de adsorção de IgG em PEVA-CM-Asp-Me ²⁺	54
4.3. Determinação das curvas de ruptura	59

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	67
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	69
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO A	84
ANEXO B	98
ANEXO C	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura da imunoglobulina G.	6
Figura 3.1. Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA.	30
Figura 3.2. Esquema dos modos de lavagem das fibras ocas de PEVA contidas no módulo de filtração.	31
Figura 3.3. Esquema da montagem utilizada na ativação das membranas de PEVA contidas no módulo de filtração.	32
Figura 3.4. Esquema da montagem do experimento de filtração.	33
Figura 4.1. Capacidade de adsorção em termos de proteínas totais do soro humano para os sistemas tamponantes estudados.	36
Figura 4.2. Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias a partir de soro humano diluído nos sistemas tamponantes indicados em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ .	37
Figura 4.3. Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias a partir de soro humano diluído nos sistemas tamponantes indicados em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	38
Figura 4.4. Perfil de eluição das proteínas adsorvidas para o sistema tamponante MA utilizando a estratégia de eluição por abaixamento de pH para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ .	41
Figura 4.5. Perfil de eluição das proteínas adsorvidas para o sistema tamponante MA utilizando a estratégia de eluição por abaixamento de pH para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	41
Figura 4.6. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na presença de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ .	45
Figura 4.7. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na ausência de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ .	45
Figura 4.8. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na presença de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	46

Figura 4.9. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na ausência de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	46
Figura 4.10. Estrutura do dos sistemas tamponantes.	52
Figura 4.11. Comparação na adsorção de IgG para os íons níquel e cobalto para os sistemas tamponantes MA-imidazol e fosfato de sódio-imidazol (ausência de sal).	53
Figura 4.12. Isoterma de adsorção de IgG em membranas PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ .	55
Figura 4.13. Isoterma de adsorção de IgG em membranas PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	55
Figura 4.14. Isoterma de adsorção de IgG pré-purificada em membranas PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	57
Figura 4.15. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ .	60
Figura 4.16. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	60
Figura 4.17. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0.	61
Figura 4.18. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0.	62
Figura 4.19. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ .	64
Figura 4.20. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ .	65
Figura A.1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ NaCl a pH 7,0.	84
Figura A.2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	85
Figura A.3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e NaCl 1,0 mol L ⁻¹ a pH 7,0.	86

Figura A.4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	86
Figura A.5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCl a pH 7,0.	87
Figura A.6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	88
Figura A.7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCl a pH 7,0.	89
Figura A.8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	89
Figura A.9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ e imidazol, 2 mmol L ⁻¹ e 1 mol L ⁻¹ NaCl a pH 7,0.	90
Figura A.10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	91
Figura A.11. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCl a pH 7,0.	92
Figura A.12. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	93
Figura A.13. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCL a pH 7,0.	94
Figura A.14. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L ⁻¹ e 2 mmol L ⁻¹ de imidazol a pH 7,0.	95

Figura A.15. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCl a pH 7,0.	96
Figura A.16. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	97
Figura B.1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ NaCl a pH 7,0.	98
Figura B.2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	99
Figura B.3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ NaCl a pH 7,0.	100
Figura B.4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	100
Figura B.5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCl a pH 7,0.	101
Figura B.6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	102
Figura B.7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ e 1,0 mol L ⁻¹ de NaCl a pH 7,0.	103
Figura B.8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L ⁻¹ e imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0.	103
Figura B.9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ e imidazol, 2 mmol L ⁻¹ e 1 mol L ⁻¹ NaCl a pH 7,0.	104
Figura B.10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de	105

proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0.

Figura B.11. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. 106

Figura B.12. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. 106

Figura B.13. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. 107

Figura B.14. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹ e 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0. 108

Figura B.15. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. 109

Figura B.16. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. 109

Figura C.1. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 111

Figura C.2. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 111

Figura C.3. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0. 112

Figura C.4. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0. 113

Figura C.5. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹. 114

Figura C.6. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Co²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Ligantes bioespecíficos obtidos a partir de bactérias. (Adaptado de Low et al., 2007)	8
Tabela 2.2. Comparação entre IMAC e cromatografia de afinidade com ligantes bioespecíficos. (Adaptado de Arnold, 1991).	11
Tabela 2.3. Classificação dos íons metálicos segundo o princípio HSAB. (Adaptado de Bresolin et al., 2009; Ueda et al., 2003)	15
Tabela 2.4. Características dos tampões utilizados em IMAC. (Adaptado de www.vanderbilt.edu/AnS/Chemistry/Rizzo/stuff/Buffers/buffers.html)	18
Tabela 3.1 - Especificações da membrana de PEVA.	25
Tabela 4.1. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ . Adsorção: MA 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.	47
Tabela 4.2. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ . Adsorção: MA 25 mmol L ⁻¹ com 2 mmol L ⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.	48
Tabela 4.3. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ . Adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ , imidazol 2 mmol L ⁻¹ a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.	49
Tabela 4.4. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ . Adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L ⁻¹ com 2 mmol L ⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.	49
Tabela 4.5. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ . Adsorção: Hepes 25 mmol L ⁻¹ com 2 mmol L ⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.	51
Tabela 4.6. Massa de IgG medida por nefelometria e pureza dos “pool” das frações de proteínas mais concentradas da etapas de eluição com 100 mmol L ⁻¹ de imidazol, para os sistemas tamponantes MA-imidazol e fosfato de sódio-imidazol, em PEVA-CM-Asp-Ni ²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co ²⁺ .	53
Tabela 4.7. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG em membranas de PEVA-CM-	56

Asp-Me²⁺, para os íons níquel e cobalto.

Tabela 4.8. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG em membranas de PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 57

Tabela 4.9. Balanço de massa das curvas de ruptura de soro humano diluído 2,5 e 5,0 vezes em tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, utilizando as membranas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 63

Tabela 4.10. Massa obtida por nefelometria para os “pools” das frações de eluição para purificação de IgG a partir de soro humano em mini-módulo de filtração PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, para o soro diluído 5,0 vezes em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. 65

Tabela 4.11. Massa obtida por nefelometria para os “pools” das frações de eluição para purificação de IgG a partir de soro humano em mini-módulo de filtração PEVA-CM-Asp-Co²⁺, para o soro diluído 5,0 vezes em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. 66

Tabela A.1. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 85

Tabela A.2. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 87

Tabela A.3. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 88

Tabela A.4. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 90

Tabela A.5. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 91

Tabela A.6. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, 93

E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Tabela A.7. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 95

Tabela A.8. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 97

Tabela B.1. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 99

Tabela B.2. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 101

Tabela B.3. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 102

Tabela B.4. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 104

Tabela B.5. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 105

Tabela B.6. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 107

Tabela B.7. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. 108

Tabela B.8. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 110

Tabela C.1. Balanço de massa das curvas de ruptura de soro humano diluído 2,5 e 5,0 vezes em tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, utilizando as membranas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺. 114

Resumo

Imunoglobulinas são anticorpos secretados por células imunitárias em resposta a introdução de um antígeno. A imunoglobulina G (IgG) de origem humana, com alto grau de pureza, tem sido empregada como prescrição terapêutica para inúmeros casos de doenças malignas, infecciosas, auto-imunes e inflamatórias. Normalmente, a IgG é purificada através da precipitação com etanol seguida de cromatografia de afinidade com proteína A ou G imobilizada, no entanto, por apresentar alto custo, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas de afinidade alternativas. Membranas, nas quais podem ser imobilizados os ligantes de afinidade, tornam-se uma alternativa aos géis tradicionais apresentando maior capacidade hidrodinâmica. Neste contexto, estudou-se o efeito da remoção do sal em diferentes sistemas tamponantes na purificação de IgG a partir do soro humano por cromatografia de afinidade com íons imobilizados (IMAC), para o módulo de membranas de fibras ocas de PEVA-CM-Asp-Me²⁺, para os íons metálicos níquel e cobalto. De acordo com eletroforeses SDS-PAGE e análises de nefelometria das frações dos picos de proteína obtidos, a melhor condição utilizada para a purificação de IgG para os adsorventes PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺, foi em presença do sistema tamponante fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 utilizando o aumento da concentração de imidazol como estratégia de eluição, alcançando pureza superior a 93% para ambos íons metálicos. Determinada a melhor condição de purificação, por meio das isotermas de adsorção, foi determinada a capacidade máxima de adsorção e a constante de dissociação dos complexos CM-Asp-Ni²⁺-IgG e CM-Asp-Co²⁺-IgG que, de acordo com o ajuste dos parâmetros pelo modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich, demonstraram boa capacidade de adsorção e constantes de dissociação características de sistemas utilizando ligantes pseudobioespecíficos. Para as filtrações em módulo de fibras ocas, construído em nosso laboratório, determinaram-se as curvas de ruptura, sendo que os resultados obtidos para as membranas finamente cortadas foram melhores que os obtidos para os de filtração em módulo de fibras ocas.

Abstract

Immunoglobulins are secreted by immune cells in response to the introduction of an antigen. Immunoglobulin G (IgG) obtained from human sources with high purity has been used as therapeutic prescription for many cases of malicious, infectious, autoimmune and inflammatory diseases. Typically, IgG is purified by precipitation with ethanol followed by affinity chromatography with immobilized protein A or G, however, due to its high cost, it is necessary to develop alternative techniques based on affinity. Affinity membranes, which may be immobilized on the affinity ligands, show a higher hydrodynamic capacity than typical gels. In this context, the effect of salt was studied in different buffer systems in the purification of IgG from human serum by Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC) for the module PEVA-CM-Asp-Me²⁺ using ions Ni²⁺ and Co²⁺. According to SDS-PAGE and nephelometric analysis fractions of protein peaks obtained, the best condition used for purification of IgG to the adsorbents PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ and PEVA-CM-Asp-Co²⁺ was in the presence of sodium phosphate buffer system 25 mmol L⁻¹ and 2 mmol L⁻¹ imidazole at pH 7.0 using increasing concentration of imidazole as elution strategy, achieving a purity higher than 93% for both metal ions. The maximum adsorption capacity and dissociation constant of complexes CM-Asp-Ni²⁺-IgG and CM-Asp-Co²⁺-IgG by adsorption isotherms were determined on the best condition of purification and the adjustment of parameters by the Langmuir and Langmuir-Freundlich models, it demonstrated good adsorption capacity and dissociation constants characteristics of systems using pseudobioespecific ligands. For filtration in hollow fiber module, constructed in our laboratory, breakthrough curves were determined; also for the best condition of purification, and the results for finely chopped membranes were better than those obtained for the filtration module and hollow fibers.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A imunoglobulina G (IgG) tem sido amplamente utilizada como prescrições terapêuticas intravenosas ou intramusculares (imunodeficiências congênita e adquirida), no tratamento de deficiências seletivas de anticorpos, doenças auto-imunes, Alzheimer e de alguns tipos de câncer; e, ainda em tecnologias baseada na afinidade específica como biosensores, imunodiagnósticos e imunocromatografia (Burnouf, 1995; Zamolo et al., 2008; Prasanna e Vijayalakshmi, 2010).

Devido à alta demanda por estes bioprodutos, a otimização e o desenvolvimento de técnicas de purificação que aliem elevada pureza e minimizem os custos são de extrema relevância, uma vez que a purificação de IgG constitui entre 50-80% do custo global do processo de produção (Zamolo et.al., 2008; Roque et al., 2007).

A cromatografia de afinidade tem como princípio as interações específicas entre a proteína e o ligante, sendo um dos métodos mais estudados para a purificação de IgG. Ligantes bioespecíficos como a Proteína A e a Proteína G são os mais utilizados em cromatografia de afinidade, devido a sua alta capacidade e seletividade na adsorção de IgG. No entanto, ligantes bioespecíficos além de serem moléculas grandes e de difícil imobilização nas matrizes cromatográficas, apresentam desvantagens como o alto custo de produção e contaminação do produto decorrente da hidrólise ou desprendimento destes ligantes da matriz cromatográfica (Burnouf e Radosevich, 2001; Champagne et al., 2007; Zamolo et al., 2008).

Com o intuito de contornar os problemas citados acima, os ligantes pseudobioespecíficos têm sido visto como uma alternativa aos ligantes bioespecíficos, pois além de serem moléculas pequenas e de fácil imobilização, apresentam menor custo e melhor estabilidade física e química. Dentre estes ligantes, os íons metálicos níquel e zinco imobilizados na fase estacionária são os mais estudados para purificação de IgG por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (Vançan et al., 2002; Hale e Beidler, 1994; Kracalikova et al., 2006; Ribeiro et al., 2008; Bresolin et al., 2010; Prasanna e Vijayalakshmi, 2010).

A escolha da matriz cromatográfica é um passo importante na técnica de IMAC. Os géis tradicionais são amplamente utilizados como fase estacionária, porém, estes apresentam a desvantagem de serem compressíveis e apresentarem maior resistência à transferência de massa, devido à difusão existente nos poros. Uma alternativa aos géis tradicionais são as membranas porosas, que permitem a aplicação de altas vazões a pressões moderadas, em maior parte sem comprometimento da eficiência da purificação. Em sistemas em que as membranas de afinidade são aplicadas, a transferência de massa é governada principalmente pela convecção (Klein, 1991, Thommes e Kula, 1995; Haupt e Bueno, 2000; Bueno e Miranda, 2005; Roper e Lightfoot, 1995; Charcosset, 1998; Suck et.al., 2005).

Outro fator importante em IMAC é a escolha do agente quelante, o tridentado ácido iminodiacético (IDA) é, tradicionalmente o mais utilizado, quelatando os metais hexacoordenados em três sítios de ligação, restando ainda três sítios para interagir com as biomoléculas. Quanto mais polidentado for o agente quelante, menor a capacidade de adsorção, porém apresenta maior seletividade na purificação. O agente quelante ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), classificado como tetradentado, quelata íons metálicos hexacoordenados em quatro sítios, restando dois remanescentes para interação com a biomolécula (Wong et al., 1991; Suen et al., 2003; Bresolin et al., 2009). Estudos realizados por Bresolin et al (2010) demonstraram a potencialidade na utilização do agente quelante CM-Asp, utilizando o adsorvente PEVA-CM-Asp-Zn²⁺ (PEVA, álcool polietileno vinílico) na purificação do anticorpo monoclonal IgG₁.

Ribeiro (2006) estudou o efeito dos agentes quelantes na purificação de IgG humana por cromatografia em membranas de afinidade com os íons cobre e níquel imobilizados. Os resultados demonstraram alta potencialidade da aplicação desta técnica para purificação de IgG humana. O agente quelante CM-Asp quando quelatado ao íon níquel apresentou maior capacidade dinâmica de adsorção que o observado para o mesmo metal quelatado ao agente quelante IDA, tradicionalmente utilizado. Para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, os tampões utilizados foram Mops-acetato de sódio (MA), Mops-imidazol e Tris-HCl, na presença e ausência de sal, sendo a melhor condição observada para o sistema tamponante Tris-HCl na ausência de sal. No

entanto, é necessário um estudo sistemático do efeito do sistema tamponante e do sal (NaCl) na purificação de IgG a partir do soro humano empregando-se o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Como há uma escassez de trabalhos publicados na literatura de emprego da cromatografia em membranas de afinidade com íon metálico cobalto imobilizado, a potencialidade do seu uso para a purificação de IgG humana também foi avaliada.

1.1.Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o estudo do efeito do sistema tamponante e do sal (NaCl) na purificação de imunoglobulina G a partir do soro humano, empregando a técnica de cromatografia de afinidade em membranas de fibras ocas com íons metálicos imobilizados (níquel e cobalto) ao agente quelante tetradentado CM-Asp. Parâmetros importantes para ampliação de escala, como capacidade máxima do adsorvente e constante de dissociação do complexo quelato metálico-IgG foram determinados.

Para atingir este objetivo, foram propostas as seguintes etapas:

1. Experimentos cromatográficos para a purificação de IgG a partir do soro humano em membranas de afinidade finamente cortadas com o íons metálicos níquel e cobalto imobilizados ao agente quelante CM-Asp, com o intuito de verificar o perfil de eluição da imunoglobulina G e determinar as condições ótimas de eluição em diferentes sistemas tamponantes na presença e ausência de sal. A seleção dos tampões foi baseada na estratégia de eluição por abaixamento de pH e por adição de agente competitivo. Foram empregados os sistemas tamponantes MA-imidazol, fosfato-imidazol, e Hepes-imidazol com e sem sal (NaCl) para estratégia de adição de agente competitivo. A eluição por decréscimo de pH foi avaliada em tampão Mops-acetato de sódio (MA). A avaliação da purificação de IgG foi feita através da determinação da pureza, do rendimento e da quantidade de IgG adsorvida;

2. Determinação de curvas de ruptura (“breakthrough”) a diversas concentrações de soro humano, diluídos no tampão que apresentou melhor resultado tanto para o níquel quanto para o cobalto. As curvas de ruptura permitiram identificar problemas relacionados ao processo, tais como perdas e precipitação de proteínas durante o carregamento da solução de alimentação, além de determinar a capacidade do adsorvente nas condições utilizadas (parâmetro importante no escalonamento do processo);

3. Determinação das isotermas de adsorção a 25°C, utilizando membranas de afinidade e IgG de alta pureza para a determinação da constante de dissociação (K_d) do complexo CM-Asp-Me²⁺-IgG e capacidade máxima de adsorção (Q_m) de IgG nas membranas, para o níquel e cobalto imobilizados. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich foram utilizados para determinação dos parâmetros.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Imunoglobulina G

Os anticorpos têm um importante papel na defesa do organismo contra a invasão de agentes externos, patogênicos ou não. Quando um antígeno invade ou é injetado em um animal ou em um ser humano, os linfócitos B são ativados e se diferenciam em plasmócitos que sintetizam os anticorpos (imunoglobulinas) (Vlug e Remortel, 1989). As imunoglobulinas apresentam sítios de ligação que reconhecem e se ligam aos agentes invasores através de um sítio específico na estrutura do antígeno, resultando na neutralização e eliminação de microorganismos, vírus, bactérias e outras moléculas (Milstein, 1980; Newcombe e Newcombe, 2007).

Quanto a sua constituição, podem ser policlonais (substâncias heterogêneas produzidas por diferentes células) e monoclonais (substâncias homogêneas produzidas por uma única célula ou seu clone) (Stryer, 1996; Augusto e Oliveira, 2001; Aragón, 2008). Embora apresentem estruturas químicas diferentes, todos os anticorpos são específicos em menor ou maior grau para um determinante, e se ligam ao mesmo, porém com diferentes graus de afinidade (Augusto e Oliveira, 2001; Aragón, 2008).

As imunoglobulinas (Igs) pertencem ao grupo das glicoproteínas (composição de 82% a 98% de proteínas e de 4% a 8% de carboidratos) e diferem de tamanho, carga elétrica, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos (Roitt et al., 1994; Vlug e Van Remortel, 1989).

As Igs, quanto à estrutura e tamanho (Figura 2.1), apresentam duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (CL) com massa molecular de 25 kDa, comum a todas as classes de imunoglobulinas e duas cadeias pesadas idênticas (CP) com massa molecular entre 50 e 70 kDa, que se apresentam de forma distinta em cada classe ou subclasse de Igs. As quatro cadeias polipeptídicas se mantêm unidas por ligações dissulfeto e por ligações não covalentes, estruturadas em forma de “Y” (Roque et al., 2007; Ren et al., 2008; Costa et al., 2009).

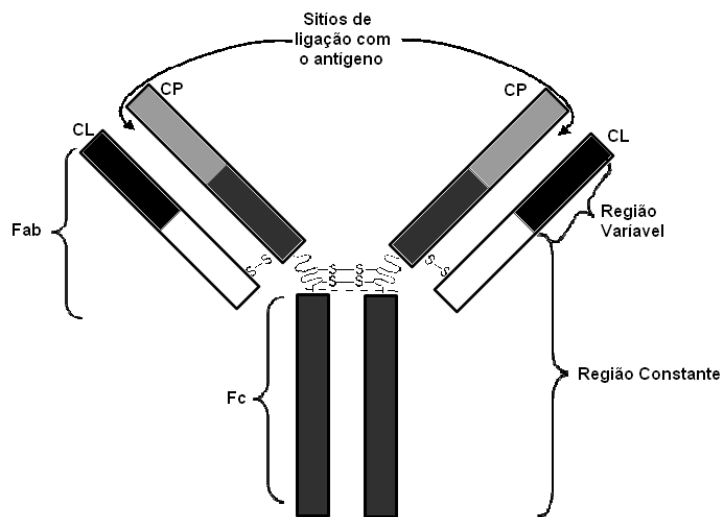


Figura 2.1: Estrutura da imunoglobulina G. (adaptado de Rowlands et al., 2007)

A cadeia leve é classificada em dois tipos: kappa (κ) e lambda (λ). Esta classificação leva em consideração a diferença de aminoácidos, no entanto, não é conhecida nenhuma diferença funcional entre elas, podendo ser encontrada em todas as classes de Ig (nunca as duas na mesma molécula). Cada cadeia leve possui uma porção amino terminal, sítio de ligação do antígeno (Jawetz et al., 1998; Stites et al., 1994; Holt et al., 2003). Nas cadeias pesadas, a porção N-terminal é encontrada no fragmento Fab, sítio de ligação do antígeno. A porção carbonila terminal encontra-se no fragmento Fc e não apresenta atividade de reconhecimento de antígeno, porém atua em diversas atividades biológicas como fixação de complemento e transferência placentária (Jawetz et al., 1998).

A cadeia pesada apresenta massa molecular variável, ou seja, diferente para cada uma das classes de Igs, sendo classificadas como: γ na IgG, μ na IgM, α na IgA, δ na IgD e ϵ na IgE (Salvalaglio et al., 2009). Não só pela diferença estrutural, mas também pelas diferenças biológicas e antigênicas, as imunoglobulinas são classificadas em IgM, IgA, IgE, IgD e IgG (Alberts et al., 1997; Vluc e Van Remortel, 1989).

Dentre as imunoglobulinas, a do tipo G é a mais abundante no plasma humano com concentração entre 6,6 mg/mL a 14,5 mg/mL (Gulich et al., 2000; Buchacher e Iberer, 2006). As IgGs são glicoproteínas com massa molecular de 150 kDa (Lau et al.,

2010). As regiões variáveis da IgG determinam a especificidade, diversidade e afinidade ao antígeno, enquanto as regiões constantes são responsáveis pelas funções efetoras e pelo controle do catabolismo (Liu et al., 2008). Dentro da classe IgG encontramos quatro subclasses: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Estas subclasses diferem pelo número e localização de pontes disulfídicas e por terem quatro cadeias pesadas, similares, sendo principalmente diferenciadas pela região flexível.

A utilização de IgG para aplicações terapêuticas, diagnósticos e purificação de anticorpos e antígeno, implica em cuidados no processo de obtenção destas proteínas, ou seja, é necessário desenvolver e/ou otimizar processos de purificação que resultem em alta eficiência na purificação, elevada pureza e na atividade dos constituintes (Burnouf e Radosevich, 2001; Balvay et al., 2004; Prasanna e Vijayalakshmi, 2010).

2.2. Purificação de IgG

A purificação de IgG a partir de plasma ou soro humano é um processo complexo que consiste na separação e recuperação desta proteína dentre centenas de outros contaminantes (Martin, 2006). Os principais constituintes do plasma ou soro humano (quantitativamente) são: albumina (35 a 55 mg), IgG (8 a 18 mg), transferrina (2 a 4 mg), IgA (0,9 a 4,5 mg) e IgM (0,6 a 2,5 mg) (Andrada e Hlady, 1987). Além destas proteínas, o plasma humano possui outras proteínas em menores quantidades, tais como os fatores do complemento C₃ e C₄, fibrinogênio, fatores anti-hemofílicos (fator VIII e fator IX), dentre outras.

Uma estratégia para a purificação de IgG a partir de soro humano é a precipitação de algumas proteínas enquanto outras são mantidas em solução (Martin, 2006). O método de Cohn et al. (1946) é uma das técnicas de purificação de IgG baseada na precipitação desta proteína com etanol a frio.

O método de Cohn tem como princípio a variação da solubilidade das proteínas com o pH, força iônica, concentração de proteínas, quantidade de etanol e temperatura.

Ao se utilizar este método, obtêm-se IgG contaminada com 0,5% de albumina e outras proteínas constituintes do plasma humano, em menores concentrações.

De forma geral, o rendimento de IgG com alta pureza obtida por métodos de precipitação varia entre 3,5 e 4,2 g L⁻¹ de plasma, sendo que a perda desta proteína nos sobrenadantes e coprecipitados varia de 40% a 50% (Buchacher e Iberer, 2006). Além disto, a purificação de proteínas utilizando a precipitação envolve passos adicionais como filtração, centrifugação e aplicação de técnicas cromatográficas para alcançar a pureza requerida. Desta forma, métodos seletivos, como os cromatográficos, têm sido estudados na intenção de se obter produtos com elevada pureza e rendimento em uma única etapa (Martin, 2006).

Dentre os métodos cromatográficos destaca-se a cromatografia de afinidade na qual a adsorção é baseada na capacidade das biomoléculas de interagir seletivamente com os ligantes imobilizados em uma matriz cromatográfica. A purificação de IgG empregando técnicas de afinidade pode ser realizada por duas estratégias diferentes, ambas baseadas na estrutura. A primeira explora a especificidade da área de ligação com o antígeno (região Fab) e a segunda utiliza ligantes que apresentam afinidade pela região Fc da IgG como proteínas e aminoácidos (Huse et al., 2002; Verdoliva et al., 2002).

As proteínas A, G e L são os ligantes mais utilizados na purificação de anticorpos de diversas fontes e são classificados como ligantes bioespecíficos. Na Tabela 2.1 encontra-se a fonte assim como a região de interação com a IgG das Proteínas A, G e L (Low et al., 2007).

Tabela 2.1. Ligantes bioespecíficos obtidos a partir de bactérias. (Adaptado de Low et al., 2007)

Proteína	Fonte	Região de interação
Proteína A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Interação com a região Fc
Proteína G	Grupos C e G <i>Streptococci</i>	Interação com as regiões Fc e Fab
Proteína L	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	Interação com a cadeia leve kappa

A utilização de ligantes bioespecíficos na purificação de IgG tem como principal vantagem a forte retenção das proteínas por estes ligantes (constante de dissociação (K_d) entre 10^{-7} e 10^{-15} mol/L), o que implica em forte interação entre o complexo proteína-ligante (Hale e Beidler, 1994; Burnouf e Radosevich, 2001; Champagne et al., 2007).

Embora apresente resultados satisfatórios para purificação de IgG, os ligantes bioespecíficos apresentam algumas desvantagens: são moléculas grandes e de difícil imobilização na matriz cromatográfica, alto custo de produção, contaminação do produto pelo desprendimento ou hidrólise dos ligantes e diminuição da vida útil do adsorvente devido às condições drásticas de eluição (baixos valores de pH) (Vijayalakshmi, 1989; Anspach et al., 1996; Çanak et al., 2004).

Neste contexto, os ligantes pseudobioespecíficos são uma alternativa aos bioespecíficos, pois estes ligantes interagem com as proteínas por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de coordenação, não apresentando interações biológicas. Além disso, são moléculas pequenas, de fácil imobilização, baixo custo e a eluição ocorre normalmente em condições brandas, pois a constante de dissociação (K_d) para os ligantes pseudobioespecíficos é da ordem de 10^{-2} a 10^{-6} mol/L (força de retenção menor que a observada para os bioespecíficos), embora sejam menos específicos (Vijayalakshmi, 1989; Çanak et al., 2004).

Os principais ligantes pseudoespecíficos utilizados para purificação de IgG em cromatografia de afinidade são: aminoácidos (El-Kak e Vijayalakshmi, 1991; Bueno et al., 1995a; Çanak et al., 2004; Sun et al., 2006), peptídeos (Fassina et al., 2001; Verdoliva et al., 2002; Yang et al., 2005; D'agostino et al. 2008; Naik et al., 2011), ligantes tiofílicos (Boschetti et al., 2001; Coffinier et al., 2002) e quelatos metálicos (Vançan et al., 2002; Bayramoglu et al., 2006).

A cromatografia com ligantes pseudobioespecíficos como os aminoácidos, por exemplo, L-histidina tem sido muito utilizada na purificação de IgG de diversas fontes e em diferentes matrizes cromatográficas (Bueno et al., 1996; Çanak et al., 2004).

Naik e colaboradores (2011) utilizaram três diferentes hexapeptídeos em resinas comerciais na purificação de anticorpos monoclonais (humanizado e quimérico) a partir de fluídos do cultivo de células CHO. Para anticorpo monoclonal humanizado do tipo IgG₄ foram utilizados os hexapeptídeos HWRGWV, HYFKFD e HFRRHL, sendo obtidos rendimentos de 85%, 86% e 84% e purezas de 95%, 93% e 95%, respectivamente. Para o quimérico do tipo IgG₁, purificado utilizando somente o hexapeptídeo HWRGWV, obteve-se rendimento e pureza acima de 95%. Para fim de comparação, foram realizadas cromatografias com o ligante bioespecífico Proteína G, onde para o IgG₄ obteve-se rendimento de 78% e pureza similar a obtida para o ligante HWRGWV (95%), enquanto para IgG₁ o rendimento e pureza obtidos foram de 82% e 96%. Nota-se que os valores obtidos para os ligantes pseudoespecíficos se assemelham aos obtidos com ligantes bioespecíficos, demonstrando a potencialidade da utilização destes ligantes.

Os ligantes tiofílicos foram introduzidos por Porath et al. (1985). Estes ligantes apresentam estabilidade estrutural, alta capacidade e especificidade, são regenerados facilmente e apresentam baixo custo. Serres et al. (1995) e Finger et al. (1996) estudaram a adsorção de anticorpos monoclonais em ligantes tiofílicos, sendo que este ligante adsorvia preferencialmente os anticorpos monoclonais das subclasses IgG₁, IgG_{2b} e IgG₃, quando comparado aos da subclasse IgG_{2a}. Qian e colaboradores (2008) utilizaram uma matriz polimérica derivatizada com um ligante tiofílico paramagnético para purificação de IgG a partir de soro humano, recuperando, durante a eluição com KCl 0,8 mol L⁻¹, 72% da IgG com pureza de 98,4%.

A cromatografia de afinidade com íons metálicos baseia-se na capacidade destes metais em se ligarem as proteínas de forma reversível por meio de ligações de coordenação. Esta técnica tem sido utilizada na purificação de IgG de diferentes fontes (Porath e Olin, 1983; Boden et al., 1995; Hale e Beidler, 1994; Vijayalakshmi, 1989; Vançan et al., 2002; Ribeiro et al., 2008; Bresolin et al., 2010; Prasanna e Vijayalakshmi, 2010).

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

A IMAC consiste em uma técnica cromatográfica de separação e purificação de proteínas baseada na afinidade destas por íons metálicos quelatados a uma matriz sólida (Karmali, 2001; Chaga et al., 2001; Roque et al., 2007). Basicamente a adsorção de proteínas em IMAC tem como base as ligações de coordenação entre os íons metálicos e os grupos doadores de elétrons presentes na superfície das proteínas (histidina, cisteína e triptofano) (Wong et al., 1991; Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Chaga, 2001). Além da interação metal-proteína, outras forças devem ser consideradas, tais como van der Waals, hidrofóbicas e eletrostáticas. É difícil determinar a contribuição relativa que cada tipo de interação exerce na adsorção das proteínas, desta forma, todas devem ser consideradas (Sharma e Agarwal, 2002; Ueda et al., 2003).

