# Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Química Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

# PURIFICAÇÃO DE PRÓ-INSULINA HUMANA RECOMBINANTE COM CAUDA DE POLI(HISTIDINA): CROMATOGRAFIA EM MEMBRANAS DE AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS

Luciana Cristina Lins de Aquino, M.S.

Autora

## Prof<sup>e</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

## Prof Dr Karsten Haupt

Co-orientador

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo Novembro de 2004

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE



-Bibid 343111

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



# Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Química Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

## **TESE DE DOUTORADO:**

Purificação de Pró-insulina Humana Recombinante com Cauda de Poli(histidina): Cromatografia em Membranas de Afinidade com lons Metálicos Imobilizados, defendida por Luciana Cristina Lins de Aquino e aprovada em 05 de Novembro de 2004 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno

Somin Dueno

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Química

Prof. Dr. Everson Alves Miranda Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Química

Vedrode Posso Allas

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessôa Filho Universidade de São Paulo - Escola Politécnica

<u>Mauria</u> <u>27</u> <u>Bep</u> Prof<sup>a</sup>/Dr<sup>a</sup>. Marisa Masumi Beppu Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Química

1abh For Las

Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos

Esta versão corresponde à redação final da dissertação de Doutorado em Engenharia Química defendida pela Eng<sup>a</sup> Química Luciana Cristina Lins de Aquino e aprovada pela comissão julgadora em 05 de Novembro de 2004.

Orientadora: Prof<sup>e</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno



# ESTA TESE E TODOS OS BONS FRUTOS QUE VIRÃO ATRAVÉS DELA SÃO DEDICADOS ÀS PESSOAS MAIS IMPORTANTES DA MINHA VIDA: MEUS PAIS, MARIA TAMA E LUÍZ SOARES

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter conseguido enfrentar o pior dos inimigos a SAUDADE;

Aos meus pais, Maria Tama e Luís Soares pelo incentivo, orações, apoio, amor e dedicação em todas as etapas da minha vida;

Ao meu irmão André Luiz, aos primos Édler, Elisângela e Elaine (prima de coração) por sempre terem feito parte da minha vida. À minha querida tia Gal pelas orações e apoio;

À minha orientadora professora Sônia Bueno pelo tema de tese, pelos ensinamentos e oportunidades durante essa etapa profissional;

Ao professor Everson Miranda pelos ensinamentos durante o desenvolvimento desta tese;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pela bolsa de estudos e apoio financeiro;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, CAPES, pela bolsa de estudos na França (doutorado sanduíche);

Ao Luciano Vilela e Heloísa Tunes, ambos da Empresa BIOMM, pelo suporte técnico e fornecimento de proteínas para a realização da tese;

Ao Professor Karsten Haupt (Co-orientador) e Professor Allan Fribollet (Chefe de Departamento) da Université de Technologie de Compiègne, França por terem permitido a realização do estágio de doutorado sanduíche;

Aos professores do Departamento de Biotecnologia: Ângela Moraes, César Santana, Everson Miranda, Sônia Bueno e Maria Helena Helena pelos conhecimentos científicos adquiridos durante a pós-graduação;

Aos colegas de laboratório Cristiane, Adriano, Rosana, Érica, Geórgia, Paula, Ana Paula, Fabiana, Goran, Leonardo, Moysés, Igor, Romi, Vinícius, Ivanildo, Carol, Elcimar, Líbia;

Em especial as amigas de laboratório Isa e Mariana pela amizade e companheirismo durante esta etapa da minha vida;

À Mariana e Fábio, este casal maravilhoso que foram a minha família na França – Merci beaucoup;

Aos amigos Adriana, Ângela, Graça, Eduardo (urso), Wanda, Sérgio, Wagner, Wesley, Raquel, Klacius, Mirla pelos momentos de entreterimento;

## MUITO OBRIGADA A TODOS !!!!

#### RESUMO

A cromatografía de afinidade com íons metálicos imobilizados (IMAC) tem sido uma técnica bastante utilizada para a purificação de proteínas recombinantes que possuem uma cauda de polihistidina acoplada na porção N ou C-terminal. Como alternativa aos géis de agarose (tradicionalmente empregados em IMAC) tem sido proposto o emprego de membranas, cuja vantagem principal é a transferência de massa ser governada principalmente por convecção. Este trabalho investigou o potencial de membranas de fibras ocas de álcool poli(etileno)vinílico (PEVA) com íons metálicos imobilizados para a purificação de pró-insulina recombinante com cauda de poli(histidina) (PIS) a partir de soluções não clarificada (PIS-NC) (obtida após solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise) e clarificada (PIS-C) (obtida após a centrifugação da solução não clarificada). Com este objetivo, experimentos de adsorção foram realizados com fibras finamente cortadas e em módulo de filtração. Inicialmente as membranas de PEVA cortadas foram ativadas e o agente quelante ácido iminodiacético (IDA) foi imobilizado, sendo estas membranas modificadas denominadas PEVA-IDA. A seguir, dentre as membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> (Me<sup>2+</sup> equivalente aos íons Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup>), PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> foram as que apresentaram melhor eficiência para adsorção de pró-insulina (90 e 97% do total de proteína alimentada, respectivamente), sendo então selecionadas para a purificação de PIS a partir das soluções PIS-NC e PIS-C. As membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram melhor seletividade e capacidade de adsorção de PIS a partir de PIS-C e PIS-NC (29 e 26% de PIS adsorvida, respectivamente) do que as membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> (7 e 0% de PIS adsorvida, respectivamente), sendo este adsorvente selecionado para a continuação do trabalho. A adsorção de PIS nas membranas cortadas foi avaliada através da cinética e isoterma de adsorção utilizando, respectivamente, a expressão da taxa de variação da concentração de proteína na fase líquida com o tempo e o modelo de Langmuir. A seguir, foi construído, um módulo de filtração, no qual as membranas foram ativadas e IDA foi imobilizado (protocolos equivalentes aos utilizados para as fibras cortadas). Através de experimentos de filtração, determinou-se curvas de ruptura e a capacidade dinâmica para a adsorção de PIS a partir das soluções PIS-NC e PIS-C. As capacidades de adsorção de próinsulina das fibras cortadas, módulo de filtração e gel foram comparadas. As membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> cortadas e o módulo de filtração apresentaram menor capacidade de adsorção de PIS (4,0 e 4,62 mg/g seca, respectivamente) do que o gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> (12,26 mg/g seco). Visando melhorar o desempenho das membranas de PEVA, estas foram ativadas e um método de polimerização foi utilizado para a imobilização do ligante ácido vinilbenziliminodiacético (VBIDA) nas membranas, sendo após este procedimento, denominadas PEVA-VBIDA. As membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>, apesar de maior densidade de ligantes (148 μmol de Ni<sup>2+</sup>/g seca), demonstraram capacidades de adsorção de PIS de 2,4 e 8,0 vezes menores, quando alimentadas com, respectivamente, soluções PIS-C e PIS-NC, do que PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (37 μmol de Ni<sup>2+</sup>/g seca). Contudo, apesar das membranas terem apresentado menor capacidade de adsorção de PIS em relação ao gel, a possibilidade de processar soluções contendo material particulado sem a necessidade de prévia clarificação, tornam este suporte vantajoso para a purificação de proteínas.

### ABSTRACT

The Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) is a technique that has been used for the purification of recombinant proteins that have a polyhistidine tag coupled at the N or C-terminal portion. The use of membranes has been proposed as an alternative to the agarose gels traditionally employed in IMAC. The main advantange of membranes systems is that the mass transfer is mainly governed by convection. In this work, we investigated the potential of poly(ethylene) vinyl alcohol (PEVA) hollow fibers membranes containing immobilized metal ions for the purification of recombinant His-tag human proinsulin (PIS) from non-clarified (PIS-NC) (obtained after inclusion body solubilization and sulfonation reaction) and clarified (PIS-C) (obtained after centrifugation of nonclarified solution) solutions. Adsorption experiments were carried out using fixed bed (finelly cut fibers) composed of column and filtration module. In the first part of this work, fixed bed experiments aimed to select a metal ion of high efficiency in adsorbing the proinsulin in terms of capacity, selectivity and kinetics. Initially, finely cut PEVA hollow fiber membranes were activated and then iminodiacetic acid (IDA) was immobilized on them. These modified membranes were named PEVA-IDA. Then, among PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> membranes (PEVA-IDA onto which different metal ions - Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup>- were immobilized), PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> and PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> showed higher efficiency for proinsulin adsorption (90 and 97% of total fed protein, respectively), and they were selected for PIS purification from PIS-NC and PIS-C solutions. The PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> membranes presented better PIS selectivity and adsorption capacity for the PIS-C and PIS-NC solutions (29 and 26% of PIS adsorbed, respectively) than PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> (7 and 0% of PIS adsorbed, respectively). In the second part of this work a filtration module was built, and their membranes were activated and IDA and the Ni<sup>2+</sup> ion were immobilized using similar protocols used for cut membranes. The breakthrough curves and the dynamic capacity of this module for the PIS adsorption from PIS-NC and PIS-C solutions were determined. The PIS adsorption capacities using cut fibers, filtration module and Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> were compared. The PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finely cut membranes and the filtration module presented lower adsorption capacity (4.00 and 4.62 mg/g dry, respectively) than Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> (12.26 mg/g dry). Aiming to improve the

performance of PEVA membranes, they were activated and the iminodiacetic vinylbenzyl acid (VBIDA) was immobilized to them. After this procedure the membranes were named PEVA-VBIDA. The PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> membranes, in spite of the high ligand density (148  $\mu$ mol of Ni<sup>2+</sup>/g dry), demonstrated lower adsorption capacities for proinsulin when PIS-C and PIS-NC solutions were used as feed (2.4 and 8.0-fold, respectively) than those obtained in PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (37  $\mu$ mol of Ni<sup>2+</sup>/g dry). However, even through PEVA membranes presented a lower PIS adsorption capacity than Sepharose gel, the possibility of processing solutions containing particulate material without prior clarification, makes this support advantageous for protein purification.

# SUMÁRIO

Resumo				
Abstract	XV			
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVO	1			
1.1. Introdução	1			
1.2. Objetivo	3			
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5			
2.1. Recuperação e purificação de proteínas recombinantes	5			
2.2. Cromatografia de afinidade por quelato metálico	7			
2.2.1. Escolha do agente quelante	8			
2.2.2. Seleção do íon metálico	9			
2.2.3. Mecanismos de adsorção e dessorção	11			
2.3. Pró-insulina recombinante: Obtenção e purificação	13			
2.4. Membranas de afinidade				
2.4.1. Princípio de adsorção				
2.4.2. Configuração das membranas e modos de operação				
2.4.3. Seleção de membranas				
2.4.4. Modificações químicas em membranas de afinidade	23			
2.5. Determinação de parâmetros de adsorção	25			
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	29			
3.1. Materiais				
3.2. Metodologia	31			
3.2.1. Ativação das fibras ocas finamente cortadas e imobilização de agente que	elante			
3.2.1.1. Ativação com epicloridrina e imobilização de IDA				
3.2.1.2. Síntese do agente quelante ácido vinilbenziliminodiacético (VBIDA)	)32			
3.2.1.3. Ativação com cloreto de metacriloil e polimerização das fibras ocas	para a			
imobilização de VBIDA				
3.2.2. Ativação das fibras ocas no módulo e imobilização do agente quelante				

3.2.2.1. Construção do módulo de filtração de membranas de fibras ocas de PEVA	6
3.2.2.2. Ativação das membranas de PEVA contidas no módulo com epicloridrina	ט דיי
3.2.2.3. Imobilização de IDA nas membranas de PEVA ativadas com epicloridrina	/ 0
3.2.3. Determinação da densidade de ligantes imobilizados	8 8
3.2.3.1. Determinação da densidade de ligantes imobilizados nas fibras cortadas3	8
3.2.3.2. Determinação da densidade de ligantes imobilizados nas fibras ocas	
contidas no módulo	9
3.2.4. Determinação de proteína total	0
3.2.5. Adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Me <sup>2+</sup>	0
3.2.6. Experimentos cromatográficos em PEVA-IDA-Me <sup>2+</sup> , PEVA-VBIDA-Me <sup>2+</sup> e	
Sepharose-IDA-Ni <sup>2+</sup>	1
3.2.6.1. Adsorção de PIS a partir de soluções clarificada e não clarificada4	1
3.2.6.2. Adsorção de proteínas altamente purificadas: Imunoglobulina G humana,	
lisozima, albumina do soro bovino e pró-insulina sulfonada recombinante4	2
3.2.7. Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados: Determinação da	
isoterma de adsorção de pró-insulina4	3
3.2.8. Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup> 4	4
3.2.9. Experimentos de filtração no módulo PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	5
3.2.10. Determinação de pró-insulina recombinante sulfonada (PIS) por cromatografia	ł
líquida de alta eficiência (HPLC) (modificado da BIOMM, Montes Claros, MG)4	8
3.2.11. Eletroforese SDS-PAGE	9
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	1
4.1. Eletroforese SDS-PAGE das amostras de pró-insulina humana recombinante5	1
4.2. Membranas de PEVA finamente cortadas: Ativação, imobilização de IDA e	
determinação da densidade de ligantes	2
4.3. Adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Me <sup>2+</sup>	4
4.4. Adsorção de PIS a partir das soluções clarificada e não clarificada em membranas	
$PEVA-IDA-Ni^{2+} e PEVA-IDA-Cu^{2+}$	8
4.4.1. Adsorção de PIS a partir de solução clarificada	8

· ·

4.4.2. Adsorção de PIS a partir de solução não clarificada	61
4.4.3. Análise comparativa da adsorção de PIS em PEVA-IDA-Cu <sup>2+</sup> e PEVA-IDA	7-
Ni <sup>2+</sup>	63
Soluções alimentadas na coluna	64
4.5. Determinação da capacidade máxima de adsorção, da constante de dissociação	e dos
parâmetros cinéticos da adsorção de PIS em membrana PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	66
4.5.1. Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados	66
4.5.2. Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	68
4.6. Experimentos de filtração em módulo de membranas PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	72
4.6.1. Determinação da densidade de ligantes das membranas de PEVA-IDA cont	tidas
no módulo	72
4.6.2. Seleção do modo operacional para a filtração de PIS no módulo PEVA-IDA	4-
Ni <sup>2+</sup>	73
4.6.3. Determinação das curvas de ruptura de PIS a partir de soluções PIS-IMAC	,
clarificada (PIS-C) e não clarificada (PIS-NC)	77
4.6.3.1. Curvas de ruptura de PIS a partir da solução PIS-IMAC	77
4.6.3.2. Curvas de ruptura de PIS a partir de solução clarificada (PIS-C)	79
4.6.3.3. Curvas de ruptura de PIS a partir de solução não clarificada (PIS-NC).	82
4.6.4. Capacidade dinâmica do módulo PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	84
4.6.5. Efeito do tempo de residência no desempenho do módulo PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	88
4.7. Potencial de utilização das membranas PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup> : Comparação entre gén	is
tradicionais e membranas	91
4.8. Avaliação do efeito do aumento da densidade de ligantes na capacidade de adso	эrção
de PIS	94
4.8.1. Membranas de PEVA finamente cortadas: Ativação com cloreto de metacr	iloil,
imobilização de VBIDA e determinação da densidade de ligantes	94
4.8.2. Adsorção de PIS a partir das soluções clarificada e não clarificada: Compa	ração
do desempenho de membranas PEVA-VBIDA-Ni <sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	96
4.10. Adsorção de proteínas altamente purificadas em PEVA-VBIDA-Me <sup>2+</sup> e PEVA	A-
IDA-Me <sup>2+</sup>	100
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	105
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS	109

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
APÊNDICE A	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.3: Representação da estrutura de pró-insulina: cadeias A e B (em vermelho) e peptídeo C (em cinza) (www.sh.isuhsc.edu/intragrad/foundations/217/aw/5)......14

Figura 2.4: Esquema das etapas de recuperação e purificação de pró-insulina humana recombinante contendo uma cauda de poli(histidina) (modificado de Petrides *et al.*, 1995 e adaptado de Tikhonov *et al.*, 2001).

Figura 3.1: Ativação e imobilização do agente quelante IDA em membranas de Pl	EVA.
Estrutura proposta da membrana PEVA-IDA.	32
Figura 3.2: Reação de ativação das membranas de PEVA. Estrutura proposta pa	ara a
membrana ativada	33

Figura	3.3:	Polimerização	e	imobilização	de	VBIDA.	Estrutura	proposta	para	as
membra	nas P	EVA-VBIDA	•••••	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••						.35
Figura	3.4: E	squema do mód	ulo	construído de	fibr	as ocas de	PEVA		•••••	.36
Figura	3.5: N	/lodos de lavage	m c	las fibras de Pl	EVA	no módu	lo de filtraç	ção		.37
Figura	<b>3.6:</b> E	Esquema da mon	tag	em experimen	tal p	oara a ativa	ação das m	embranas	de PE	VA

 Figura 3.7: Esquema experimental para a obtenção da cinética e isoterma de adsorção

 (Figura adaptada de Lucena, 1999).

Figura 4.1: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixas 1, 5 e 6: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixa 2: PISR. Faixa 3: PIS-IMAC. Faixa 4: PIS-NC. Faixa 7: PIS-C. 52

**Figura 4.3:** Cromatografia para adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (em leito de partículas). Alimentação de 2,8 mL de solução a 5,5 mg/mL. Tampões de lavagem: (A) Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 de imidazol; (B) Tampão A e (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampão de eluição (D) Tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Volume das frações: 2,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Linha preta: concentração de imidazol – Linhas coloridas: picos obtidos durante a cromatografia.......55

Figura 4.4: Cromatografia para adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Zn<sup>2+</sup> (em leito de partículas) Alimentação de 2,5 mL de solução a 6,0 mg/mL. Tampões de lavagem: (A) Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A e (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampão de eluição (D) Tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Volume das frações: 2,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Linha preta: concentração de imidazol – Linhas coloridas: picos obtidos durante a cromatografia........56

Figura 4.6: Cromatografia para adsorção de PIS a partir de solução clarificada em membranas de (a) PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e (b) PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Alimentação: 20 mL de solução a 3,5 mg/mL. Tampões de lavagem: (A) Tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A; (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampões de eluição: (D) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,1 M de imidazol; (E) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,3 M de imidazol. (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. (c) Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixa 2: PIS-Ib. Faixa 3: Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Faixa 5: Fração de lavagem da

**Figura 4.7:** Cromatografia para adsorção de PIS a partir de solução não clarificada em membranas de (**a**) PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e (**b**) PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Alimentação: 20 mL de solução a 4,6 mg/mL.Tampões de lavagem: (A) Tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A; (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampões de eluição: (D) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,1 M de imidazol; (E) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,1 M de imidazol; (E) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,3 M de imidazol. (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. (**c**) Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. **Faixa 1:** marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). **Faixa 2:** PIS-Ia. **Faixa 3:** Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>. **Faixa 5:** Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. **Faixa 6:** Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. **62** 

**Figura 4.10:** Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. Concentração inicial de PIS-IMAC: 5,0 mg/mL. Temperatura de 25°C. Curvas experimental () e ajustada (--)...70 **Figura 4.11:** Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. Concentração inicial de PIS-IMAC: 9,0 mg/mL. Temperatura de 25°C. Curvas experimental () e ajustada (--)...70 **Figura 4.14:** Curva de ruptura de proteína total a partir de solução clarificada (PIS-C). Vazão de alimentação de 0,7 mL/min. Vazão de filtrado de 0,5 mL/min. Volume coletado: frações de 2,0 mL. Frações do filtrado analisadas pelo método de Bradford.......80

Figura 4.18: Curva de Ruptura de PIS no filtrado a partir de solução não clarificada (PIS-NC), determinada em análise por HPLC.
83
Figura 4.19: Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixas 1 e 9: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixas 2 a 8: frações 2 a 8 do filtrado.
Faixas 10 a 16: frações 10 a 16 do filtrado.

Figura 4.20 : Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Filtração no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> com injeção tangencial e recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL. Faixas 1 e 7: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Filtração de solução clarificada. Faixa 2: Fração da injeção. Faixa 3: Fração do retentado. Faixa 4: Fração das etapas de lavagem. Faixa 5: Fração das etapas de eluição. Filtração de solução não clarificada. Faixa 8: Fração da injeção. Faixa 9: Fração do retentado. Faixa 10: Fração das etapas de lavagem. Faixa 11: Fração das etapas de eluição. Faixas 6 e 12: marcador de PIS de alta pureza.

**Figura 4.22:** Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida homogêneo 20%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: solução não clarificada. Faixa 2: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 3: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> VBIDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 4: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 5: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 5: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 5: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 5: Inação de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 5: Inação de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 5: Inação de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 5: Inação de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 6: PIS purificada por IMAC (BIOMM).

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Especificações da membrana de PEVA.    30
onde:
Tabela 4.1: Valores de densidade de ligantes utilizando membranas de PEVA e géis de
agarose com IDA imobilizado
Tabela 4.2: Quantidade de PISR obtida nas etapas de lavagem, eluição e regeneração
durante as cromatografias em membranas PEVA-IDA-Me <sup>2+</sup> utilizando PISR
<b>Tabels 4.3</b> Quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etanas de lavagem eluição e
regeneração durante as cromatografias em membranas PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu <sup>2+</sup>
analisadas respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC
Tabela 4.4: Quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e
regeneração durante as cromatografias em membranas PEVA-IDA-Ni $^{2+}$ e PEVA-IDA-Cu $^{2+}$ ,
analisadas, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC61
Tabela 4.5: Quantidades de proteína total e PIS obtidas nas etapas de lavagem e eluição
referentes às cromatografias em membranas PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu <sup>2+</sup> com
diferentes soluções de alimentação
Tabela 4.6 : Parâmetros determinados para a adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-
Ni <sup>2+</sup>
Tabela 4.7: Constantes de adsorção (k <sub>a</sub> ) e dessorção (k <sub>d</sub> ) de PIS em membranas PEVA-
IDA-Ni <sup>2+</sup>

Tabela 4.15 : Adsorção de IgG, PIS, lisozima e BSA em membranas PEVA-E	$-IDA-Me^{2+}e$
PEVA-VBIDA-Me <sup>2+</sup>	101

## LISTA DE NOMENCLATURAS

PEVA = Álcool poli(etileno)vinílico;

IMAC = Cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado;

VBIDA = Ácido vinilbenziliminodiacético;

IDA = Ácido iminodiacético;

EDTA = Ácido etilenodiamino tetracético;

HEMA = Hidroxietilmetacrilato;

AIBN =  $\alpha$ ,  $\alpha$ ' azoisobutironitrilo;

PEVA-IDA = Membranas de PEVA ativadas com epicloridrina contendo o agente quelante IDA imobilizado;

PEVA-VBIDA = Membranas de PEVA ativadas com cloreto de metacriloil contendo o agente quelante VBIDA imobilizado;

Sepharose-IDA = Gel de agarose ativado com epicloridrina contendo o agente quelante IDA imobilizado;

PISR = Pró-insulina sulfonada purificada por IMAC e por troca iônica e renaturada;

PIS-IMAC = Pró-insulina sulfonada purificada por IMAC;

PIS-NC = Solução obtida após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise;

PIS-C = Solução obtida após a solubilização dos corpos de inclusão, sulfitólise e centrifugação;

PIS = Pró-insulina sulfonada quantificada por HPLC;

HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência;

k<sub>a</sub> = Constante cinética de adsorção;

k<sub>d</sub> = Constante cinética de dessorção;

Q = Quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente;

C = Concentração de soluto livre em solução;

Q<sub>m</sub> = Capacidade máxima do adsorvente;

t = Tempo;

K<sub>d</sub> = Constante de dissociação da reação em equilíbrio;

Ceq = Concentração de soluto em equilíbrio com o adsorvente;

V = volume total do tanque agitado;

m = Massa do adsorvente;

 $C_0 = Concentração inicial de proteína em solução;$ 

• •

- $\eta = Razão$  massa ou volume de adsorvente e o volume da solução protéica no tanque;
- Q<sub>f</sub> = Vazão do filtrado;
- Q<sub>i</sub> = Vazão de alimentação;
- t<sub>R</sub> = Tempo de residência;
- $V_i$  = Volume intersticial das membranas;
- A = Área superficial das membranas;
- $r_i = Raio$  interno das membranas;
- L = Comprimento das membranas;
- N = Número de fibras;
- $V_m$  = Volume das membranas;
- $r_0 = Raio$  externo das membranas;

## Introdução e objetivo

# **CAPÍTULO** 1

## INTRODUÇÃO E OBJETIVO

### 1.1. Introdução

O recente avanço da Biotecnologia nas últimas décadas, particularmente em relação à tecnologia de DNA recombinante, tem possibilitado intenso desenvolvimento da produção em larga escala de proteínas e peptídeos para a preparação de fármacos. O meio a partir do qual estas proteínas são produzidas é, de uma maneira geral, complexo, contendo sólidos dissolvidos e biomassa em suspensão de várias massas moleculares e tamanhos, respectivamente. A recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) a partir do meio de cultivo é uma etapa crítica e, muitas vezes, a de maior custo do bioprocesso, uma vez que, na maioria dos casos, é necessário a obtenção da substância ativa com alto grau de pureza. Para alcançar o grau de pureza desejado, seja para a proteína acumulada no interior das células ou excretada para o meio, são requeridas uma série de etapas de purificação, através de uma combinação de diferentes operações unitárias.

Os avanços da engenharia genética tem possibilitado a incorporação de caudas ("tag") de proteínas ou peptídeos na proteína de interesse, tais como  $\beta$ -galactosidase, proteína A, poli(arginina), poli(histidina) e outras. A proteína híbrida resultante apresenta algumas das características físico-químicas inerentes ao "tag" que facilitam a subseqüente purificação. Finalizada a etapa de purificação, a ligação entre a cauda e a proteína alvo pode ser rompida empregando métodos químicos ou enzimáticos que preservam a estrutura e atividade da proteína de interesse (Flaschel e Freihs, 1993).

A fusão de uma sequência de seis histidinas na porção C- ou N-terminal da proteína alvo tem sido bastante utilizada e confere à mesma a possibilidade de purificação através da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Esta técnica, a qual explora a interação entre os resíduos de histidina da cauda acoplada e o íon metálico imobilizado (Porath *et al.*, 1975; Porath e Olin, 1983; Sulkowski, 1985 e Sulkowski, 1989), tem sido muito utilizada para a purificação de proteínas recombinantes devido a seu baixo custo, especificidade, alta capacidade, condições brandas de eluição da proteína adsorvida e facilidades de regeneração do adsorvente e de ampliação de escala (Vijayalakshmi, 1989; Hochuli, 1988a, 1988b e Oswald *et al.*, 1997).

Embora a técnica de acoplamento de caudas nas proteínas recombinantes proporcione maior simplicidade de operação, a purificação da proteína alvo dificilmente pode ser efetuada em uma única etapa. Com o intuito de minimizar o número de etapas, o tempo e o custo do processo de separação, várias estratégias de recuperação tem sido propostas. Uma delas é a técnica de filtração em membranas de afinidade, a qual integra separação sólido-líquido e a purificação em uma única etapa, muitas vezes sem comprometimento da eficiência da purificação. Desta forma, a proteína recombinante pode ser recuperada diretamente a partir do meio de cultivo de microrganismos ou células rompidas, sem a necessidade de remoção prévia dos sólidos suspensos (Anspach *et al.*, 1989 e Weissenbom *et al.*, 1997).

A adsorção em membranas de afinidade é mais vantajosa que a adsorção em leitos fixos de partículas porosas tradicionais (geralmente géis), devido ao fato da transferência de massa ser governada principalmente pela convecção (a difusão nos poros é negligenciável), possibilitando o tratamento de grandes volumes por unidade de tempo empregando-se pressões moderadas (Suen *et al.*, 2003; Charcosset, 1998; Roper e Lightfoot, 1995; Thömmes e Kula, 1995; Klein, 1991 e Brandt *et al.*, 1988).

Apesar das membranas de afinidade, tanto na configuração plana, como na de fibras ocas, serem muito empregadas para a purificação de proteínas diversas, a literatura consultada registra poucos artigos sobre a purificação de proteína recombinante empregando-se membranas contendo íons metálicos imobilizados, sendo eles os trabalhos desenvolvidos por Reif *et al.* (1994), os quais empregaram membranas de copolímero hidrofilico-IDA-Ni<sup>2+</sup> (Sartorius, Alemanha) para a purificação de endonuclease recombinante contendo uma cauda com seis histidinas, Tsai *et al.* (2001), que utilizaram membranas planas de poli(fluoreto) de vinilideno (PVDF)-IDA-Cu<sup>2+</sup> para a purificação de fator de crescimento de hepatócito e Liu *et al.* (2003) que utilizaram membranas planas de celulose-IDA-Cu<sup>2+</sup> para a purificação de penicilina G acilase recombinante.

2

## 1.2. Objetivo

Esse trabalho visou investigar o potencial de utilização de membranas de fibras ocas de álcool poli(etileno)vinílico (PEVA) como suporte de afinidade para a purificação, através da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), de próinsulina humana sulfonada recombinante contendo uma cauda de poli(histidina). A etapa objeto deste estudo corresponde no processo de obtenção de insulina à purificação de próinsulina recombinante após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise. Para tal foram utilizadas as soluções denominadas não clarificada (solução obtida após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise) e clarificada (solução obtida após solubilização dos corpos de inclusão, sulfitólise e centrifugação). A possibilidade de processamento de soluções contendo sólidos em suspensão (o que seria impossível em colunas de leito fixo) e a quase inexistência de trabalhos publicados sobre o emprego de membranas de afinidade com íon metálico imobilizado para a purificação de proteínas recombinantes serviram de motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

Para serem utilizadas como suportes em IMAC, as membranas de PEVA foram modificadas através de dois métodos: pelo método tradicional utilizado para géis de agarose (ativação com epicloridrina e imobilização do agente quelante ácido iminodiacético (IDA)) e, com o objetivo de aumentar a densidade de ligantes imobilizados nas membranas de PEVA, foi desenvolvida uma técnica de polimerização para a imobilização do agente quelante (ácido vinilbenziliminodiacético) (VBIDA) nas membranas. O VBIDA é um monômero sintetizado inicialmente por Morris *et al.* (1959), e tem sido polimerizado juntamente com etileno glicol dimetacrilato, para o recobrimento de partículas de sílica destinadas a separação de enantiômeros através da técnica "molecular imprinting" (Vidyasankar *et al.*, 1997). Não há relatos na literatura do emprego do VBIDA como agente quelante em sistemas IMAC.

# CAPÍTULO 2

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste capítulo são abordados conhecimentos básicos e relevantes para a compreensão deste trabalho. A revisão da literatura é dividida em cinco tópicos: recuperação e purificação de proteínas recombinantes, cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado, obtenção e purificação de pró-insulina recombinante, membranas de afinidade e determinação de parâmetros de adsorção.

#### 2.1. Recuperação e purificação de proteínas recombinantes

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante tem, nos últimos anos, possibilitado a produção em larga escala de várias proteínas e peptídeos destinados a aplicações terapêuticas. A recuperação e purificação do produto é uma etapa fundamental onde é desejável a obtenção de alta pureza associado a um baixo custo. Através da tecnologia do DNA recombinante, proteínas podem ser obtidas intra ou extracelularmente em uma célula hospedeira, sendo comumente utilizada a bactéria *Escherichia coli* por ser considerado um microrganismo modelo de características genéticas bem conhecidas. Estas proteínas são denominadas heterólogas podem ser obtidas na célula hospedeira em altas concentrações na forma de agregados densos de proteína inativa, chamados corpos de inclusão ou em concentrações menores na forma solúvel. Em sistemas bacterianos, geralmente as proteínas são obtidas intracelularmente como corpos de inclusão e representam 25% ou mais da proteína total no material produzido (Dyr e Suttnar, 1997 e Bailey e Meagher, 2000).