Esta técnica tem sido utilizada na purificação de proteínas nativas ou recombinantes, peptídeos e ácidos nucleicos, por apresentar alta capacidade e estabilidade, baixo custo, dessorção em condições brandas e facilidade na ampliação de escala (Vijayalakshmi, 1989; Hochuli, 1988; Winzerling, 1992; Roque et al., 2007).

A técnica de IMAC para purificação de proteínas apresenta algumas vantagens quando comparada com cromatografia de afinidade utilizando ligantes bioespecíficos. (Tabela 2.2) (Arnold, 1991).

Tabela 2.2. Comparação entre IMAC e cromatografia de afinidade com ligantes bioespecíficos. (Adaptado de Arnold, 1991).

Propriedade	IMAC	Ligante bioespecífico
Estabilidade do ligante	Alta	baixa
Adsorção de proteína	Alta	baixa
Condição de eluição	branda	drástica
Seletividade	média	alta
Custo	baixo	alto

O sucesso na utilização de IMAC depende, em grande parte, da seleção de condições apropriadas para adsorção e dessorção. Diversos fatores devem ser cuidadosamente analisados para a purificação por IMAC, tais como, a escolha da

matriz, do agente quelante, do íon metálico e a determinação das condições ótimas de adsorção e dessorção, favorecendo assim, a interação proteína-metal resultando em expressiva recuperação e seletividade da proteína de interesse (Wong et al, 1991; Winzerling, 1992; Suen et al., 2003; Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Sharma e Agarwal, 2002; Ribeiro et al., 2008).

2.3.1. Matriz cromatográfica

Existe uma variedade de matrizes que pode ser utilizada em IMAC. A estabilidade do complexo formado entre o metal imobilizado e a proteína pode ser influenciada pela matriz escolhida (Wong et al., 1991).

As propriedades geralmente requeridas para uma matriz cromatográfica são: alta hidrofilicidade e baixa adsorção não-específica, distribuição uniforme do tamanho e forma das partículas para melhor empacotamento na coluna, área superficial e porosidade altas, resistência mecânica, estabilidade em ampla faixa de pH e na presença de sais e solventes orgânicos e resistência a crescimento de microorganismos (Wong et al., 1991; Suen et al., 2003; Ngo, 2007; Gutiérrez et al., 2007; Bresolin et al., 2009).

As matrizes cromatográficas geralmente utilizadas na técnica de IMAC (baixa pressão) são os géis de agarose, celulose e dextrana reticulada. O gel de agarose é amplamente utilizado, por apresentar estabilidade mecânica e química, enquanto que os géis de celulose e dextrana reticulada possuem aplicações limitadas devido ao tamanho da partícula (Wong et al., 1991). Por serem compressíveis, a utilização destes géis só se torna possível em sistemas que requerem baixo fluxo, sendo assim pouco utilizado industrialmente, pois apresentam baixa produtividade (Garbec-Porekar e Menart, 2001; Ngo, 2007; Gutiérrez et al., 2007).

Os adsorventes inorgânicos (por exemplo, óxido de titânio modificado para cromatografia de troca iônica e fibras ocas de vidro utilizadas em IMAC) apresentam melhores propriedades mecânicas, estabilidade térmica e resistência química quando

comparado aos adsorventes orgânicos. No entanto, a distribuição dos poros, custo e capacidade de modificação da superfície (ativação e imobilização de ligantes) são fatores limitantes na utilização destes como matriz cromatográfica (Suen et al., 2003).

Uma alternativa às matrizes citadas são as membranas porosas, que podem ser utilizadas como suporte para imobilização de ligantes (membranas de afinidade). As membranas de afinidade apresentam como vantagem a possibilidade de operar a altas vazões, aliada a pressão moderada. Estas membranas podem ser obtidas a partir de diversos polímeros naturais ou sintético (por exemplo, celulose, álcoolpoli(etileno)vinílico (PEVA), copolímeros alifáticos entre outros) (Suen et al., 2003; Bresolin et al., 2009).

2.3.2. Agente quelante

A escolha do agente quelante é de extrema importância em IMAC. Os grupos doadores de elétrons N, S e O que compõem a estrutura dos agentes quelantes (imobilizados na matriz cromatográfica) coordenam os íons metálicos formando quelatos metálicos (Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Bresolin et al., 2009). Os sítios de coordenação que não foram quelatados são ocupados por moléculas de água, podendo ocorrer à troca por grupos doadores de elétrons da proteína (Porath et al., 1975; Chaga, 2001; Roque et al., 2007).

O ácido iminodiacético (IDA) é o agente quelante mais utilizado para a imobilização de íons metálicos em matrizes cromatográficas. IDA é um agente quelante tridentado, possui um átomo de oxigênio e dois átomos de nitrogênio, quelatando o íon metálico hexacoordenado em três sítios de coordenação, restando três sítios para interação com a proteína (Porath, 1988; Wong et al., 1991; Suen et al., 2003; Bresolin et al., 2009).

Os agentes quelantes tetradentados como o ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), o tris-2(aminoetil)amina (TREN) e o ácido nitrilotriacético (NTA) quelatam o íon metálico em quatro sítios de coordenação (tetradentado), restando dois sítios

remanescentes para interação com a biomolécula (Wong et al., 1991; Suen et al., 2003; Bresolin et al., 2009). O agente quelante CM-Asp possui três átomos de oxigênio e um de nitrogênio para coordenação com o metal, formando três anéis quelato, sendo dois anéis constituído de cinco átomos e o anel restante por seis átomos. O CM-Asp apresenta três grupamentos carboxila de pKs inferiores a 3,0, indicando que a pH neutro, quando não quelatado ao metal, o CM-Asp apresente carga líquida negativa, pois apresenta ponto isoelétrico entre 2,0 e 4,0 (*Sigma-Aldrich Technical Service*).

O agente quelante tris(carboximetil)etilenodiamina (TED) é pentadentado e quelata o metal em cinco sítios, apresentando elevada estabilidade na ligação de coordenação, principalmente com íons Ni^{2+} e Fe^{2+} . A utilização deste agente quelante é recomendada quando as condições cromatográficas favorecem o desprendimento do íon metálico da coluna. Devido ao fato do complexo TED- Me^{2+} disponibilizar apenas um sítio de coordenação do íon metálico com a biomolécula, capacidade de adsorção é reduzida (Anspach et.al., 1996; Bresolin et al., 2009).

O número de ligações entre o agente quelante e o íon metálico determina a afinidade da proteína pelo adsorvente. A afinidade e capacidade de adsorção de proteínas em IMAC para os complexos Me^{2+} -agente quelante segue a seguinte ordem:



Porém são de ordem exatamente inversa as características de afinidade dos íons metálicos pelos agentes quelantes imobilizados (Porath, 1988).

2.3.3. Íon metálico

Qualquer íon que apresente a capacidade de interagir com proteínas, pode ser utilizado em IMAC. A diferença de afinidade das proteínas pelos metais pode ser explicada, em parte, pelo princípio *Hard and Soft Acids and Bases (HSAB)* descrito por Pearson (1968). Segundo este princípio, quando dois átomos se ligam, um átomo se comporta como base de Lewis e o outro como ácido de Lewis. HSAB separa os íons metálicos em três categorias, de acordo com a reatividade: duro, intermediário e mole

(Tabela 2.3). A associação de ácidos e bases que apresentam o mesmo caráter (duro, intermediário ou mole), resulta em compostos estáveis, obedecendo ao princípio dos ácidos e bases duros e moles (Wong et al., 1991; Porath, 1988; Ueda et al., 2003; Bresolin et al., 2009).

Tabela 2.3. Classificação dos íons metálicos segundo o princípio HSAB. (Adaptado de Bresolin et al., 2009; Ueda et al., 2003).

Classificação	Íons metálicos	Informações complementares
Duro	K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+}	Coordenam estávelmente bases duras (principalmente átomos de oxigênio, nitrogênio alifático e fósforo).
Intermediário	Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}	Coordenam estávelmente bases intermediárias (principalmente átomos de nitrogênio aromático) e bases moles (principalmente átomos de enxofre).
Mole	Ag^+ e Cu^+	Coordenam estávelmente bases moles (principalmente átomos de enxofre).

Sulkowski (1989) determinou regras de interação entre os resíduos de histidina acessíveis presentes na superfície de proteínas e peptídeos para IMAC¹. E estas regras são válidas para as interações entre estes resíduos e agarose contendo IDA- Co^{2+} , IDA- Ni^{2+} , IDA- Cu^{2+} e IDA- Zn^{2+} , são elas:

- A ausência de resíduos de histidina na superfície da proteína está associada a não adsorção de proteínas em IDA- Me^{2+} .
- A presença de um único resíduo de histidina na superfície da proteína é suficiente para a retenção desta em um gel IDA- Cu^{2+} , no entanto a presença de dois resíduos de histidina intensifica a interação entre os resíduos disponíveis e o adsorvente IDA- Cu^{2+} .
- A presença de dois resíduos de histidina na superfície da proteína é necessária para a retenção desta em um gel IDA- Ni^{2+} .
- A forte retenção de proteínas para IDA- Zn^{2+} e de IDA- Co^{2+} ocorre na presença de dois resíduos de histidina vicinais. Isto ocorre quando dois resíduos

¹ Sistema tamponante utilizada foi fosfato de sódio 20 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0.

de histidina estão espacialmente localizados em uma α -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos.

e. A retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina vicinais (efeito quelato) será mais forte, em todos os géis IDA- Me^{2+} , que a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

A força de retenção dos metais de transição (intermediário) quelatados ao agente quelante IDA, segue a seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \sim \text{Co}^{2+}$. Um fator que deve ser levado em consideração é que a utilização de íons metálicos que apresentem maior retenção de proteína, não necessariamente resulta em maior seletividade, podendo ocorrer adsorção de impurezas (Sulkowski, 1989; Ueda et al., 2003).

2.3.4. Adsorção e dessorção

2.3.4.1. Adsorção

A adsorção de proteína é resultado da combinação de interações eletrostáticas (iônica), hidrofóbicas e de coordenação. Além da escolha apropriada do quelante metálico a predominância de uma interação específica é determinada pela composição da fase móvel, ou seja, sistema tamponante, força iônica e pH (Sharma e Agarwal, 2001; Bresolin et.al., 2009).

A técnica de IMAC caracteriza-se pela utilização de altas concentrações de sal (0,1 a 4 mol/L) e também altos valores de pH (entre 7 e 8) (Porath et al., 1975; Sulkowisk, 1985; Wong et al., 1991; Beitle e Ataa, 1992; Ueda et al., 2003; Gutiérres et al., 2007).

A utilização de altas concentrações salinas nos tampões de adsorção inibe ou limita as interações eletrostáticas decorrentes das interações entre os aminoácidos presentes na superfície da proteína, que se encontram positivamente carregados e a rede de cargas negativas decorrente do grande número de grupos hidroxilas presente

na vizinhança, resultado da solvatação dos quelatos metálicos pelas moléculas de água (Porath e Olin, 1983; Vijayalakshmi, 1989).

Além da concentração do sal deve-se levar em conta a natureza do sal utilizado, segundo Porath (1988) a contribuição do sal na adsorção das proteínas segue a seguinte ordem:

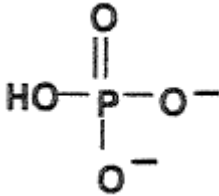
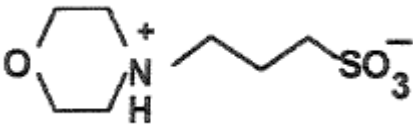
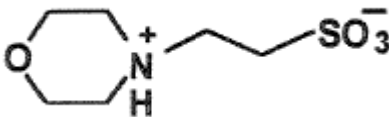
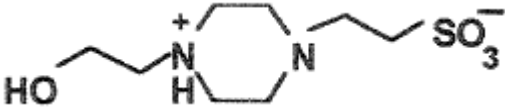
fosfatos > sulfatos > acetatos > cloretos > nitratos > tiocianatos

Os sais cloreto e sulfato de sódio são os mais utilizados em tampões para adsorção de proteínas em IMAC (Beitle e Ataai, 1992).

Com as interações eletrostáticas suprimidas na presença de sal, a adsorção das proteínas na técnica de IMAC ocorre por ligação de coordenação, esta ligação é favorecida no pH em que os grupos doadores de elétrons na superfície da proteína se encontram parcialmente desprotonados. Para proteínas em que a histidina e cisteína são as principais vias de interação com o metal, isto ocorre em pH entre 6,0 e 8,0, quando da utilização dos metais Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} (Sulkowski, 1985; Gaberc-Porekar e Menart, 2001).

Os sistemas tamponantes tradicionalmente utilizados em IMAC são fosfato de sódio, acetato de sódio e os zwitteriônicos (*Good buffers*) tais como MOPS (ácido 3-[*N*-morfolino]propanossulfônico), MES (ácido 2-[*N*-morfolino]etanossulfônico) e HEPES (ácido *N*-[2-hidroxietil]piperazina-*N'*-[2-etanolssulfônico]) (Winzerling et.al., 1992). A Tabela 2.4 demonstra a estrutura e as principais características destes tampões.

Tabela 2.4. Características dos tampões utilizados em IMAC. (adaptado de <http://www.vanderbilt.edu/AnS/Chemistry/Rizzo/stuff/Buffers/buffers.html>)

Tampão	Estrutura Molecular	pKa	Faixa tamponante
Fosfato de Sódio		2,12-7,20 12,67	- 6,0 – 7,5
Acetato de Sódio	$\text{HC}_3\text{--COO}^-$	2,35	3,7 -5,6
MOPS		7,20	6,5 – 7,9
MES		6,15	5,8 – 6,5
HEPES		7,55	7,0 – 8,0

Os tampões zwitteriônicos quando em pH menor que o pKa apresentam carga efetiva nula, o acetato e o fosfato de sódio, nas mesmas condições, encontram-se negativamente carregados. Os tampões preparados com fosfato de sódio e acetato de sódio, por apresentarem grupos doadores de elétrons, competem com a proteína pelo sítio de adsorção o que pode resultar em uma menor capacidade de adsorção, porém maior seletividade.

2.3.4.2. Dessorção

A dessorção das proteínas adsorvidas nas matrizes cromatográficas pode ser realizada de diferentes formas. A dessorção ocorre por abaixamento do pH da fase

móvel ou pela adição de um agente competidor, por exemplo, imidazol que possua a propriedade de interagir com o metal. Porém outras duas vias de dessorção podem ser consideradas, utilizando um agente competidor forte (por exemplo, EDTA) que desloca o complexo metal-proteína e a eluição isocrática, que é a eluição das proteínas em condições constantes de composição do tampão (Sulkowski, 1985; Wong et al., 1991).

Quando a dessorção ocorre pela adição de um agente competidor, esta substância compete com a proteína pelo sítio de ligação em que a proteína está adsorvida, sendo, então, a proteína dessorvida em meio aquoso e o agente fica ligado à matriz (Wong et al., 1991; Beitle e Ataai, 1992). No caso da utilização do abaixamento de pH para a dessorção das proteínas, segundo Sulkowski (1989), alguns fatores devem ser cuidadosamente analisados.

- a. Utilização de eluições moderadas para evitar a perda de atividade da proteína de interesse;
- b. Pode ocorrer precipitação isoelétrica das proteínas dentro da coluna;
- c. Possível desprendimento do metal da coluna devido ao enfraquecimento da ligação entre o agente quelante e o metal.

Após a etapa da eluição é necessário que a coluna passe pela etapa de regeneração, etapa em que ocorre o desprendimento total dos metais ligados ao agente quelante, para que a coluna possa ser utilizada novamente com o mesmo ou outros metais. Em alguns casos a proteína de interesse interage fortemente com o metal, sendo o deslocamento do metal a única forma de removê-los da matriz, para isto é utilizado um agente forte, por exemplo, EDTA (Wong et al, 1991; Beitle e Ataai, 1992).

2.4. Membranas de afinidade

Várias técnicas de separação por afinidade têm sido desenvolvidas utilizando membranas de afinidade como matriz cromatográfica, sendo suas propriedades de adsorção e eficiência na separação, amplamente estudadas (Bayramoglu et al., 2006;

Aquino et al., 2006; Boi et al., 2009). A cromatografia com membranas de afinidade apresenta algumas vantagens sobre as técnicas cromatográficas convencionais e tem sido vista como uma alternativa de grande potencial para purificação de bioprodutos (Castilho et al., 2000; Suen et al., 2003; Boi, 2007).

A principal vantagem da utilização de membranas de afinidade como alternativa aos géis tradicionalmente utilizados em cromatografia está relacionada com a transferência de massa na adsorção da biomolécula. (Boi 2007). Nas membranas, o mecanismo de adsorção é controlado pela convecção, o que elimina a difusão intrapartícula e a queda de pressão, sendo a adsorção regida somente pela interação entre a proteína e o ligante, minimizando o tempo de processamento e aumentando a eficiência do processo (Dancette et al., 1999; Castilho et al., 2000; Charcosset, 2006; Vicente et al., 2008).

Cromatografia em membranas de afinidade tem como princípio de separação a adsorção da biomolécula a um ligante imobilizado na superfície da membrana, principalmente, no interior dos poros (Nova et al., 2008; Castilho et al., 2000, Haupt e Bueno, 2000; Bueno e Miranda, 2005). Esta técnica tem como base a união de dois conceitos, filtração e afinidade. A solução contendo a molécula de interesse passa através da membrana. Sendo assim, as moléculas ou partículas que não passam pelos poros, por serem grandes, são eliminadas na linha do retentado, enquanto as moléculas ou partículas menores, inclusive a de interesse, atravessam pelo interior dos poros onde o ligante está imobilizado (Castilho et al., 2000; Haupt e Bueno, 2000; Bueno e Miranda, 2005; Charcosset, 2006,).

A utilização deste sistema proporciona, devido ao transporte convectivo dentro dos poros, a alimentação de grandes volumes por unidade de tempo, permitindo a operação em altas vazões e com pressões moderadas evitando a formação de caminhos preferenciais, favorecendo a ampliação para escala industrial (Klein, 1991; Charcosset, 1998; Aquino et al., 2006; Boi, 2007; Haupt e Bueno, 2000; Bueno e Miranda, 2005; Barroso et al., 2010).

Para a utilização de membranas de afinidade como matriz cromatográfica elas devem apresentar algumas características. Quanto aos aspectos físicos devem apresentar porosidade com distribuição uniforme, permitindo assim que as moléculas penetrem nos poros e possam se ligar aos ligantes imobilizados na matriz. Em relação aos aspectos químicos, deve ser hidrofílica e neutra, para que não ocorra interação não-específica com as biomoléculas; deve ter grupos funcionais que permitam a ativação da membrana para a imobilização de ligantes; e sejam estáveis quimicamente em uma ampla faixa de pH, na presença de sais, solventes orgânicos, reagentes utilizados durante a ativação e nas etapas de cromatografia (adsorção, eluição e regeneração). No aspecto biológico, é essencial que a membrana seja biocompatível, principalmente, se for para uso extracorpóreo (Charcosset, 1998; Klein, 1991; Haupt e Bueno, 2000; Bayramoglu et al., 2006; Nova et al., 2008).

Os materiais normalmente utilizados como matrizes cromatográficas para imobilização de ligantes são: celulose, acetato de celulose, polisulfona, poli(éter)sulfona, policaprolactama, poli(metil metacrilato), poli(hidroxietil dimetacrilato), poli(fluoreto) de vinilideno (PVDF), poli(éter-uretanouréia), álcool poli(etileno)vinílico (PEVA), álcool polivinílico (PVA), poliamida, polietileno e fibras de vidro (Haupt et al., 1995; Suen et al., 2003; Sun et al., 2006).

A maior limitação na utilização de membranas de afinidade em cromatografia de afinidade é a não-uniformidade na distribuição do fluxo, devido ao grande valor da razão diâmetro/comprimento da coluna. Esta limitação pode influenciar de forma negativa na eficiência das membranas, podendo ser diminuído por meio de um projeto apropriado para distribuição do fluxo (Charcosset 2006).

Yang e Chen (2002) estudaram a capacidade dinâmica de adsorção de IgG humana para as membranas de quitosana-celulose e um filtro de celulose com Proteína A imobilizada, sendo a capacidade de adsorção obtida igual a $14,9 \text{ mg mL}^{-1}$ e $3,3 \text{ mg mL}^{-1}$, para membrana e filtro, respectivamente. Jia et al. (1999) e Klein et al. (1994), obtiveram maiores capacidade de adsorção de IgG ao testar as membranas celulose-polímeros acrílicos e celulose revestida com SPES (poliétersulfona), é apresentando

capacidade dinâmica de adsorção de 21,5 mg mL⁻¹ membrana e 32,1 mg mL⁻¹ membrana, respectivamente.

No mesmo ano, Coffinier e colaboradores (2002) utilizaram membranas fibras ocas de álcool polietienovinílico (PEVA) com o ligante T-gel (ligante tiofílico) imobilizado para o estudo da purificação de IgG a partir do plasma humano, recuperando cerca de 85% da IgG contaminada com uma pequena quantidade de albumina (<1%).

Sun e colaboradores (2006) estudaram a capacidade de adsorção de IgG em membranas de fibra oca PVDF para utilização como matriz em cromatografia de afinidade utilizando como ligantes os aminoácidos L-Fenilalanina, L-Triptofano e L-Histidina, obtendo IgG a partir do plasma humano com pureza de 83,9%, 76,7 e 80,2%, respectivamente.

Serpa e colaboradores (2005) utilizaram membranas de fibras ocas (PEVA) para purificação do anticorpo monoclonal anti-TNP isotipo IgG₁ por IMAC utilizando o agente quelante IDA com os íons metálicos Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ imobilizados, sendo o melhor resultado obtido para o íon metálico zinco, alcançando fator de purificação acima de 15 e capacidade máxima de adsorção de 39,7 mg mL⁻¹.

Aquino e colaboradores. (2006) utilizaram IMAC com membranas de fibras ocas (PEVA) na purificação de proinsulina recombinante, utilizando o agente quelante IDA com os íons metálicos Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ imobilizados, sendo que o melhor resultado foi obtido com o íon metálico níquel, que em termo de seletividade apresentou resultado semelhante ao obtido para o adsorvente Sepharose-IDA, no entanto apresentando menor capacidade de adsorção (3,68 mg g⁻¹ contra 12,26 mg g⁻¹).

Ribeiro e colaboradores (2008) estudaram o efeito do agente quelante na purificação de IgG proveniente do plasma humano por IMAC com PEVA com o íon metálico Ni²⁺ imobilizado, sendo testados os adsorventes PEVA-IDA-Ni²⁺ e PEVA-TREN-Ni²⁺. Obteve-se capacidade máxima de adsorção de 204,6 mg g⁻¹ membrana seca e 93,9 g g⁻¹ membrana seca, respectivamente.

Bresolin e colaboradores (2010) utilizaram IMAC com PEVA como matriz e o agente quelante CM-Asp na purificação do anticorpo monoclonal anti-TNP isotipo IgG₁. Obteve-se alta pureza eletroforética e fator de purificação de 85,9, sendo que a eluição ocorreu em condições brandas, não resultando em perda da capacidade de ligação com os antígenos.

A aplicação de cromatografia em membranas de afinidade tem demonstrado potencialidade na purificação de bioprodutos, principalmente pela capacidade de adsorção convectiva. A aplicação de membranas de afinidade em escala industrial depende da sua eficiência em relação aos métodos já utilizados. Desta forma o entendimento dos fenômenos físicos e químicos que rege a adsorção e dessorção de proteínas por cromatografia em membranas de afinidade é essencial para a otimização e possível utilização industrial.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Métodos

3.1.1. Reagentes

Acrilamida, bis-acrilamida, decilsulfato de sódio (SDS), glicina e TEMED (BioAgency, Brasil). Ácido fosfórico (Ecibra, Brasil). EDTA, formaldeído, imidazol, Mops, sulfato de níquel, sulfato de cobalto, Tris (Merck, Alemanha). Glutaraldeído (Nuclear, Brasil). Azul de bromofenol e ditiotrietol (PlusOne, Suécia). Albumina de soro bovino (BSA, 98% de pureza), glicerol, persulfato de amônio e soro humano (Sigma, EUA). Ácido acético, ácido cítrico, ácido clorídrico, etanol, hidróxido de sódio e metanol (Synth, Brasil). Azul de comassie brilhante G 250 (Vetec, Brasil). Para eletroforese, marcador de alta massa molecular contendo as seguintes proteínas: miosina 212 kDa, α 2-macroglobulina 170 kDa, γ -galactosidase 116 kDa, transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica 53 kDa (Amersham Biosciences, EUA) o marcador de IgG (150 kDa) foi preparado a partir de IgG humana pré-purificada (Aventis Behring, Alemanha). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

3.1.2. Matriz

Nos experimentos cromatográficos utilizando membranas como suporte, foram empregadas membranas microporosas comerciais na configuração de fibras ocas de álcool polietilenovinílico (PEVA), da marca Kuraray Co (Japão), doadas pela Dra. Cécile Legallais (UTC, França). As especificações da membrana estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Especificações da membrana de PEVA.

Diâmetro médio de poro	0,05 μm
Tamanho nominal do poro	600 kDa
Diâmetro interno da fibra	200 μm
Diâmetro externo da fibra	240 μm
Área superficial ⁽¹⁾	49,5 m^2/g
Espessura da parede da	20 μm

Fonte: Kuraray (Japão), exceto para ⁽¹⁾ (Petsch et al. 1998).

As membranas de PEVA foram removidas do cartucho comercial e finamente cortadas em tamanhos de aproximadamente 2 a 3 mm. A seguir, foram ativadas e o agente quelante CM-Asp foi imobilizado conforme procedimentos descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia da UNICAMP.

3.2. Métodos

3.2.1. Ativação das membranas com epícloridrina

As fibras foram retiradas do cartucho comercial de 1 m^2 de área e foram finamente cortadas em pedaços de tamanho de aproximadamente 2 a 3 mm. Depois de serem embebidas em água, foram degaseificação utilizando uma bomba de vácuo, para que todo ar presente nos poros fossem removidos. A água foi esgotada vertendo o frasco. A ativação das membranas de fibras ocas de PEVA foi feita utilizando epícloridrina de acordo com o protocolo descrito por Hemdan e Porath (1985) e Serpa (2002).

A ativação foi realizada em capela, onde foi colocado um frasco erlenmeyer de 250 mL contendo as fibras (16 g de fibras filtradas a vácuo por 5 minutos) sobre um agitador magnético. Primeiro foram adicionados às fibras 5 mL do agente ativador epícloridrina e 50 mL de NaOH 2 mol L^{-1} contendo 0,266 g de boroidreto de sódio (NaBH_4). Esta suspensão (fibras e solução) foi deixada sob agitação moderada e à temperatura de 25°C, durante 15 minutos. Em seguida, foram gotejados,

simultaneamente, 50 mL de NaOH e 23,3 mL de epícloridrina, a uma vazão de, respectivamente, 0,27 e 0,13 mL min⁻¹, para evitar o aumento de temperatura durante a reação. O passo seguinte foi deixar a suspensão (fibras e solução) sob agitação por um período de 16 horas a 25°C, tempo suficiente para a reação ser completada, conforme Hemdam e Porath (1985). Após este período, em capela, as fibras foram lavadas com água ultrapura até verificar o mesmo valor de pH para água ultrapura e para água de lavagem (descarte), indicando que todo o excesso de solução foi removido.

3.2.2. Síntese e imobilização do CM-Asp

A síntese do ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) foi realizada em duas etapas, como descrito em Mantovaara et al. (1991), que são: imobilização do ácido aspártico na matriz previamente ativada, seguido da carboxi-metilação.

Imobilização do ácido L-aspártico

Para a imobilização do ácido L-aspártico seguiu-se o mesmo protocolo aplicado na imobilização do ligante a partir de um grupamento amino em matriz ativada contendo oxirano. Primeiramente, foi realizada a lavagem da matriz com uma solução de NaHCO₃/Na₂CO₃ 2,0 mol L⁻¹, tendo como objetivo a remoção de toda água contida na matriz. Preparou-se uma solução contendo 8,0 g de ácido L-aspártico adicionados a 50 mL de uma solução aquosa de NaHCO₃/Na₂CO₃ 1,0 mol L⁻¹, tendo o pH ajustado para 11,5, com pastilhas de NaOH. Em seguida, esta solução foi adicionada ao suporte e mantida sob agitação durante a noite. Após a imobilização, as membranas foram lavadas com água ultrapura, até que o pH da solução fosse igual ao pH da água.

Carboxi-metilação

Enquanto as membranas já contendo o ácido L-aspártico imobilizado foram lavadas com uma solução de NaHCO₃/Na₂CO₃ 1,0 mol L⁻¹, pH 10,5, foi preparada uma solução contendo 12,6 g de ácido bromo-acético em 30 mL de NaOH 4,0 mol L⁻¹ e o pH foi ajustado para 10,5 com pastilhas de NaOH. Esta solução foi adicionada às membranas e a suspensão permaneceu sob agitação durante a noite. Após a carboxi-

metilação, as membranas foram lavadas com água ultrapura, até o pH da solução fosse igual ao pH da água. As membranas assim obtidas foram denominadas PEVA-CM-Asp.

3.2.3. Experimentos cromatográficos em membranas de afinidade

Os ensaios cromatográficos em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺ foram realizados para determinar o perfil de eluição da IgG nos sistemas tamponantes fosfato de sódio-imidazol, Hepes-imidazol, MA (MOPS e acetato de sódio)-imidazol e MA (Mops e acetato de sódio). Os tampões de adsorção utilizados foram: fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0, Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0, MA 25 mmol/L e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e MA 25 mmol/L a pH 7,0. Para os três primeiros foram adicionado 2 mmol L⁻¹ de imidazol no tampão de adsorção, pois, segundo Sulkowski (1996), a inclusão deste agente previne que durante a eluição as moléculas de imidazol adsorvam nos quelatos fazendo com que o pH fique entre 1 e 2, devido a perda de um próton pelo imidazol. A coluna utilizada foi o modelo C 10/20 (10 mm de diâmetro interno x 20 cm de altura, da GE Healthcare, EUA), preenchida com 5,0 mL (1,24 g massa seca) de membranas finamente cortadas (PEVA-CM-Asp) e conectada a um sistema de cromatografia de baixa pressão (BioRad, EUA). A coluna contendo o adsorvente foi alimentada, até a saturação, com uma solução a 50 mmol L⁻¹ de sulfato de níquel ou sulfato de cobalto e, em seguida, lavada com água ultrapura e tampão (maior concentração de agente competidor). Este procedimento visa remover o metal fracamente quelatado na matriz. Em seguida, o adsorvente foi equilibrado à temperatura ambiente a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ com tampão adsorção. A eluição foi realizada por adição de agente competidor (imidazol) no tampão de adsorção em forma de gradiente degrau para os tampões de eluição: fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ com 20, 100 e 500 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0, Hepes 25 mmol L⁻¹ com 20, 100 e 500 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0, MA 25 mmol L⁻¹ com 20, 100 e 500 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0, e por abaixamento de pH para o tampão MA 25 mmol L⁻¹ a pH 4,0. A adsorvente foi regenerado utilizando uma solução de EDTA a 100 mmol L⁻¹ pH 7,0. A corrente de saída foi coletada durante todo o experimento em frações de volume de 2,0 mL. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford

(1976) e por nefelometria e aquelas com maior concentração de proteínas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.4. Quantificação de proteínas totais

Para a determinação da concentração de proteínas totais nas frações coletadas durante a cromatografia foi utilizado o método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Soluções padrões de albumina de soro bovino (BSA) foram utilizadas para a construção da curva de calibração.