Durante a produção de uma proteina recombinante, somente a etapa de recuperação e purificação representa cerca de 60 a 70% dos custos operacionais. A recuperação e

purificação de um produto recombinante exige basicamente a remoção de fragmentos celulares, de alguns precursores de proteína e de impurezas e contaminantes derivados da cultura de células.

No caso das proteínas obtidas sob a forma de corpos de inclusão, a recuperação pode ser efetuada de acordo com os seguintes passos:

- Rompimento da célula hospedeira através de sonicação ou no caso de operações em larga escala, emprega-se um homogeinizador de alta pressão associado com um prétratamento enzimático para reduzir a quantidade de fragmentos celulares;
- 2. Separação dos corpos de inclusão por centrifugação;
- 3. Inativação viral (quando necessário), por exemplo, por microondas;
- Solubilização dos corpos de inclusão com desnaturantes como uréia, guanidina, ácido clorídrico ou dodecilsulfato de sódio (Dyr e Suttnar, 1997 e Bailey e Meagher, 2000).

A solubilização dos corpos de inclusão resulta em uma mistura complexa, que além da proteína principal, contém peptídeos, monômeros e constituintes celulares com características distintas (tamanho, carga e hidrofobicidade) que dificultam o processo de purificação. Como consequência, a purificação da proteína exige uma série de etapas, cuja finalidade é a obtenção de um produto final concentrado e biologicamente ativo. Atualmente, os processos industriais empregam várias metodologias, tais como precipitação, extração líquido-líquido, filtração em gel, filtração em membranas e as cromatografias de afinidade, de interação hidrofóbica, de troca iônica e de fase reversa que, em combinação, resultam em produtos com elevado grau de pureza. Em tais processos, geralmente é necessário uma sequência de múltiplos passos cromatográficos, dos quais a cromatografia por afinidade destaca-se como um dos métodos mais eficientes em termos de purificação (Dyr e Suttnar, 1997 e Bailey e Meagher, 2000).

Um aumento na seletividade e diminuição do número de etapas cromatográficas do processo de purificação de proteínas recombinantes tem sido alcançado com a incorporação de caudas ("tag") de proteínas ou peptídeos na proteína de interesse. A proteína híbrida resultante apresenta características físico-químicas inerentes à cauda que facilitam a subsequente purificação por técnicas tais como cromatografias de troca iônica, de interação hidrofóbica ou de afinidade. Finalizada a etapa de purificação, a ligação entre a cauda e a

proteína alvo pode ser rompida para, assim, se poder separar esta proteína alvo na sua forma final. Esta cisão da cauda pode ser efetuada empregando-se métodos enzimáticos ou químicos que preservam a estrutura e a atividade da proteína de interesse. Uma variedade de caudas tem sido acopladas visando a purificação da proteína de interesse:  $\beta$ -galactosidase, glutationa S-transferase, proteína A, pequenos peptídeos - poli(arginina), poli(lisina) ou poli(histidina) - e sistemas baseados na seqüência de reconhecimento por anticorpos monoclonais imobilizados como os peptídeos "Flag" (Flaschel e Freihs, 1993).

A fusão de sequência de seis histidinas na porção C ou N-terminal da proteína alvo tem sido bastante utilizada e confere à mesma a possibilidade de purificação através da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC - "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography"). Esta técnica explora a interação entre grupos doadores de elétrons na proteína (como resíduos de histidina, cisteína, triptofano, arginina, lisina, metionina, asparagina, glutamina e tirosina) principalmente os resíduos de histidina da cauda acoplada, triptofano e cisteína e o íon metálico imobilizado (Porath *et al.*, 1975; Porath e Olin, 1983; Sulkowski, 1985 e Sulkowski, 1989), além da contribuição de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. A interação destes resíduos (histidina, triptofano e cisteína) com íons metálicos decorre de uma ligação de coordenação entre os grupamentos imidazol, indol e tiol, respectivamente e o ligante: um íon metálico quelatado por agentes tais como ácido iminodiacético (IDA) ou ácido nitrilotriacético (NTA).

### 2.2. Cromatografia de afinidade por quelato metálico

A técnica de cromatografia IMAC, introduzida por Porath e colaboradores (1975), é baseada na capacidade que as proteínas têm de serem reversivelmente ligadas aos íons metálicos através de ligações de coordenação, onde a proteína atua como uma base de Lewis, doando elétrons para o íon metálico (Porath *et al.*, 1975; Sulkowski, 1985 e Wong *et al.*, 1991). O metal que interage com a proteína encontra-se imobilizado por meio de um agente quelante, que por sua vez está ligado covalentemente, via um espaçador (epicloridrina ou bisoxirano, por exemplo), à matriz. As interações entre o íon metálico imobilizado e a proteína são complexas e combinam efeitos eletrostáticos, hidrofóbicos e de coordenação. Geralmente, todos os três tipos de interação devem ser considerados, no entanto, nem sempre é possível determinar suas relativas contribuições (Sharma e Agarwal,

2001). Estudos realizados com proteínas padrão (Sulkowski, 1985 e Belew *et al.*, 1987) e aminoácidos (Hemdan e Porath, 1985) comprovaram a importância dos resíduos de histidina, cisteína e triptofano entre os aminoácidos presentes nas proteínas para ligações de coordenação com os íons metálicos imobilizados.

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados demonstrou ser eficiente na purificação de várias proteínas (Wong *et al.*, 1991) e, recentemente, com o advento da engenharia genética, proteínas que na sua forma original não possuíam histidinas disponíveis para ligação com íons metálicos imobilizados, recebem através de técnicas de recombinação genética, uma cauda de histidina que possibilita sua purificação por IMAC.

Há muitas vantagens na utilização de IMAC como técnica de purificação, graças à sua versatilidade em relação aos adsorventes de afinidade. Diferentes metais podem ser imobilizados na mesma matriz cromatográfica e podem ser facilmente removidos através de agentes competidores fortes (ex: EDTA) (alimentados na coluna) sem que haja perda da capacidade da matriz. Métodos de separação específicos podem ser empregados para cada tipo de proteína, apenas com a escolha adequada do metal e das condições de eluição (Wong *et al.*, 1991). Além do seu uso em purificação, IMAC também pode ser utilizado no estudo da estrutura das proteínas. O conhecimento das interações metal-proteína pode ser uma ferramenta no estudo da interação entre a proteína e outras moléculas, como por exemplo, a relação entre enzima-inibidor (Wong *et al.*, 1991).

Em IMAC, o processo de purificação depende de vários fatores, como a escolha da matriz, que deve possuir basicamente as mesmas características requeridas aos outros suportes utilizados em cromatografias de afinidade, do agente quelante, do ion metálico e das condições de adsorção e dessorção para que a interação entre a proteína e o metal seja favorecida e resulte em alta recuperação e seletividade.

### 2.2.1. Escolha do agente quelante

Os ions metálicos são imobilizados através de um agente quelante covalentemente ligado à matriz. Vários agentes quelantes são utilizados em IMAC, dentre eles o carboximetil etileno diamino (TED), o ácido nitrilotriacético (NTA), o ácido carboximetil aspártico (CM-Asp), o tetraetilenopentamina (TEPA), ácido carboximetil  $\alpha$ ,  $\beta$  diamino

succínico (CM-DASA) e o ácido iminodiacético (IDA). Em geral, quanto mais polidentado o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos, porém, já que permanecem poucos sítios disponíveis para a ligação da proteína, esta pode ser adsorvida apenas fracamente. A ligação entre o ligante e o íon metálico é chamada de efeito quelato, por ser mais forte e mais estável do que a formação de um complexo de coordenação. O ácido iminodiacético (IDA) é o ligante mais utilizado em IMAC, sendo um composto tridentado que ocupa três sítios de coordenação ao quelatar o íon metálico. No caso de íons hexacoordenados, três sítios são ocupados pelo IDA e os outros três ficam disponíveis para a ligação com a proteína (Wong *et al.*, 1991). A representação esquemática do complexo IDA-Me<sup>2+</sup>, em gel de agarose ativado com epicloridrina está apresentada na Figura 2.1.



Figura 2.1: Representação esquemática da formação do complexo IDA-Me<sup>2+</sup> em uma superfície sólida ativada com epicloridrina (Figura adaptada de Gaberc-Porekar e Menart, 2001).

### 2.2.2. Seleção do íon metálico

Um fator fundamental na técnica de IMAC é a escolha do íon metálico a ser imobilizado. De um modo geral, qualquer metal capaz de interagir com as proteínas pode ser utilizado em IMAC, porém, Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, são os íons metálicos mais comumente empregados. Os íons metálicos Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos acessíveis de histidina, triptofano e cisteína, onde os metais interagem com os grupamentos imidazol, indol e tiol

(Figura 2.2), respectivamente, de cada aminoácido. Os íons  $Fe^{3+}$  e Al<sup>3+</sup> ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários podendo ser utilizados para separar fosfoproteínas (Sulkowski, 1988 e Andersson e Porath, 1986) e o íon Ca<sup>2+</sup> coordena o átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos ácidos aspártico e glutâmico, podendo ser utilizado para purificação de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos (Mantovaara *et al.*, 1991).



**Figura 2.2:** Representação dos grupamentos imidazol, indol e tiol, respectivamente, dos aminoácidos histidina, triptofano e cisteína (R corresponde à estrutura CH<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>COOH) (Lehninger, 1984).

Em 1989, Sulkowski, utilizando tampão fosfato 20 mM a pH 7,0 e 1,0 M NaCl, estudou a importância dos resíduos de histidina acessíveis presentes em proteínas e peptídeos na separação por IMAC e determinou regras de interação entre estes resíduos com adsorventes contendo IDA-Cu<sup>2+</sup>, IDA-Ni<sup>2+</sup>, IDA-Co<sup>2+</sup> e IDA-Zn<sup>2+</sup>, que são as seguintes:

I. A presença de pelo menos um resíduo de histidina disponível na superficie da proteína para a coordenação é suficiente para a retenção da mesma em um gel de IDA-Cu<sup>2+</sup>;

 II. A presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma mais forte retenção da proteína em um gel de IDA-Cu<sup>2+</sup>;

III. A presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação é requerida para a retenção em um gel de IDA-Ni<sup>2+</sup>;

IV. A presença de dois resíduos histidina espacialmente localizadas em uma  $\alpha$ -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em géis de IDA-Zn<sup>2+</sup> e de IDA-Co<sup>2+</sup>;

V. A retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina vicinais será mais forte, em todos os géis IDA-Me<sup>2+</sup>, do que a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

Como resultado desta regra, ele pôde determinar uma ordem crescente de força de retenção de proteínas (determinada pela eluição das proteínas por abaixamento de pH) contendo histidinas acessíveis, em géis IDA-Me<sup>2+</sup>, da seguinte forma:  $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \ge Co^{2+}$ .

#### 2.2.3. Mecanismos de adsorção e dessorção

Como já mencionado, em IMAC a adsorção de proteínas ocorre através de uma ligação de coordenação, onde a proteína doa pares de elétrons ao metal que está imobilizado. Embora muitos resíduos de aminoácidos (asparagina, glutamina, tirosina, cisteína, arginina, lisina, metionina, e histidina) podem participar da ligação, a retenção das proteínas em IMAC tem sido baseada primariamente na disponibilidade de resíduos de histidina na superfície. Esta adsorção é favorecida em uma faixa de pH alcalino (entre 6 e 8) onde os nitrogênios do anel imidazol dos resíduos de histidina estão na forma desprotonada. O grupamento tiol das cisteínas se no estado reduzido também pode contribuir para a interação com o metal (Sulkowski, 1985 e Gaberc-Porekar e Menart, 2001). Cadeias aromáticas de triptofano, fenilalanina e tirosina podem contribuir para as interações em IMAC, quando vicinais a resíduos de histidina acessíveis. (Gaberc-Porekar e Menart, 2001). Além dos resíduos de aminoácidos, as extremidades N-terminal das proteínas também participam diretamente na interação com o metal imobilizado.

Além do pH, a força iônica também é uma variável que pode influenciar na adsorção. O quelato metálico imobilizado se encontra altamente solvatado por moléculas de água, possuindo assim elevado número de grupos hidroxila na vizinhança formando uma rede de cargas negativas. Estas cargas sugerem a participação de interações eletrostáticas ou indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos positivamente carregados, na associação da proteína com o quelato. Para diminuir as interações não específicas do tipo

eletrostáticas utiliza-se, em geral, cloreto de sódio adicionado aos tampões, em concentrações que podem variar de 0,1 a 1,0 M (Vijayalakshmi, 1989).

A dessorção das proteínas adsorvidas na matriz cromatográfica pode ser conduzida utilizando-se quatro métodos: 1) abaixamento de pH da fase móvel (pH < 6), ocasionando a protonação de resíduos de histidina; 2) adição de agente competidor, que também possua capacidade de interagir com o metal; 3) deslocamento do complexo metal-proteína utilizando outro agente quelante mais forte (por exemplo, EDTA) e 4) eluição isocrática que consiste na eluição das proteínas a condições constantes (Sulkowiski, 1985). Os métodos mais comumente empregados são o abaixamento de pH e a adição de um agente competidor na fase móvel da cromatografia.

No primeiro caso, abaixamento de pH, alguns cuidados devem ser tomados durante a eluição: 1) utilização de condições ácidas de eluição moderadas, a fim de evitar a desestabilização da biomolécula, acarretando perda irreversível da atividade; 2) cuidados com a possível precipitação isoelétrica das proteínas dentro da coluna, também ocasionada pelas condições de baixo pH (dependendo da proteína em questão); e 3) monitoramento do desprendimento do metal da coluna, causado pelo enfraquecimento da interação entre o agente quelante e o metal imobilizado.

No segundo método, a eluição das proteínas é feita a pH neutro, através de agentes competidores, tais como histidina e imidazol, que competem com a proteína pela ligação com o metal. Este método de eluição é conveniente, pois evita a utilização de condições de baixo pH na recuperação das proteínas adsorvidas na matriz, porém torna-se necessária a introdução de mais uma etapa de processo a fim de eliminar o imidazol do meio contendo a proteína purificada.

O deslocamento do complexo metal-proteína utilizando um agente quelante mais forte, como por exemplo o EDTA, é normalmente utilizado para a regeneração da coluna após o término da etapa de eluição feita através de outro método. Porém, às vezes, a interação entre o metal e a proteína de interesse é tão forte, que o único meio de retirá-la da coluna é proporcionar o deslocamento do metal.

A eluição isocrática é mais utilizada quando a interação entre o metal e a proteína é fraca e para pequenas proteínas e peptídeos. Neste método a eluição é realizada em condições constantes (composição de tampão) como na etapa de lavagem.

12
Nas cromatografias de afinidade, independentemente do ligante utilizado, o fator decisivo para que ocorra a adsorção das biomoléculas, é que elas tenham acesso aos sítios de interação com a matriz, que se encontram no interior dos seus poros. Este acesso pode ser facilitado ou dificultado de acordo com o tipo de matriz utilizada. Dentre as matrizes disponíveis comercialmente, as membranas são as que mais favorecem o transporte de massa até o interior dos poros, portanto, favorecem o processo de adsorção das proteínas nos ligantes imobilizados.

#### 2.3. Pró-insulina recombinante: Obtenção e purificação

A tecnologia de DNA recombinante tem sido empregada na produção de insulina humana desde 1978, quando foram expressados separadamente em *Escherichia coli* os genes artificiais para a obtenção das cadeias A e B, as quais foram interligadas, após purificação, por pontes dissulfeto. Atualmente a insulina humana tem sido obtida a partir da produção de pró-insulina recombinante, uma proteína α-hélice de massa molecular 9,5 kDa a qual contém as cadeias A e B da insulina interligadas por três pontes de dissulfeto e o peptídeo C (Figura 2.3). Esta tecnologia tem como vantagem principal o enovelamento espontâneo para a formação da estrutura de insulina, sendo o peptídeo C posteriormente removido através de clivagem proteolítica (Winter *et al.*, 2002 e Winter *et al.*, 2000).

Geralmente o gene da pró-insulina é expressado em *Escherichia coli*, sob a forma de corpos de inclusão, devido a habilidade deste hospedeiro em multiplicar-se a altas taxas atingindo altas densidades celulares na presença de substratos de baixo custo, além de possuir características genéticas bem definidas. Apesar disto, é difícil a produção de algumas proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, sobretudo as de baixa massa molecular, devido a presença de proteases e peptidases encontradas no citoplasma da bactéria, as quais provocam a degradação do produto. Com o objetivo de contornar este problema, tradicionalmente a pró-insulina humana tem sido produzida sob a forma de proteína fusão, ou seja, acoplada a aminoácidos que a protegem do ataque proteolítico. Uma outra opção seria a produção da proteína no espaço perisplasmático da bactéria, uma vez que a maioria das proteases estão localizadas no citoplasma (Mergulhão *et al.*, 2004).



Figura 2.3: Representação da estrutura de pró-insulina: cadeias A e B (em vermelho) e peptídeo C (em cinza) (www.sh.isuhsc.edu/intragrad/foundations/217/aw/5).

Geralmente os processos de obtenção de pró-insulina humana recombinante relatados na literatura exigem uma ou mais etapas cromatográficas de purificação, onde os géis são as matrizes mais comumente empregadas. Alguns destes trabalhos estão apresentados na Tabela 2.1.

Dentre os processos mencionados (Tabela 2.1), destaca-se a produção de próinsulina com cauda de poli(histidina), a qual tem sido amplamente utilizada pela indústria (como por exemplo, pela BIOMM, Montes Claros, MG), cuja purificação é facilitada por cromatografia de afinidade por ions metálicos imobilizados (IMAC).

Pró-insulina humana recombinante produzida	Etapa(s) cromatográfica(s)	Fonte
Pró-insulina contendo o peptídeo histidina-triptofano	Cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado (IMAC)	Smith <i>et al.</i> (1988)
Pró-insulina	Cromatografía de troca iônica e interação hidrofóbica	Petrides et al. (1995)
Pró-insulina-ZZ*	Cromatografia de afinidade (IgG-Sepharose)	Nilsson <i>et al.</i> (1996) e Mergulhão <i>et al.</i> (2004)
Pró-insulina contendo um cauda de poli(histidina)	Filtração em gel, IMAC e cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP- HPLC).	Mackin (1999)
Pró-insulina	Filtração em gel e cromatografia de troca iônica	Cowley e Mackin (1997)
Pró-insulina contendo DsbA **	Cromatografia de troca iônica	Winter et al. (2000)
Pró-insulina contendo uma cauda de poli(histidina)	Cromatografia de troca iônica seguido por IMAC	Tikhonov et al. (2001)
Pró-insulina	Cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP- HPLC)	Mackin e Choquette (2003)

Tabela 2.1: Produção e purificação de pró-insulina humana recombinante.

\*A pró-insulina-ZZ é pró-insulina contendo uma cauda de afinidade ZZ, ou seja, um domínio de ligação à IgG, baseado no domínio B da proteína A encontrada na parede celular de bactérias *Staphylococcus aureus*.
 \*\* DsbA é uma proteína que favorece a formação correta das pontes de dissulfeto.

Um dos procedimentos, descrito em literatura, para a obtenção de insulina humana a partir da pró-insulina recombinante com cauda de poli(histidina) está esquematizado no diagrama de blocos da Figura 2.4 (modificado de Petrides *et al.*, 1995), cujas etapas de purificação de pró-insulina foram descritas segundo Tikhonov *et al.* (2001).





Figura 2.4: Esquema das etapas de recuperação e purificação de pró-insulina humana recombinante contendo uma cauda de poli(histidina) (modificado de Petrides *et al.*, 1995 e adaptado de Tikhonov *et al.*, 2001).

Primeiramente, ocorre o rompimento da célula hospedeira (*Escherichia coli*) em um homogeinizador de alta pressão. Os corpos de inclusão são, então, separados dos constituintes celulares por centrifugação ou microfiltração e, em seguida, os corpos de inclusão são lavados com soluções tamponantes e solubilizados com uréia e 2- $\beta$ -mercaptoetanol. A pró-insulina recuperada contendo uma cauda de poli(histidina), denominada pró-insulina-His-"tag", é, em seguida, submetida a uma sulfitólise, que rompe

todas as pontes de dissulfeto e adiciona grupos sulfito (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a todos os resíduos de enxofre nas cisteínas. A presença de um agente desnaturante nesta etapa, uréia ou guanidina-HCl, previne o reenovelamento da molécula. A pró-insulina-His-"tag" sulfonada resultante é submetida a etapas de purificação (IMAC e cromatografia de troca iônica) para uma posterior renaturação da molécula com a formação correta das pontes de dissulfeto. A seguir, a proteína renaturada é purificada por cromatografia de interação hidrofóbica, e convertida à insulina pelas enzimas tripsina e carboxipeptidase B. Finalmente, a insulina é submetida às etapas finais de purificação por cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por fase reversa, filtração em gel e cristalização (Petrides *et al.*, 1995 e Tikhonov *et al.*, 2001).

No processo de produção de insulina humana via pró-insulina recombinante, descrito segundo Petrides *et al.* (1995), os custos de recuperação e purificação do produto chegam a quase 97% do custo total (onde aproximadamente 60% do custo total está associado a modificações químicas e etapas intermediárias de purificação, 30% do custo total está associado as etapas finais de purificação e cerca de 7% corresponde a etapa inicial de recuperação), sendo as cromatografias as etapas de mais alto custo do processo, correspondente a quase 70% do custo operacional total.

Em geral os processos de purificação empregam géis de agarose como matrizes cromatográficas, os quais podem apresentar problemas de colmatagem (entupimento) durante o processamento de soluções contendo material particulado devido a limitações difusionais no interior dos poros. A adsorção em membranas de afinidade seria uma alternativa devido ao fato da transferência de massa ser governada principalmente pela convecção, minimizando as limitações difusionais no interior dos poros ocasionadas em vazões elevadas quando empregado géis tradicionais. O fluxo convectivo através das membranas permite o emprego de vazões elevadas de alimentação, resultando em tempos reduzidos para efetuar as etapas de adsorção, lavagem e eluição, em condições moderadas de quedas de pressão, e obtenção de altas taxas de separação de proteína por quantidade de ligante imobilizado. Devido a estes fatores, o emprego de membranas em cromatografia tem demonstrado potencial para o processamento de grandes quantidades de soluções brutas (contendo material particulado) sem a necessidade de uma etapa preliminar de centrifugação para a remoção dos sólidos em suspensão (Suen e Etzel, 1992; Charcosset *et al.*, 1995; Kochan *et al.*, 1996; Zeng e Ruckenstein, 1999 e Zou *et al.*, 2001).

17

A literatura relata poucos trabalhos relacionados ao emprego da técnica IMAC em membranas de afinidade para a purificação de proteínas recombinantes. Reif *et al.* (1994), empregaram membranas de copolímero hidrofilico-IDA-Ni<sup>2+</sup> (Sartorius, Alemanha) para a purificação de endonuclease recombinante contendo uma cauda com seis histidinas e demonstraram que este sistema apresentou seletividade e atividade específica da enzima recuperada similar a obtida pelo gel Sepharose FF-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Tsai *et al.* (2001) utilizaram membranas planas de poli(fluoreto) de vinilideno (PVDF)-IDA-Cu<sup>2+</sup>, as quais demonstraram seletividade para a purificação de fator de crescimento de hepatócito. Liu *et al.* (2003) utilizaram membranas planas de celulose-IDA-Cu<sup>2+</sup> para a purificação de purificação comparáveis aos obtidos comumente em gel de Sepharose-IDA-Cu<sup>2+</sup> (onde a enzima é recuperada após três etapas de eluição) utilizando uma única etapa de eluição e com a vantagem de maior área superficial, menores caminhos difusionais, baixos tempos de residência e menores quedas de pressão.

#### 2.4. Membranas de afinidade

#### 2.4.1. Princípio de adsorção

A cromatografia de adsorção em membranas de afinidade foi introduzida como um método de purificação de bioprodutos a partir de 1980 e desde então as membranas vêm sendo derivatizadas com ligantes biológicos e não biológicos, incrementando-se assim, a utilização destes suportes como matrizes em cromatografias de afinidade.

Segundo Thömmes e Kula (1995), a cromatografia em membranas de afinidade pode ser diferenciada da cromatografia em gel convencional, pois quando o fluido passa através dos poros da membrana, o transporte das moléculas da solução até o interior dos poros é regido pela convecção e não pela difusão, ao contrário do que ocorre nos géis. Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante, conforme está ilustrado na Figura 2.5.

O princípio da separação consiste na adsorção da biomolécula de interesse no ligante, imobilizado na superficie e, principalmente, no interior dos poros da membrana. Assim, a solução contendo a biomolécula a separar é forçada a passar através da membrana. As moléculas grandes e partículas, que não atravessam os poros, são eliminadas no

18

retentado, enquanto que as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde o ligante está imobilizado. A adsorção da biomolécula representa a primeira etapa da separação; a segunda etapa consiste na lavagem, onde todas as moléculas não adsorvidas são eliminadas nas linhas do filtrado e do retido. A eluição representa a terceira etapa, onde a biomolécula é dessorvida do suporte sólido, podendo ser recuperada, se ela for o produto de interesse, ou descartada, se ela for uma impureza.



Figura 2.5: Representação esquemática dos mecanismos envolvidos durante a adsorção em sistemas baseados em membranas e géis de afinidade (Thömmes e Kula, 1995).

A cromatografía em membranas de afinidade tem sido vista como uma técnica com grande potencial de utilização nos processos de purificação de bioprodutos, pois em uma única etapa, pode-se eliminar impurezas particuladas, através da filtração e recuperar as proteínas de interesse que ficam adsorvidas nos ligantes de afinidade, podendo-se ainda, utilizar grandes volumes de alimentação, trabalhando-se a baixas pressões e sem a possibilidade de formação de caminhos preferenciais (Labrou e Clonis, 1994; Haupt e Bueno, 2000; Zou *et al.*, 2001 e Ghosh, 2002).

A utilização de membranas em cromatografias de afinidade deriva da tecnologia de filtração e ultrafiltração utilizando membranas microporosas; assim, muitos dos módulos em diversas configurações disponíveis comercialmente e utilizadas hoje são derivados dos módulos empregados também nas técnicas de filtração.

#### 2.4.2. Configuração das membranas e modos de operação

Freqüentemente, as membranas são apresentadas na forma de discos ou como fibras ocas. As membranas planas são mais comumente utilizadas, pela facilidade de aplicação em larga escala e por possuírem uma estrutura interna de poro mais homogênea do que as outras formas de membranas. Por outro lado, as membranas na forma de fibras ocas possuem como vantagem maior razão área superficial por volume, proporcionando uma maior densidade de ligantes imobilizados e, conseqüentemente, uma maior capacidade de adsorção, além da facilidade de aplicação em larga escala pelo simples agrupamento de um número maior de fibras ocas. Apesar das vantagens, ambas configurações de membranas podem apresentar problemas tais como: distribuição irregular do fluxo e efeitos de dispersão axial e de espaços vazios. (Suen *et al.*, 2003; Suen *et al.*, 2000; Kubota *et al.*, 1997 e Roper e Lightfoot, 1995).

Os sistemas cromatográficos que empregam membranas como suportes para a purificação de proteínas podem operar tanto em modo de filtração frontal ("dead-end") como em modo de filtração tangencial ("cross flow"). Independente do modo operacional, quando se processa uma solução utilizando membrana, pode ser observado uma diminuição do fluxo do permeado com o tempo, ocasionado por efeitos de polarização que consiste na concentração de soluto na região próxima a interface membrana/solução e efeitos denominado "fouling", o qual engloba, além da polarização, adsorção não específica de moléculas do soluto na superfície e/ou no interior dos poros, entupimento de poros e depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana, os quais podem ser irreversíveis. No caso da filtração clássica, em modo frontal, geralmente, o efeito da polarização é maior, devido a passagem do permeado pela membrana, acumulando soluto ou material em suspensão na interface membrana/solução (Figura 2.6A). Na filtração tangencial, a polarização existe, mas pode ser minimizada, visto que a solução escoa paralelamente à superfície da membrana, enquanto o permeado é transportado

20

transversalmente à mesma (Figura 2.6B). Devido a este fato, geralmente, emprega-se a filtração em modo tangencial para recuperação de uma molécula de interesse de soluções complexas tais como, plasma sanguíneo, misturas contendo fragmentos celulares ou soluções contendo materiais particulados (apostila do curso "on line" de processos de separação com membranas. Homepage: www.peq.coppe.ufrj.br /piloto/membranas.html; Suen *et al.*, 2000 e Haupt e Bueno, 2000).



Figura 2.6: Esquema da formação da camada de polarização em membranas nos modos operacionais (A) frontal ("dead-end") e tangencial ("cross-flow") (apostila do curso "on line" de processos de separação com membranas. Homepage: www.peq.coppe.ufrj.br /piloto/membranas.html ).

#### 2.4.3. Seleção de membranas

É aconselhável que a seleção de membranas visando a utilização como matrizes para a imobilização de ligantes seja baseada em alguns aspectos físicos, químicos e biológicos. Em relação aos aspectos físicos, as membranas devem apresentar porosidade adequada com distribuição uniforme, de forma a permitir a penetração da proteína e sua acessibilidade aos ligantes imobilizados, elevada resistência mecânica e elevada área superficial, possibilitando a imobilização de uma quantidade elevada de ligantes. Quanto aos aspectos químicos, as membranas devem ser altamente hidrofilicas para evitar a adsorção não específica de proteínas, devem apresentar grupos funcionais que permitam a modificação química do material para imobilização de ligantes, devem ser estáveis em uma ampla faixa de pH, na presença de sais, solventes orgânicos, reagentes utilizados nas etapas de ativação e imobilização de ligantes e nas etapas cromatográficas (equilíbrio, adsorção, lavagem, eluição e regeneração do adsorvente). Finalmente, em relação a aspectos biológicos, as matrizes membranas devem ser biocompatíveis, principalmente se aplicadas em tratamentos extracorpóreos, como por exemplo a plasmaferese (Klein, 1991; Charcosset, 1998; Haupt e Bueno, 2000 e Senel *et al.*, 2001).

Membranas de diversos materiais têm sido empregadas como matrizes para a imobilização de ligantes tais como: celulose, acetato de celulose, polisulfona, poli(éter)sulfona, policaprolactama, poli(metil metacrilato), poli(hidroxietil dimetacrilato), poli(fluoreto) de vinilideno (PVDF), poli(éter-uretano-uréia), álcool poli(etileno)vinílico (PEVA), álcool polivinílico (PVA), poliamida, polietileno e vibras de vidro (Haupt e Bueno, 2000 e Suen *et al.*, 2000). A maioria das membranas disponíveis comercialmente são hidrofóbicas portanto, suscetíveis à adsorção não específica de proteínas, ou apresentam uma baixa concentração de grupos funcionais para a ativação e imobilização de ligantes, sendo necessário a modificação química da superfície para torná-las membranas hidrofílicas são, às vezes, instáveis às condições de ativação e imobilização de ligantes, sendo necessário a escolha criteriosa da matriz e dos métodos de derivatização de acordo com a aplicação desejada (Zeng e Ruckenstein, 1996; Beeskow *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1997; Weissenborn *et al.*, 1997 e Castilho *et al.*, 2000).

22

#### 2.4.4. Modificações químicas em membranas de afinidade

Membranas hidrofilicas de celulose são vantajosas para aplicação em sistemas de adsorção e purificação de proteínas, devido a baixa adsorção não específica e disponibilidade de grupamentos hidroxilas, os quais permitem a ativação por reagentes bifuncionais, epicloridrina ou bisoxirano, e subsequente imobilização de ligantes. No entanto, essas membranas são pouco estáveis às reações de ativação e imobilização de ligantes e à condições de pH alcalino, além de possuírem uma densidade de grupos reativos (-CH<sub>2</sub>OH) muito menor do que a encontrada em géis de agarose. Membranas de celulose regenerada e acetato de celulose, apesar de elevada densidade de grupos reativos e baixa adsorção não específica, necessitam ainda de modificações químicas para melhorar a resistência mecânica (Zou et al., 2001). Por outro lado, as membranas de álcool polietileno vinílico (PEVA) e álcool polivinílico (PVA), devido a sua hidrofilicidade e estabilidade em pHs alcalinos, podem ser facilmente ativadas com reagentes como brometo de cianogênio, epicloridrina e bisoxirano para imobilização de ligantes de afinidade como histidina, agentes quelantes como IDA e outros. Além disso, devido a sua excelente biocompatibilidade as membranas de PEVA têm sido empregadas para a remoção de heparina do sangue utilizando poli(l-lisina) imobilizada (Ma et al., 1992).