3.2.5. Eletroforese SDS-PAGE

Com a intenção de determinar a pureza nas frações protéicas obtidas nas etapas cromatográficas, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutora (SDS – PAGE). As análises foram realizadas no equipamento Mini Protean III (Bio Rad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida), conforme protocolo apresentado por Laemmli (1970), na concentração de 7,5 %. As frações de cromatográficas de cada etapa foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e alíquotas de 10 a 15 µL de cada amostra foram aplicadas aos géis. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cubas verticais e a coloração foi realizada com nitrato de prata, conforme Morrissey (1981).

3.2.6. Quantificação de IgG, IgM, Trf e Alb

A quantificação de IgG, IgM, transferrina (Trf) e albumina (Alb) presente no “pool” das frações cromatográficas mais concentradas, foi realizada por nefelometria de acordo com o manual do nefelômetro Array Protein System 360 (Beckman Coulter, EUA). Este método se baseia no espalhamento da luz obtida pelos complexos (anticorpo específico-antígeno) em suspensão na amostra a ser submetida a um feixe

luminoso incidente. A variação da intensidade do espalhamento de luz medido pelo nefelômetro é convertida em unidades de concentração (mg/dL). Cada proteína tem um limite de detecção, sendo 0,93 mg/dL, 0,69 mg/dL, 0,62 mg/dL e 0,35 mg/dL para IgG, IgM, transferrina (Trf) e albumina (Alb), respectivamente.

3.2.7. Determinação das isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção foram determinadas através de experimentos em batelada, em duplicata e com soluções de IgG humana Aventis Behring (Alemanha) na temperatura de 25°C, com membranas finamente cortadas quelatadas ao íon metálico utilizando o agente quelate CM-Asp. Em colunas de filtração (BAKER Disposable Filtration Columns, JT BAKER. EUA) com capacidade para 3,0 mL, 50 mg de massa úmida (12,5 mg de massa seca) de membranas foram equilibradas com tampão de adsorção fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ contendo imidazol 2 mmol L⁻¹ em pH 7,0. Em seguida, em cada coluna de filtração foi adicionado 1 mL de solução de IgG em tampão de adsorção em diferentes concentrações (0,5 a 40,0 mg mL⁻¹). As colunas de filtração foram deixadas sobre agitação de 120 rpm e durante 16 h (tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido, determinado experimentalmente). Após este tempo, a solução foi analisada por espectrofotometria a 280 nm, sendo 1,4 o coeficiente de extinção utilizado para o cálculo da concentração de IgG no equilíbrio (C*). A massa de proteína adsorvida por grama de adsorvente no equilíbrio (Q*) foi calculada utilizando a Equação 3.1.

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

Onde C é concentração inicial de IgG adicionada no tubo, C* a concentração de IgG após no equilíbrio (mg mL⁻¹), V o volume adicionado no tubo (mL) e m a massa de adsorvente (g). Conhecendo os valores de Q* e C* utilizou-se o modelo de Langmuir (regressão não linear – Gauss-Marquardt) para determinar os parâmetros de

capacidade máxima de adsorção (Q_m) e constante de dissociação (K_d) complexo proteína-ligante imobilizado, segundo a Equação 3.2 (Langmuir, 1913):

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

Para o sistema em que o modelo de Langmuir não representou adequadamente os dados experimentais, foi utilizado o modelo de Langmuir-Freundlich (regressão não-linear – Gauss-Marquardt). Por este modelo, determinaram-se os parâmetros capacidade máxima de adsorção (Q_m), a constante de dissociação aparente ($K_{d(LF)}$) do complexo proteína-ligante imobilizado e o coeficiente de Langmuir-Freundlich (n), segundo a Equação 3.4.

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

3.2.8. Determinação da curva de ruptura

As curvas de ruptura foram determinadas em módulos de fibras ocas contendo CM-Asp quelatado aos íons metálicos níquel e cobalto. A Figura 3.1 apresenta o esquema do módulo de fibras ocas de PEVA utilizado neste trabalho que foi construído em nosso laboratório.

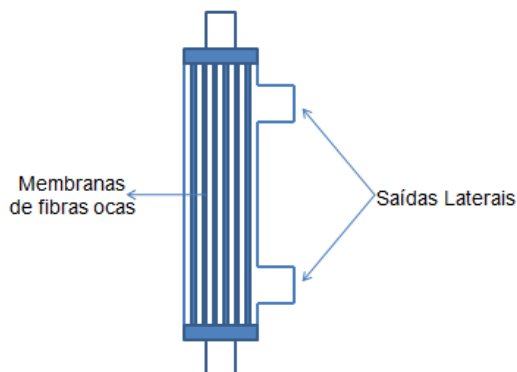


Figura 3.1. Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA (Adaptado de Serpa (2002)).

O módulo consiste em um tubo de vidro com duas saídas laterais (14 cm de comprimento e 1 cm de largura) onde foram introduzidas 150 fibras ocas de PEVA, retiradas do cartucho comercial (EVAL 5A, Kuraray, Japão), sendo as extremidades dessas fibras fixadas ao tubo por meio de uma resina epóxi, permanecendo aberto somente o espaço intracapilar (Figura 3.1). A área superficial (A) e o volume (V) ocupado pelas membranas são 113 cm^2 e $0,248 \text{ cm}^3$, respectivamente (Serpa (2002)).

A ativação e imobilização do agente quelante CM-Asp foi realizada de acordo com Bueno et al.(1995), onde as membranas foram, primeiramente, lavadas com NaOH 25 mmol L^{-1} em 4 modos, conforme Figura 3.2.

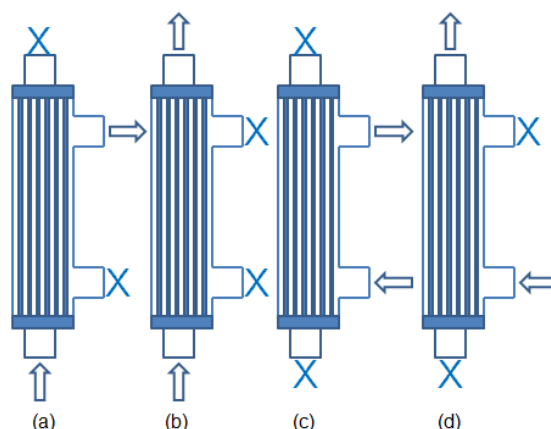


Figura 3.2. Esquema dos modos de lavagem das fibras ocas de PEVA contidas no módulo de filtração. (a) Frontal. (b) Lavagem Interna. (c) Espaço concha. (d) “Backflushing”. Adaptado de Serpa (2002).

Para ativação com epicloridrina e imobilização do CM-Asp, as soluções e os tempos utilizados seguiram os procedimentos descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2. As soluções de lavagem, de ativação e imobilização foram bombeadas e recirculadas no módulo em modo tangencial, Figura 3.3, por uma bomba peristáltica. Feita a imobilização, o módulo foi lavado com água ultrapura nos 4 modos (Figura 3.2) até que o pH da solução de lavagem fosse igual ao da água.

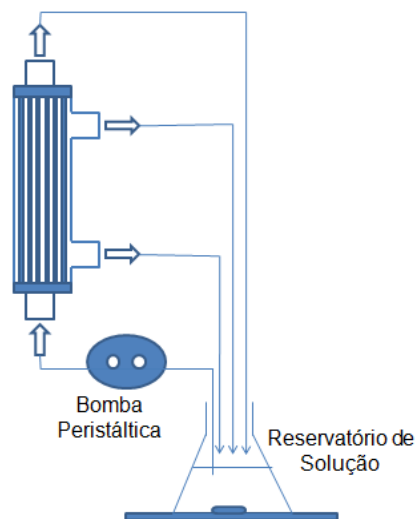


Figura 3.3. Esquema da montagem utilizada na ativação das membranas de PEVA contidas no módulo de filtração. Adaptado de Serpa (2002).

Com o objetivo de determinar a curva de ruptura (“breakthrough”) e a capacidade de adsorção da IgG nas membranas contidas no módulo de filtração, foram realizados experimentos de filtração onde o módulo de fibras ocas foi conectado a um sistema de cromatografia de baixa pressão da marca Gilson (França) e a corrente de saída monitorada por um medidor de absorvância a 280 nm e coletada em um coletor de frações, conforme ilustrado na Figura 3.4.

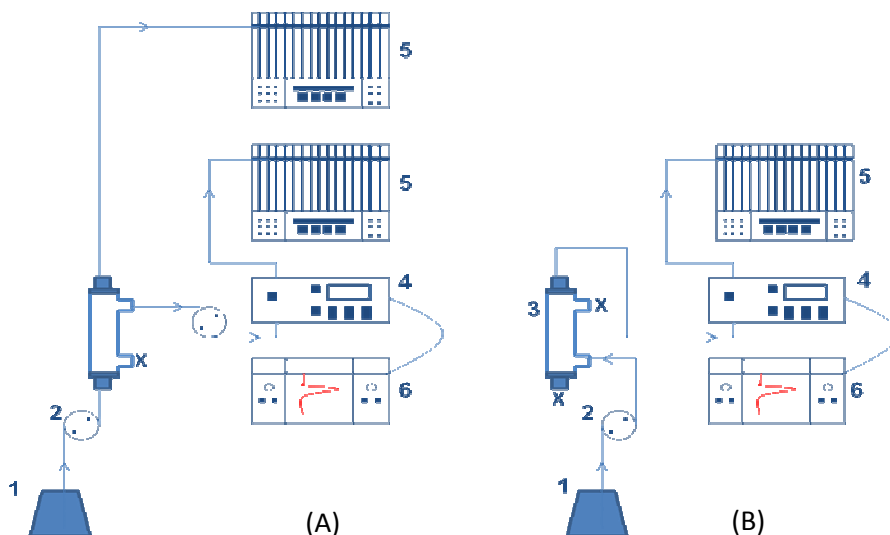


Figura 3.4. Esquema da montagem do experimento de filtração. (A) etapa de alimentação; (B) etapa de eluição e regeneração; (1) reservatório de solução; (2) bomba peristáltica; (3) módulo de filtração; (4) medidor de absorvância 280 nm; (5) coletor de frações e (6) registrador. Adaptado de Serpa (2002).

O módulo PEVA-CM-Asp, foi lavado sequencialmente nos modos apresentados na Figura 3.2. Depois o módulo foi alimentado até a saturação com soluções de sulfato de níquel e sulfato de cobalto 50 mmol L^{-1} e, logo depois, lavado sequencialmente com água ultrapura nos quatro modos e com o tampão de maior concentração de imidazol, a fim de remover os metais fracamente quelatados.

Em seguida as fibras do módulo foram equilibradas, à temperatura ambiente, a vazão de 1 mL min^{-1} com o tampão de adsorção fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0, em modo frontal. Então, preparou-se uma solução de 4,0 mL de soro humano nas diluições de 2,5 e 5,0 vezes no tampão de adsorção fosfato de sódio-imidazol, sendo alimentado na coluna na vazão de alimentação (Q_A) de 1 mL min^{-1} , em modo tangencial, até a saturação da coluna. As vazões Q_A e Q_f (vazão de filtrado) foram mantidas constantes e na razão de 0,5 (Serpa et. al., 2005).

As correntes de saída do filtrado e retentado foram coletadas separadamente em frações de 1,0 mL, sendo que a de filtrado foi monitorada a 280 nm durante toda alimentação. Após a saturação da coluna, o módulo de fibras ocas foi lavado com o mesmo tampão de equilíbrio nos quatro modos de operação.

Para a eluição foi utilizado à estratégia de aumento da concentração de imidazol, sendo as concentrações de 20, 100 e 500 mmol L⁻¹ de imidazol, no modo tangencial, sendo coletadas em frações de 2,0 mL. O módulo foi regenerado com EDTA 100 mmol L⁻¹ e depois lavado com água ultrapura. As frações foram quantificadas pelo método de Bradford e aquelas que correspondem às etapas de alimentação e aos picos obtidos durante a etapa de eluição foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. A quantificação de IgG, IgM, Albumina e transferrina foi obtida por nefelometria, das amostras da alimentação e do “pool” das frações mais concentradas da eluição.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo referem-se ao estudo do efeito do sistema tamponante, da remoção do sal e do íon metálico na adsorção e purificação de IgG humana por cromatografia em membranas de fibra oca de álcool poli(etileno)vinílico (PEVA) com íons metálicos Ni^{2+} e Co^{2+} imobilizados ao agente quelante ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp). Esse estudo foi dividido em três etapas. A primeira etapa compreendeu o estudo do sistema tamponante, da remoção de sal (NaCl) e do íon metálico na purificação de IgG a partir de soro humano diluído 5,0 vezes em diferentes sistemas tamponantes, para os íons metálicos níquel e cobalto. Na segunda etapa determinou-se isotermas de adsorção de IgG para o adsorvente PEVA-CM-Asp com os íons metálicos níquel e cobalto imobilizados, na melhor condição obtida na primeira etapa, com a finalidade de determinar os parâmetros capacidade de adsorção e constante de dissociação do complexo CM-Asp- Ni^{2+} -IgG e CM-Asp- Co^{2+} -IgG. A terceira etapa consistiu na obtenção de curvas de ruptura para a melhor condição obtida na primeira etapa, tanto para o níquel quanto para o cobalto, com o soro humano nas diluições de 2,5 e 5,0 vezes, a fim de identificar problemas relacionados ao processo, tais como perdas e precipitação de proteínas durante o carregamento da solução de alimentação, além de determinar a capacidade do adsorvente nas condições utilizadas.

4.1. Estudos do efeito tamponante, do íon metálico e do sal (NaCl) na purificação de IgG a partir de soro humano utilizando os adsorventes PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} e PEVA-CM-Asp- Co^{2+}

O estudo do efeito da remoção de NaCl $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Porath et al., 1975) na adsorção de IgG a partir de soro humano foi realizado com os seguintes sistemas tamponantes: MA 25 mmol L^{-1} a pH 7,0; MA 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0; fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0 e Hepes 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. A eluição foi realizada utilizando duas estratégias: abaixamento de pH para o MA e aumento da concentração de imidazol para o MA e

demais sistemas tamponantes estudados. As duplicatas e cromatogramas dos experimentos encontram-se no Anexo A e B, respectivamente.

Na presença de sal, a interação entre proteínas e o quelato metálico ocorre majoritariamente por ligações de coordenação e estas ligações são favorecidas no pH em que os resíduos de histidina (principal via de interação proteína-quelato metálico) encontram-se desprotonados, ou seja, em pH maior que seu pKa (~6,5) (Porath, 1975). As massas de proteína total adsorvidas na presença e ausência de sal, para os íons metálicos níquel e cobalto, estão apresentadas na Figura 4.1, e os perfis eletroforéticos encontram-se nas Figuras 4.2 para o níquel e 4.3 para o cobalto.

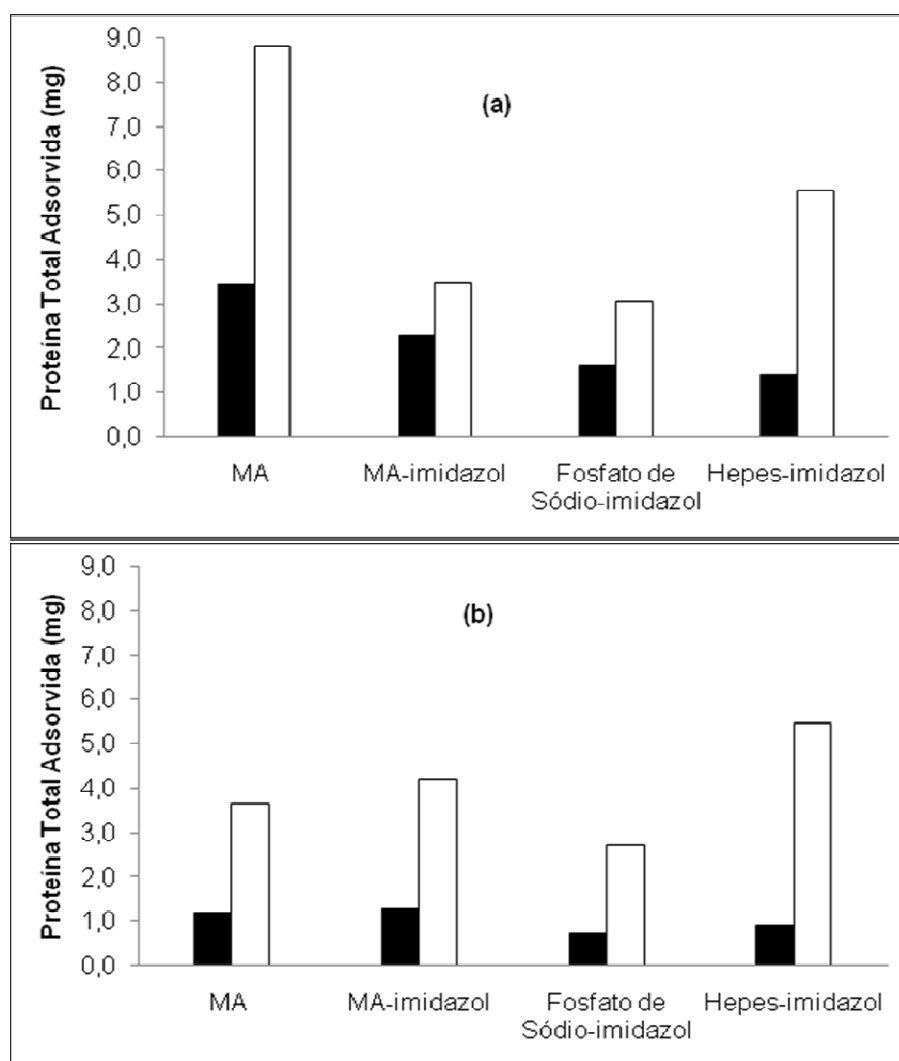


Figura 4.1. Capacidade de adsorção em termos de proteínas totais do soro humano para os sistemas tamponantes estudados. (a) PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. (b) PEVA-CM-Asp-Co²⁺. (■) Presença e (□) Ausência de NaCl 1,0 mol L⁻¹.

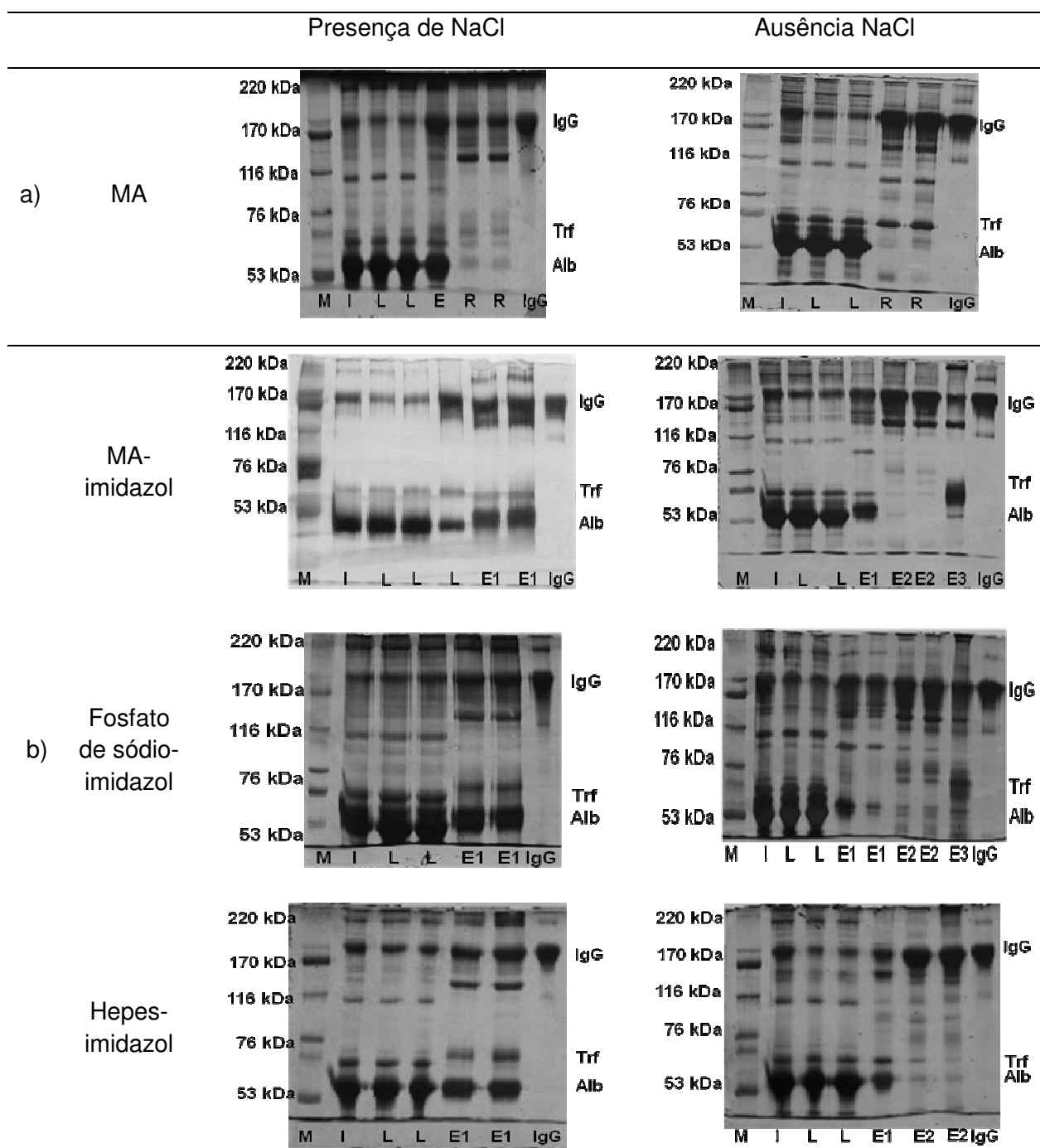


Figura 4.2. Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias do soro humano diluído nos sistemas tamponantes indicados em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Eluição: a) Estratégia abaixamento de pH. M – Marcador de massa molecular. L – Lavagem. E – Eluição. R – Regeneração. IgG – Marcador de IgG. b) Aumento da concentração de imidazol. M – Marcador de massa molecular. L – Lavagem. E1 – Frações da Eluição 1. E2 – Frações da Eluição 2. E3 – Frações da Eluição 3. R – Regeneração. IgG – Marcador de IgG.

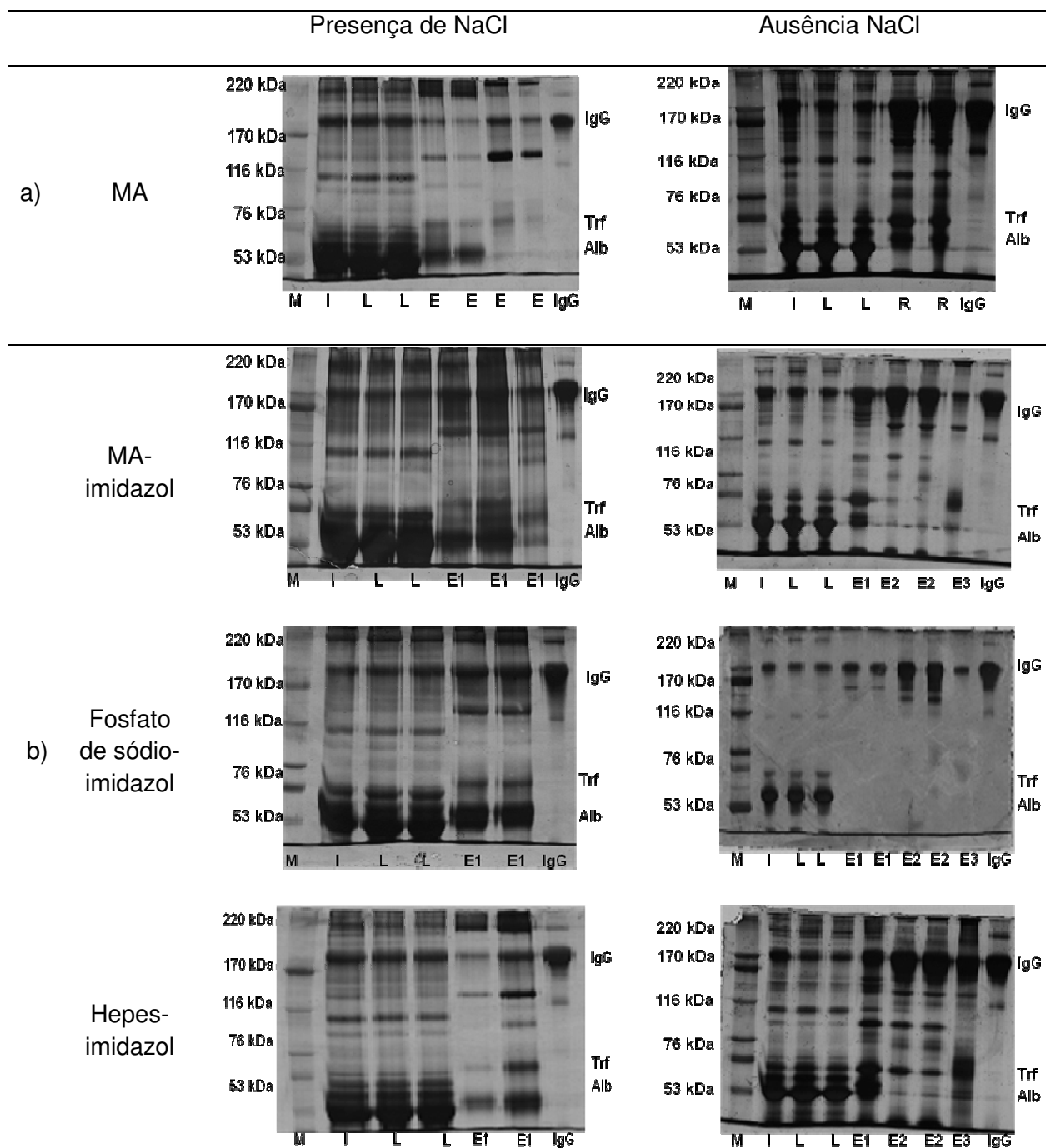


Figura 4.3. Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias do soro humano diluído nos sistemas tamponantes indicados em PEVA-CM-Asp-Co²⁺. Eluição: a) Estratégia abaixamento de pH. Legenda: M – Marcador de massa molecular. L – Lavagem. E – Eluição. R – Regeneração. IgG – Marcador de IgG. b) Aumento da concentração de imidazol. Legenda: M – Marcador de massa molecular. L – Lavagem. E1 – Frações da Eluição 1. E2 – Frações da Eluição 2. E3 – Frações da Eluição 3. R – Regeneração. IgG – Marcador de IgG.

Observa-se que a remoção do sal promoveu o aumento da capacidade de adsorção para todos os sistemas tamponantes estudados, tanto para o níquel quanto para o cobalto (Figura 4.1). Esperava-se que na presença de sal, ocorresse o favorecimento na adsorção seletiva de IgG devido à minimização das interações não específicas do tipo hidrofóbica e/ou eletrostática, favorecendo as ligações de coordenação entre o quelato metálico e os grupos doadores de elétrons (por exemplo, histidina) presentes na superfície da proteína.

Para todos os sistemas tamponantes estudados na presença de sal, o níquel apresenta maior capacidade de adsorção de proteínas totais que o cobalto, chegando a uma diferença de 65,3%, no caso dos sistemas tamponantes MA. Segundo Sulkowski (1989), a força de retenção de proteínas, quando os metais níquel e cobalto são quelatados ao agente quelante IDA é $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$. Na presença de sal e do agente quelante CM-Asp esta mesma ordem foi verificada. A diferença na capacidade de adsorção do Ni^{2+} em relação ao Co^{2+} varia de 35,2% a 65,3%, para os sistemas tamponantes Hepes-imidazol e MA, respectivamente (Figura 4.1).

Na ausência de sal, exceto para o sistema tamponante MA-imidazol, observou-se a ordem proposta por Sulkowski (1989), $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$. No entanto, a diferença entre as capacidades de adsorção de proteína total foi menor (entre 1,6% e 58,4% para os tampões Hepes-imidazol e MA, respectivamente) (Figura 4.1). Para o sistema tamponante MA-imidazol, a capacidade de adsorção de proteína total para o cobalto foi 17,8% maior que a observada para o níquel (Figura 4.1).

Quanto à seletividade, observa-se nos perfis eletroforéticos apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3, a presença de impurezas (outras proteínas do soro humano, tais como albumina (Alb) e transferrina (Trf)) nas frações de eluição, nas duas estratégias de eluição utilizadas. Outros autores também obtiveram baixa seletividade na purificação de IgG a partir de diferentes fontes utilizando íons metálicos imobilizados (soro e plasma humano e sobrenadante de cultura celular) quando na presença de sal (Serpa et al., 2005; Ribeiro et al., 2008, Bresolin et al., 2010).

A seletividade e a capacidade de adsorção de IgG dependem, além do quelato metálico imobilizado na matriz cromatográfica, das forças físico-químicas que regem a adsorção de proteínas, que podem ser minimizadas ou maximizadas dependendo da composição da fase móvel (Bresolin et al., 2009). Na ausência de sal, o quelato metálico atua como um pseudocátion favorecendo as interações eletrostáticas (Zachariou e Hearn, 2000).

Eluição por abaixamento de pH

O tampão Mops-acetato de sódio (MA), mesmo em pH neutro, apresenta carga predominantemente negativa, pois embora o Mops (pKa 7,2) em pH 7,0, apresente carga líquida nula devido ao seu caráter zwitteriônico ($\text{pH} < \text{pKa}$), o acetato de sódio (pKa 2,35), encontra-se negativamente carregado. De acordo com a Figura 4.2a e 4.3a, para níquel e cobalto, respectivamente, não foi verificado a recuperação de IgG livre de impurezas; nota-se a presença de Alb e Trf nas frações de eluição e regeneração, tanto na presença quanto na ausência de sal.

No que concerne a força de retenção, as Figuras 4.4 e 4.5 demonstram o perfil das etapas de eluição e regeneração das proteínas adsorvidas na presença e ausência de sal, para os íons metálicos níquel e cobalto, respectivamente. Na presença de sal, 79,2% e 73,3% das proteínas adsorvidas foram removidas da coluna durante a etapa de eluição a pH 4,0 para níquel e cobalto, respectivamente, contrariamente ao observado na ausência de sal onde mais de 97% das proteínas adsorvidas foram eluídas durante a etapa de regeneração com EDTA, para ambos íons metálicos. Com o abaixamento de pH da fase móvel para 4,0, tem-se a protonação dos resíduos de histidina e o rompimento das ligações de coordenação formadas entre o quelato metálico e a proteína, consequentemente, favorecendo a dessorção (Porath, 1988; Ueda et al., 2003). O EDTA é um agente quelante forte, que elui as proteínas adsorvidas na matriz através do deslocamento da ligação Me^{2+} -IgG, sendo necessário um passo adicional para remoção do metal presente nesta fração.

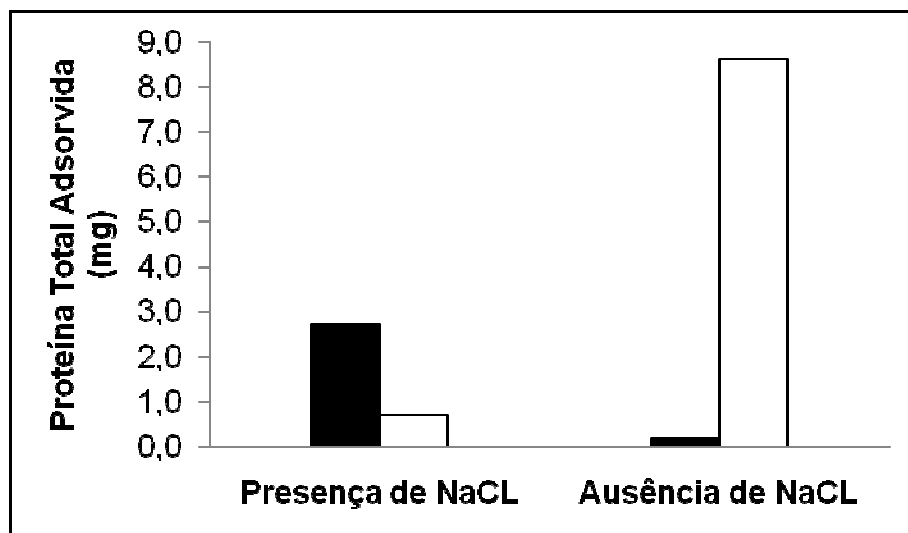


Figura 4.4. Perfil de eluição das proteínas adsorvidas para o sistema tamponante MA utilizando a estratégia de eluição por abaixamento de pH para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. (■) E. Eluição: pH 4,0 (□) Regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹.

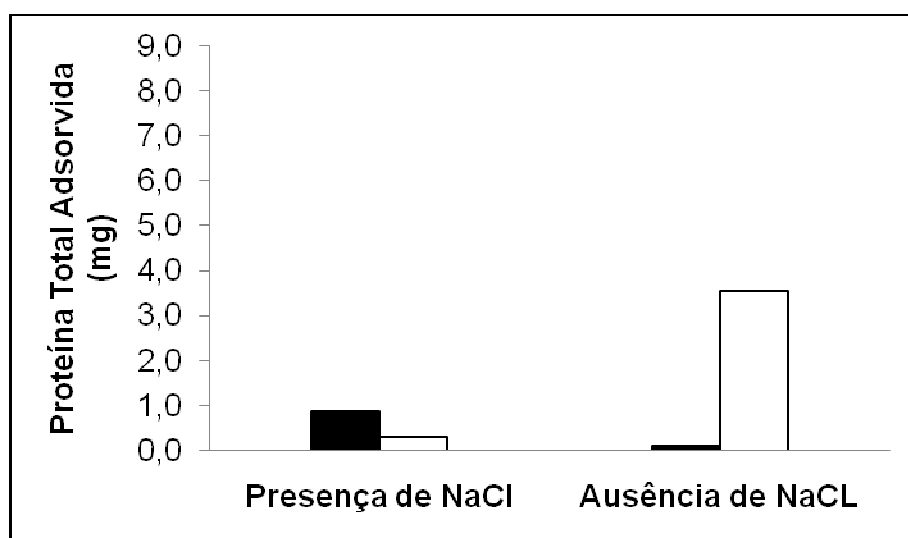


Figura 4.5. Perfil de eluição das proteínas adsorvidas para o sistema tamponante MA utilizando a estratégia de eluição por abaixamento de pH para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Co²⁺. (■) E. Eluição: pH 4,0 (□) Regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹.

A estratégia de eluição por abaixamento de pH não foi eficaz para a purificação de IgG a partir do soro humano. Embora na presença de sal a maior parte das proteínas adsorvidas tenham sido eluídas, não foi verificada seletividade para IgG. Desta forma uma alternativa foi utilizar eluição por aumento da concentração de imidazol.

Eluição por aumento da concentração de imidazol

O imidazol é um agente competidor, competindo fortemente com a proteína pelo sítio de ligação. Segundo Sulkowski (1996), para utilizar o imidazol como agente competidor na eluição de proteínas em IMAC, é necessário saturar os quelatos livres com imidazol na etapa de equilíbrio da coluna, pois durante a etapa de dessorção este agente adsorve nos quelatos metálicos perdendo um próton, originando uma zona de pH muito baixa (entre 1 e 2). A adição de imidazol no tampão de equilíbrio assegura que a eluição das proteínas ocorreu devido ao aumento de sua concentração e não pelo abaixamento do pH. A fim de evitar este fenômeno, foi adicionado aos tampões de equilíbrio 2,0 mmol L⁻¹ de imidazol.

A adição do agente competitivo imidazol ao tampão MA (MA-imidazol) na ausência de sal, desfavoreceu a adsorção de proteínas do soro humano (diferentes de IgG) no quelato metálico tanto para o níquel quanto para o cobalto, como pode ser verificado nas Figuras 4.2b e 4.3b, respectivamente. A presença de imidazol e NaCl não proporcionou seletividade na adsorção de IgG (Figuras 4.2b e 4.3b), tendo-se observado Alb e Trf nas frações eluídas, tanto para o níquel quanto para o cobalto.

Para ambos íons metálicos, observa-se maior seletividade na adsorção de IgG para o sistema tamponante MA-imidazol (Figuras 4.2b e 4.3b) quando comparado ao mesmo sistema tamponante na ausência deste agente competidor (Figuras 4.2a e 4.3a). As frações eluídas utilizando como estratégia o aumento da concentração de imidazol, apresentaram menos impurezas (apresentando albumina, transferrina e outras proteínas do soro), tanto para o níquel quanto para o cobalto (Figura 4.2b e 4.3b). Neste caso as moléculas de imidazol adicionadas no tampão de adsorção por se ligarem aos quelatos metálicos (agente competidor), provavelmente desfavoreceram a formação de ligações de coordenação entre as proteínas do soro e o quelato metálico, aumentando a seletividade. Quanto à IgG humana, por apresentar uma ampla faixa de pI (entre 4,3 e 9,9, Prin et al., 1995), pode estar ocorrendo interações mistas (*mixed-mode chromatography*, Majors et al., 2009) entre o quelato e IgG, tais como ligações de coordenação e interações eletrostáticas. Este fenômeno foi também observado por

Bresolin e colaboradores (2010) ao utilizar o tampão competitivo Tris-HCl sem adição de NaCl para purificação do anticorpo monoclonal anti-TNP, isotipo IgG₁.

Para o íon metálico níquel, foi observada uma diminuição na capacidade de adsorção das proteínas do soro para o sistema tamponantes MA-imidazol (3,33 mg) quando comparado àquela sem adição de imidazol no tampão de adsorção (8,83 mg). No entanto, para o íon metálico cobalto, observou-se que na ausência de sal e presença de imidazol a capacidade de adsorção foi maior que a observada na ausência de sal e imidazol (4,22 mg e 3,67 mg, respectivamente) (Figura 4.1).

Quanto ao tampão fosfato (pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} iguais a 2,12 e 7,20 e 12,67, respectivamente), este apresenta grupo químico capaz de competir fracamente pelo sítio de adsorção de proteínas em IMAC (Chottard et al., 1992). No entanto, o fosfato de sódio é classificado como base dura e os íons Ni^{2+} e Co^{2+} como ácidos intermediários (segundo definições de ácido-base de Lewis) formando assim complexos e coordenação pouco estáveis (Pearson, 1968). Serpa (2002), utilizando o tampão fosfato de sódio sem a adição de imidazol, verificou que este tampão não proporcionou adsorção seletiva de anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular em PEVA-IDA- Ni^{2+} (eluição por abaixamento de pH), apresentando baixo grau de pureza dos anticorpos.

Este tampão na presença de NaCl e imidazol apresentou baixa capacidade de adsorção de proteínas totais (1,6 mg para o níquel e 0,73 mg para o cobalto) associada a baixa seletividade na adsorção de IgG (Figura 4.2b e 4.3b, níquel e cobalto, respectivamente), constatando-se a presença de Alb, Trf e outras proteínas do soro humano na primeira eluição (20 mmol L^{-1}).

A remoção do sal proporcionou maior capacidade de adsorção na presença de fosfato de sódio-imidazol (Figura 4.1), associado à maior seletividade na purificação de IgG (Figura 4.2b e 4.3b). Nesta mesma condição, observa-se homogeneidade eletroforética maior para o íon cobalto quando comparado ao níquel (Figuras 4.2b e 4.3b), no entanto, a capacidade de adsorção para o íon metálico níquel é maior que a obtida para o cobalto (Figura 4.1).

O tampão Hepes, assim como o Mops, é classificado como zwitteriônico, sendo que o Hepes apresenta carga líquida nula em pH abaixo de 7,55 (pKa igual a 7,55). Observa-se alta capacidade de adsorção na ausência de sal, tanto para níquel quanto para o cobalto (5,56 mg e 5,47 mg, respectivamente), valores maiores que os obtidos para os outros sistemas tamponantes na presença de imidazol apresentados anteriormente (Figura 4.1). No entanto, não foi possível obter IgG eletroforicamente homogênea pois outras proteínas do soro, tais como Alb e Trf, foram adsorvidas (Figuras 4.2b e 4.3b)

Para o tampão Hepes, nas duas condições experimentais empregadas (sem e com adição de sal no tampão de adsorção), tanto para o níquel quanto para o cobalto, não foi possível obter IgG eletroforicamente homogênea pois outras proteínas do soro, tais como Alb e Trf, foram adsorvidas (Figuras 4.2b e 4.3b). Provavelmente as proteínas do soro humano quando alimentadas na coluna cromatográfica diluídas no tampão Hepes-imidazol contendo $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl interagiram com o quelato metálico por ligações de coordenação. Observa-se menor massa de proteína adsorvida nesta condição (1,39 mg para o níquel e 0,90 mg para cobalto) quando comparada à condição sem sal, o aumento observado na ausência de sal pode estar relacionado a adsorção das proteínas no quelato metálico por interações mistas (eletrostáticas e ligações de coordenação).

Força de retenção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺

No que concerne à força de retenção, as Figuras 4.6 e 4.7 apresentam os perfis de eluição para o níquel e as Figuras 4.8 e 4.9 para o cobalto, para os sistemas tamponantes estudados para eluição por aumento da concentração de imidazol, na presença e ausência de sal, respectivamente.

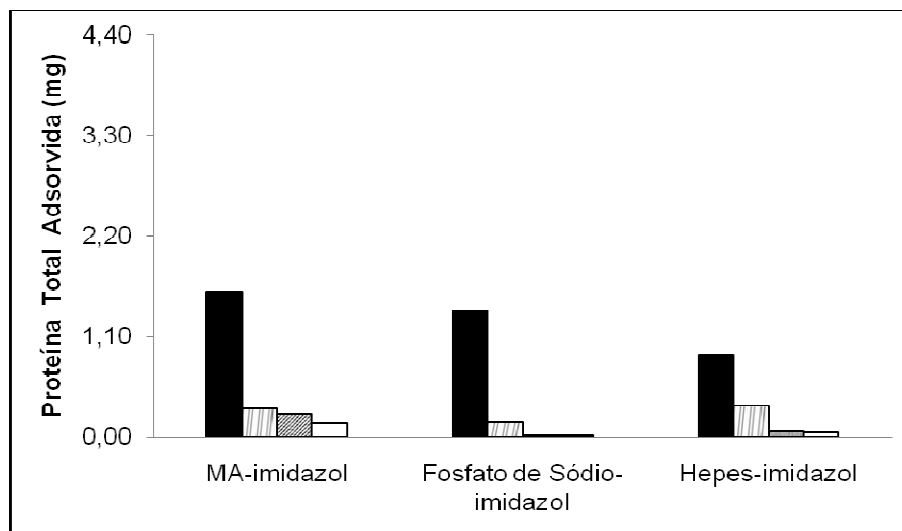


Figura 4.6. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na presença de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. (■) E1: eluição com 20 mmol L⁻¹ (□) E2: eluição com 100 mmol L⁻¹ (▨) E3: eluição com 500 mmol L⁻¹ (□) Regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹.

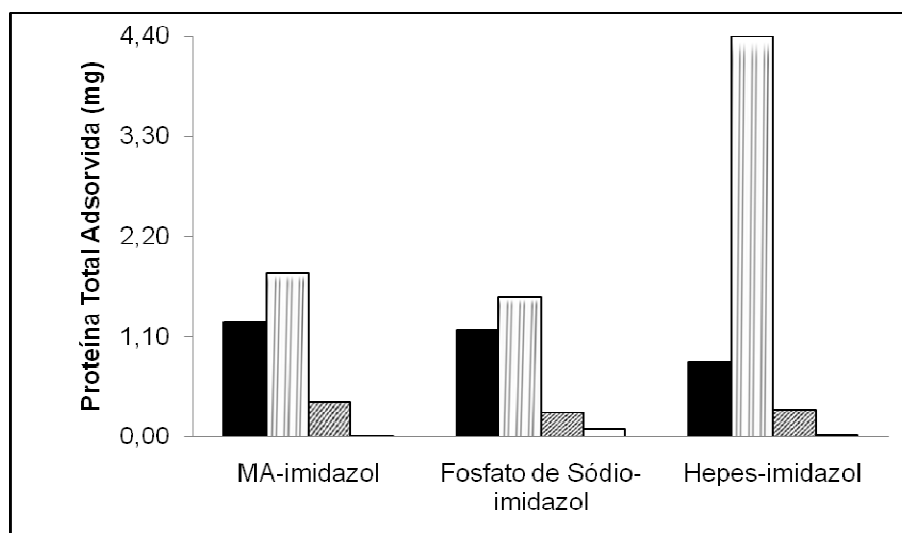


Figura 4.7. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na ausência de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. (■) E1: eluição com 20 mmol L⁻¹ (□) E2: eluição com 100 mmol L⁻¹ (▨) E3: eluição com 500 mmol L⁻¹ (□) Regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹.

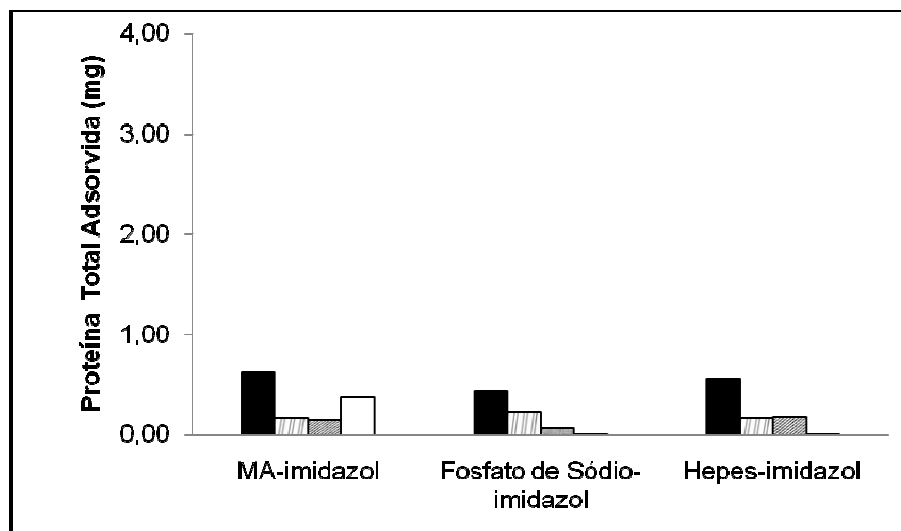


Figura 4.8. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na presença de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Co²⁺. (■) E1: eluição com 20 mmol L⁻¹ (▨) E2: eluição com 100 mmol L⁻¹ (▩) E3: eluição com 500 mmol L⁻¹ (□) Regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹.

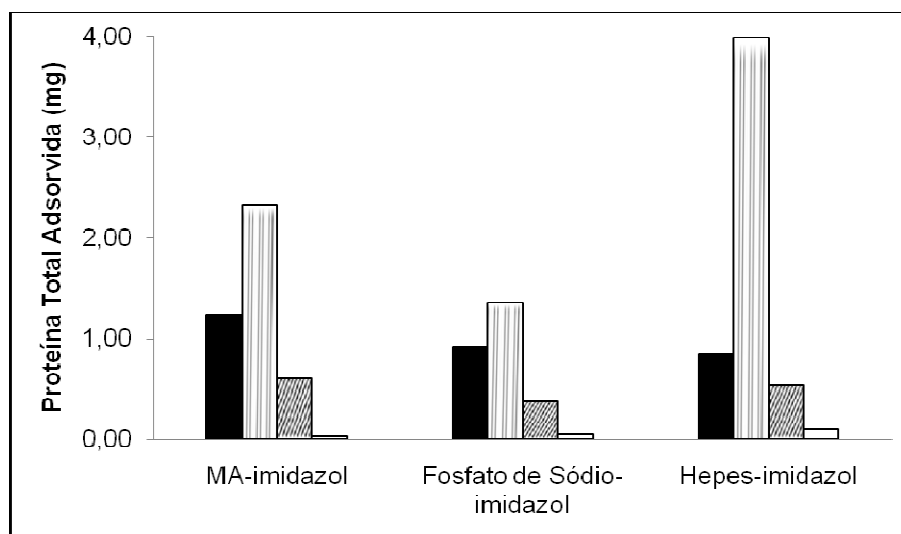


Figura 4.9. Perfis de eluição de proteína total para os sistemas tamponantes na ausência de sal utilizados na estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Co²⁺. (■) E1: eluição com 20 mmol L⁻¹ (▨) E2: eluição com 100 mmol L⁻¹ (▩) E3: eluição com 500 mmol L⁻¹ (□) Regeneração: EDTA 100 mmol L⁻¹.

Verifica-se que a estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol foi suficiente para eluir mais de 93% das proteínas adsorvidas, tanto na presença quando na ausência de sal, para ambos os íons metálicos, com exceção do cobalto, que para o tampão MA na presença de sal, a adição de imidazol eluiu apenas 73,3% das proteínas adsorvidas. No entanto, nota-se que, para ambos íons metálicos na

presença de sal, baixa concentração de imidazol (20 mmol L^{-1}) já foi suficiente para eluir a maior parte das proteínas adsorvidas (para o níquel 68,5%, 86,2% e 65,5% e para o cobalto 48,1%, 58,9% e 62,2%, para os sistemas tamponantes MA-imidazol, fosfato de sódio-imidazol e Hepes-imidazol, respectivamente). Enquanto que na ausência de sal, observa-se que a maior parte das proteínas adsorvidas foram eluídas na concentração de 100 mmol L^{-1} , para ambos íons metálicos (níquel 51,9%, 50,0% e 79,1% e para o cobalto 55,4%, 64,8% e 72,9%, para os sistemas tamponantes MA-imidazol, fosfato de sódio-imidazol e Hepes-imidazol).

Selecionou-se, dentre os sistemas tamponantes estudados na ausência de sal, aqueles que propiciaram maior seletividade na adsorção de IgG baseado nos perfis eletroforéticos, a saber: MA-imidazol, Fosfato-imidazol e Hepes-imidazol para o níquel e MA-imidazol e Fosfato de sódio-imidazol para o cobalto. As frações cromatográficas de alimentação, lavagem e eluição foram analisadas por nefelometria para quantificação de IgG, IgM, Alb e Trf.

Para o sistema tamponante MA-imidazol os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2, para o níquel e cobalto, respectivamente.

Tabela 4.1. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Adsorção: MA 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.

Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG	
	IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	7,20	0,73	31,98	2,39	51,27	14,0	1,0
Lavagem	4,10	0,61	31,85	2,24	45,66	9,0	0,6
E1	0,66	n.d.	0,63	0,05	1,16	57,0	4,0
E2	1,73	n.d.	n.d.	n.d.	1,80	96,2	6,7
E3	0,23	n.d.	n.d.	n.d.	0,35	64,8	4,6
Regeneração	-	-	-	-	0,02	-	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

^c FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho ($0,93 \text{ mg/dL}$ para IgG, $0,69 \text{ mg/mL}$ para IgM, $0,62 \text{ mg/mL}$ para Alb. e $0,35 \text{ mg/mL}$ para Trf).

Volume do leito: 5 mL

Tabela 4.2. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Co²⁺. Adsorção: MA 25 mmol L⁻¹ com 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.

Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG	
	IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	7,15	0,75	31,28	3,00	51,26	13,9	1,0
Lavagem	4,64	0,65	31,69	2,23	50,20	9,2	0,7
E1	0,50	n.d.	n.d.	0,28	1,12	45,1	3,2
E2	1,99	0,07	n.d.	0,03	2,13	93,4	7,1
E3	0,12	0,05	n.d.	n.d.	0,29	42,3	3,0
Regeneração	-	-	-	-	-	-	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

^c FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

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

Volume do leito: 5 mL

Para o níquel, o sistema tamponante MA-imidazol não favoreceu a adsorção de IgG (adsorção de 36,4% do total de IgG alimentada), tendo-se observado baixo grau de pureza nas frações eluídas a 20 e 500 mmol L⁻¹ de imidazol (pureza de 57,0% e 64,8%, respectivamente, Tabela 4.1). Alto grau de pureza foi obtido somente na fração eluída a 100 mmol L⁻¹ de imidazol (96,2%) representando 66,0% da IgG adsorvida (24,0% da IgG alimentada). Para o cobalto, observa-se a adsorção de 2,61 mg de IgG (36,5% da IgG alimentada). A maior parte da IgG adsorvida (76,2%) foi recuperada nas frações de eluição a 100 mmol L⁻¹ de imidazol, no entanto, nota-se a contaminação com IgM (0,07 mg) e Trf (0,03 mg), sendo a pureza obtida de 93,4%. As frações eluídas a 20 e 500 mmol L⁻¹ apresentaram baixo grau de pureza (45,1% e 42,3%, respectivamente, Tabela 4.2).

Para o sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol, para níquel e cobalto, os resultados de nefelometria estão apresentados nas Tabelas 4.3 e 4.4, respectivamente.

Tabela 4.3. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.

Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG	
	IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	7,14	0,74	30,68	2,39	51,88	13,8	1,0
Lavagem	4,20	0,58	30,19	2,19	45,31	9,3	0,7
E1	0,73	n.d.	n.d.	n.d.	0,86	85,4	6,2
E2	1,25	n.d.	n.d.	n.d.	0,96	130,1	9,5
E3	0,09	n.d.	n.d.	n.d.	0,13	70,1	5,1
Regeneração	-	-	-	-	0,09	-	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

^c FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

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

Volume do leito: 5 mL

Tabela 4.4. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Co²⁺. Adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ com 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.

Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG	
	IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	9,72	1,06	40,96	3,09	51,22	19,0	1,0
Lavagem	5,83	0,89	39,73	2,89	45,31	12,9	0,7
E1	0,35	n.d.	n.d.	n.d.	0,42	83,3	4,4
E2	1,28	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	127,7	6,7
E3	0,11	n.d.	n.d.	0,03	0,20	56,2	3,0
Regeneração	-	-	-	-	-	-	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

^c FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

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

Volume do leito: 5 mL

Para o níquel, o tampão fosfato de sódio, a 20 e 500 mmol L⁻¹ de imidazol foram eluídas 0,73 e 0,09 mg de IgG, com pureza de 85,4% e 70,1%, respectivamente (Tabela 4.3). Cerca de 17% da IgG injetada foi recuperada nas frações eluídas com 100 mmol L⁻¹ de imidazol com grau de pureza elevado (130%) (Tabela 4.3). O valor de

pureza acima de 100% pode ser explicado, segundo Hammond e Kruger (1988), pela diferença de sensibilidade dos métodos utilizados para a quantificação de proteína total e IgG. A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (1976), o qual subestima a quantidade de IgG presente nas amostras. A proteína que este método apresenta maior sensibilidade é albumina. A IgG foi quantificada pelo método de nefelometria, o qual apresenta alta especificidade, devido a interação antígeno-anticorpo, sendo, portanto, a quantidade de IgG real da amostra.

Para o cobalto, o sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol adsorveu 17,9% da IgG injetada. A eluição a 20 e 500 mmol L⁻¹ eluíram 0,35 mg e 0,11 mg de IgG, com pureza de 83,3% e 56,2%, respectivamente (Tabela 4.4). Similar ao observado para o sistema tamponante MA-imidazol (Tabela 4.2), para o fosfato de sódio-imidazol nota-se que o maior grau de pureza para IgG na eluição com 100 mmol L⁻¹ de imidazol (127,7%) associada a maior quantidade de IgG adsorvida 1,28 mg (73,6% e 13,2% da IgG adsorvida e injetada, respectivamente, Tabela 4.4). Pureza superior a 100% é explicada pela diferença da sensibilidade dos métodos utilizados para quantificação de proteína total e proteínas específicas (IgG, IgM, Alb e Trf).

Para o sistema tamponantes Hepes-imidazol, as medidas nefelométricas foram realizadas somente para o níquel, uma vez que não foi verificada seletividade na adsorção de IgG nas frações de eluição para o cobalto (Figura 4.3b). Os resultados de nefelometria encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Adsorção: Hepes 25 mmol L⁻¹ com 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Dessorção: aumento da concentração de imidazol.

Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG	
	IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	7,37	0,81	33,00	2,51	51,33	14,4	1,0
Lavagem	0,79	0,16	32,06	0,84	49,53	1,6	0,1
E1	0,14	n.d.	n.d.	0,06	0,52	26,8	1,9
E2	4,26	0,66	0,12	0,15	5,19 ^d	82,1	7,0
E3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,49	-	-
Regeneração	-	-	-	-	0,08	-	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

^c FP: Fator de purificação, razão entre a pureza da fração e a pureza do material injetado.

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

^d Referente a soma dos valores de IgG, IgM, Alb e Trf obtidos por nefelometria.

Volume do leito: 5 mL

Verifica-se que quase toda IgG adsorvida (4,26 mg) foi removida na segunda eluição (concentração de imidazol igual a 100 mmol L⁻¹) quando o sistema tamponante Hepes-imidazol foi empregado como tampão de adsorção, sendo a maior quantidade de IgG adsorvida em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ em comparação aos outros sistemas tamponantes estudados (Tabelas 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4). No entanto, a alta capacidade de adsorção está associada à menor seletividade (82,1% de pureza), em contraste ao observado com sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol, que apresentou menor capacidade de adsorção, porém alto grau de pureza (130,1%). A pureza verificada na primeira eluição foi baixa, de 26,8%, sendo detectada nestas frações a presença de Trf (Tabela 4.5).

Com base nos resultados apresentados, todos os sistemas tamponantes empregados apresentaram maior pureza nas frações eluídas a 100 mmol L⁻¹ de imidazol (para o níquel 94,6, 130,1, e 82,1% para MA, fosfato e Hepes, respectivamente e para o cobalto 93,3 e 127,7%, MA-imidazol e fosfato de sódio-imidazol, respectivamente).

Tanto para o íon metálico níquel quanto para o cobalto, o sistema tamponante fosfato de sódio apresentou-se como a melhor condição para purificação de IgG. A Figura 4.10, apresenta as estruturas dos sistemas tamponantes em pH 7,0.

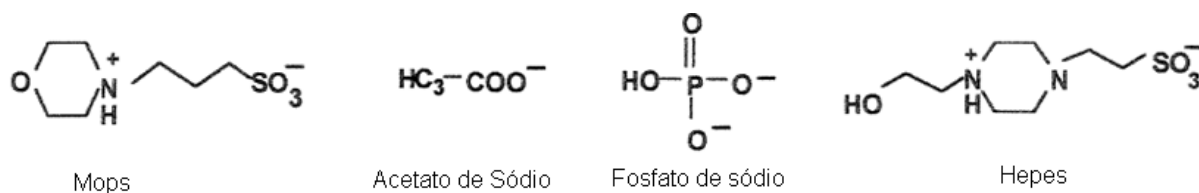


Figura 4.10. Estrutura do dos sistemas tamponantes.

O tampão fosfato de sódio apresenta em sua estrutura somente carga negativa, o que pode explicar a maior seletividade na adsorção de IgG, uma vez que na ausência de sal, a Alb e Trf, encontram-se negativamente carregadas a pH 7,0 (pI igual a 4,9 para Alb, e pI entre 5,2 e 5,9 para Trf, Putnam, 1987), e são repelidas pelo sistema tamponante. Desta forma, a menor pureza obtida para os sistemas tamponantes MA e Hepes pode estar relacionada com as cargas positiva e negativa presente em sua estrutura, que teria favorecido a adsorção de proteínas contaminantes devido às interações não específicas, na ausência de sal. Nota-se que para o MA a adição do agente competidor imidazol aumentou consideravelmente a seletividade na adsorção de IgG, tanto para níquel quanto para o cobalto (Figura 4.10).

Recomenda-se, portando, para a membrana PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} , o emprego do sistema tamponante Hepes-imidazol para aplicações na qual não são requeridas IgG de alta pureza, enquanto que para aplicações para as quais são requeridas IgG com alta pureza, o sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol.

Comparação entre os íons metálicos níquel e cobalto

A capacidade de adsorção de IgG, segundo Sulkowski (1989), depende do número de histidinas presentes na superfície da proteína, para o níquel são necessárias duas histidinas, enquanto que para o cobalto, é necessário a presença de dois resíduos de histidina espacialmente localizados em uma α -hélice e separadas por dois ou três

aminoácidos. A Figura 4.11 apresenta a capacidade de adsorção de IgG para os íons níquel e cobalto para os sistemas tamponantes MA-imidazol e fosfato de sódio-imidazol na ausência de sal.

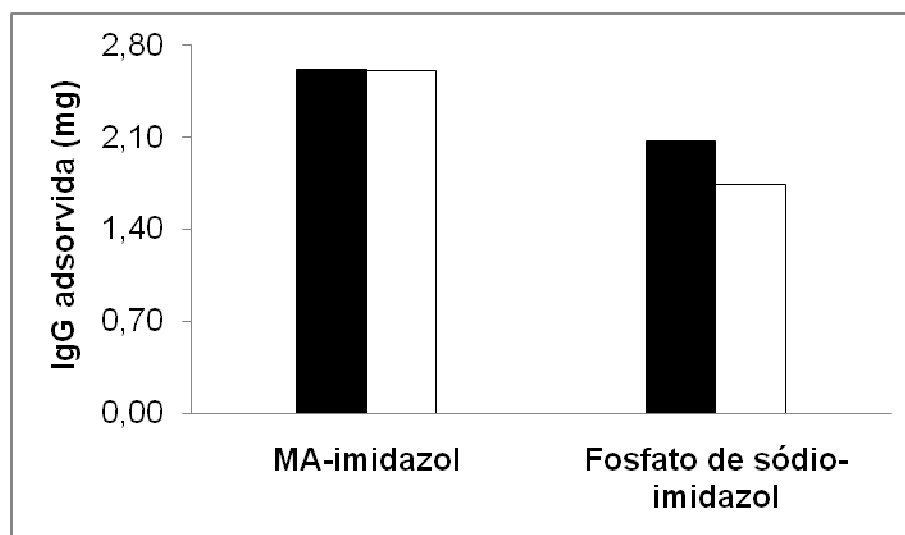


Figura 4.11. Comparação na adsorção de IgG para os íons níquel e cobalto para os sistemas tamponantes MA-imidazol e fosfato de sódio-imidazol (ausência de sal). (■) Níquel (□) Cobalto.

A capacidade de adsorção, para o sistema tamponante MA-imidazol foi 0,38% maior para níquel que para cobalto, enquanto que para o fosfato de sódio-imidazol essa diferença foi de 15,9% (Figura 4.11).