A quitina (poli(N-acetil-D-glicosamina) é um material de fácil disponibilidade por estar presente em exoesqueletos de insetos, em paredes celulares de fungos e em crustáceos (especialmente de camarões e caranguejos) e a quitosana (poli(2-amino-2-deoxi-D-glicose), é a forma desacetilada da quitina (Machado, 2003). Membranas de quitosana têm demonstrado boa estabilidade química e mecânica. Membranas de quitina são estáveis em soluções ácidas, básicas e solventes orgânicos e contém grupamentos (N-acetil-Dglucosamina), com afinidade para aglutinina e lisozima, podendo ser utilizadas para a separação por afinidade dessas proteínas sem a necessidade de modificações químicas (Zou *et al.*, 2001).

Membranas hidrofóbicas, como poliamida (nylon), polisulfona e poliétersulfona, têm sido utilizadas em processos de separação de proteínas, devido à estabilidade química e mecânica e homogeinidade na distribuição de poros. Contudo, para minimizar a adsorção não específica e aumentar a densidade de ligantes imobilizados, os pesquisadores têm empregado técnicas de recobrimento, os quais permitem a introdução de polímeros

hidrofilicos tais como hidroxietilcelulose (HEC), álcool polivinílico (PVA), dextrana ou quitosana nas membranas, que uma vez ativados (com por exemplo, epicloridrina ou bisoxirano) possibilitam a imobilização de ligantes como o agente quelante IDA, proteína A e outros. Os pesquisadores têm constatado que, após o processo de recobrimento, é necessário a ativação do polímero introduzido para a obtenção de uma elevada densidade de ligantes imobilizados (Beeskow *et al.*, 1995; Castilho *et al.*, 2000 e Camperi *et al.*, 2004).

Apesar de várias aplicações, estes métodos de recobrimento apresentam como desvantagem a formação de camadas poliméricas instáveis, ocasionando desprendimentos que podem afetar a eficiência do suporte. Para contornar este problema, tem sido empregado métodos alternativos de recobrimento de membranas utilizando soluções contendo um monômero funcional (por exemplo metacrilato), um iniciador de polimerização (por exemplo persulfato de amônio) e um agente cross-linking (acrilamidas, metacrilatos ou metileno bisacrilamida), os quais são subseqüentemente polimerizados em condições de aquecimento, luz ultravioleta ou radiação  $\gamma$  (Zeng e Ruckenstein, 1999).

A polimerização induzida por radiação é um método efetivo para a introdução na superficie de membranas de uma elevada densidade de cadeias poliméricas homogêneas, contendo grupos funcionais que, após a ativação, proporcionam a imobilização de uma elevada densidade de ligantes. Membranas de polipropileno e polietileno têm sido polimerizadas com os monômeros vinil acetato ou 2-hidroxietilmetacrilato, para a introdução de grupos trocadores de íons, ou glicidil metacrilato, para a introdução de grupos epóxi, os quais permitem a imobilização de grupos trocadores de íons (dietilamino, hidroxietilamino ou ácido sulfônico) (Tsuneda et al., 1995a e 1995b), grupos quelato (ácido iminodiacético) (Iwata et al., 1991), ou grupos hidrofóbicos (fenil, butil, fenilalanina ou triptofano) (Kubota et al., 1997 e Kiyohara et al., 1997). As membranas resultantes apresentaram alta permeabilidade e boa resistência mecânica. Apesar de eficiente, a polimerização induzida por radiação é um método economicamente inviável pois exige alto consumo de energia, sendo mais adequado o emprego da polimerização induzida por radicais livres (Hou et al., 1989). A polimerização induzida por radicais livres têm sido empregada, para aumentar a densidade de grupos funcionais, pela introdução de grupos epóxi, e melhorar a resistência mecânica de membranas hidrofilicas de celulose, utilizando

glicidil metacrilato como monômero e persulfato de amônio e tiosulfato de sódio como catalisadores (Yang et al., 1998).

Além dos aspectos mencionados acima, a suscetibilidade para a aplicação de suportes de afinidade em larga escala depende entre outros fatores da avaliação do comportamento de adsorção das proteínas nos suportes. Baseado nos princípios de adsorção entre a proteína e o ligante imobilizado em um suporte sólido, os pesquisadores têm avaliado o desempenho dos sistemas de afinidade através da determinação de parâmetros como a capacidade máxima de adsorção e as constantes de adsorção e dessorção do complexo proteína-ligante.

#### 2.5. Determinação de parâmetros de adsorção

Nos processos de separação por afinidade, um adsorvente contendo um ligante imobilizado pode interagir reversivelmente com uma molécula de interesse formando um complexo não covalente (exceção na cromatografia covalente). Assumindo que o adsorvente tem afinidade por apenas uma espécie do soluto, o equilíbrio pode ser descrito pela seguinte equação (Chase, 1984):

ligante + proteína 
$$\underset{k_d}{\overset{k_a}{\longleftarrow}}$$
 complexo proteína-ligante (2.1)

onde  $k_a$  e  $k_d$  são, respectivamente, as constantes cinéticas de adsorção e dessorção do complexo proteína-ligante. Estas constantes também representam as contribuições da resistência à transferência de massa da fase líquida para o sítio de adsorção, resistência à difusão nos poros e resistência à reação na superfície, fenômenos que controlam a transferência de massa nestes sistemas (Chase, 1984). A equação 2.1 pode ser expressa na forma da equação da taxa de variação da quantidade de soluto no adsorvente, obtida pelo balanço de massa do soluto na fase sólida (equação 2.2).

$$dQ/dt = k_a C (Q_m - Q) - k_d Q$$
(2.2)

onde Q é a quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente, C é a concentração de soluto livre em solução,  $Q_m$  é a capacidade máxima do adsorvente e t é o tempo. Esta equação descreve a cinética de adsorção do sistema e permite a determinação das constantes cinéticas de adsorção (k<sub>a</sub>) e dessorção (k<sub>d</sub>).

Nos casos onde a proteína é relativamente pequena e o ligante imobilizado facilmente acessível, a dinâmica da adsorção pode ser considerada rápida e condições de equilíbrio local podem ser assumidas, transformando a equação 2.2 como descrito na equação 2.3.

$$\frac{\mathrm{d}Q}{\mathrm{d}t} = 0 = k_{\mathrm{a}}C_{\mathrm{eq}}\left(Q_{\mathrm{m}}-Q\right) - k_{\mathrm{d}}Q \tag{2.3}$$

Rearranjando a equação 2.3 obteve-se a equação de Langmuir como descrito a seguir:

$$Q = \frac{Q_m C_{eq}}{K_d + C_{eq}}$$
(2.4)

onde Q é a quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente em equilíbrio com a quantidade de soluto não adsorvido em solução,  $C_{eq}$  é a concentração de soluto em equilíbrio na solução e  $K_d = k_d/k_a$  é a constante de dissociação da reação em equilíbrio. A determinação dos parâmetros  $Q_m$  e  $K_d$  é de grande importância para descrever o desempenho do sistema matriz-ligante na adsorção da proteína desejada.

O modelo de Langmuir (equação 2.4) representa um caso simplificado de adsorção de proteína, onde são assumidas as seguintes hipóteses: a adsorção é reversível e limitada a uma camada, a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos; as moléculas adsorvidas não interagem entre si e não há adsorção competitiva. (Finette *et al.*, 1997).

As isotermas de equilíbrio de adsorção são comumente obtidas através de experimentos em batelada (tanques agitados), onde uma quantidade conhecida do adsorvente é contactada a soluções com várias concentrações do soluto até ser atingido o

equilíbrio entre a concentração de proteína na fase líquida e na fase sólida (adsorvente) (Cowan et al., 1989).

Nos experimentos de adsorção em tanques agitados, a massa de proteína adsorvida na matriz pode ser determinada através da diferença entre as concentrações iniciais e finais do sobrenadante (balanço de massa no tanque), resultando na seguinte equação:

$$Q = \frac{V}{m} (C_0 - C_{eq})$$
(2.5)

onde: V é o volume total no tanque; m pode ser a massa ou volume do adsorvente e  $C_0$  é a concentração inicial de proteína em solução.

As constantes de adsorção e dessorção de proteínas nos adsorventes podem ser determinadas através da cinética de adsorção em tanques agitados. Skidmore *et al.* (1990) apresentaram uma expressão para a taxa de variação da concentração de proteína na fase líquida com o tempo, utilizando as equações 2.2 e 2.5, resultando em:

$$dC/dt = -(k_a Q_m \eta)C + k_a (C_0 - C)C + (k_a K_d)(C_0 - C)$$
(2.6)

onde:  $\eta$  é a razão entre a massa ou o volume do adsorvente e o volume de solução protéica no tanque. Neste modelo, a taxa de reação na superfície é considerada baixa em comparação com a transferência de massa, de maneira que a concentração de proteína pode ser considerada a mesma fora e no interior dos poros da partícula do adsorvente. A solução analítica da equação 2.6, apresentada por Skidmore *et al.* (1990), está descrita na equação 2.7:

$$C = C_0 - \eta \left[ \begin{array}{c} b + a \right) (1 - \exp(-2ak_a \eta t) \\ (b + a) - \exp(-2ak_a \eta t) \\ \hline (b - a) \end{array} \right]$$
(2.7)

onde:

$$a^2 = b^2 - (C_0/\eta)Q_m$$
 (2.8)

$$b = 1/2(C_0/\eta + Q_m + K_d/\eta).$$
(2.9)

As equações matemáticas apresentadas são ajustadas aos dados experimentais e os parâmetros determinados estão relacionados às interações envolvidas entre a molécula a ser adsorvida, a matriz, o braço espaçador e o ligante, à densidade de ligante imobilizado e às condições operacionais.

### **CAPÍTULO 3**

#### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1. Materiais

Epicloridrina, acido etilenodiamino tetracético (EDTA), imidazol, ácido morfolinoetanosulfônico (Mes), ácido morfolinopropanosulfônico (Mops), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) e acrilamida foram obtidos da Sigma (EUA). Cloreto de 4-vinilbenzil, cloreto de metacriloil, hidroxietilmetacrilato (HEMA), acetonitrila, metanol, éter, trietilamina,  $\alpha, \alpha'$  azoisobutironitrilo (AIBN) e ácido clorídrico foram obtidos da Aldrich (EUA). Sulfato de cobre, sulfato de níquel, sulfato de zinco, sulfato de cobalto, acetato de sódio, cloreto de sódio, Tris hidroximetil aminometano (Tris), uréia, ácido iminodiacético (IDA), formaldeído a 37% e hidróxido de sódio foram adquiridos da Merck (Alemanha). Metilenobisacrilamida, N, N, N', N' tetrametil etilenodiamino (TEMED), dodecilsulfato de sódio, ditiotreitol, persulfato de amônio, azul de bromofenol, ß-mercaptoetanol, gel de acrilamida homogêneo 20%, tiras de tampão de SDS ("buffer strip") e marcadores de baixa massa molecular foram obtidos da Amersham Biosciences GE (EUA). Carbonato de sódio, nitrato de prata, ácido acético, metanol (usado na revelação de gel de eletroforese) e ácido cítrico anidro foram obtidos da LabSynth (Brasil). Glutaraldeído foi obtido da Casa da Ouímica (Brasil). Foram utilizadas as seguintes proteínas: imunoglobulina G humana (IgG, 99% de pureza) obtida da Aventis Behring (Alemanha), lisozima (obtida da clara do ovo de galinha) (99% de pureza) e albumina do soro bovino (BSA, 98% de pureza) obtidas da Sigma (EUA). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida do equipamento Milli Q (Millipore, EUA).

Foram utilizados gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> (doado pelo Laboratoire d'Interactions Moléculaires et de Technologie des Séparations (LIMTech.S), Compiègne, França) e membranas de fibras ocas de álcool poli(etileno)vinílico (PEVA), modelo EVAL 4A,

obtida da Kuraray Co. (Japão). As especificações da membrana estão apresentadas na Tabela 3.1.

Diâmetro de poro	0,05 µm
Diâmetro interno da fibra	200 µm
Diâmetro externo da fibra	240 µm
Área superficial <sup>(1)</sup>	49,5 m²/g
Espessura da parede da fibra	20 µm

Tabela 3.1: Especificações da membrana de PEVA.

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

Nos experimentos de adsorção e filtração foram utilizadas soluções de pró-insulina sulfonada com cauda de poli(histidina) (PIS), doadas pelo Engenheiro Luciano Vilela (na Biobrás S.A., hoje na BIOMM, Montes Claros-MG), cujas especificações estão listadas a seguir:

- a) Pró-insulina sulfonada purificada por IMAC e por troca iônica e renaturada, tendo aproximadamente, segundo o fornecedor, 76% de pró-insulina renaturada (PISR), análise por HPLC;
- b) Pró-insulina sulfonada purificada por IMAC em gel Sepharose IDA-Ni<sup>2+</sup> (PIS-IMAC) tendo, segundo o fornecedor, aproximadamente 84% de PIS, análise por SDS-PAGE;
- c) Solução não clarificada (PIS-NC): solução obtida após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise. Esta solução é constituída de PIS, a qual encontra-se solubilizada em tampão de desnaturação (tampão contendo 8 M de uréia) e vários outros componentes não divulgados pelo fornecedor. Segundo o fornecedor este material tem 35% de PIS, análise por SDS-PAGE;
- d) Solução clarificada (PIS-C): solução obtida a partir da centrifugação da solução não clarificada (PIS-NC), a 4000 g durante 30 min (centrífuga Himac CF 15D, Hitachi, Japão).

#### 3.2. Metodologia

#### 3.2.1. Ativação das fibras ocas finamente cortadas e imobilização de agente quelante

#### 3.2.1.1. Ativação com epicloridrina e imobilização de IDA

As membranas de fibras ocas de PEVA foram ativadas com epicloridrina de acordo com o protocolo descrito por Hemdan e Porath (1985) e Serpa (2002). Inicialmente as fibras ocas foram removidas do cartucho comercial de 1 m<sup>2</sup> de área e foram finamente cortadas em pedaços de tamanho de aproximadamente 3 mm. Em seguida, as membranas, embebidas em água, foram desgaseificadas para remover o ar presente nos poros, utilizando uma bomba de vácuo e sem filtrá-las, esgotou-se toda a água (virando o frasco).

Em capela, foi montado o experimento para a ativação, onde um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo as fibras (16 g de fibras secas à vácuo) foi colocado em um agitador magnético Hitrel HTR 8068, marca IKA (Alemanha). Inicialmente foram adicionados às fibras 5 mL de epicloridrina (agente ativador) e 50 mL de NaOH 2 M contendo 0,266 g de NaBH<sub>4</sub>. Esta suspensão (fibras e solução) foi deixada sob moderada agitação, à temperatura de 25°C, durante 15 min. Após este tempo de reação, foram gotejados, simultaneamente, 50 mL de NaOH e 23,3 mL de epicloridrina, a uma vazão de, respectivamente, 0,27 e 0,13 mL/min, para evitar o aumento de temperatura durante a reação. A seguir, a suspensão (fibras e solução) foi deixada sob agitação por um período de 16 h, tempo suficiente para a reação ser completada. Após este período, em capela, as fibras foram lavadas com água ultrapura até verificar o mesmo valor de pH para a água ultrapura e para a água de lavagem (descarte), indicando que todo o excesso de solução (solução com epicloridrina, NaOH e NaBH<sub>4</sub> com pH em torno de 10,0) foi removido.

Finalizada a etapa de ativação, o agente quelante IDA foi imobilizado segundo o protocolo descrito por Porath e Olin (1983) e Serpa (2002). Inicialmente, foi preparada uma solução de IDA dissolvendo-se 26 g deste em 65 mL de NaOH 2 M e, a esta solução, foram adicionadas pastilhas de NaOH até obter pH 10,0. Em paralelo, foram preparados 65 mL de uma solução de carbonato de sódio 2 M. As soluções de IDA e carbonato foram misturadas e a solução resultante foi adicionada às fibras ocas previamente ativadas. Esta suspensão (solução e fibras) foi deixada sob agitação a 65°C durante 24 h. Após este tempo, as fibras foram lavadas com água ultrapura até verificar o mesmo valor de pH para a água ultrapura

e para a água de lavagem (descarte). As reações de ativação e imobilização de IDA estão demonstradas na Figura 3.1. O adsorvente obtido foi, então, denominado membranas PEVA-IDA.





#### 3.2.1.2. Síntese do agente quelante ácido vinilbenziliminodiacético (VBIDA)

O ligante VBIDA foi sintetizado segundo o protocolo descrito por Morris *et al.* (1959). Inicialmente, pesou-se 13,3 g de IDA e 6,6 g de NaOH e adicionou-se à 100 mL de metanol e 100 mL de água ultrapura. Esta solução foi deixada sob agitação à temperatura de 60°C. A seguir, gotejou-se 7 mL de cloreto de 4-vinilbenzil e adicionou-se 6,6 g de NaOH; por fim gotejou-se 7,25 mL de cloreto de 4-vinilbenzil. Esta solução foi mantida à 60°C, sob agitação, durante 1 h. Em seguida, evaporou-se o metanol em rotavapor e fez-se extração misturando a solução com éter (3 estágios) em um funil decantador. A camada líquida remanescente obtida após a extração foi ajustada à pH 2,5 com ácido clorídrico concentrado formando uma solução branca e densa contendo, além do produto de interesse, NaCl. Esta solução foi filtrada em papel de filtro e o sólido foi ressuspenso em metanol e

novamente filtrado para a remoção do sal ainda presente. A seguir, o sólido obtido, denominado ácido vinilbenziliminodiacético, foi liofilizado e armazenado em geladeira.

# 3.2.1.3. Ativação com cloreto de metacriloil e polimerização das fibras ocas para a imobilização de VBIDA

As membranas de fibras ocas de PEVA foram ativadas com cloreto de metacriloil e polimerizadas com os monômeros HEMA e VBIDA de acordo com o protocolo desenvolvido no Laboratoire de Technologie Enzimatique, França. Inicialmente as fibras ocas foram removidas do cartucho comercial de 1  $m^2$  de área e foram finamente cortadas em tamanhos de aproximadamente 3 mm.

Em capela, 1 g de fibras cortadas foram colocadas em um tubo de vidro com tampa rosqueada e, a seguir, adicionou-se seqüencialmente 20 mL de acetonitrila, 10 mL de cloreto de metacriloil e 2 mL de trietilamina. A solução contendo as fibras foi sonicada por 10 min (para que a solução de ativação atingisse o interior dos poros da membrana) e, a seguir, foi deixada sob agitação, à temperatura ambiente (20 °C), durante 3 h. Após o término da reação, as fibras foram lavadas com acetonitrila e armazenadas em uma solução de acetonitrila e água ultrapura na proporção 1:1. A estrutura proposta para a reação de ativação está representada na Figura 3.2.



Figura 3.2: Reação de ativação das membranas de PEVA. Estrutura proposta para a membrana ativada.

#### Capítulo 3

#### Materiais e Métodos

Para a imobilização do agente quelante VBIDA, as membranas ativadas foram polimerizadas com os monômeros HEMA e VBIDA na presença do catalisador AIBN. Inicialmente, foi preparada, em um tubo rosqueado, uma solução contendo 8 mmol de HEMA, 2 mmol de VBIDA e 0,2 mmol de AIBN para resultar em uma massa total de 1 g de reagentes, dissolvidos em 20 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura. Para solubilizar o monômero VBIDA foram adicionadas gotas de ácido clorídrico concentrado. A solução contendo os monômeros foi borbulhada com nitrogênio por 10 min, a seguir, adicionou-se as fibras ativadas e borbulhou-se nitrogênio por 10 min, sonicou-se por 10 min e borbulhou-se nitrogênio por mais 10 min. O tubo de vidro foi colocado sob o equipamento UV – Spectroline model TC 312 A (Fisher Scientific, Alemanha) e as fibras foram polimerização, a solução foi removida e as fibras foram lavadas exaustivamente com metanol e água ultrapura (proporção 10:1), seguido por água ultrapura. Após este procedimento, o adsorvente foi denominado membranas PEVA-VBIDA, cuja estrutura proposta está representada na Figura 3.3.



Figura 3.3: Polimerização e imobilização de VBIDA. Estrutura proposta para as membranas PEVA-VBIDA.

#### 3.2.2. Ativação das fibras ocas no módulo e imobilização do agente quelante

#### 3.2.2.1. Construção do módulo de filtração de membranas de fibras ocas de PEVA

Foram removidas 200 fibras ocas de PEVA do cartucho comercial modelo EVAL 4A (Kuraray, Japão) e introduzidas em um tubo de vidro previamente construído contendo duas saídas laterais (comprimento igual a 5,7 cm e diâmetro interno igual a 1 cm). As extremidades das fibras foram fixadas no tubo de vidro, através de uma resina epóxi. O esquema do módulo está representado na Figura 3.4.



Figura 3.4: Esquema do módulo construído de fibras ocas de PEVA.

A área superficial e o volume das membranas contidas no módulo foram determinados, respectivamente, através das equações 3.1 e 3.2.

$$A = 2\pi r_i LN \tag{3.1}$$

$$V_{m} = \pi (r_{0}^{2} - r_{i}^{2})LN$$
(3.2)

onde:

A = área superficial das membranas (valor calculado 71,6 cm<sup>2</sup>);

 $r_i$  = raio interno das membranas (100 µm);

L =comprimento das membranas (5,7 cm);

N = número de fibras (200);

$$V_m$$
 = volume das membranas (valor calculado 0,157 cm<sup>3</sup>);

 $r_0 = raio$  externo das membranas (120  $\mu$ m).

Como no cartucho comercial de PEVA 1  $m^2$  de área superficial corresponde a 19 g de membrana seca, o módulo construído neste trabalho possui aproximadamente 0,13 g de membrana seca.

#### 3.2.2.2. Ativação das membranas de PEVA contidas no módulo com epicloridrina

Inicialmente, as membranas de PEVA foram lavadas com água ultrapura nos seguintes modos operacionais: frontal, lavagem interna, espaço concha e "backflushing" (fluxo reverso do permeado), como ilustrado na Figura 3.5.



Figura 3.5: Modos de lavagem das fibras de PEVA no módulo de filtração.

Em capela, foi montado o experimento para a ativação das fibras de PEVA contidas no módulo como ilustrado na Figura 3.6, segundo procedimento descrito por Serpa (2002). Uma solução contendo 5 mL de epicloridrina e 50 mL de NaOH 2 M contendo 0,266 g de NaBH<sub>4</sub>, foi recirculada através das fibras à vazão de 5 mL/min, à temperatura de 25°C, durante 15 min. Após este tempo de reação, foram adicionados, simultaneamente, 50 mL de NaOH e 23,3 mL de epicloridrina, a uma vazão, de respectivamente, 0,27 e 0,13 mL/min e a solução foi recirculada por um período de 8 h. Após este tempo, as fibras foram lavadas com água ultrapura seqüencialmente em todos os modos operacionais como ilustrado na Figura 3.5, até verificar o mesmo valor de pH para a água ultrapura e para a água de lavagem (descarte), indicando que todo o excesso de solução (solução com epicloridrina, NaOH e NaBH<sub>4</sub> com pH em tomo de 10,0) foi removido.



Figura 3.6: Esquema da montagem experimental para a ativação das membranas de PEVA contidas no módulo (Serpa, 2002).

#### 3.2.2.3. Imobilização de IDA nas membranas de PEVA ativadas com epicloridrina

Após o processo de ativação, seguiu-se a imobilização de IDA como descrito em Porath e Olin (1983) e Serpa (2002). Preparou-se uma solução contendo 26 g de IDA e 65 mL de NaOH 2 M e à esta solução foram adicionadas pastilhas de NaOH até obter pH 10,0. Em paralelo, foram preparados 65 mL de uma solução de carbonato de sódio 2 M. As soluções de IDA e carbonato foram misturadas, mantidas sob agitação a 65°C e recirculadas no módulo durante 24 h, como esquematizado na Figura 3.6.

Após este procedimento as fibras foram lavadas com água ultrapura seqüencialmente em todos os modos operacionais como ilustrado na Figura 3.5, até verificar o mesmo valor de pH para a água ultrapura e para a água de lavagem (descarte).

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

#### 3.2.3.1. Determinação da densidade de ligantes imobilizados nas fibras cortadas

O experimento de determinação da densidade de ligantes imobilizados consistiu em alimentar até a saturação uma solução 50 mM de sulfato de cobre ou sulfato de níquel (até a concentração do metal na saída da coluna atingir a concentração de alimentação) a uma coluna cromatográfica contendo 5 mL de membranas de fibras ocas PEVA-IDA ou 3,5 mL

de PEVA-VBIDA finamente cortadas, a uma vazão de 1 mL/min (Johhson et al., 1996). Após este procedimento, a coluna foi lavada, inicialmente, com água ultrapura, seguido por tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl, para remover íons metálicos fracamente adsorvidos e, novamente, com água ultrapura. Cada etapa de lavagem foi monitorada por espectrofotometria (a 730 ou 384 nm, respectivamente, para os íons cobre e níquel) e somente finalizada após a obtenção de absorbância zero no comprimento de onda empregado, indicando que todo o metal fracamente adsorvido foi removido. A seguir, os ions níquel ou cobre imobilizados foram eluídos com solução de EDTA 50 mM pH 8.0. Por fim, a coluna foi lavada com água ultrapura para a remoção do excesso de EDTA. A densidade de íons metálicos imobilizados nas membranas (PEVA-IDA e PEVA-VBIDA) foi determinada em função de análises das frações de dessorção (solução EDTAmetal) por espectrofotometria UV-VIS (Johnson et al., 1996; Liu et al., 2003; Wu et al., 2003 e Camperi et al., 2004), em espectrofotômetro DU 650 (Beckman, EUA) à 730 e 384 nm, respectivamente, para a determinação de íons cobre e níquel. Vários pesquisadores (Belew e Porath, 1990; Beeskow et al., 1995; Liesiene et al, 1997; Wu et al., 2003 e Denizli et al., 2003) têm também determinado a densidade de metal em géis contendo agentes quelantes imobilizados, através da técnica de espectrometria de absorção atômica. Para fins de comparação, as frações de dessorção (solução EDTA-metal) das membranas PEVA-IDA foram também analisadas no Instituto de Química da UNICAMP por espectrometria de emissão ótica por plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP) (Perkin Elmer - Optima 3000 DV, EUA). O procedimento consistiu inicialmente na acidificação das soluções (EDTA-metal) com ácido nítrico e clorídrico, seguido pela análise dos metais no espectrômetro de emissão, utilizando uma curva de calibração obtida a partir de soluções padrões de níquel e cobre (padrões NIST - "National Institute of Standards and Technology"). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

## 3.2.3.2. Determinação da densidade de ligantes imobilizados nas fibras ocas contidas no módulo

A densidade de ligantes IDA imobilizada foi avaliada através da determinação da quantidade de metal quelatado nas membranas. O experimento consistiu em bombear uma solução de sulfato de cobre 50 mM a uma vazão de 1mL/min, até que a absorbância a 730

nm da solução de cobre na saída fosse igual a absorbância da solução de cobre na entrada (saturação de metal na coluna). Após este procedimento o módulo foi lavado com água ultrapura seqüencialmente em todos os modos de filtração (segundo o esquema da Figura 3.5). O tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl foi utilizado na lavagem "backflushing" para remover o metal fracamente quelatado. Em seguida, uma solução de EDTA 50 mM pH 8,0 foi passada através do módulo (em modo "backflushing") para a remoção do cobre quelatado pelo ligante IDA (Serpa, 2002). As frações de dessorção foram coletadas e analisadas a 730 nm em espectrofotômetro DU 650 (Beckman, Alemanha) e a densidade de íons cobre foi determinada utilizando um coeficiente de extinção previamente determinado (0,0927 cm<sup>2</sup>/mg). Por fim o módulo foi lavado com água ultrapura para a remoção do EDTA.

#### 3.2.4. Determinação de proteína total

A proteína total presente nas amostras foi quantificada através do método colorimétrico empregando o corante "comassie blue" segundo Bradford (1976). Albumina do soro bovino (BSA) foi utilizada como proteína de referência.

### 3.2.5. Adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup>

Nestes experimentos foi verificada a adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> com o objetivo de selecionar, dentre os íons metálicos cobre, níquel, zinco e cobalto, aquele que apresentasse maior capacidade para adsorção da proteína de interesse.

Uma coluna cromatográfica contendo 5 mL de membranas PEVA-IDA finamente cortadas foi alimentada com uma solução a 50 mM de sulfato de cobre, níquel, zinco ou cobalto, a uma vazão de 0,7 mL/min, até a saturação (quando a concentração de metal na saída da coluna fosse igual a concentração de metal na entrada). Em seguida, o adsorvente foi lavado com água ultrapura, seguido por um tampão de baixo pH (tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl) e água ultrapura para a remoção do metal fracamente adsorvido. Após este procedimento, o adsorvente foi equilibrado com o tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (tampão A) a uma vazão de 0,7 mL/min.

Foi preparada uma solução de PISR (concentração de 5,5 a 6,0 mg/mL), em tampão Tris-HCL 30 mM pH 7,5 contendo 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia (tampão de adsorção), e

alimentou-se a coluna (em fluxo ascendente) com uma massa de proteína entre 15 e 18 mg, a uma vazão de 0,5 mL/min. A seguir, a coluna foi lavada seqüencialmente com o tampão A contendo 0,02 M de imidazol, tampão A e tampão A contendo 6 M de uréia, para remover as proteínas não adsorvidas. A proteína adsorvida foi eluída com o tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Por fim, o adsorvente foi regenerado com uma solução de EDTA 50 mM pH 8,0.

As amostras das etapas de adsorção e eluição foram coletadas em frações individuais de 2 mL e a absorbância foi medida a 280 nm em espectrofotômetro DU 650 (Beckman, EUA), utilizando um coeficiente de extinção determinado para a PISR equivalente a 0,399 cm<sup>2</sup>/mg. As frações individuais da etapa de regeneração dos suportes contendo cobre, níquel e cobalto foram analisadas pelo método de Bradford, devido ao fato do complexo EDTA-Me<sup>2+</sup> apresentar um pico de absorção a 280 nm. As frações individuais da etapa de regeneração do suporte contendo zinco foram analisadas a 280 nm, pelo fato do complexo EDTA-Zn<sup>2+</sup> não ser absorvido neste comprimento de onda.

# 3.2.6. Experimentos cromatográficos em PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup>, PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup> e Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>

#### 3.2.6.1. Adsorção de PIS a partir de soluções clarificada e não clarificada

Estes experimentos foram realizados em colunas cromatográficas contendo de 3,5 a 5,0 mL de adsorvente, previamente equilibrados com tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A), com o objetivo de avaliar o desempenho de membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup> (sendo Me<sup>2+</sup> os ions níquel ou cobre) para a adsorção de pró-insulina sulfonada a partir das soluções clarificada e não clarificada. A quantidade de proteína total injetada nas colunas foi calculada proporcional ao volume de leito. As soluções de PIS-NC e PIS-C foram preparadas, em diferentes concentrações, na proporção 1:1 no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia (tampão de adsorção). As amostras de PIS-NC (concentração entre 4,0 e 5,0 mg/mL) foram alimentadas, em termos de proteína total, nas quantidades de 92,0 mg, 99,0 mg e 70,0 mg, e as amostras de PIS-C (concentração em torno de 3,5 mg/mL), nas quantidades de 70,0 mg, 68,0 mg e 54,4 mg, respectivamente, em membranas finamente cortadas de PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>. Para fins de comparação, foi realizado um experimento de adsorção de PIS a partir de solução PIS-C (concentração em torno de 3,5 mg/mL) em gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>, alimentando-se 70 mg de proteína total. As soluções (PIS-NC ou PIS-C) foram alimentadas na coluna a uma vazão de 0,5 mL/min. As proteínas não adsorvidas pelos suportes foram removidas através da lavagem seqüencial com tampão A contendo 0,02 M de imidazol, tampão A e, finalmente, tampão A contendo 6 M de uréia. A dessorção de proteínas foi realizada, seqüencialmente, com o tampão A contendo 50 mM de NaCl, 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol e tampão A contendo 50 mM de NaCl, 6 M de uréia e 0,3 M de imidazol. Os adsorventes foram regenerados com solução de EDTA 50 mM pH 8,0.