A recuperação de IgG com alto grau de pureza foi observado nas frações eluídas a 100 mmol L⁻¹ de imidazol, tanto para o MA-imidazol quanto para fosfato de sódio-imidazol, para ambos íons metálicos. A pureza e a massa de IgG recuperada nesta etapa de eluição encontra-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Massa de IgG medida por nefelometria e pureza dos “pool” das frações de proteínas mais concentradas da etapas de eluição com 100 mmol L⁻¹ de imidazol, para os sistemas tamponantes MA-imidazol e fosfato de sódio-imidazol, em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Metal	MA-imidazol		Fosfato de sódio-imidazol	
	IgG (mg)	Pureza ^a	IgG (mg)	Pureza ^a
Níquel	1,73	96,2	1,25	130,2
Cobalto	1,99	93,4	1,28	127,7

^a Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

Para o tampão MA-imidazol, do total de proteína adsorvida foram recuperadas nesta etapa cromatográfica 66,0% e 76,2% de IgG com pureza de 96,2% e 93,4% para níquel e cobalto, respectivamente (Tabela 4.6).

Observa-se para o níquel utilizando o sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol pureza de IgG similar ao obtido para o mesmo tampão para o íon cobalto imobilizado (Tabela 4.6). Obteve-se, nestas frações de eluição, a recuperação de 60,3% e 73,6% do total de IgG adsorvida, para níquel e cobalto respectivamente (Tabelas 4.3 e 4.4).

4.2. Isoterma de adsorção de IgG em PEVA-CM-Asp-Me²⁺

Determinada as melhores condições de purificação de IgG a partir do soro humano, para os íons metálicos níquel e cobalto, (fosfato de sódio-imidazol na ausência de sal), foram realizados experimentos em frascos agitados para determinação da isoterma de adsorção para IgG. Os experimentos foram conduzidos em batelada, a temperatura de 25°C, como descrito no item 3.2.7, para determinação da capacidade máxima de adsorção (Q_m) e da constante de dissociação (K_d) para os complexos CM-Asp-Ni²⁺-IgG e CM-Asp-Co²⁺-IgG. As Figuras 4.12 e 4.13 apresentam os resultados obtidos para os íons níquel e cobalto, respectivamente, com os quais ajustaram-se os parâmetros modelo de Langmuir (Equação 3.2, item 3.2.7) pelo método de regressão não linear. Os valores de Q_m e K_d para este modelo estão apresentados na Tabela 4.7.

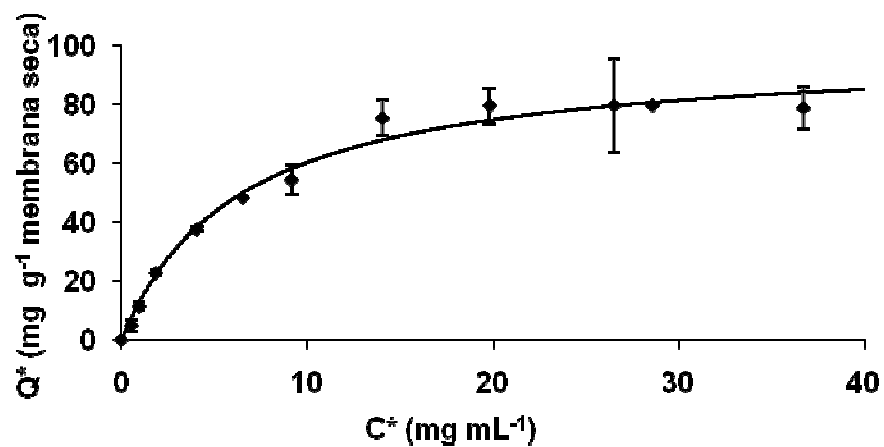


Figura 4.12. Isotherma de adsorção de IgG em membranas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. (◆) Dados experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo de Langmuir.

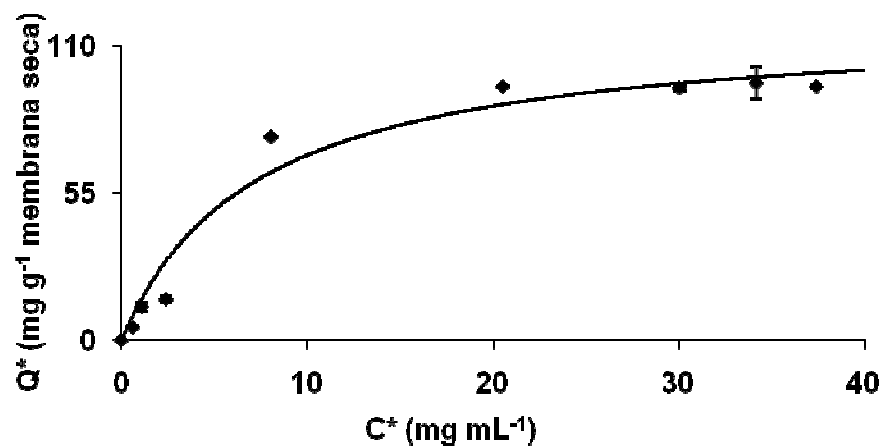


Figura 4.13. Isotherma de adsorção de IgG em membranas PEVA-CM-Asp-Co²⁺. (◆) Dados experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo de Langmuir.

Tabela 4.7. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de IgG em membranas de PEVA-CM-Asp-Me²⁺, para os íons níquel e cobalto.

Parâmetros	Ni ²⁺	Co ²⁺
Q _m (mg g ⁻¹ membrana seca)	98,48 ± 3,98	119,01 ± 10,10
K _d (mol L ⁻¹)	(1,00 ± 0,13) × 10 ⁻⁴	(1,10 ± 1,77) × 10 ⁻⁴
R ²	0,99	0,96
Chi ²	13,43	68,65

O modelo de Langmuir representou bem os dados experimentais ($R^2 = 0,99$) para o íon metálico níquel. Desta forma, pode-se dizer que o modelo descreve a adsorção da IgG neste adsorvente: adsorção é reversível e limitada a uma camada, a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos e as moléculas adsorvidas não interagem entre si e não há adsorção competitiva. O mesmo não foi observado para o íon metálico cobalto que apresentou um coeficiente de correlação de 0,96 (Tabela 4.7).

Quando o modelo de Langmuir não representa de forma satisfatória os dados experimentais, pode-se empregar outro modelo que leve em consideração a existência de heterogeneidade das interações entre a proteína e o adsorvente, tais como a cooperatividade, heterogeneidade da superfície e a formação de várias camadas. Neste trabalho, escolheu-se o modelo Langmuir-Freundlich para representação dos dados experimentais (Sharma e Agarwal, 2001).

A Figura 4.14 apresenta o ajuste da curva segundo o modelo de Langmuir-Freundlich (Equação 3.4, item 3.2.7) para os dados experimentais obtidos para PEVA-CM-Asp-Co²⁺ e os parâmetros do modelo estão apresentados na Tabela 4.8.

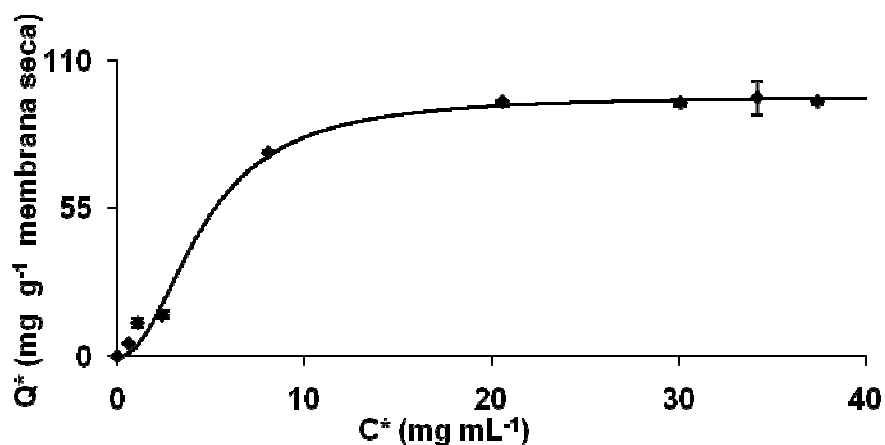


Figura 4.14. Isoterma de adsorção de IgG pré-purificada em membranas PEVA-CM-Asp-Co²⁺. (◆) Dados experimentais. (—) Curva ajustada segundo modelo Langmuir-Freundlich.

Tabela 4.8. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG em membranas de PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Parâmetros	Co ²⁺
Q_m (mg g ⁻¹ membrana seca)	$97,01 \pm 2,78$
$K_{d(LF)}$ (mol L ⁻¹)	$(3,85 \pm 1,77) \times 10^{-4}$
n	$2,12 \pm 0,31$
R^2	0,99
χ^2	18,27

O valor de n maior que 1 (Tabela 4.8), indica cooperatividade positiva, ou seja, a adsorção de uma molécula de IgG favorece a interação com outra molécula em solução. Várias são as interações que ocorrem durante a adsorção de IgG, que contribuem para o desvio do modelo de Langmuir, tais como interação proteína-proteína e as interações multipontos. Em IMAC são possíveis duas situações de adsorção de proteínas nos quelatos: a proteína pode ser adsorvida por um único íon metálico diminuindo a força de retenção, ou, uma única proteína é adsorvida por mais de um íon metálico, intensificando a força de retenção (Sharma e Agarwal, 2001).

Em termos de capacidade máxima de adsorção, obteve-se Q_m igual 98,48 mg IgG g⁻¹ de membrana seca e 97,1 mg IgG g⁻¹ de membrana seca, para PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺, respectivamente. Ribeiro (2006) obteve, para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, Q_m igual a 349,8 mg IgG humana g⁻¹ de membrana seca, no

entanto, utilizando o sistema tamponante Tris-HCl a pH 7,0. A diferença na capacidade máxima de adsorção pode ser explicada pela interação entre tampão-IgG, uma vez que em pH 7,0, as IgGs que apresentam ponto isoelétrico maior que 7,0 estão positivamente carregadas e os sistemas tamponantes fosfato de sódio-imidazol (este trabalho) e Tris-HCl (Ribeiro, 2006) estão carregados negativa e positivamente, respectivamente. Uma hipótese para explicar a baixa capacidade de adsorção de IgG em presença de tampão fosfato é que na ausência de sal, a IgG interage com as cargas negativas deste tampão, mascarando o sítio de adsorção de IgG. Como o tampão Tris-HCl apresenta carga positiva em pH 7,0, há repulsão das moléculas de IgG, podendo estas serem adsorvidas no quelato metálico.

Bresolin e colaboradores (2010) obtiveram valor de Q_m igual a $77,7 \text{ mg g}^{-1}$ membrana seca para adsorção de IgG_1 de camundongo em PEVA-CM-Asp- Zn^{2+} em tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} a pH 7,0, valor menor que o observado neste trabalho para ambos íons metálicos (lembrando que a IgG utilizada por Bresolin et al. (2009b) é IgG_1 de camundongo). Como discutido anteriormente, a carga positiva na estrutura do tampão Tris-HCl favorece a adsorção de IgG, principalmente, pelas interações eletrostáticas. No entanto observa-se, neste caso, que a menor capacidade de adsorção se deve ao íon metálico zinco, que segundo Sulkowski (1989), a capacidade de adsorção de proteínas nos íons metálicos de transição segue a seguinte ordem $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} \cong \text{Zn}^{2+}$. No entanto, observa-se que a capacidade máxima de adsorção foi similar para o níquel e cobalto, não estando em concordância com a ordem estabelecida por esse autor. Este mesmo resultado foi observado nos dados de nefelometria, onde a capacidade de adsorção de IgG foi semelhante (item 4.1). Deve-se levar em consideração que Sulkowski (1989) utilizou o agente quelante IDA e o sistema tamponante fosfato de sódio com $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl para determinação da retenção de proteínas em IMAC, enquanto que neste trabalho foi utilizado o agente quelante CM-Asp para o sistema tamponantes fosfato de sódio-imidazol na ausência de sal.

Os valores de K_d obtidos pelo modelo de Langmuir para ambos íons metálicos são valores típicos de constantes de dissociação de sistemas de pseudobioafinidade,

ou seja, na faixa de 10^{-3} a 10^{-6} mol L⁻¹ (Vijayalakshmi, 1989). Bresolin et al. (2010) obteve K_d de $2,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Zn²⁺, enquanto que o obtido por Ribeiro (2006) foi de $1,01 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Neste trabalho obteve-se $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $3,85 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, para níquel e cobalto, respectivamente. Observa-se que a constante de dissociação obtida neste trabalho para o CM-Asp-Ni²⁺ foi menor que a observada no trabalho de Ribeiro (2006), o que demonstra menor afinidade do sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol quando comparado ao Tris-HCl.

4.3. Determinação das curvas de ruptura

Os experimentos de filtração para determinação da curva de ruptura foram realizados para o adsorvente PEVA-CM-Asp, para os íons metálicos Ni²⁺ e Co²⁺, utilizando como solução de alimentação soro humano diluído 2,5 e 5,0 vezes em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ contendo 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0 (melhor condição para ambos íons metálicos, ver item 4.1). As duplicatas estão apresentadas no Anexo C.

Os valores de condutividade e pH para o soro humano “in natura” são de 10,88 mS/cm e 7,30. A diluição do soro humano acarretou na mudança da condutividade e do pH do meio, sendo obtido, para as diluições de 2,5 e 5,0, valores de condutividade igual a 5,34 mS/cm e 2,97 mS/cm, respectivamente, e valores de pH igual a 6,95, para ambas diluições.

As curvas de rupturas realizadas com soro humano nas diluições de 2,5 e 5,0 vezes, para os íons metálicos níquel e cobalto, são apresentadas nas Figuras 4.15 e 4.16, os resultados do balanço de massa na Tabela 4.9. Os perfis de eluição estão apresentados nas Figuras 4.17 e 4.18, para todos os experimentos foi utilizado vazão de alimentação (Q_A) de 1,0 ml min⁻¹ e vazão de filtrado (Q_F) de 0,5 mL min⁻¹, com tempo de residência de 29,8 s (tempo de residência é a razão entre o volume das membranas e a razão de filtrado (Q_F)), que corresponde à vazão de aproximadamente 120 mL min⁻¹ para módulos comerciais de 25 cm de altura com 2 m² de área de membrana.

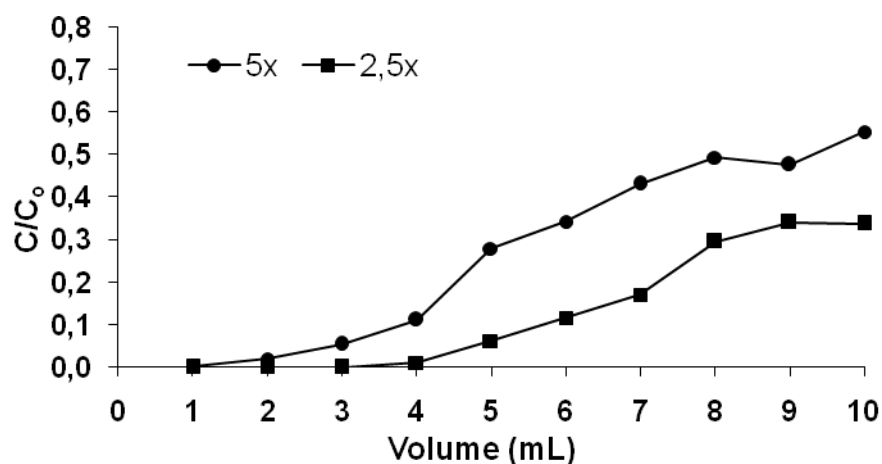


Figura 4.15. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Vazão de filtrado: $Q_F = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão de adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Injeção: 4,0 mL de soro diluído 2,5 e 5,0 vezes (160 a 190 mg proteínas totais).

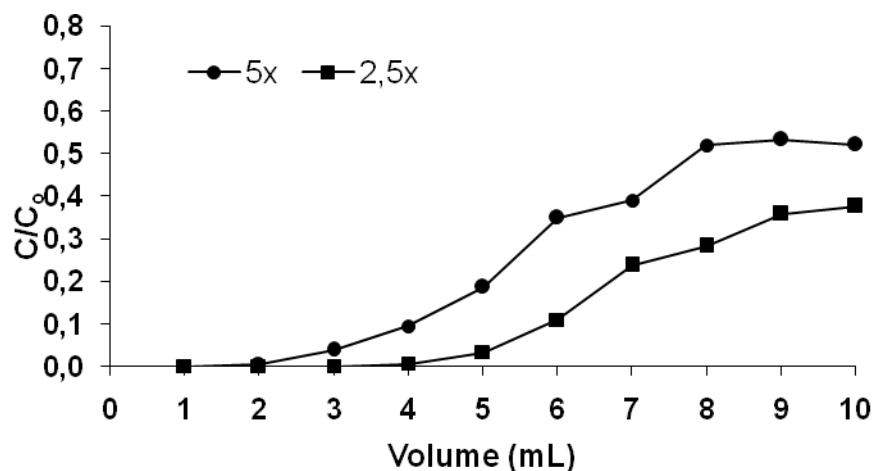


Figura 4.16. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Co²⁺. Vazão de filtrado: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão de adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Injeção: 4,0 mL de soro diluído 2,5 e 5,0 vezes (160 a 190 mg proteínas totais).

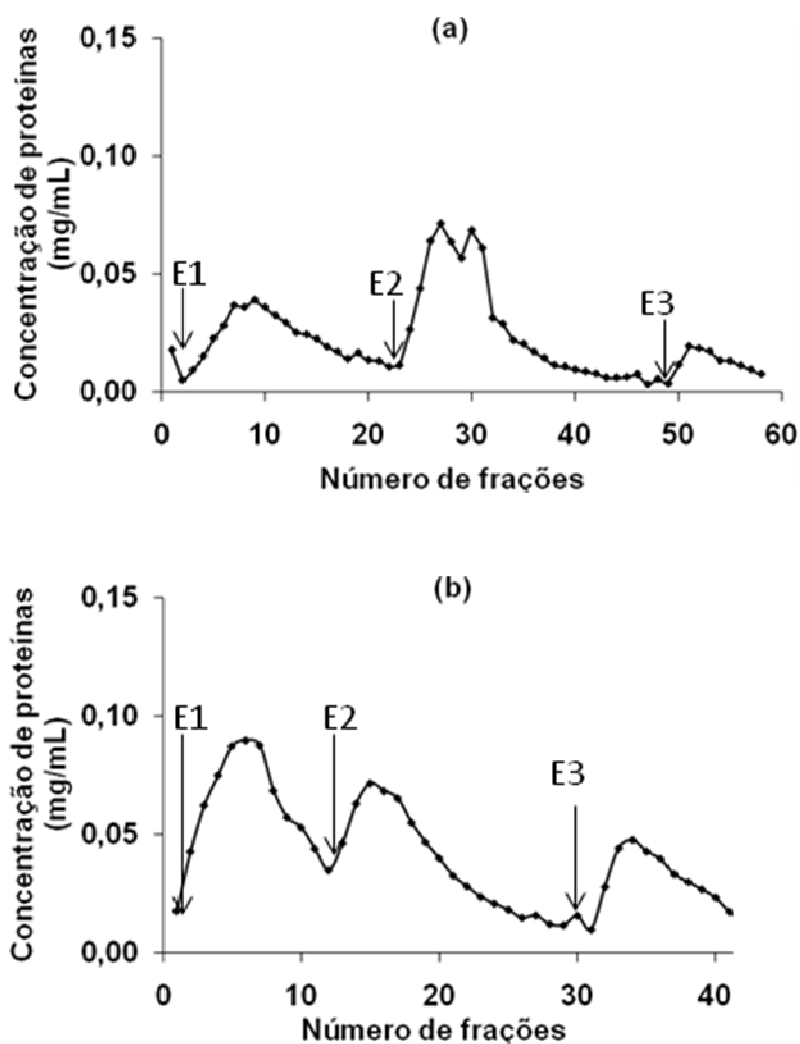


Figura 4.17. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0. a) 2,5 vezes; b) 5,0 vezes. Eluição: aumento concentração de imidazol. E1, 20 mmol L^{-1} ; E2, 100 mmol L^{-1} ; E3, 500 mmol L^{-1} .

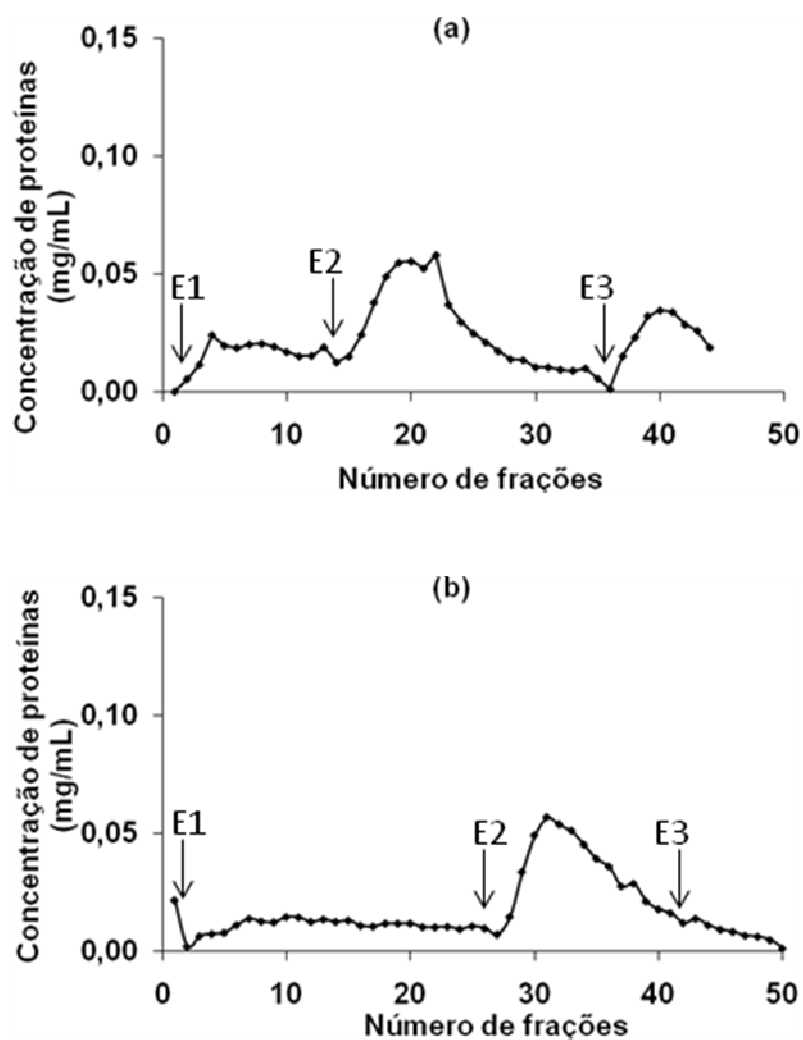


Figura 4.18. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0. a) 2,5 vezes; b) 5,0 vezes. Eluição: aumento concentração de imidazol. E1, 20 mmol L⁻¹; E2, 100 mmol L⁻¹; E3, 500 mmol L⁻¹.

Tabela 4.9. Balanço de massa das curvas de ruptura de soro humano diluído 2,5 e 5,0 vezes em tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, utilizando as membranas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Etapas	Ni ²⁺				Co ²⁺			
	2,5		5,0		2,5		5,0	
	PT ^a (mg)	(%) ^b	PT ^a (mg)	(%) ^b	PT ^a (mg)	(%) ^b	PT ^a (mg)	(%) ^b
Injeção	185,31	100,0	190,46	100,0	191,02	100,0	180,55	100,0
Filtrado	20,1	11,1	26,30	13,8	22,37	11,7	23,81	13,2
Retido	71,14	38,4	85,36	44,8	78,17	40,9	80,71	44,7
Lavagem	89,19	48,1	109,57	57,5	84,94	44,5	80,85	44,9
E1	0,98	0,5	1,33	0,7	0,41	0,2	0,34	0,2
E2	1,33	0,7	1,27	0,6	1,14	0,6	1,49	0,8
E3	0,24	0,1	0,74	0,3	0,43	0,2	0,56	0,3
Reg.	0,01	0,0	0,02	0,0	0,21	0,1	0,04	0,0
Recuperação	183,51	99,0	224,60	117,9	187,25	98,0	187,25	103,7
PT ^a adsorvidas	2,57	1,4	3,36	1,8	2,19	1,1	2,43	1,3

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

Massa de membrana no mini-módulo: 0,13 g seca.

Analisando as Figuras 4.15 e 4.16 verifica-se que a razão C/C₀ foi superior a 0,1 depois da passagem de 4,0 mL, para diluição de 5,0 vezes e 6,0 mL, para diluição de 2,5 vezes, para ambos íons metálicos, o que segundo Charcosset e colaboradores (1995) caracteriza o ponto de ruptura. Depois da passagem de 8,0 mL para ambas diluições e íons metálicos, o sistema atinge o estado estacionário.

Nota-se pela Tabela 4.9 que a capacidade de adsorção de proteínas totais foi maior na diluição de 5,0 que a observada para a diluição de 2,5. Como já citado, a condutividade diminui com o aumento da diluição e, dessa forma, maior capacidade de adsorção é observada para o soro 5,0 vezes diluído. Provavelmente, a maior capacidade de adsorção esteja relacionada com a diminuição da condutividade, uma vez que o pH foi idêntico para as ambas diluições. Comparando a capacidade de adsorção das membranas do mini-módulo com as membranas finamente cortadas para a diluição de 5,0 vezes, temos que para o níquel foi de 25,88 e 2,45 mg g⁻¹ membrana seca e para o cobalto foi de 18,71 e 2,17 mg g⁻¹ membrana seca, para membranas do módulo e cortadas, respectivamente (a capacidade de adsorção foi calculada pela razão da massa total adsorvida pela massa de membrana seca na coluna, no caso do

mini-módulo essa massa é de 0,13 g de membrana seca e para membranas cortadas 1,25 g de membrana seca).

No que diz respeito à seletividade na adsorção de IgG, nos perfis eletroforéticos apresentados nas Figuras 4.19 e 4.209, tanto para o soro diluído 2,5 quanto 5,0 vezes para os íons metálicos testados, nota-se a presença de albumina e transferrina nas frações de eluição. A Tabela 4.10 e 4.11 apresenta os resultados de nefelometria para o soro humano diluído 5,0 vezes, para o níquel e cobalto, respectivamente.

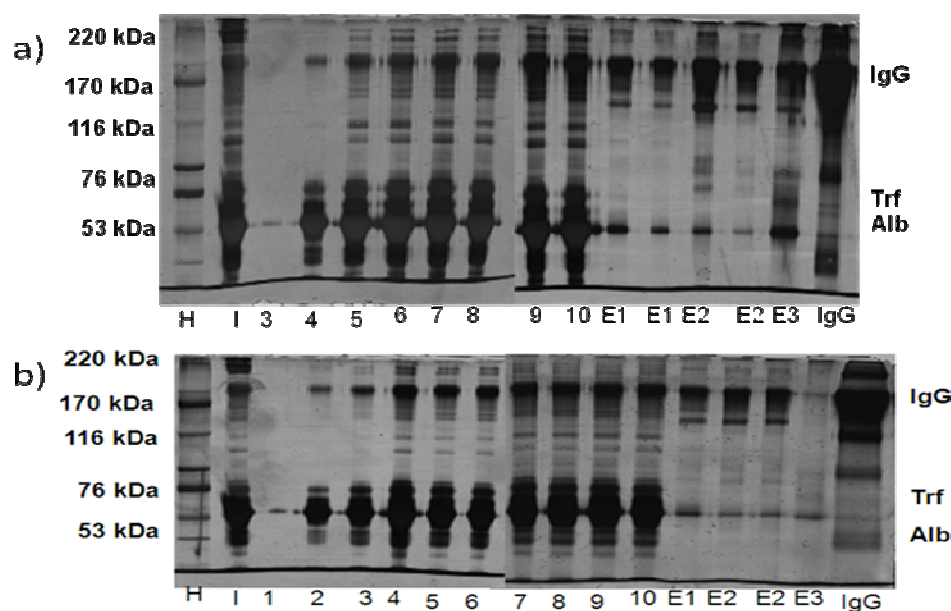


Figura 4.19. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ injetando 4,0 mL de soro humano nas diluições: a) 2,5 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 3-10. Amostras de filtrado, E1. Amostras da E1, E2. Amostras da E2, E3. Amostras E3, IgG: Marcador de IgG. b) 5,0 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 1-10. Amostras de filtrado, E2. Amostras da E2, IgG. Marcador de IgG.

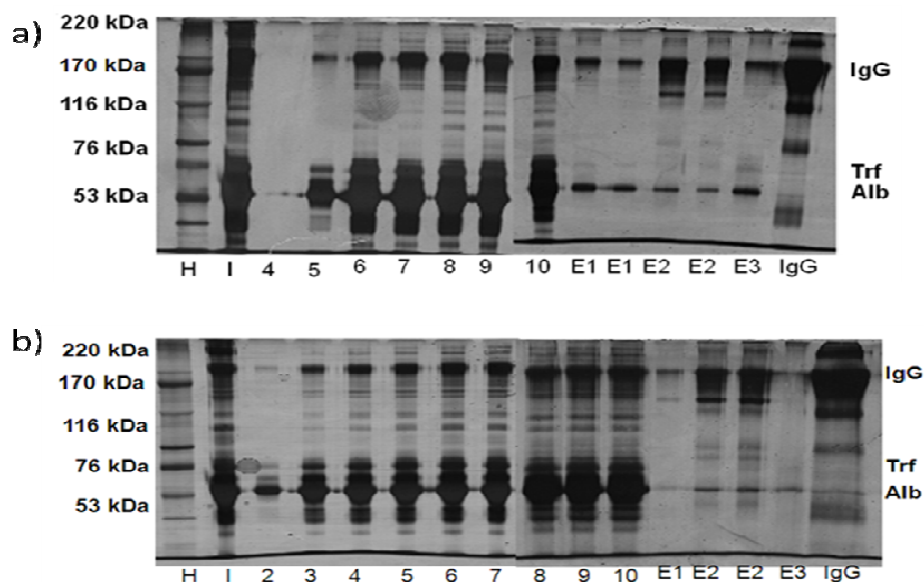


Figura 4.20. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Co²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ injetando 4,0 mL de soro humano nas diluições: a) 2,5 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 4-10. Amostras de filtrado. E1: Amostras da E1; E2: Amostras da E2; E3: Amostras E3; IgG. Marcador de IgG. b) 5,0 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 4-10. Amostras de filtrado. E1: Amostras da E1; E2: Amostras da E2; E3: Amostras E3. IgG: Marcador de IgG.

Tabela 4.10. Massa obtida por nefelometria para os “pools” das frações de eluição para purificação de IgG a partir de soro humano em mini-módulo de filtração PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, para o soro diluído 5,0 vezes em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0.

		Proteínas (mg)					Purificação de IgG
		IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)
Eluição	Injeção	26,2	2,34	107,04	8,57	190,46	14,1
	20 mmol L ⁻¹	1,26	n.d.	0,15	n.d.	1,33	94,7
	100 mmol L ⁻¹	0,98	n.d.	n.d.	n.d.	1,27	77,2
	500 mmol L ⁻¹	0,46	n.d.	n.d.	n.d.	0,67	68,6
Regeneração		n.d.	n.d.	n.d.	0,12	0,02	-
Total adsorvido		2,70	-	0,15	0,12	-	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

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

Tabela 4.11. Massa obtida por nefelometria para os “pools” das frações de eluição para purificação de IgG a partir de soro humano em mini-módulo de filtração PEVA-CM-Asp-Co²⁺, para o soro diluído 5,0 vezes em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0.

		Proteínas (mg)					Purificação de IgG
		IgG	IgM	Alb	Trf	PT ^a	Pureza ^b (%)
Eluição	Injeção	26,8	2,18	108,04	8,12	180,55	14,84
	20 mmol L ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,26	-
	100 mmol L ⁻¹	0,64	n.d.	n.d.	n.d.	1,08	59,03
	500 mmol L ⁻¹	n.d.	n.d.	n.d.	0,09	0,39	-
Regeneração		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04	-
Total adsorvido		0,64	-	-	0,09	1,73	-

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976).

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a de cada etapa multiplicada por 100.

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

Embora seja possível notar a presença de IgG e proteínas contaminantes albumina e transferrina nas frações de eluição nos perfis eletroforéticos (Figuras 4.19 e 4.20), tanto para o níquel quanto para o cobalto, não foi possível, em alguns casos, a detecção destas massas por nefelometria. Isto ocorre devido às baixas concentrações destas proteínas das frações de eluição, estando abaixo do limite de detecção do aparelho. Nas eletroforeses, as bandas correspondentes a essas proteínas são visíveis devido à coloração do gel ter sido realizada com nitrato de prata, que é sensível a concentrações da ordem de nanogramas. Em termos de seletividade na adsorção de IgG, nota-se que para o níquel o perfil eletroforético obtido para o mini-módulo de filtração e para as membranas finamente cortadas foram similares, no entanto para o cobalto nota-se que a adsorção de IgG foi eletroforeticamente mais homogênea para as membranas finamente cortadas. Uma hipótese para explicar a menor seletividade no mini-módulo seria que as etapas de lavagem não sejam suficientes para eliminar as proteínas fracamente adsorvidas, tais como albumina e transferrina. No entanto, seria necessário a realização de diferentes modos de lavagem para que esta hipótese seja confirmada.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

A fim de estudar o efeito do sal na purificação de IgG humana por cromatografia em membranas de afinidade por íons metálicos imobilizados, foram realizados experimentos de adsorção de proteínas do soro na presença e ausência de sal para quatro sistemas tamponantes, sendo a eluição realizada por abaixamento de pH e aumento da concentração de imidazol, para os íons cobalto e níquel.

Quanto à estratégia de eluição por abaixamento de pH, esta foi eficiente na presença de sal, porém não apresentou seletividade para IgG. Na ausência de sal esta condição não favoreceu a dessorção das proteínas retidas na coluna, sendo a maior parte das proteínas adsorvidas eluídas durante a regeneração da coluna com EDTA.

A estratégia de eluição por aumento da concentração de imidazol foi eficaz na dessorção das proteínas adsorvidas na coluna, tanto na presença quanto ausência de sal, sendo que na presença de sal, a maior parte das proteínas adsorvidas foram eluídas com baixa concentração de imidazol (20mmol L^{-1}), enquanto que na ausência de sal, a maior parte foi eluída na concentração de 100 mmol L^{-1} , para ambos íons metálicos.

A remoção do sal promoveu o aumento da capacidade de adsorção para todos os sistemas tamponantes, tanto para o níquel quanto para o cobalto. No que concerne a seletividade, para o níquel foi observada melhor pureza de IgG com o emprego dos sistemas tamponantes MA, fosfato de sódio e Hepes, enquanto que para o cobalto, com o emprego do MA e fosfato de sódio, todos na presença de imidazol.

Os sistemas tamponantes, sem adição de sal, apresentaram boa capacidade de adsorção aliado a boa seletividade para a adsorção de IgG. A melhor condição tanto para o níquel quanto para o cobalto, foi obtida para o sistema tamponante fosfato de sódio-imidazol, apresentando fator de purificação de 9,45 e 6,73 e pureza para IgG de 130% e 127%, respectivamente (baseados em medidas de IgG, IgM, Alb e Trf).

Para todos os tampões empregados, com exceção do MA-imidazol, a capacidade de adsorção para o níquel foi maior que para o cobalto. Para o sistema tamponante MA-imidazol, os valores obtidos foram similares.

Os dados experimentais das isotermas de adsorção de IgG em membranas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺ foram utilizados para ajustar os parâmetros do modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich. Os valores das constantes de dissociação foram de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,85 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para níquel e cobalto, respectivamente. Os valores de K_d e $K_{d(LF)}$ obtidos estão na ordem de grandeza que caracteriza os sistemas de pseudobioafinidade, demonstrando baixa afinidade do quelato pela IgG. Quanto a capacidade de adsorção, obteve-se Q_m igual a 98,48 mg IgG g⁻¹ de membrana seca e 97,1 mg IgG g⁻¹ de membrana seca, para os níquel e cobalto, respectivamente.

Para a filtração em mini-módulos, obteve-se maior capacidade de adsorção da membrana para soro humano diluído 5,0 vezes, no entanto, apresentando baixa seletividade na adsorção de IgG. Uma hipótese para explicar a menor seletividade no mini-módulo seria que as etapas de lavagem não foram suficientes para eliminar as proteínas fracamente adsorvidas, tais como albumina e transferrina. No entanto, seria necessário a realização de diferentes modos de lavagem para que esta hipótese seja confirmada.

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Tendo sido obtido resultados promissores na purificação de IgG a partir de plasma humano por meio de cromatografia de íons metálicos imobilizados utilizando membranas como matriz cromatográfica, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Desta forma, sugere-se:

- a - Estudar a eficiência da purificação IgG provenientes de diferentes fontes.
- b - Realização de estudos termodinâmicos para os adsorventes PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺ para análise da natureza de adsorção.
- c - Testar outros tipos de membranas como matrizes cromatográficas, tais como celulose e fibras de vidro.
- d - Realização de testes de aumento de escala utilizando módulos comerciais.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. e WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*, 3ª edição, p. 1196-1251, 1997.

ANDRADE, D. e HLADY, V. Plasma protein adsorption: the big twelve, v. 516, p. 158-172, 1987.

ANSPACH, F. B., PETSCH, D. e DECKWER, W. D. Purification of murine IgG1 on group specific affinity sorbents. *Bioseparation*, v. 6, p. 165-184, 1996.

ARAGÓN, M.M., Extraction of Immunoglobulin G. Study of Host-Guest mechanisms, Tese P.H.D., 2008.

ARNOLD, F. H, Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology*, v. 9, p. 151-156, 1991.

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

AQUINO, L.C.I., SOUSA, H.R.T., MIRANDA, E.A., VILELA, L. e BUENO, S.M.A. Evaluation of IDA-PEVA fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin. *Journal of Chromatography B*, v.834, p. 68-76, 2006.

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

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

BARROSO, T., TEMTEM, M., HUSSAIN, A., AGUIAR-RICARDO, A. e ROQUE, A.C.A. Preparation and characterization of a cellulose affinity membrane for human immunoglobulin G (IgG purification, v.348, p. 224-230, 2010.

BEITLE, R. R. e ATAAL, M. M. Immobilized metal affinity chromatography and related techniques, AIChE Symposium Series, v. 88, n. 290, p. 34-43, 1992.

BELEW, M.; PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography – effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. Journal of Chromatography, v. 516, n. 2, p. 333-354, 1990.

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

BOI, C. Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification, Journal of Chromatography B, v. 848, p. 19-27, 2007.

BOI C., BUSINI V., SALVALAGLIO M., CAVALLOTTI C. e SARTI G.C. Understanding ligand-protein interactions in affinity membrane chromatography for antibody purification. Journal of Chromatography A, v. 1216, p. 8687-8696, 2009.

BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review. Biochemical and Biophysical methods, V. 49, p. 361-389, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1946.

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

BRESOLIN, I.T.L., BORSOI-RIBEIRO, M., TAMASHIRO, W.M.S.C., AUGUSTO, E.F.P., VIJAYALAKSMI, A. E BUENO, S.M.A. Evaluation of Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC) as a Technique for IgG₁ Monoclonal Antibodies Purification:

The Effect os Chelanting Ligand and Suport. Appl Biochem Biotechnol, v. 160, p. 2148-2165, 2010.

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

BUENO, S.M.A., HAUPT, K. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes. Journal of Chromatography B. v. 667, p. 57-67, 1995a.

BUENO, S.M.A.: HAUPT, K. e VIJAYALAKSHMI. M.A. In vitro removal of human IgG by pseudobioespecific affinity membrane filtratrion on a large scale. A preliminarly report. The International Journal of Artificial Organs, v. 18, p.392-398, 1995b.

BUENO, S.M.S., LEGALLAIS, C., HAUPT, K E VIJAYALAKSHMI, M. Experimental knetic aspect os hollow fiber membrane-based pseudobioaffinity filtration: process for IgG separation from human plasma. Journal os Membrane Science, v. 117, p. 45-56, 1996.

BUENO, S.M.A. e MIRANDA, E.A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G(1) monoclonal antibody. J. Chromatogr., v. 816, p. 259-268, 2005.

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

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

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

CASTILHO, L.R., DECKWER, W. e ANSPACH, F.B. Influence of matrix activations and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 172, p. 269-277, 2000.

CASTILHO L.C., ANSPACH F.B. e DECKWER W. Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. *Journal of Membrane Science*, v. 207, p. 253-264, 2002.

CHAGA, G. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 49, p.313-334, 2001. *Chromatographia*, v.65, p. 639-648, 2001.

CHAMPAGNE, J., DELATTRE, C., SHANTHI, C., SATHEESH, B., DUVERNEUIL, I. e VIJAYALAKSMI, M.A. Pseudoafinity Chromatography Using a Conventive Onteration Media®-Disk Monolithic Column. *Chromatographia*. v. 65. p. 639-648, 2007.

CHARCOSSET, C., Su, Z., KAROOR, S., DAUN, G. E COLTON, C.K. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: Experimental characterization. *Biotechnology e Bioengineering*, v. 48, p. 415-427, 1995.

CHARCOSSET, C. Purification of proteins by membrane chromatography. *Journal of Chemical and Technology Biotechnology*, v.71, p. 95-110, 1998.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: An overview. *Biotechnology Advances*, v.24, p.482–492, 2006.

CHOTTARD, J. C., DEPEZAY, J. C. e LEROUX, J. P. *Chimie fondamentale –Études biologiques et médicales, II. Structure moléculaire*, Hermann Éditeurs dessciences et des arts, p. 224-234, Paris, 1992.

COFFNIER Y., LEGALLAIS C. e VIJAAYALAKSHMI M.A. Separation of IgG from human plasma using thiophilic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 208, p. 13-32, 2002.

COHN, E.J., STRONG, L.E., HUGHESJR.,W.L., MULFORD, D.J. e ASHWOETH, J.N.: MELIN, M. TAYLOR, H.L. Preparation and properties af serum and plama protein. IV. A

system for the separation into protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *Journal of American Chemical Society*, vol.8, p. 459-475, 1946.

COSTA, D., BROODMAN, I., VANDUIJN, M.M., STINGL, C., DEKKER, L.J.M., BURGERS, P.C., HOOGSTEDEN, H.C., SILLEVIS, E.J.K. e LUIDER, T.M. Sequencing and Quantifying IgG Fragments and Antigen-Binding Regions by Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*. Vol.9, p. 2937-2945, 2009.

D'AGOSTINO, B., BELLOFIORE, P., MARTINO, T., PUNZO, V.R e VERDOLIVA, A. Affinity purification of IgG monoclonal antibodies using the D-PAM synthetic ligand: chromatographic comparison with protein A and thermodynamic investigation of the D-PAM/IgG interaction. *Journal of Immunological Methods*, v. 333, p. 126-138, 2008.

DANCETTE, O.P., TABOUREAU, J.L., TOURNIER, E., CHARCOSSET, C. e BLOND, P. Purification of immunoglobulin G by protein A/G affinity membrane chromatography. *Journal of Chromatography B*, vol. 723 p. 61-68, 1999.

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

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

FINGER, U. B., BRÜMMER, W., KNIÉPS, E., THÖMMES, J. e KULA, M. R. Investigations on the specificity of thiophilic interaction for monoclonal antibodies of different subclasses. *Journal of Chromatography B*, v. 675, p. 197-204, 1996.

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

GULICH, S., UHLÉN, M. e HOBER, S. Protein engineering of an IgG-binding domains allows milder elution conditions during affinity chromatography. *Journal of Biotechnology*, v. 76, p. 233-244, 2000.

GUTIÉRREZ, R., VALLE, E.M., MARTÍN DEL VALE, E.M. e GALÁN, M.A. Source: *Separation and Purification Reviews*, v. 36, p. 71-111, 2007.

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

HAMMOND, B.W. e KRUGER N.J., The Bradford method for protein quantitation. *Meth. Mol. Biol.*, Vol. 3, 1988.

HAUPT, K., BUENO, S. M. A. e VIJAYALAKSHMI, M. A. Interaction of human immunoglobulin G with L-histidine immobilized onto poly(ethylene-vinyl alcohol) hollow-fiber membranes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 674 n. 1, p. 13-21, 1995.

HAUPT, K. e BUENO S. M. A. Affinity membranes – In *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press., London, p. 229-235, 2000.

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

HOCHULI. E., BANNWARTH. W., BOBELI. H., GENTZ. R. e STUBER. D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology*, vol. 1321-1325, 1988.

HOLT, L.J., HERRING, C., JESPER, L.S., WOOLVEN, B.P. e TOMLINSON, I.A. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol*, v. 21, p. 484, 2003.

<http://www.vanderbilt.edu/AnS/Chemistry/Rizzo/stuff/Buffers/buffers.html> acessado em junho de 2011.

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

JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A., BROOKS, G. F. e BUREL, J. S. *Imunologia – In Microbiologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 89- 108, 1998.

JIA, L., YANG, L., ZOU, H., ZHANG, J., FAN., C. E SHA, L. Protein A tangencial flow affinity membrane cartridge for extracorporeal immunoadsorption therapy. *Biomedical Chromatography*, v. 23, p. 473-477, 1999.

KARMALI A. Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes. *Separação e Purificação de Proteínas*. Boletim de Biotecnologia, 2001.

KRACALIKOVA, K., TISHCHENKO, G. E BLEHA, M. Effect of the matrix structure and concentration of polymer-immobilized Ni^{2+} -iminodiacetic acid complexes on retention of IgG₁. *Biochemical and biophysical methods*, v. 67, p. 7-25, 2006.

KLEIN, E. Affinity membranes – Their chemistry and performance in adsorptive separation process. New York: John Wiley & Sons Inc., p. 15-25, 1991.

KLEIN, E., EICHHOLZ, E., THEIMER, F. e YEAGER, D. Chitosan modified sulfonated poly(ethersulfone) as a support for affinity separations. *Journal of Membrane Science*, v. 95, p. 6199-204, 1994.

LAU, H., PACE, D., YAN, B., MACGRATH, T., SMALLWOOD, S., PATEL, K., PARK, J., PARK, S.S. e LATYPOV.R.F. Investigation of degradation process in IgG1 monoclonal antibodies by limited proteolysis coupled with weak cation-exchange HPLC. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 868-876, 2010.

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

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

LIU, X., POP, L.M. e VITETTA, E.S. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. Immunological Reviews. Vol.222. p. 9-27, 2008.

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

LOW, D., O'LEARY, R. e PUJAR, N.S. Future of antibody purification. Journal of Chromatography B, v. 848, p. 48-63, 2007.

MAJORS, R.E., LEES, A. e BURKHARDT, M. Improving Protein Separation with Mixed-Mode Chromatography. Chromatographyonline.com, 2009, acessado em 15/06/2011 às 11:44 hs.

MANTOVAARA, T., PERTOFT, H. e PORATH, J. Carboxymethylated aspartic acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. Biotechnol.Appl Biochem, v. 13, p. 315-322, 1991.

MARTIN, T.D., IGIV: Contents, properties, and methods of industrial production—evolving closer to a more physiologic product. International Immunopharmacology, v. 6, p. 517-522, 2006.

MILSTEIN, C. Monoclonal Antibodies. Scientific American, v. 243, n. 4, p. 66-74,1980.

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

NAIK, A.D., MENEGATTI, S., GURGEL, P.V. e CARBONELL, R.G. Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media. Journal of Chromatography A, v. 1218, p. 1691-1700, 2011.

NEWCOMBE, C. e NEWCOMBE, A.R. Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. Journal of Chromatography B, v. 848, p. 2-7, 2007.

NOVA C.J.M., PAOLUCCI-JEANJEAN D., BELLEVILLE M, BARBOIU M., RIVALLIN M. e RIOS G. Elaboration, characterization and study of a new hybrid chitosan/ceramic

membrane for affinity membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, v.321, p. 81-89, 2008.

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

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 fiber membranes. *Journal of Chromatography B*, v.707, p.121-130, 1998.

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

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

PORATH, J., MAISANO, F. e BELEW, M. Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation. *FEBS* 2631, v. 185, nº2.

PORATH, J. IMAC—immobilized metal ion affinity based chromatography. *Trends Analytical Chemical*, v. 7, p. 254–259, 1988.

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

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

PUTNAM, F. W. The plasma proteins: structure, function, and genetic control. Academic Press. p. 1-55, New York, 1987.

QIAN, H., CHEN, M.Q. E LIN, Z.Y. The effective and specific isolation of antibodies from human serum by using thiophilic paramagnetic polymer beads, *Colloids and Surfaces*, v. 67, p. 224-229, 2008.

RIBEIRO, M.B. Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp / Mariana Borsoi Ribeiro.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

RIBEIRO M.B., VIJAYALAKSHMI M., TEDOROVA-BALVAY D. e BUENO S.M.A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffers systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes. *Journal of Chromatography*, v. 861, p. 64-73, 2008.

REN, D., PIPES, G., XIAO, G., KLEEMANN, G.R., BONDARENKO, P.V., TREUHEIT, M.J. e GADGIL, H.S. Reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of site-specific chemical modifications in intact immunoglobulin molecules and their fragments. *Journal of Chromatography A*, vol.1179, p. 198-204, 2008.

ROITT, I, BROSTOFF, J. E MALE, D. *Imunologia*. São Paulo, Manole Ltda, 1999.

ROPER. D.K. e LIGHTFOOT. E.N. Separation of biomolecules using adsorptive membrane. *Journal of Chromatography A*, vol. 702, p. 3-26, 1995.

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

ROWLANDS, R.E.G., RISTORI, C.A., FERREIRA, T., YTO, A.Y., FRANCO, D.L., SCOLA, M.C.G., JAKABI, M., GELLI, D.S., TAMPLIN, M., CHNHA, T.N. e GASPARI, E.N. Produção e Aplicação de Novos Anticorpos Monoclonais na Padronização de Técnicas Imunológicas para a Detecção das Bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1 e Toxinas Stx1, Stx2 em Alimentos. *BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista*, V.4, número 37, 2007.

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

SERRES, A., MUELLER, D. e JOZEFONVICZ, J. Purification of monoclonal antibodies on dextran-coated silica support grafted by thiophilic ligand. *Journal of Chromatography A*, v. 711, p. 151-157, 1995.

SERPA, GISELE. Purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG1 utilizando cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 105p. Dissertação (Mestrado).

SERPA G., AUGUSTO E.F.P., TAMASHIRO W.M.S.C., RIBEIRO M.B., MIRANDA E.A. e BUENO S.M.A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of a immunoglobulin G1 monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, v. 816, p. 259-268, 2005.

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

SHARMA, S. e AGARWAL, G. P. Adsorption equilibrium and kinetics of white protein metal ion affinity gels for designing fraction. *Adsorption*. v. 8, p. 203-213, 2002.

SHARMA, S. e AGARWAL, G. P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. *Separation Science and Technology*, v. 37, p. 3491-3511, 2002.

STITES, D.P., TERRA, A.L. e PARSLow, T.G. Basic e Clinical Immunology, 8ª edição. Norwalk: Ed. Appleton & Lange, pg. 870, 1994.

STRYER, L., Bioquímica, 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, pg 1000, 1996.

SUCK, K., WALTER, J., MENZEL, F., RAPPE, A., KASPER, C., NAUMANN, C., ZEIDLER, R. e SCHEPER, T. Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems. v.121, p. 361-367, 2005.

SUEN, S.Y., LIU, Y.-C. e CHANG, C.-S. Exploiting immobilized metal affinity membranes for the isolation or purification of therapeutically relevant species. Journal of Chromatography B, v.797, p.305-319, 2003.

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

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography of proteins on IDAFe³⁺. Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia, v.17, p.334-335, 1988.

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

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography: Imidazole proton pump and chromatographic sequale. 1. Proton pump. J. Mol. Recog., v. 9, p. 389-393, 1996.

SUN Y, SHI Q-H., TIAN Y e DONG X-Y. Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption. Biochemical Engineering Journal, v. 16, p.317-322, 2003.

SUN, H., ZHANG, L., CHAI, .C., QIAN, H E CHEN, H. A study of human Y-globulin adsorption capacity of PDVF hollow fiber affinity membranes containing different amino acido ligands, v. 48, p. 215-222, 2006.

THÖMMES, J. e KULA, M. R. Membrane chromatography – an integrative concept in the downstream processing of proteins. Biotechnology Progress, v. 11, p. 357- 36, 1995.

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

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

VERDOLIVA A., PANNONE F., ROSSI M., CATELLO S. e ANFREDI V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *Journal of Immunological Methods*, v. 271, p.77-88, 2002.

VICENTE T, SOUSA M.F.Q., PEIXOTO C, MOTAB J.P.B., ALVES P.M. e CARRONDO M.J.T. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. *Journal Membrane Science*, v.311, p. 270-283, 2008.

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

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

WINZERLING.J.J., BERNA.P. e WANG. N. H. W. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, vol. 4, p. 4-13, 1992.

WONG, J., ALBRIGTH, R.L. e WANGN N.H.W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) – chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*, v. 20 n. 1, p. 49-106, 1991.

YANG, L. e CHEN, P. Chitosan coarse filter paper composite membrane for fast purification of IgG from human serum. *Journal of Membrane Science*, v. 205, p.141-153, 2002.

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

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

ZAMOLO L., BUSINI V., MOIANI D., MOSCATELLI D. e CAVALLOTTI C. Molecular Dynamic Investigation of the Interaction of Supported Affinity Ligands with Monoclonal Antibodies. v. 24, p. 527-539, 2008.

ANEXO A

Duplicatas dos ensaios realizados com o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺ para os tampões de adsorção MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0, fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0, na presença e ausência de sal. Os perfis cromatográficos e eletroforéticos assim com os respectivos balanços de massa encontram-se a seguir.

Sistema Tamponante MA

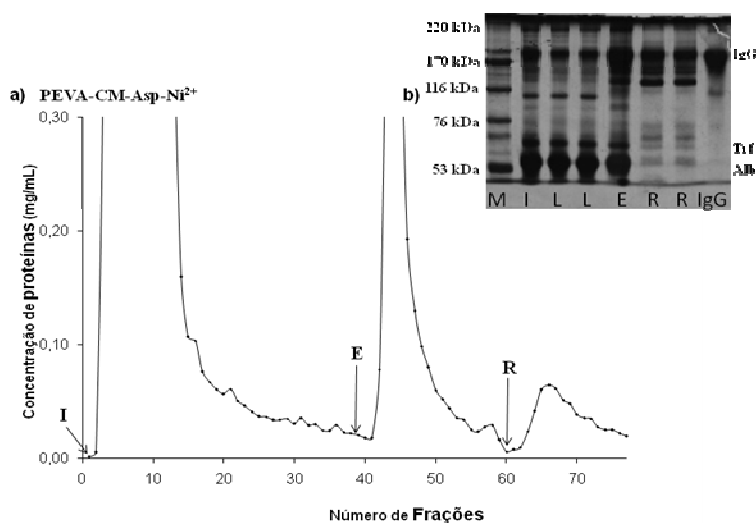


Figura A.1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mmol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mmol L⁻¹ de NaCl pH 4,0, Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E. frações de eluição, R. frações da regeneração, IgG. Marcador de IgG.

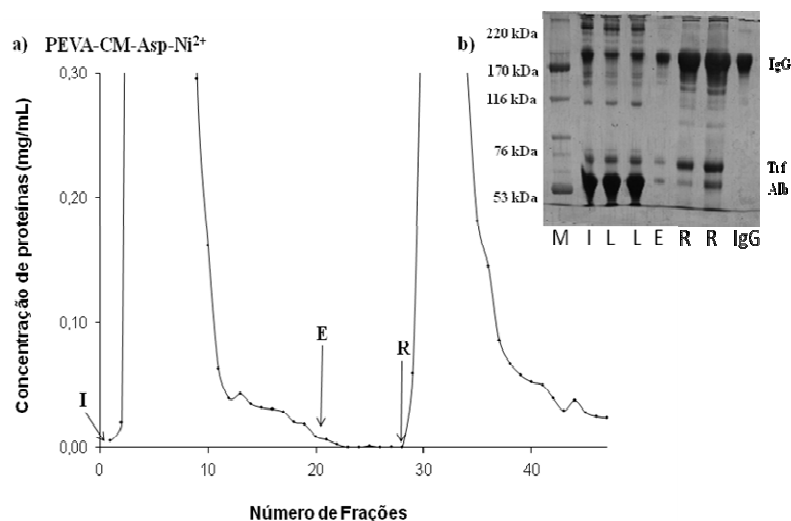


Figura A.2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L^{-1} a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, MA 25 mmol L^{-1} a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH MA 25 mmol L^{-1} a pH 4,0, Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E. frações de eluição, R. frações da regeneração, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.1. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L^{-1} a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} .

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,59	100,00	51,78	100,00
Lavagem	49,73	96,39	51,25	98,96
E	3,39	6,90	0,12	0,22
Regeneração	0,91	1,76	6,67	12,89
Total	54,79	105,04	58,04	112,07

^a Proteína total calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

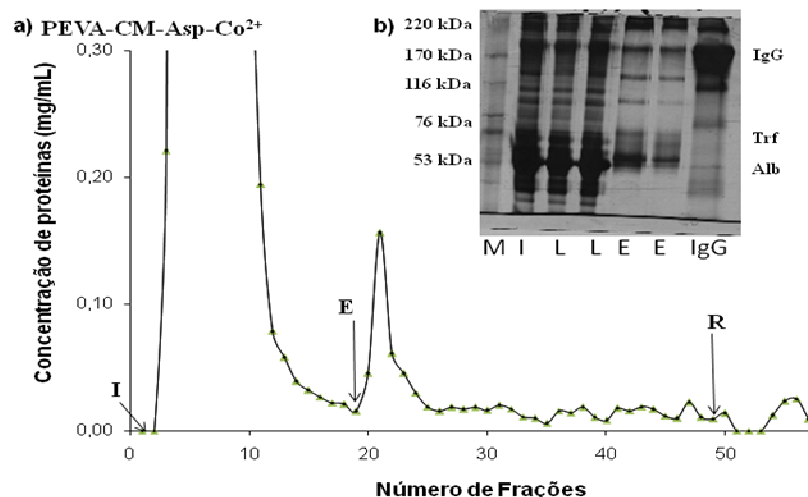


Figura A.3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ e NaCl 1,0 mol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl pH 4,0, Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E. frações de E, IgG. Marcador de IgG.

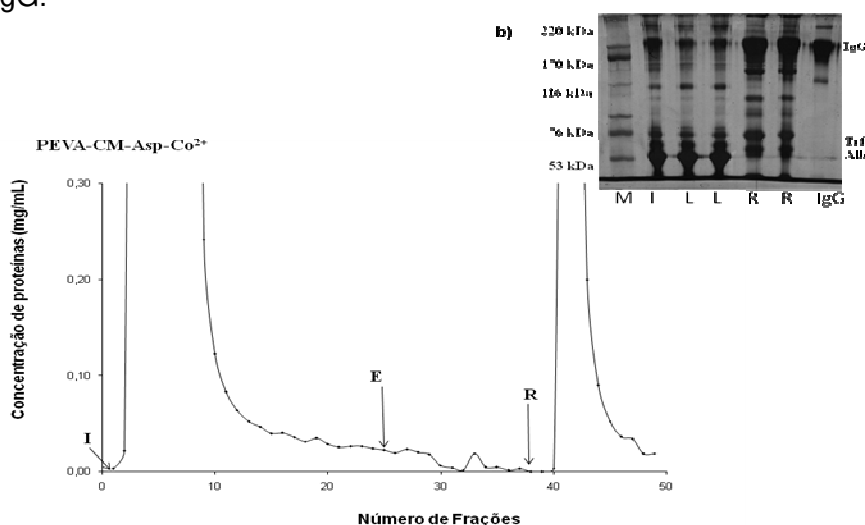


Figura A.4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH MA 25 mmol L⁻¹ pH 4,0, Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, R. frações da regeneração, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.2. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,42	100,00	51,42	100,00
Lavagem	55,41	107,75	46,82	91,06
E	1,47	2,85	0,21	0,40
Regeneração	0,14	0,27	4,16	8,10
Total	57,01	110,87	51,19	99,56

^a Proteína total calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

Sistema tamponante MA-imidazol

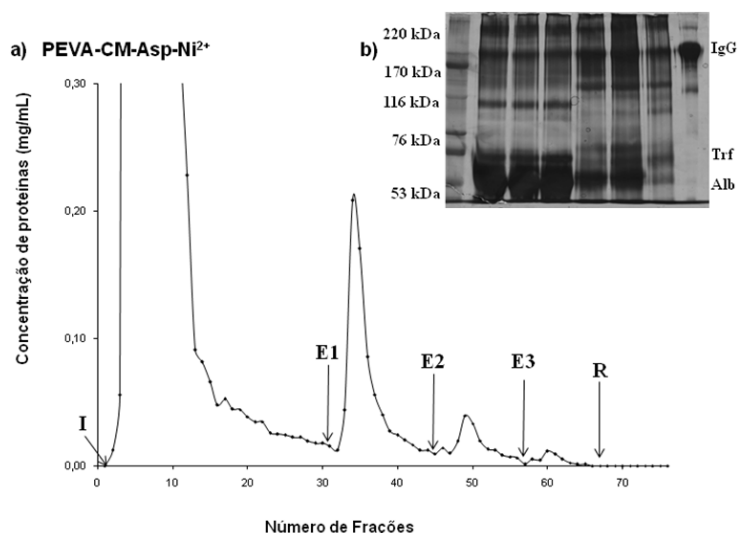


Figura A.5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. E1 - 20 mmol L⁻¹. E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, IgG. Marcador de IgG.