Durante as cromatografias foram coletadas frações individuais de 2,0, 1,2 e 1,5 mL das etapas de adsorção, eluição e regeneração, respectivamente, para serem analisadas pelo método de Bradford, eletroforese SDS-PAGE e por HPLC.

### 3.2.6.2. Adsorção de proteínas altamente purificadas: Imunoglobulina G humana, lisozima, albumina do soro bovino e pró-insulina sulfonada recombinante

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o desempenho de membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup> (sendo Me<sup>2+</sup> os íons níquel ou cobre), para a adsorção das seguintes proteínas de diferentes massas moleculares: imunoglobulina G humana (IgG, 150 kDa), lisozima (14,3 kDa) e albumina do soro bovino (BSA, 65 kDa). Visou-se comparar a capacidade destes adsorventes para adsorção destas proteínas com a capacidade de adsorverem pró-insulina sulfonada recombinante (9,5 kDa).

Uma coluna cromatográfica contendo 3,5 mL de membranas finamente cortadas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> ou PEVA-VBIDA- Me<sup>2+</sup> foi equilibrada com o tampão MMA (Mes, Mops e Acetato) 50 mM pH 7,0 contendo 1 M de NaCl ou tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5, conforme o experimento, a uma vazão de 0,7 mL/min. Foram preparadas soluções protéicas de IgG e BSA na concentração de 5,0 mg/mL e solução de lisozima, na concentração de 1,0 mg/mL, em tampão MMA 50 mM pH 7,0 contendo 1 M de NaCl. A solução PIS-IMAC foi preparada na concentração de 5,0 mg/mL no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia. A coluna foi alimentada com 2 mL das soluções de IgG, BSA ou PIS-IMAC ou com 5 mL da solução de lisozima, a uma vazão de 0,5 mL/min. A seguir, para a remoção das proteínas não adsorvidas, a coluna foi lavada

com o tampão MMA 50 mM pH 7,0 contendo 1 M de NaCl e as proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão MMA 50 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl. Nos experimentos com solução PIS-IMAC, as etapas de lavagem e eluição foram efetuadas como descrito anteriormente para as soluções clarificada e não clarificada (item 3.2.6.1). A regeneração das membranas foi feita com EDTA 200 mM pH 8,0. Durante as cromatografias, foram coletadas frações individuais de 2,0 mL das etapas de adsorção, eluição e regeneração. As frações geradas nas cromatografias de IgG, BSA e PIS foram analisadas pelo método de Bradford, utilizando BSA como proteína de referência e as frações das cromatografias com lisozima foram analisadas a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção de 3,04 cm<sup>2</sup>/mg, previamente determinado. As frações cromatográficas foram também monitoradas a 384 nm e 730 nm para verificar se houve o desprendimento, respectivamente, dos íons níquel e cobre.

## 3.2.7. Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados: Determinação da isoterma de adsorção de pró-insulina

O experimento para a obtenção da isoterma de adsorção de pró-insulina sulfonada em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> foi realizado, três vezes em duplicata, à temperatura de 25°C, utilizando tubos Eppendorf contendo membranas finamente cortadas.

O procedimento experimental consistiu inicialmente em determinar o tempo de equilíbrio (tempo a partir do qual a concentração de soluto permaneceu constante no sobrenadante) entre a proteína e o adsorvente. Em um Eppendorf contendo 100 mg úmida de fibras cortadas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, previamente equilibradas com Tris-HCl 30 mM pH 7,5, foi adicionado 1 mL da solução PIS-IMAC na concentração de 1,0 mg/mL em tampão Tris-HCl 30 mM contendo 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia (tampão de adsorção) e este foi deixado sob agitação por um período de 3 h. A seguir, para a obtenção da isoterma de adsorção foram preparadas soluções de PIS-IMAC no tampão de adsorção em diferentes concentrações variando entre 0,45 e 10,0 mg/mL. Em seguida 1,0 mL de cada solução foi adicionada à 100 mg do adsorvente (correspondente a 19,4 mg de membrana seca), previamente equilibrado com Tris-HCl 30 mM pH 7,5. Os tubos Eppendorf foram deixados sob agitação durante 3 h, tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Esquema experimental para a obtenção da cinética e isoterma de adsorção (Figura adaptada de Lucena, 1999).

Atingido o equilíbrio, a densidade ótica dos sobrenadantes foi medida a 280 nm no espectrofotômetro DU 650 (Beckman, Alemanha) para determinar a concentração de proteína não adsorvida ( $C_{eq}$ ) pelo suporte (utilizando um coeficiente de extinção a 280 nm para a PIS-IMAC previamente determinado igual a 0,47 cm<sup>2</sup>/mg). A quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente seco (Q) foi calculada usando a equação 2.5 do item 2.5 da "Revisão Bibliográfica".

O modelo de Langmuir foi ajustado aos valores calculados de Q e aos valores experimentais obtidos para  $C_{eq}$ , através da equação 2.4 do item 2.5 da "Revisão Bibliográfica", com a finalidade de determinar a quantidade máxima de proteína adsorvida  $(Q_m)$  e a constante de dissociação do complexo PIS-IDA-Ni<sup>2+</sup> (K<sub>d</sub>).

### 3.2.8. Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

O experimento para a determinação da cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> foi realizado em tanques agitados, utilizando tubos Eppendorf contendo 100 mg de massa úmida de membranas finamente cortadas (correspondente à 19,4 mg de membrana seca), previamente equilibradas com tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5, como ilustrado na Figura 3.7. Para estes experimentos foram preparadas amostras de PIS-IMAC no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia (tampão de adsorção), nas concentrações de 1,0, 5,0 e 9,0 mg/mL. Para cada concentração de proteína foi adicionado 1,0 mL de solução aos tubos contendo o adsorvente e, em seguida, estes foram colocados sob agitação. Decorrido os tempos de contato adsorvente-solução PIS-

IMAC de 1, 2,5, 5, 8, 10, 20, 30, 60, 120 e 180 min, o sobrenadante de cada tubo era removido e a concentração de PIS-IMAC não adsorvida pelo suporte foi determinada através da análise do sobrenadante recolhido a 280 nm em espectrofotômetro DU 650 (Beckman, EUA). Foi determinado previamente um coeficiente de extinção a 280 nm para a PIS-IMAC equivalente a 0,47 cm<sup>2</sup>/mg.

A constante de adsorção para a formação do complexo PIS-metal foi determinada através da solução analítica desenvolvida por Skidmore *et al.* (1990) (equações 2.7 a 2.9 do item 2.5 da "Revisão Bibliográfica") para a expressão da taxa de variação da concentração de proteína na fase líquida com o tempo, e a constante de dessorção foi calculada a partir da equação  $K_d = k_d/k_{a_s}$  utilizando o valor de  $K_d$  determinado no item 3.2.7.

#### 3.2.9. Experimentos de filtração no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

#### 3.2.9.1. Seleção do modo operacional

O módulo contendo as fibras foi carregado com o íon níquel alimentando-o em modo frontal, até a saturação, com uma solução de sulfato de níquel 50 mM. Em seguida efetuou-se a lavagem com água ultrapura em todos os modos de filtração, como esquematizado na Figura 3.5, e lavagem "backflushing" com tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,0 contendo 1 M de NaCl para a remoção dos íons metálicos fracamente adsorvidos.

Com a finalidade de selecionar as melhores condições para a filtração de PIS no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, foram realizados os seguintes experimentos (a) filtração em modo frontal da solução de alimentação até atingir a saturação; b) filtração em modo tangencial da solução de alimentação até a saturação sem recirculação do retentado e do filtrado; c) filtração em modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado; c) filtração por um período de 1 h; d) filtração em modo tangencial da solução de alimentação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL (para obter o tempo de recirculação de 2 h). Em todos os experimentos foi utilizado volume inicial de alimentação de 60 mL.

As fibras foram equilibradas em modo tangencial ou frontal (dependendo do experimento) a uma vazão de 0,7 mL/min com tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5. Foi preparada uma solução de PIS-C de 60 mL (na concentração de 3,1 a 3,3 mg/mL) diluída

1:1 em tampão Tris HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. Para as filtrações em modo tangencial a solução protéica foi alimentada a 0,7 mL/min, mantendo-se constante a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação ( $Q_f/Q_i$ ) igual a 0,7, através de duas bombas peristálticas, como ilustrado na Figura 3.8a. Para a filtração em modo frontal esta solução foi alimentada a 0,5 mL/min, como demonstrado na Figura 3.8b. Durante toda a alimentação o filtrado foi monitorado a 280 nm, através do detector UV.



Figura 3.8: Esquema da montagem do experimento de filtração (Serpa, 2002): (a) etapa de alimentação em modo tangencial; (b) etapa de alimentação em modo frontal e (c) etapa de eluição e regeneração. (1) reservatório de solução; (2) bomba peristáltica; (3) módulo de filtração; (4) detector UV (medidor de absorbância a 280 nm); (5) coletor de frações e (6) registrador.

Uma vez fixada a vazão do filtrado, pode-se calcular o tempo de residência da proteína dentro dos poros da membrana (no módulo) através da seguinte equação (Klein, 1991):

$$t_{\rm R} = V_i / Q_{\rm f} \tag{3.3}$$

onde:

 $t_R$  = tempo de residência;

 $V_i$  = volume intersticial das membranas (corresponde a 70% do volume total da membrana  $(0,157 \text{ cm}^3) = 0,118 \text{ cm}^3$ );

 $Q_f = vazão do filtrado (0,5 mL/min ou 0,3 mL/min).$ 

Após a alimentação, as proteínas não adsorvidas foram removidas do módulo através da lavagem em todos os modos de filtração (Figura 3.5) com o tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 0,02 M de imidazol, e em modo "backflushing", seqüencialmente, com os tampões Tris-HCl 30 mM pH 7,5 e tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 6 M de uréia. A seguir, todo o tampão contido no espaço concha foi removido, para evitar que durante a etapa de eluição das proteínas adsorvidas, houvesse a diluição das mesmas. A etapa de eluição foi realizada em modo "backflushing", como esquematizado na Figura 3.8c, a 0,5 mL/min utilizando seqüencialmente os tampões Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 50 mM de NaCl, 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol e Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 50 mM de NaCl, 6 M de uréia e 0,3 M de imidazol. Frações de todas as etapas de filtração foram coletadas em volumes de 1,0 mL e o conteúdo de proteína total e pró-insulina sulfonada foi analisado pelos métodos de Bradford e por HPLC, respectivamente. Por fim, o módulo foi regenerado em modo "backflushing" com solução de EDTA 50 mM pH 8,0.

#### 3.2.9.1. Determinação das curvas de ruptura

A seguir, foram determinadas as curvas de ruptura e a capacidade dinâmica das membranas no módulo para adsorção de PIS a partir das soluções PIS-IMAC, PIS-NC e PIS-C. Foi preparada uma solução de PIS de 60 mL (PIS/IMAC na concentração de 3,0 e 2,5 mg/mL, PIS-C na concentração de 3,3 mg/mL ou PIS-NC na concentração de 3,5 mg/mL) diluída 1:1 em tampão Tris HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. A solução de PIS foi alimentada a uma vazão de 0,7 mL/min, em modo tangencial com recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL (mantendo-se constante a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação (Q<sub>f</sub>/Q<sub>i</sub>) igual a 0,7). As curvas de ruptura foram obtidas através das análises quantitativas (pelo método de Bradford) e qualitativas (por eletroforese SDS-PAGE) das frações do filtrado, coletadas em volumes de

2,0 mL, durante a alimentação da solução protéica. Após a alimentação, com o intuito de determinar a capacidade dinâmica do módulo, as proteínas não adsorvidas e adsorvidas nas membranas foram removidas, respectivamente, nas etapas de lavagem e eluição, segundo o procedimento descrito para os experimentos de filtração. As frações de todas as etapas de filtração foram coletadas em volumes de 1,0 mL e analisadas pelo método de Bradford, eletroforese SDS-PAGE e por HPLC. As frações de eluição foram concentradas em filtros para centrífuga do tipo Centricon, de tamanho nominal de corte de 10.000 e 3.000 Daltons (Millipore, EUA), para serem quantificados seus conteúdos de pró-insulina sulfonada por HPLC.

Para avaliar o efeito do tempo de residência no desempenho do módulo foram realizados também experimentos de filtração da solução PIS-C (concentração de 3,4 a 3,6 mg/mL), nas mesmas condições descritas acima, para os modos tangencial (mantendo-se a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação ( $Q_f/Q_i$ ) igual a 0,7) e frontal empregando vazões de alimentação de, respectivamente, 0,43 e 0,3 mL/min.

# 3.2.10. Determinação de pró-insulina recombinante sulfonada (PIS) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (modificado da BIOMM, Montes Claros, MG)

As frações de lavagem e eluição obtidas durante os experimentos cromatográficos e de filtração foram analisadas, para quantificação de PIS, em um sistema HPLC da Waters (EUA), constituído de um sistema de bombas binário modelo 1525, detector de absorbância modelo 2487 e um computador Compaq com software Breeze versão 3.20. Foi utilizada uma coluna trocadora de ânions (contendo como grupo trocador de ânions o quaternário de amônio) Mono-Q HR 5/5 (Amersham Biosciences, EUA), de volume de leito de 1,0 mL, constituída de resina hidrofilica de poliéter com tamanho médio de partículas de 10 µm. As análises foram realizadas a 29 °C, à uma vazão de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 20 µl. As amostras foram previamente filtradas em filtros PVDF-Millex-HV (Millipore, EUA) de diâmetro de poro de 0,45 µm. A eluição das proteínas foi realizada em um gradiente descontínuo utilizando como fase móvel A, o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 6 M de uréia e como fase móvel B, o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 6 M de uréia e 1 M de NaCl. O gradiente foi realizado empregando as seguintes proporções
#### Materiais e Métodos

da fase móvel B na fase móvel A: 0-50% em 9 min, 50-80% em 3 min, 80% por 2 min, 80-81% em 1 min, 81% por 1 min, 81-100% em 1 min e 100% por 2 min, reequilibrando a coluna com 100 % da fase móvel A por 10 min. Durante as análises a proteína foi detectada pelo equipamento no comprimento de onda de 280 nm.

#### 3.2.11. Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas adsorvidas e não adsorvidas durante os experimentos cromatográficos e de filtração utilizando amostras clarificadas e não clarificadas foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes e redutoras, na presença de dodecilsulfato de sódio e β-mercaptoetanol.