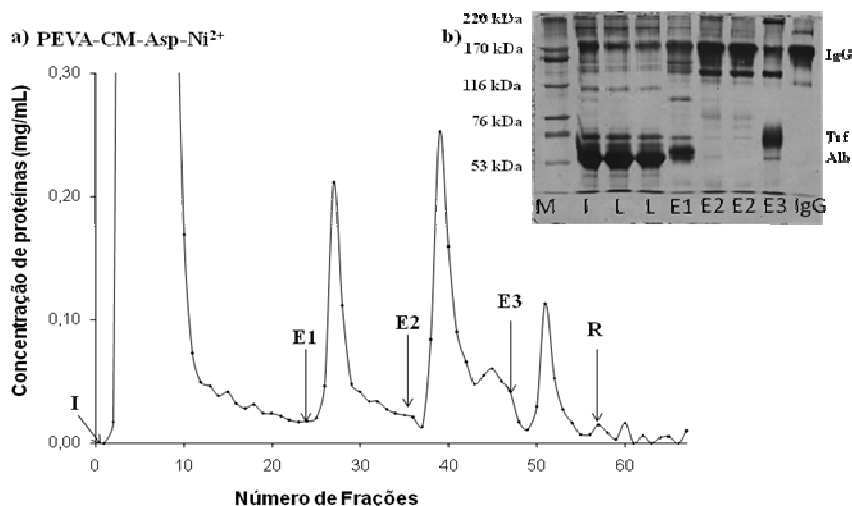


Figura A.6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, E3. Frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.3. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,11	100,00	51,58	100,00
Lavagem	50,20	98,21	47,47	91,04
E1	1,47	2,88	1,24	2,4
E2	0,36	0,71	1,92	3,72
E3	0,08	0,16	0,53	1,02
Regeneração	0,00	0,00	0,13	0,26
Total	52,11	101,96	51,29	99,44

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

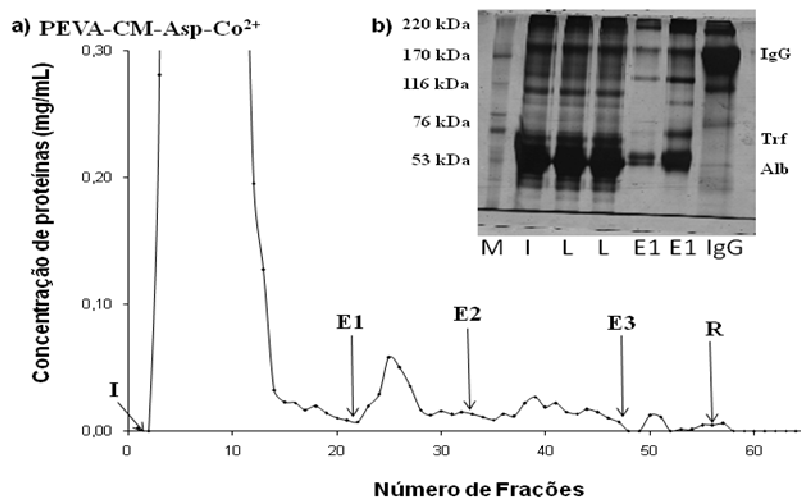


Figura A.7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51mg (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (e): degrau de imidazol em MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 -100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

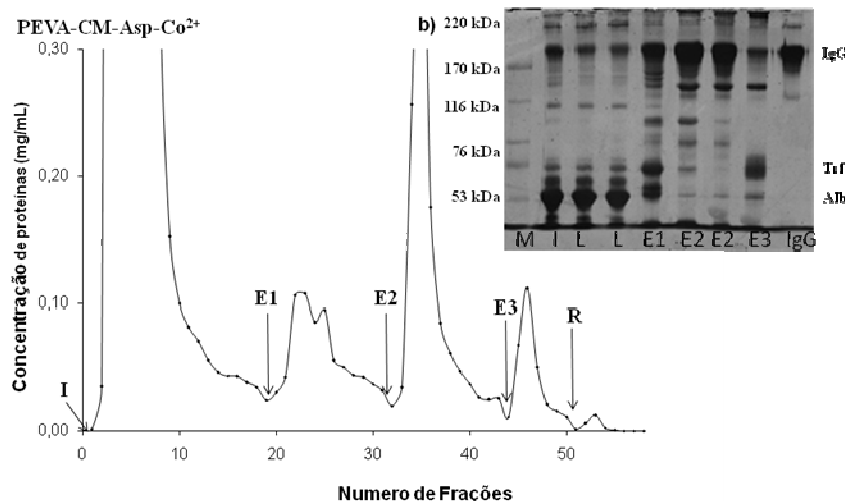


Figura A.8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 -100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, E3. frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.4. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,14	100,00	51,09	100,00
Lavagem	47,51	92,91	51,06	99,95
E1	0,59	1,15	1,45	2,84
E2	0,38	0,74	2,53	4,95
E3	0,08	0,15	0,63	1,22
Regeneração	0,00	0,00	0,04	0,08
Total	48,55	94,95	55,71	109,05

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

Sistema tamponante Fosfato de sódio-imidazol

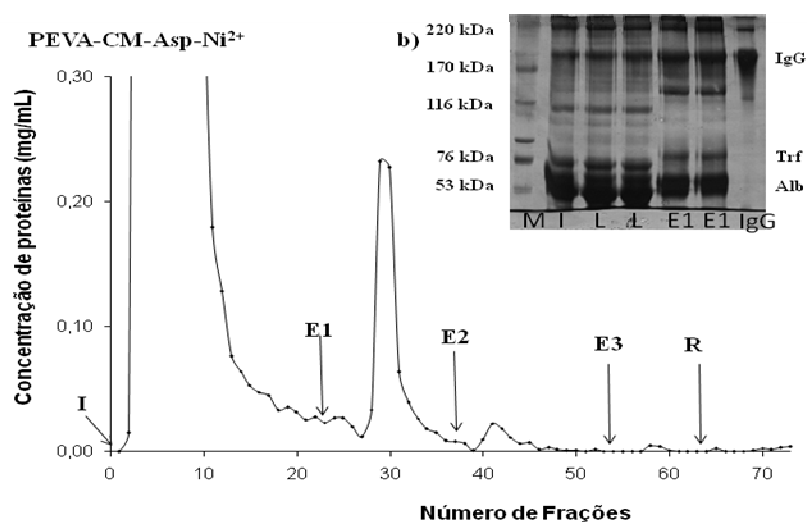


Figura A.9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol, 2 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

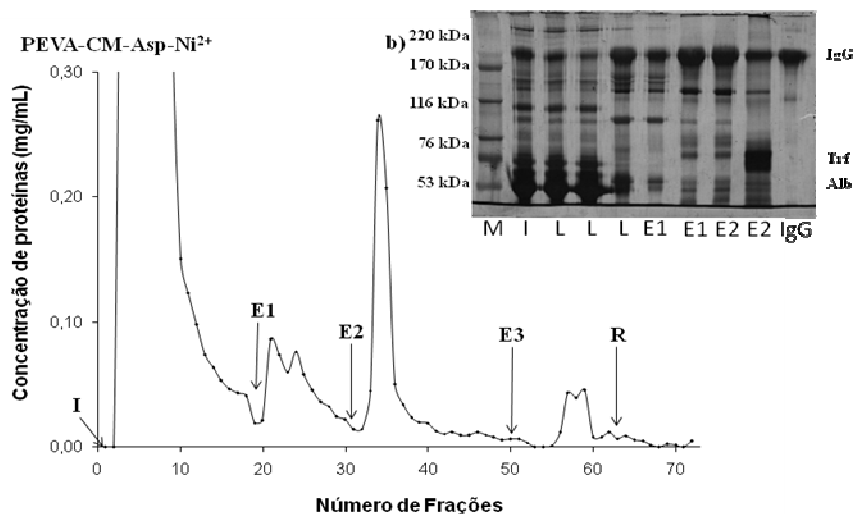


Figura A.10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 -100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.5. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,56	100,00	50,56	100,00
Lavagem	50,13	97,23	44,14	98,38
E1	1,28	2,49	1,14	2,55
E2	0,19	0,38	1,56	3,49
E3	0,02	0,03	0,35	0,78
Regeneração	0,03	0,05	0,06	0,13
Total	51,65	100,18	47,26	105,32

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

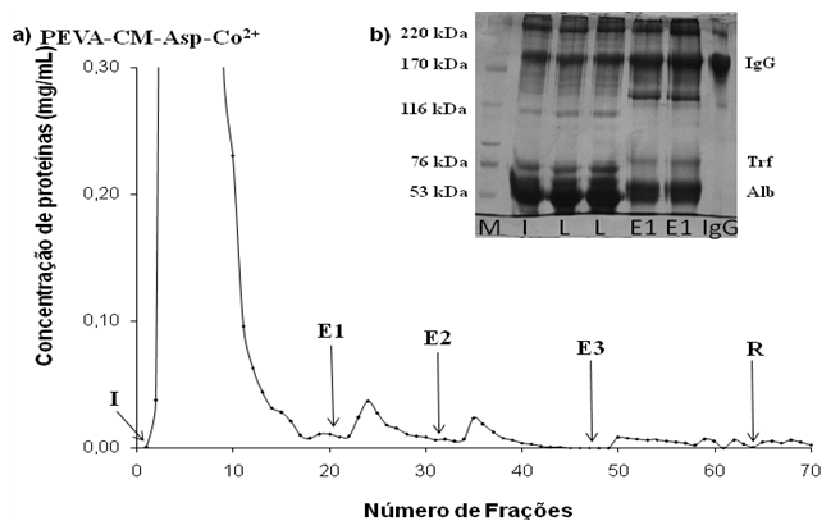


Figura A.11. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: $5,0 \text{ mL}$. Vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Injeção: $\sim 51 \text{ mg}$ de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato 25 mmol L^{-1} e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol/L , E2 - 100 mmol/L e E3 - 500 mmol/L . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

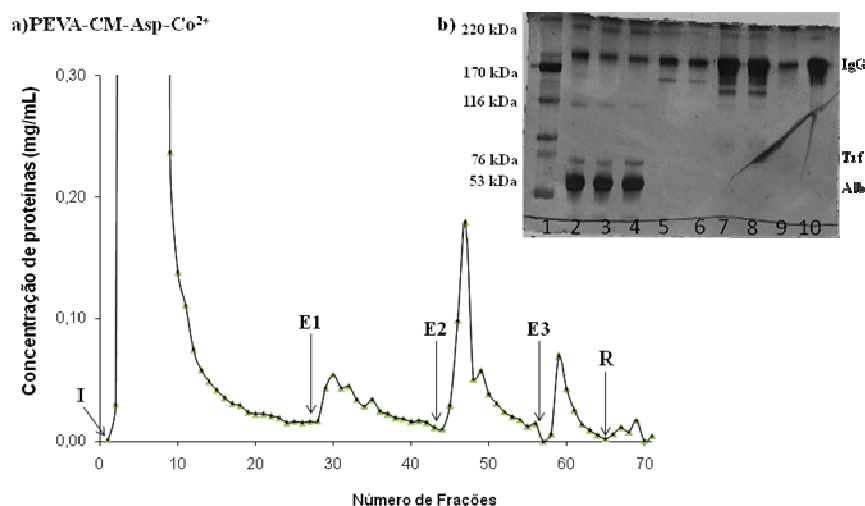


Figura A.12. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Volume do leito: $5,0 \text{ mL}$. Vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Injeção: $\sim 51 \text{ mg}$ de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, E3. frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.6. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L^{-1} , E2. 100 mmol L^{-1} e E3. 500 mmol L^{-1} , utilizando o sistema PEVA-CM-Asp- Co^{2+} .

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	48,29	100,00	51,73	100,00
Lavagem	44,18	91,48	51,68	99,90
E1	0,37	0,76	0,91	1,75
E2	0,17	0,34	1,19	2,31
E3	0,14	0,29	0,36	0,70
Regeneração	0,05	0,11	0,08	0,16
Total	44,90	92,98	54,23	104,83

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

Sistema tamponante Hepes-imidazol

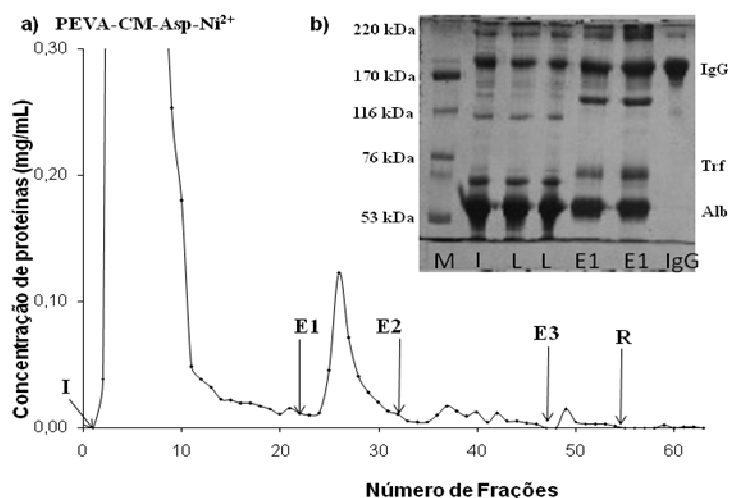


Figura A.13. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

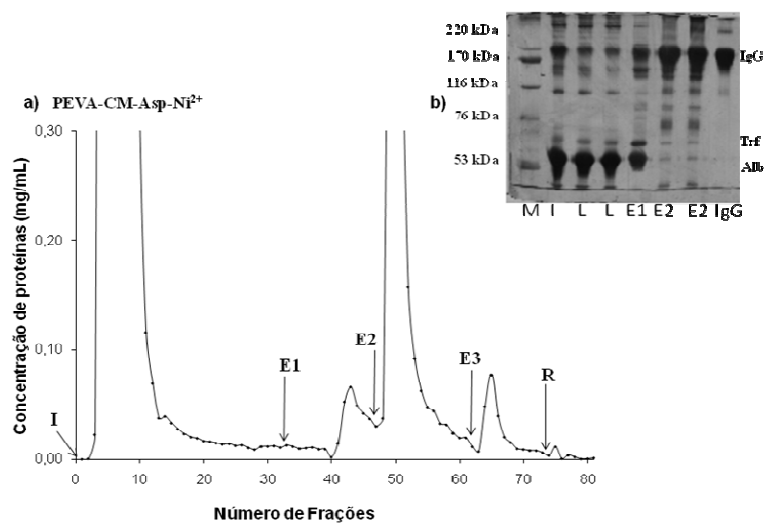


Figura A.14. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹ e 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L⁻¹ e 2 mmol L⁻¹ de imidazol a pH 7,0; dessorção: degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações da E2, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.7. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,24	100,00	51,50	100,00
Lavagem	46,14	90,03	49,88	96,85
E1	0,74	1,45	0,53	1,02
E2	0,21	0,42	4,84	9,40
E3	0,06	0,11	0,49	0,95
Regeneração	0,01	0,01	0,08	0,15
Total	47,16	92,03	55,82	108,37

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

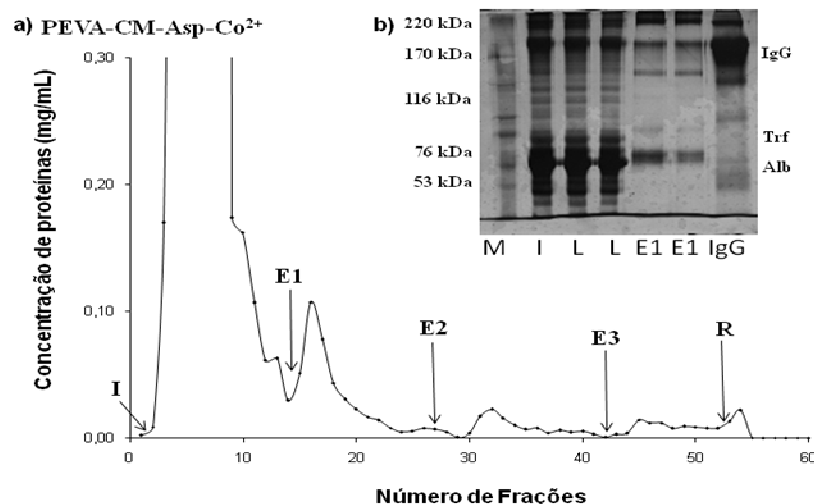


Figura A.15. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

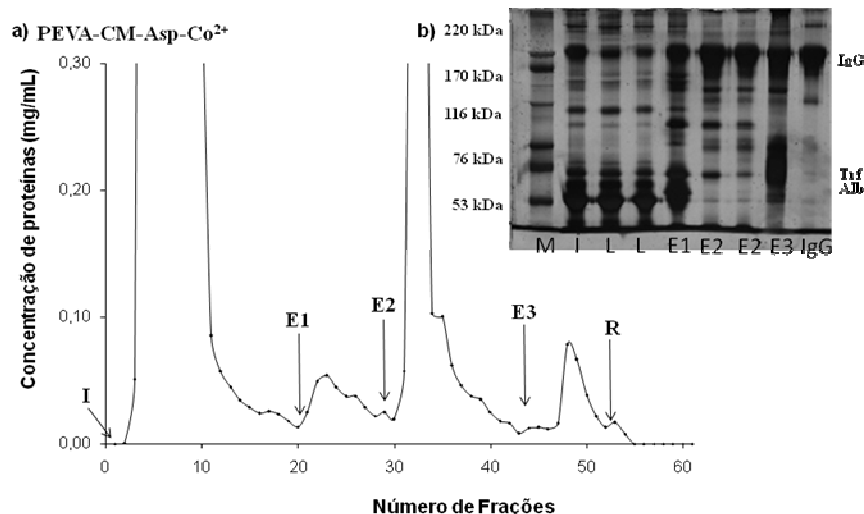


Figura A.16. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L^{-1} a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações da E2, E3. Frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela A.8. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L^{-1} , E2. 100 mmol L^{-1} e E3. 500 mmol L^{-1} , utilizando o sistema PEVA-CM-Asp- Co^{2+} .

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,41	100,00	51,70	100,00
Lavagem	50,41	98,08	50,71	98,07
E1	0,85	1,66	0,71	1,37
E2	0,21	0,40	3,98	7,70
E3	0,23	0,46	0,52	1,00
Regeneração	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	51,72	100,60	55,91	108,14

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

ANEXO B

Perfis cromatográficos e balanços de massa dos ensaios realizados com o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺ para os tampões de adsorção MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0, fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0, na presença e ausência de sal.

Sistema tamponante MA

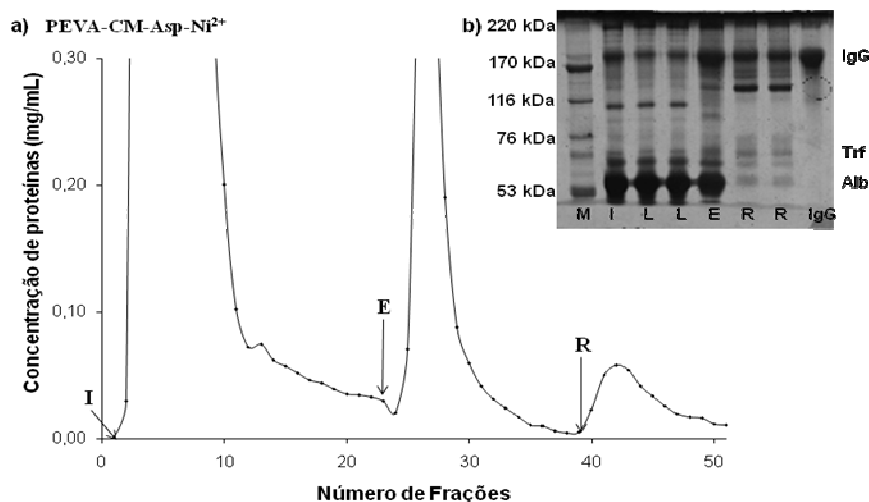


Figura B.1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mmol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mmol L⁻¹ de NaCl pH 4,0, Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E. frações de eluição, R. frações da regeneração, IgG. Marcador de IgG.

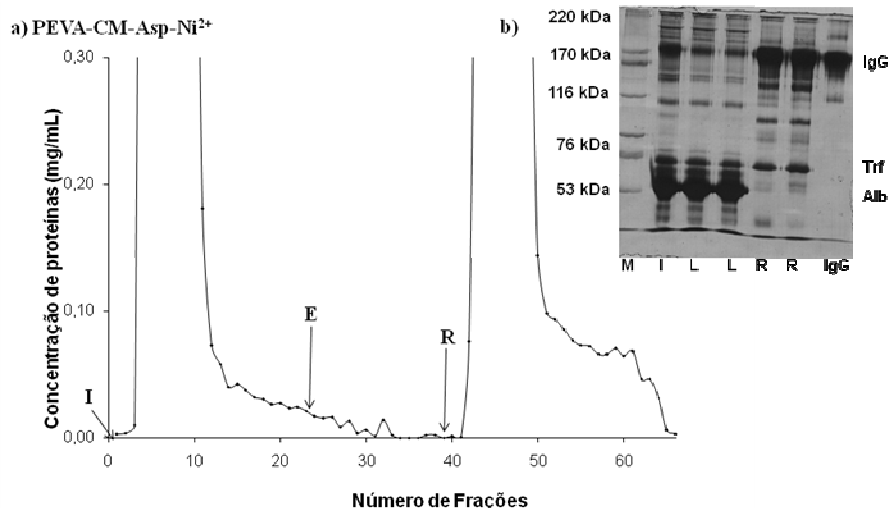


Figura B.2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH MA 25 mmol L⁻¹ pH 4,0, Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E. frações de eluição, R. frações da regeneração, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.1. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,37	100,00	51,26	100,00
Lavagem	50,62	98,54	43,75	85,34
E	2,74	5,34	0,20	0,39
Regeneração	0,72	1,40	8,63	16,85
Total	54,08	105,28	52,58	102,58

^a Proteína total calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

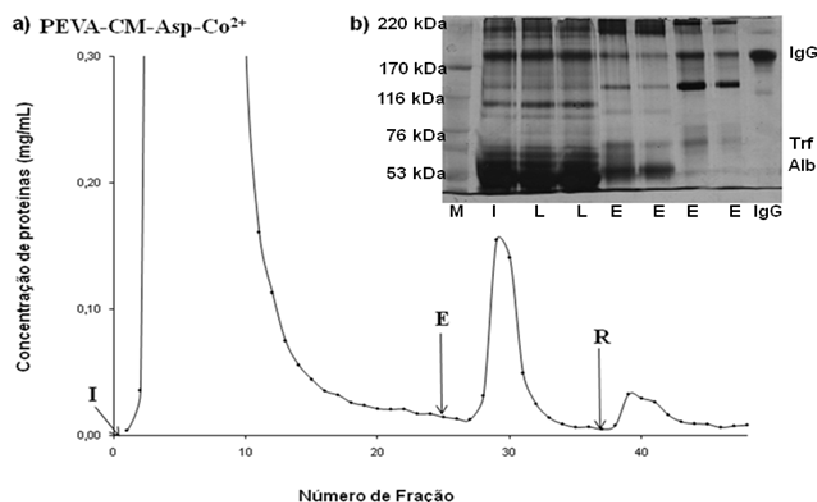


Figura B.3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em $\text{MA } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Injeção: $\sim 51 \text{ mg}$ de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, $\text{MA } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH $\text{MA } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl pH 4,0, Regeneração (R): $\text{EDTA } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E. frações de E, IgG. Marcador de IgG.

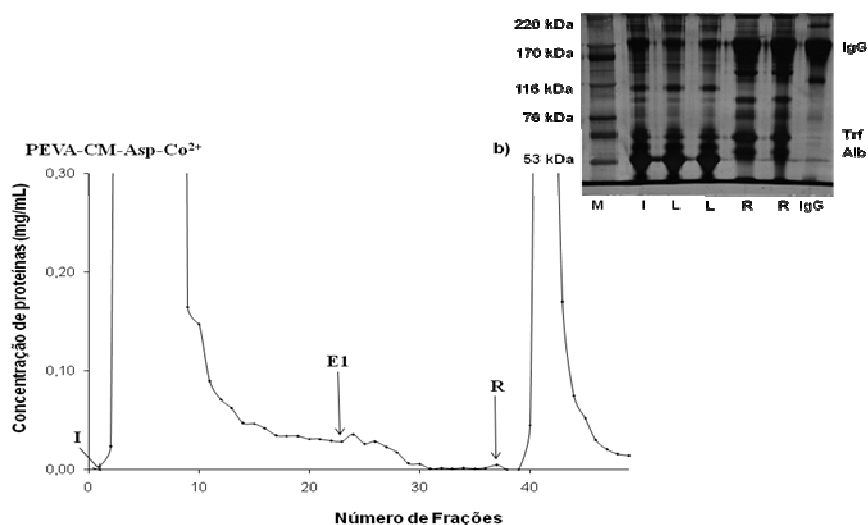


Figura B.4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em $\text{MA } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Injeção: $\sim 51 \text{ mg}$ de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: Tampão de lavagem, $\text{MA } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 7,0. Eluição (E): abaixamento de pH $\text{MA } 25 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 4,0, Regeneração (R): $\text{EDTA } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, R. frações da regeneração, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.2. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção abaixamento de pH, E. pH 4,0, utilizando os sistemas PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,60	100,00	51,64	10,00
Lavagem	51,36	99,53	45,58	94,08
E	0,88	1,70	0,11	0,21
Regeneração	0,32	0,62	3,56	6,90
Total	52,56	101,86	52,26	101,20

^a Proteína total calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

Sistema tamponante MA-imidazol

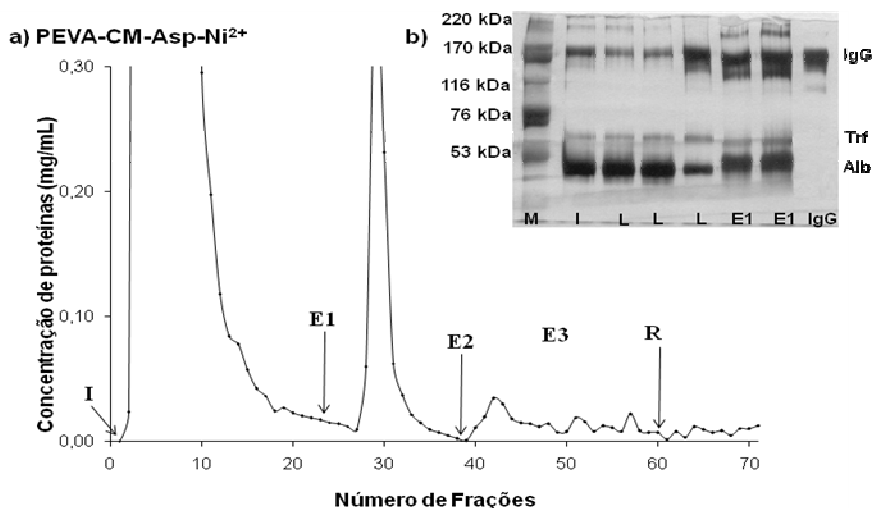


Figura B.5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes), a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em MA 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. E1 - 20 mmol L⁻¹. E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, IgG. Marcador de IgG.

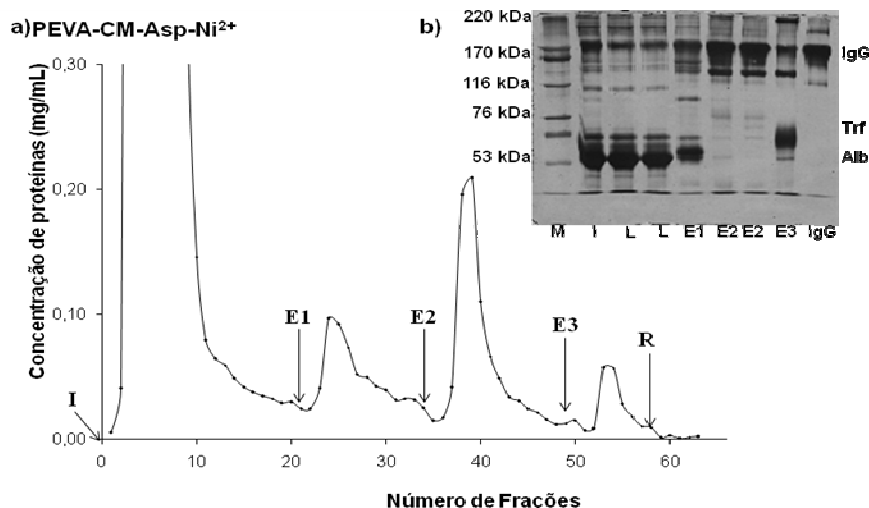


Figura B.6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em MA 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, E3. Frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.3. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Ni²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,19	100,00	51,27	100,00
Lavagem	51,11	99,85	51,81	101,06
E1	1,59	3,10	1,26	2,47
E2	0,32	0,62	1,80	3,40
E3	0,25	0,49	0,39	0,77
Regeneração	0,16	0,32	0,02	0,04
Total	53,43	104,38	55,23	107,74

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

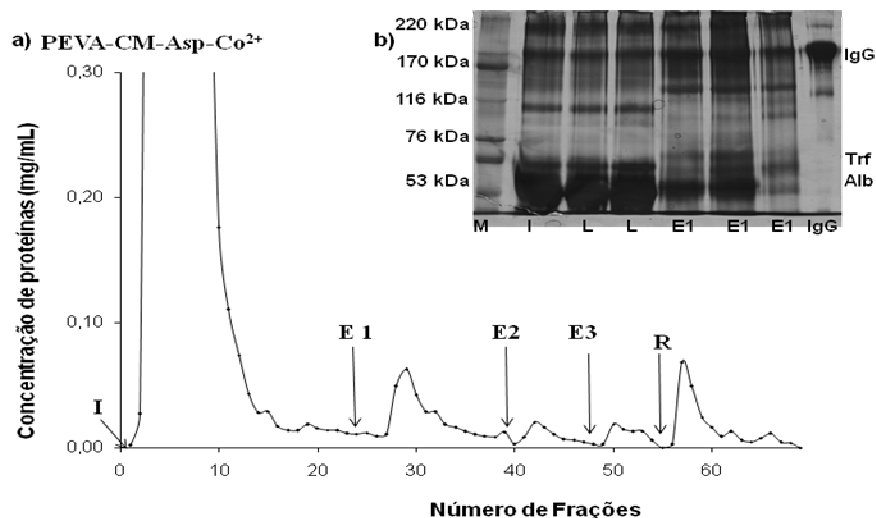


Figura B.7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51mg (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0. Eluição (e): degrau de imidazol em MA 25 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 -100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

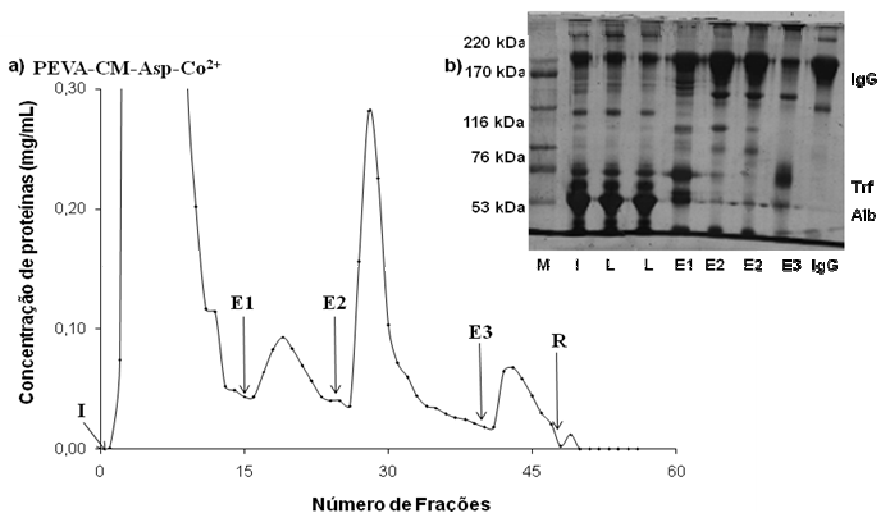


Figura B.8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em MA 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem MA 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em MA 25 mmol L^{-1} a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 -100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, E3. frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.4. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio MA 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,48	100,00	52,26	100,00
Lavagem	45,33	88,06	51,10	99,71
E1	0,62	1,21	1,24	2,42
E2	0,16	0,32	2,34	4,57
E3	0,14	0,26	0,61	1,19
Regeneração	0,37	0,72	0,03	0,06
Total	46,63	90,57	55,33	105,86

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

Sistema tamponante Fosfato de Sódio-imidazol

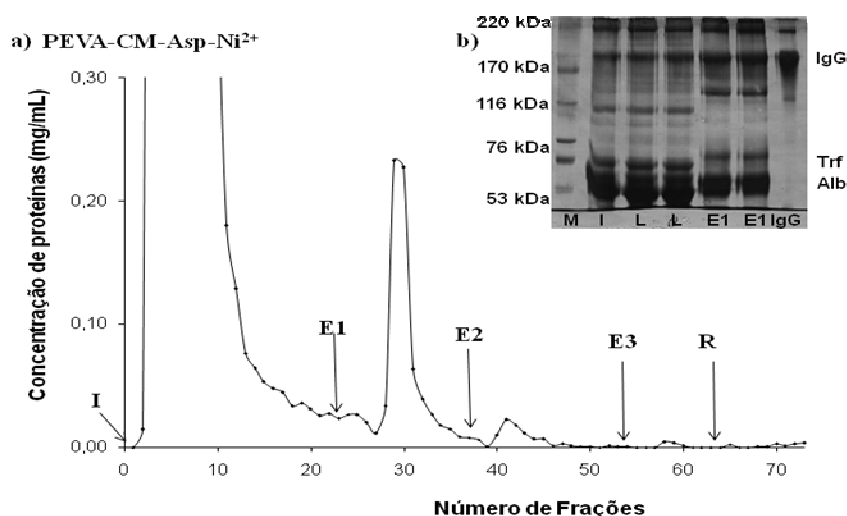


Figura B.9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol, 2 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 - 100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

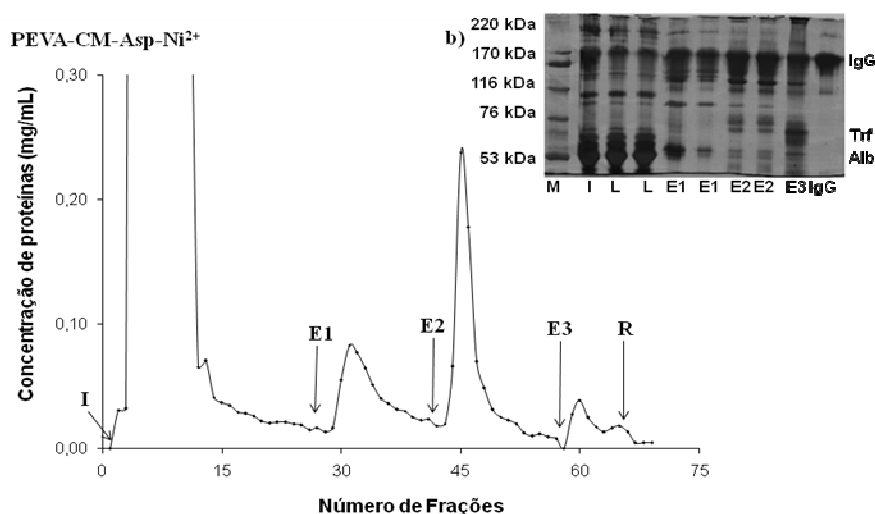


Figura B.10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Volume do leito: $5,0 \text{ mL}$. Vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Injeção: $\sim 51 \text{ mg}$ de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.5. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L^{-1} , E2. 100 mmol L^{-1} e E3. 500 mmol L^{-1} , utilizando o sistema PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} .

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,00	100,00	51,88	100,00
Lavagem	46,08	90,35	49,55	95,52
E1	1,38	2,71	1,17	2,25
E2	0,17	0,33	1,53	2,96
E3	0,02	0,04	0,27	0,53
Regeneração	0,03	0,05	0,09	0,17
Total	47,67	93,48	52,62	101,43

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

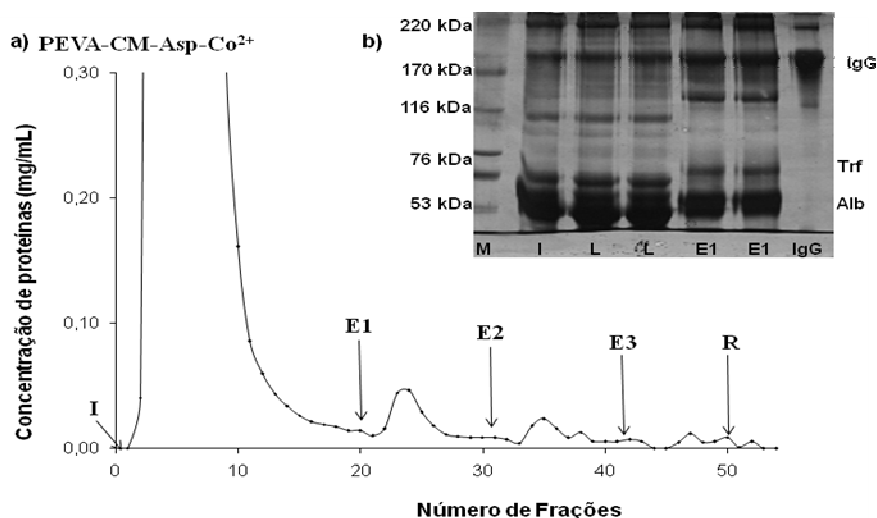


Figura B.11. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol/L, E2 -100 mmol/L e E3 - 500 mmol/L. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

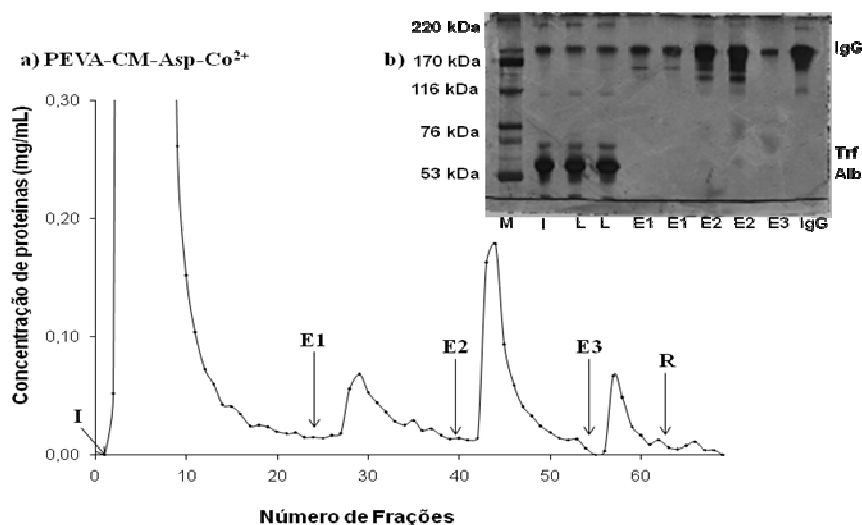


Figura B.12. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺, a partir de uma solução de soro humano em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes) a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 -100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações E2, E3. frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.6. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,32	100,00	51,22	100,00
Lavagem	47,72	92,98	49,81	97,25
E1	0,43	0,84	0,92	1,79
E2	0,22	0,44	1,36	2,66
E3	0,07	0,14	0,38	0,74
Regeneração	0,01	0,03	0,05	0,10
Total	48,46	94,42	52,53	102,55

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

Sistema tamponante Hepes-imidazol

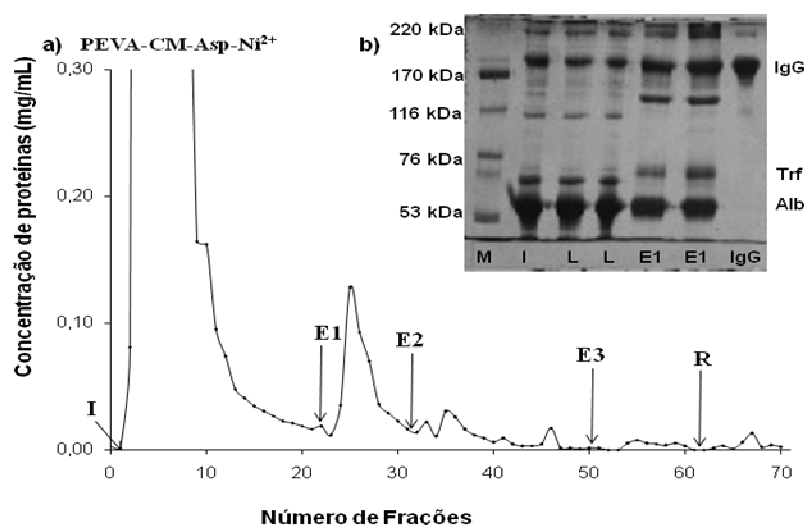


Figura B.13. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min⁻¹. Injeção: ~51mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L⁻¹, imidazol 2 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L⁻¹ e 1,0 mol L⁻¹ NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol L⁻¹, E2 -100 mmol L⁻¹ e E3 - 500 mmol L⁻¹. Regeneração (R): EDTA 100 mmol L⁻¹ a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

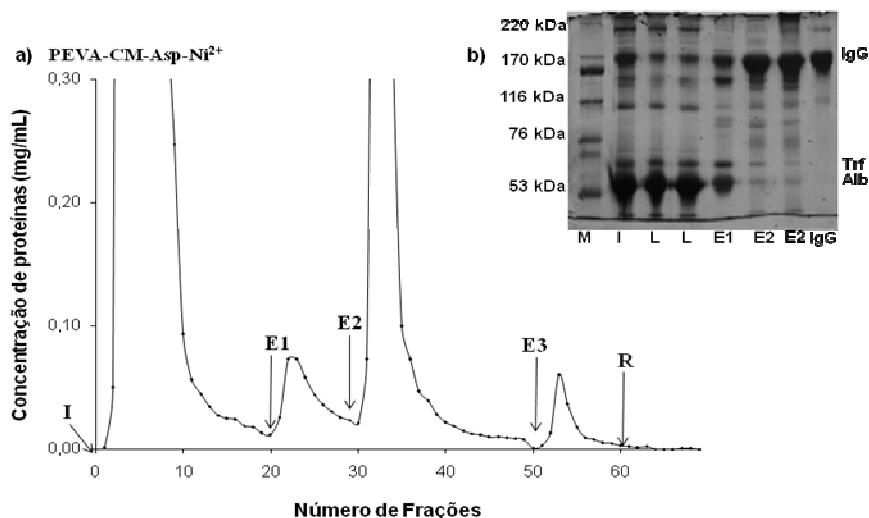


Figura B.14. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L^{-1} e 2 mmol L^{-1} de imidazol a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L^{-1} e 2 mmol L^{-1} de imidazol a pH 7,0; dessorção: degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L^{-1} a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações da E2, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.7. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L^{-1} , E2. 100 mmol L^{-1} e E3. 500 mmol L^{-1} , utilizando o sistema PEVA-CM-Asp- Ni^{2+} .

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,86	100,00	57,47	100,00
Lavagem	51,33	98,98	48,69	94,61
E1	0,91	1,75	0,83	1,61
E2	0,35	0,68	4,40	8,54
E3	0,07	0,13	0,30	0,59
Regeneração	0,06	0,12	0,03	0,05
Total	52,72	101,65	54,24	108,37

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca.

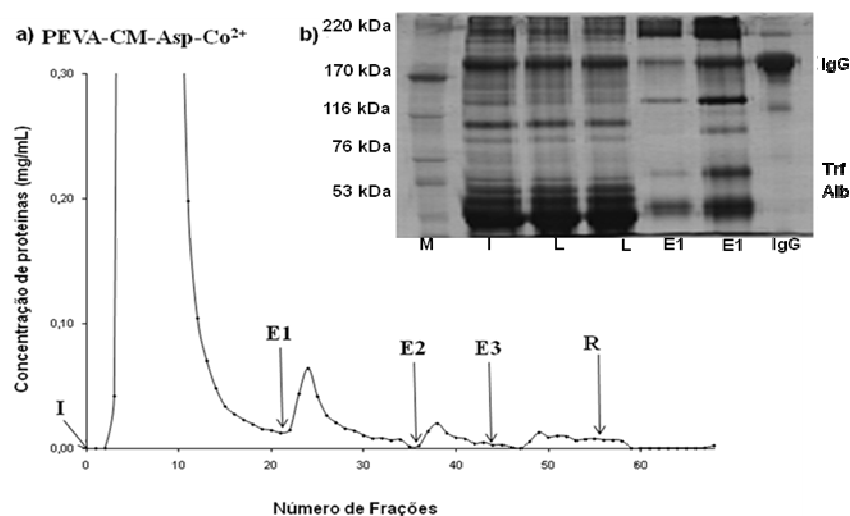


Figura B.15. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51 mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L^{-1} , imidazol 2 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L^{-1} e 1,0 mol L^{-1} de NaCl a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, IgG. Marcador de IgG.

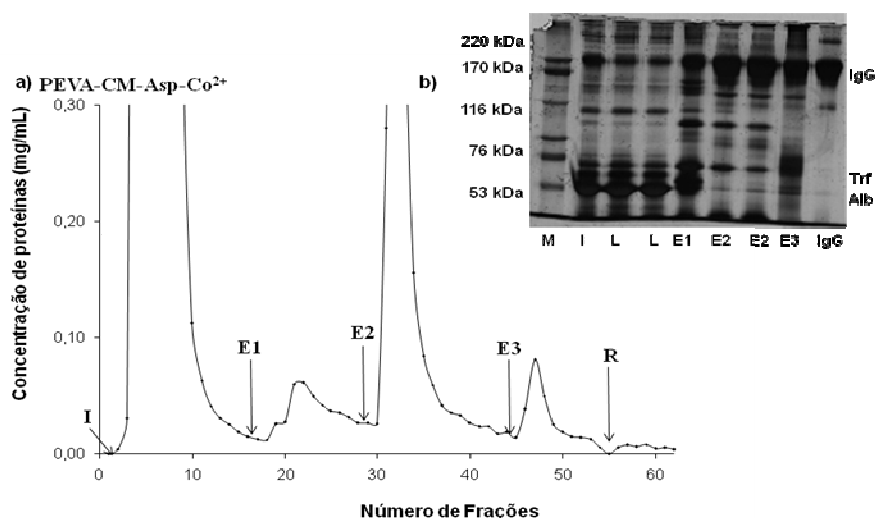


Figura B.16. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em PEVA-CM-Asp- Co^{2+} , a partir de uma solução de soro humano em Hepes 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL min^{-1} . Injeção: ~51mg de proteína total (soro humano diluído 5 vezes). a) Perfil cromatográfico: tampão de lavagem Hepes 25 mmol L^{-1} e imidazol 2 mmol L^{-1} a pH 7,0. Eluição (E): degrau de imidazol em Hepes 25 mmol L^{-1} a pH 7,0, E1 - 20 mmol L^{-1} , E2 - 100 mmol L^{-1} e E3 - 500 mmol L^{-1} . Regeneração (R): EDTA 100 mmol L^{-1} a pH 7,0. b) Perfil eletroforético: M. Marcador de massa molecular, I. Injeção, L. frações de lavagem, E1. frações da E1, E2. frações da E2, E3. Frações E3, IgG. Marcador de IgG.

Tabela B.8. Balanço de massa da cromatografia utilizando tampão de equilíbrio Hepes 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, E1. 20 mmol L⁻¹, E2. 100 mmol L⁻¹ e E3. 500 mmol L⁻¹, utilizando o sistema PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Fração	Presença de NaCl		Ausência de NaCl	
	(mg) ^a	(%) ^b	(mg) ^a	(%) ^b
Injeção	51,53	100,00	51,65	100,00
Lavagem	48,42	93,95	44,51	86,18
E1	0,56	1,08	0,84	1,64
E2	0,16	0,30	3,99	7,73
E3	0,17	0,34	0,54	1,04
Regeneração	0,01	0,02	0,10	0,20
Total	49,31	95,69	49,98	96,78

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

1 mL de membrana equivale a 0,25 g seca

Anexo C

Curvas de ruptura, perfis cromatográficos, balanços de massa e perfis eletroforéticos dos ensaios de filtração em mini-módulo para o adsorvente PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺ para o tampão de adsorção fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 na ausência de sal.

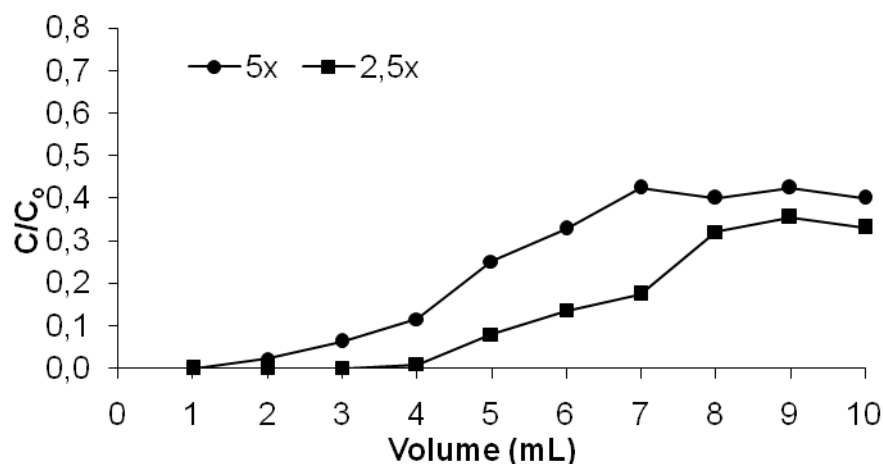


Figura C.1. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Ni²⁺. Vazão de filtrado: $Q_F = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão de adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Injeção: 4,0 mL de soro diluído 2,5 e 5,0 vezes (160 a 190 mg proteínas totais).

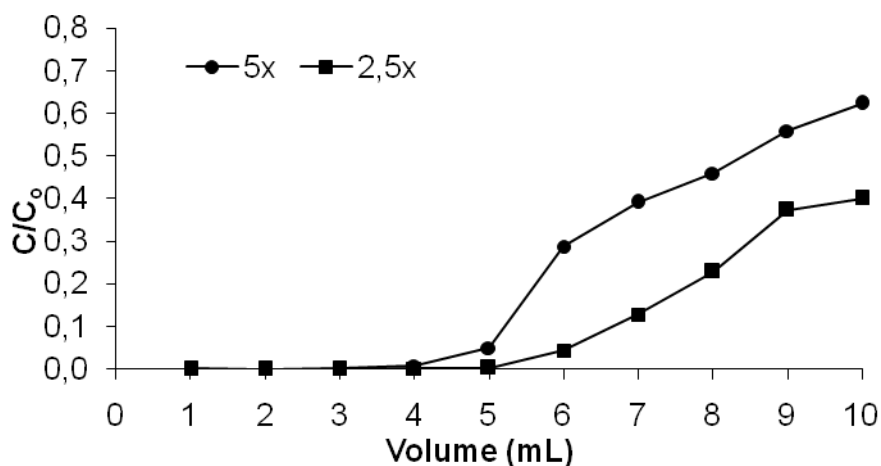


Figura C.2. Curva de ruptura obtida para PEVA-CM-Asp-Co²⁺. Vazão de filtrado: $Q_F = 0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Tampão de adsorção: fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0. Injeção: 4,0 mL de soro diluído 2,5 e 5,0 vezes (160 a 190 mg proteínas totais).

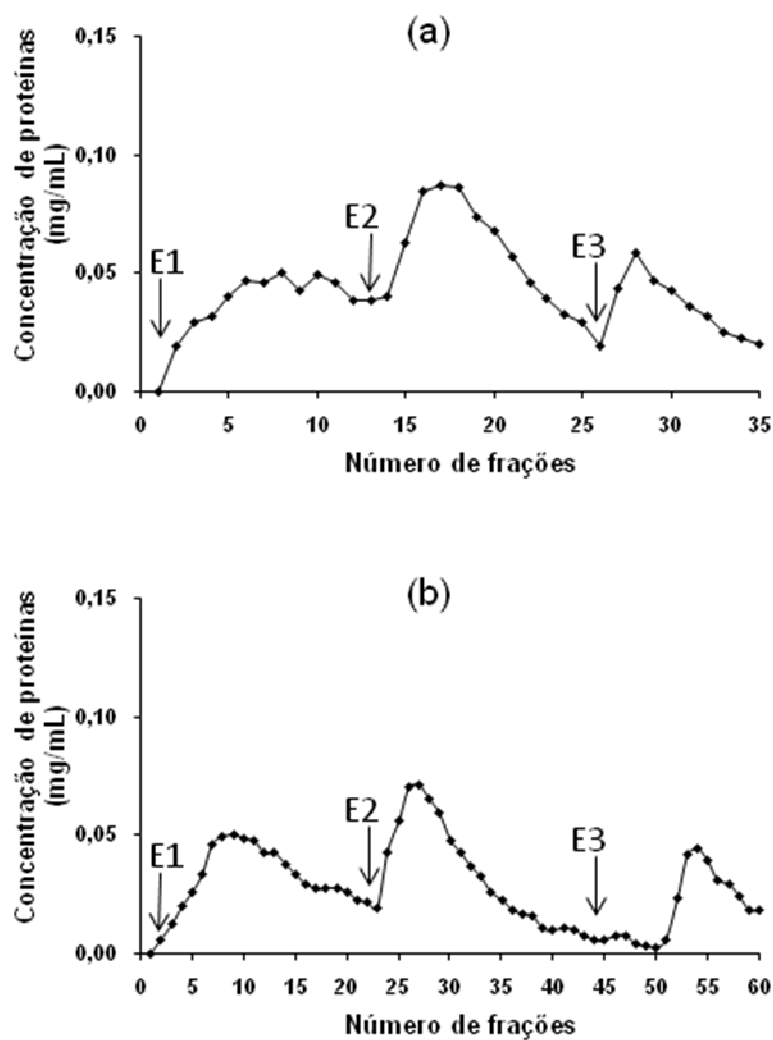


Figura C.3. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0. a) 2,5 vezes; b) 5,0 vezes. Eluição: aumento concentração de imidazol. E1, 20 mmol L⁻¹; E2, 100 mmol L⁻¹; E3, 500 mmol L⁻¹.

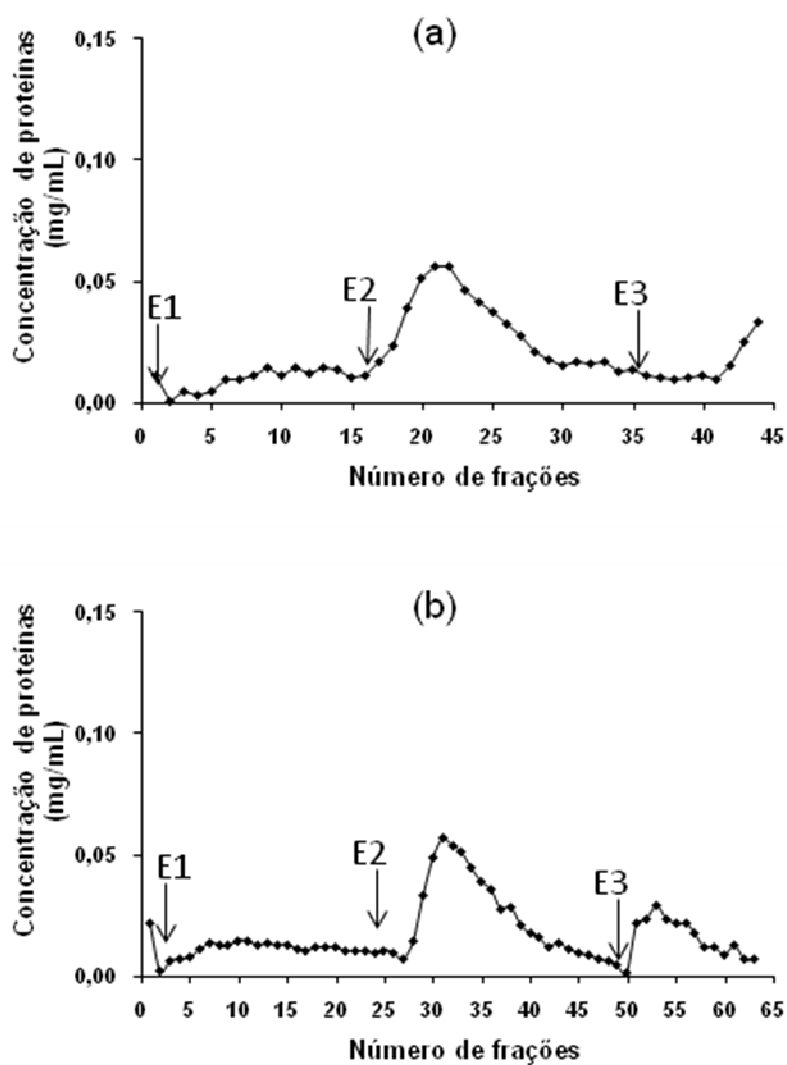


Figura C.4. Perfil cromatográfico das frações de eluição das cromatografias realizadas em PEVA-CM-Asp-Co²⁺ em duas diluições do soro humano em fosfato de sódio a pH 7,0. a) 2,5 vezes; b) 5,0 vezes. Eluição: aumento concentração de imidazol. E1, 20 mmol L⁻¹; E2, 100 mmol L⁻¹; E3, 500 mmol L⁻¹.

Tabela C.1. Balanço de massa das curvas de ruptura de soro humano diluído 2,5 e 5,0 vezes em tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ a pH 7,0 e dessorção por aumento da concentração de imidazol, utilizando as membranas PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ e PEVA-CM-Asp-Co²⁺.

Etapas	Ni ²⁺				Co ²⁺			
	2,5		5,0		2,5		5,0	
	PT ^a (mg)	(%) ^b	PT ^a (mg)	(%) ^b	PT ^a (mg)	(%) ^b	PT ^a (mg)	(%) ^b
Injeção	184,73	100,0	187,18	100,0	186,01	100,0	189,89	100,0
Filtrado	32,51	17,6	22,83	12,2	16,89	9,1	22,64	11,9
Retido	74,02	40,1	81,04	43,3	60,07	32,3	89,50	47,1
Lavagem	85,18	46,1	95,21	50,9	88,82	47,8	102,93	54,2
E1	0,98	0,5	1,34	0,7	0,19	0,1	0,57	0,3
E2	1,64	0,9	1,44	0,8	1,21	0,7	1,16	0,6
E3	0,69	0,4	0,55	0,3	0,30	0,2	0,46	0,2
Reg.	0,32	0,2	0,13	0,1	0,48	0,3	0,00	0,0
Recuperação	194,65	105,8	202,53	108,3	167,65	90,5	216,79	114,8
PT ^a								
adsorvidas	3,63	2,0	3,46	1,9	2,18	1,3	2,19	3,8

^a Massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (Método de Bradford, 1976)

^b Percentagem relativa à massa de proteína total de injeção.

Massa de membrana no mini-módulo 0,13 g membrana seca.

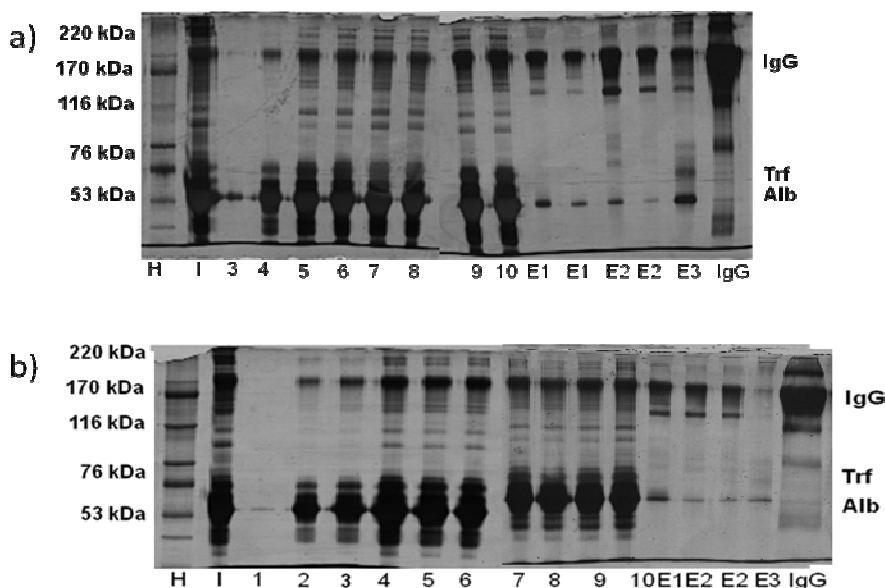


Figura C.5. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Ni²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ injetando 4,0 mL de soro humano nas diluições: a) 2,5 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 3-10. Amostras de filtrado, E1. Amostras da E1, E2. Amostras da E2. E3. Amostras E3, IgG: Marcador de IgG. b) 5,0 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 1-10. Amostras de filtrado, E2. Amostras da E2, IgG. Marcador de IgG.

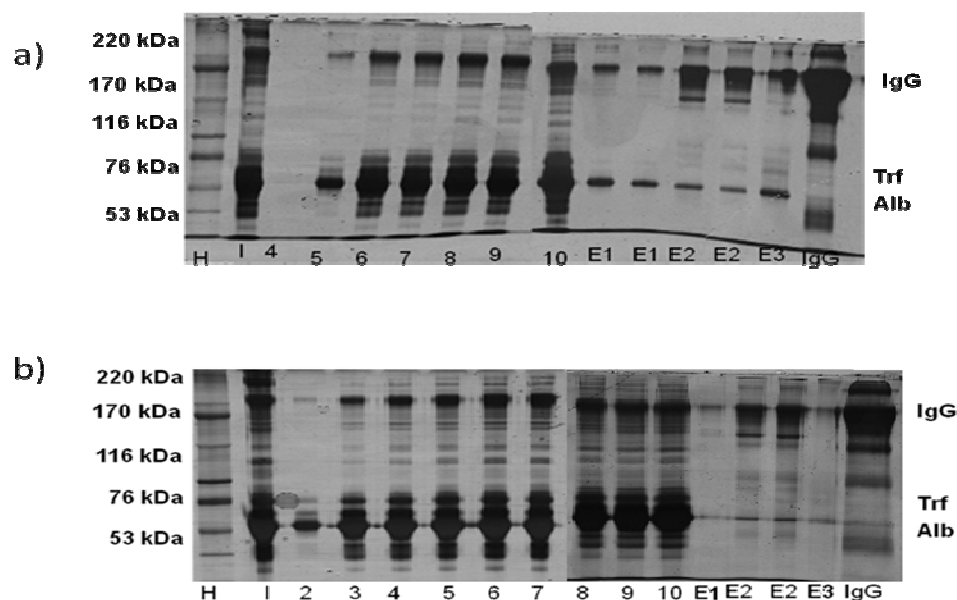


Figura C.6. Eletroforese da filtração em PEVA-CM-Asp-Co²⁺ utilizando o tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ e imidazol 2 mmol L⁻¹ injetando 4,0 mL de soro humano nas diluições: a) 2,5 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 4-10. Amostras de filtrado, E1. Amostras da E1, E2. Amostras da E2, E3. Amostras E3, IgG: Marcador de IgG. b) 5,0 vezes. H. Marcador de alta massa molecular, I. Amostra da injeção, 2-10. Amostras de filtrado, E2. Amostras da E2, IgG. Marcador de IgG.