A eletroforese SDS-PAGE, realizada no equipamento Mini Protein II Eletrophoresis Cell (Bio Rad, EUA), consistiu inicialmente na preparação de um gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida) na concentração de 15%. As amostras protéicas foram desnaturadas com solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10%, βmercaptoetanol a 1% e aquecimento a 100 °C por 8 min. A separação das proteínas no gel foi obtida em cuba vertical com voltagem constante de 200 V. Ao término da eletroforese, as proteínas foram visualizadas pela coloração do gel com nitrato de prata (Morrissey, 1981), fixando-se, inicialmente, o gel em solução aquosa contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético, mantendo, sob agitação, por um período de 30 min. Em seguida, o gel foi colocado em uma solução aquosa com 5% de metanol e 7% de ácido acético e mantido, sob agitação, durante 30 min. Após este tempo, o gel foi colocado em uma solução aquosa com 10% de glutaraldeído, permanecendo em contato com esta solução por 30 min. O gel foi, então, lavado com água destilada e adicionou-se uma solução de ditiotreitol a uma concentração de 5 mg/mL, mantendo-se, sob agitação, durante 30 min. Em seguida, adicionou-se uma solução a 0,1% de nitrato de prata, a qual foi mantida em contato com o gel por 30 min. O gel, após este procedimento, foi lavado com água destilada e duas vezes com o revelador (50 µl de formaldeído a 37% em 100 mL de carbonato de sódio a 3%). Em seguida, adicionou-se um volume de revelador suficiente para cobrir o gel e agitou-se até a visualização completa das bandas de proteínas no gel. A revelação foi finalizada ao adicionar uma solução de ácido cítrico 2,3 mol/l, a qual foi mantida, sob agitação, por 10 min. Lavou-se o gel 3 vezes com água destilada por 30 min. O gel foi estocado em 0,03%

# Materiais e Métodos

de carbonato de sódio e posteriormente guardado a seco em celofane. Para fins de comparação, algumas amostras foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Phast System (Pharmacia, EUA), sob condições desnaturantes e redutoras, utilizando gel de acrilamida homogêneo a 20%, o qual permite a visualização de proteínas de massa molecular entre 2 e 150 kDa. A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, segundo procedimento descrito no manual do equipamento.

Em todas as eletroforeses realizadas foram utilizados os seguintes marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA): fosforilase b (97 kDa), albumina (65 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

# **CAPÍTULO** 4

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1. Eletroforese SDS-PAGE das amostras de pró-insulina humana recombinante

Para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, foram doadas pela BIOMM, algumas amostras provenientes de diferentes etapas do processo de produção de próinsulina humana recombinante. Com a finalidade de avaliar qualitativamente estas amostras foi realizada eletroforese SDS-PAGE empregando gel de poliacrilamida a 15%, para identificar a presença de pró-insulina e de outras proteínas nas amostras. O resultado desta análise pode ser visualizado na Figura 4.1.

Foi verificado que todas as amostras contém a pró-insulina, cuja massa molecular, segundo a literatura (Ashcroft e Ashcroft, 1992), é de aproximadamente 9,5 kDa. Segundo o fornecedor, a banda correspondente a pró-insulina é constituída de pró-insulina sulfonada e não sulfonada. A amostra de PISR (Faixa 2), por ser constituída praticamente de pró-insulina, foi utilizada nos experimentos de adsorção em membranas-IDA-Me<sup>2+</sup> finamente cortadas com a finalidade de avaliar o perfil de eluição da proteína e selecionar o metal que apresentasse a maior capacidade de adsorção. A amostra de PIS-IMAC (Faixa 3), também por ser constituída quase que totalmente de pró-insulina e por estar disponível em maior quantidade, foi utilizada como proteína padrão nas análises por HPLC e nos experimentos para determinação da isoterma de adsorção e parâmetros cinéticos. As amostras de PIS-NC e PIS-C (Faixas 4 e 7, respectivamente) foram utilizadas como soluções de alimentação, por serem o objeto de purificação deste trabalho.

51



Figura 4.1: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixas 1, 5 e 6: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixa 2: PISR. Faixa 3: PIS-IMAC. Faixa 4: PIS-NC. Faixa 7: PIS-C.

# 4.2. Membranas de PEVA finamente cortadas: Ativação, imobilização de IDA e determinação da densidade de ligantes

As membranas de PEVA são constituídas de 70% de grupamentos hidrofilicos (álcool vinílico) e 30% de grupamentos hidrofóbicos (etileno) (Sakurada *et al.*, 1987), portanto, apresentam em sua estrutura grupamentos hidroxilas que permitem a ativação por vários reagentes, dentre eles, aqueles que apresentam grupamentos epóxido, como a epicloridrina, resultando em uma ligação éter com a matriz. A introdução de grupos epóxi na membrana permite a imobilização de ligantes, como o agente quelante IDA através da ligação covalente entre o grupamento epóxido e o grupamento amina deste ligante. A ativação das membranas de PEVA foi realizada de acordo com Serpa (2002), entretanto, este método está sujeito a ocorrência de reações paralelas, tais como hidrólise dos grupos epóxi ou reações entre os grupos hidroxilas remanescentes provocando cross-linking, as quais têm sido previstas por Scoble e Scopes (1996) durante a ativação de géis de agarose.

A eficiência da imobilização do agente quelante IDA na membrana de PEVA foi medida através da determinação da densidade de metal quelatado. A densidade dos metais cobre e níquel imobilizados nas membranas derivatizadas foi medida através de espectrofotometria UV-VIS e espectrometria de emissão ótica por plasma com acoplamento induzido (ICP), como descrito no item 3.2.3.1 de "Materiais e Métodos". Os valores obtidos para cada metal, bem como alguns valores de densidades de ligantes obtidos na literatura, utilizando géis de agarose, estão dispostos na Tabela 4.1.

 Tabela 4.1: Valores de densidade de ligantes utilizando membranas de PEVA e géis de agarose com IDA imobilizado.

	Densidade	e de ligantes	Método de	
Tipo de Matriz	(µmol/g su	porte seco) <sup>(1)</sup>	quantificação do	Referência
-	$Cu^{2+}$	Ni <sup>2+</sup>	metal	
Membranas PEVA	40	29	espectrometria de emissão ótica	Este trabalho
Membranas PEVA	40	37	Espectrofotometria UV-VIS	Este trabalho
Chelating Superose (i)	45	-	espectrometria de absorção atômica	Belew e Porath (1990)
Chelating Superose (ii)	90	-	espectrometria de absorção atômica	Belew e Porath (1990)
Chelating Superose (iii)	126	-	espectrometria de absorção atômica	Belew e Porath (1990)
Chelating Sepharose Fast Flow	93	-	Espectrofotometria UV-VIS	Belew et al. (1987)
Agarose	60		Não consta	Porath et al. (1975)
Sepharose 6B	49	47	espectrometria de absorção atômica	Smith et al. (1988)
Sepharose 6B	-	35 <sup>(2)</sup>	Não consta	Porath e Olin (1983)

<sup>(1)</sup> Utilizando a correlação: 3 mL de agarose = 1 g de gel seco e 1 mL de membrana = 0,25 g de membrana seca.

<sup>(2)</sup> Valores dados em µmol de Ni<sup>2+</sup>/g úmido de gel. (i), (ii) e (iii) indicam diferentes géis de Chelating Superose.

Comparando-se os valores obtidos neste trabalho com os encontrados na literatura, observou-se que os valores de densidade de metal imobilizados nas membranas de PEVA, em relação a massa seca, são próximos a alguns valores encontrados para os géis de agarose, tradicionalmente utilizados em IMAC, com exceção da densidade obtida no gel

Chelating Superose por Belew e Porath (1990) (126 µmol/g de suporte seco). Tal observação, comprovou a eficiência dos métodos de ativação e imobilização de IDA (desenvolvidos para a modificação de géis de agarose) para a preparação de adsorventes IMAC baseados em membranas poliméricas como suporte.

A variação encontrada nos valores de densidade de ligantes, mesmo entre os da literatura, ocorre possivelmente devido a dois fatores: 1) método utilizado na quantificação do metal (espectrofotometria UV-VIS ou espectrometria de absorção atômica), e 2) tipo de matriz empregada, que embora sejam basicamente constituídas de agarose, apresentam diferenças na sua estrutura física e química, ocasionando diferenças na capacidade de imobilização do metal. As características de cada suporte tais como tamanho dos poros e material de fabricação e os métodos empregados para a ativação e imobilização do agente quelante, também influenciam na densidade de ligantes imobilizados, o que torna pouco recomendável a comparação entre técnicas e matrizes diferentes. Dentre os métodos utilizados para a quantificação de íons metálicos imobilizados observou-se que a espectrometria de absorção atômica tem sido a técnica mais freqüentemente utilizada.

# 4.3. Adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup>

Com a finalidade de determinar o perfil de eluição da pró-insulina sulfonada e a capacidade de adsorção em função do íon metálico presente na matriz (Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup>), foram realizados experimentos cromatográficos com as membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> finamente cortadas, utilizando a proteína parcialmente purificada (PISR).

Nos cromatogramas típicos das Figuras 4.2 a 4.5 estão representados os picos obtidos nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias em membranas PEVA-IDA contendo, respectivamente, os íons Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup> imobilizados. As quantidades de proteína adsorvida e não adsorvida pelos suportes, respectivamente, nas frações das etapas de lavagem e eluição, foram determinadas através de análise a 280 nm. As frações da etapa de regeneração foram analisadas pelo método de Bradford. As quantidades de PISR obtidas nas etapas cromatográficas estão apresentadas na Tabela 4.2.



Figura 4.2: Cromatografía para adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> (em leito de partículas). Alimentação de 3,0 mL de solução a 6,0 mg/mL. Tampões de lavagem:
(A) Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A e
(C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampão de eluição (D) Tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Volume das frações: 2,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Linha preta: concentração de imidazol – Linhas coloridas: picos obtidos durante a cromatografía.



**Figura 4.3:** Cromatografia para adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (em leito de partículas). Alimentação de 2,8 mL de solução a 5,5 mg/mL. Tampões de lavagem: (A) Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 de imidazol; (B) Tampão A e (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampão de eluição (D) Tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Volume das frações: 2,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Linha preta: concentração de imidazol – Linhas coloridas: picos obtidos durante a cromatografia.



Figura 4.4: Cromatografia para adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Zn<sup>2+</sup> (em leito de partículas) Alimentação de 2,5 mL de solução a 6,0 mg/mL. Tampões de lavagem:
(A) Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A e
(C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampão de eluição (D) Tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Volume das frações: 2,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Linha preta: concentração de imidazol – Linhas coloridas: picos obtidos durante a cromatografia.



Figura 4.5: Cromatografia para adsorção de PISR em membranas PEVA-IDA-Co<sup>2+</sup> (em leito de partículas). Alimentação de 3,0 mL de solução a 5,5 mg/mL. Tampões de lavagem:
(A) Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A e
(C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampão de eluição (D) Tampão A contendo 6 M de uréia e 0,1 M de imidazol. Volume das frações: 2,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Linha preta: concentração de imidazol – Linhas coloridas: picos obtidos durante a cromatografia.

Suporte	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Regeneração* (mg)	% de proteína adsorvida
PEVA-IDA-Cu <sup>2+</sup>	18,00	0,60	17,23	0,18	97
PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup>	15,40	0,53	13,65	0,31	90
PEVA-IDA-Zn <sup>2+</sup>	15,00	5,90	7,15	0,15**	49
PEVA-IDA-Co <sup>2+</sup>	16,60	16,00	3,14	0,07	19

**Tabela 4.2:** Quantidade de PISR obtida nas etapas de lavagem, eluição e regeneração durante as cromatografias em membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> utilizando PISR.

\* As frações de PISR obtidas na etapa de regeneração foram analisadas pelo método de Bradford.

\*\* As frações de PISR obtidas na regeneração em membranas IDA-Zn<sup>+2</sup> foram analisadas a 280 nm.

Nas condições tamponantes empregadas, as membranas PEVA-IDA- $Cu^{2+}$  e PEVA-IDA- $Ni^{2+}$ , apresentaram capacidades de adsorção de PISR correspondendo, respectivamente, a 97 e 90% do total de proteína alimentada. Nos suportes PEVA-IDA- $Zn^{2+}$  e PEVA-IDA- $Co^{2+}$  foi adsorvida uma quantidade de PISR equivalente, respectivamente, a 49 e 19% do total de proteína alimentada. Diante destes resultados verificou-se que as membranas PEVA-IDA- $Cu^{2+}$  e PEVA-IDA- $Ni^{2+}$  apresentaram praticamente a mesma capacidade para adsorção de PISR, sendo maior do que as obtidas com as membranas PEVA-IDA- $Zn^{2+}$  e PEVA-IDA- $Co^{2+}$ .

As frações cromatográficas de adsorção de pró-insulina em PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup>, foram analisadas por espectrofotometria para os ions cobre, níquel e cobalto, respectivamente, nos comprimentos de onda 730, 384 e 511 nm. Foi demonstrado que as condições tamponantes empregadas e afinidade da proteína (PIS) pelo ion metálico não provocaram o desprendimento de metal durante os processos cromatográficos.

Tendo as membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentado melhor eficiência para adsorção de PISR (nas condições tamponantes propostas), estas foram selecionadas para a realização dos experimentos de purificação de pró-insulina sulfonada a partir das soluções clarificada e não clarificada.

# 4.4. Adsorção de PIS a partir das soluções clarificada e não clarificada em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>

Os experimentos de adsorção de PIS em membranas finamente cortadas de PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> foram realizados com o intuito de verificar o potencial destes adsorventes para a purificação desta proteína a partir de soluções clarificada (PIS-C) e não clarificada (PIS-NC). As proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelos suportes foram quantificadas pelo método de Bradford (em termos de proteína total) e por HPLC (em termos de pró-insulina sulfonada). A seletividade dos suportes para purificação de próinsulina foi avaliada qualitativamente através da análise das frações cromatográficas por eletroforese SDS-PAGE.

#### 4.4.1. Adsorção de PIS a partir de solução clarificada

Nestes experimentos, a solução clarificada diluída na proporção 1:1 no tampão Tris-HCl 30 mM contendo 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia (aproximadamente 70 mg de proteína total), foi alimentada na coluna de leito fixo contendo as membranas PEVA-IDA finamente cortadas com os íons Cu<sup>2+</sup> ou Ni<sup>2+</sup> imobilizados e os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.6. As proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelos suportes foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida a 15%, como apresentado na Figura 4.6 c.

Segundo a eletroforese (Figura 4.6 (c)), verificou-se que ambos suportes adsorveram uma quantidade significativa de pró-insulina (sulfonada e não sulfonada), como apresentado nas faixas 4 e 6. Entretanto, as membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> adsorveram, além da PIS, uma maior quantidade de impurezas (Faixa 6) do que as obtidas em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (Faixa 4). Como a presença de um único resíduo de histidina disponível na superfície é suficiente para a adsorção de proteínas em íons cobre, é justificável que este metal tenha adsorvido uma maior quantidade de proteínas contaminantes do que o íon níquel, o qual necessita de pelo menos dois resíduos de histidina disponíveis na superfície das proteínas para que ocorra a adsorção (Sulkowski, 1989).



**Figura 4.6:** Cromatografia para adsorção de PIS a partir de solução clarificada em membranas de (a) PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e (b) PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Alimentação: 20 mL de solução a 3,5 mg/mL. Tampões de lavagem: (A) Tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A; (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampões de eluição: (D) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,1 M de imidazol; (E) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,3 M de imidazol. (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. (c) Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. **Faixa 1:** marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). **Faixa 2:** PIS-C. **Faixa 3:** Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. **Faixa 4:** Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. **Faixa 5:** Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>. **Faixa 6:** Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>. **Faixa 7:** PISR .

As quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas cromatográficas, para ambos suportes, foram determinadas, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC e estão apresentadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração durante as cromatografias em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, analisadas, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC.

Analito	Suporte	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Recuperação
PEVA-IDA		68,00	61,00	5,20	0,22	66,42
Proteína (m <sub>§</sub>	PEVA-IDA- Cu <sup>2+</sup>	70,00	53,36	2,53	0,13	56,00
Analito	Suporte	Alimentação	Lavagem	Eluição	Recuperação	PIS adsorvida (%)
mg)	PEVA-IDA- Ni <sup>2+</sup>	16,00	8,20	4,60	13,00	29
PIS (n	PEVA-IDA- Cu <sup>2+</sup>	16,00	13,61	1,13	14,74	7

As membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> demonstraram maior adsorção de pró-insulina, 8% em termos de proteína total (5,42 mg em relação a 68,00 mg de alimentação) e 29% em termos de PIS (4,60 mg em relação a 16,00 mg de alimentação), do que as membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, onde a porcentagem de adsorção foi de 4% em termos de proteína total (2,66 mg em relação a 70,00 mg de alimentação) e 7% em termos de PIS (1,13 mg em relação a 16,00 mg de alimentação). Visto que 97% de pró-insulina (PISR) foi adsorvida em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> (item 4.3) e tendo a PIS, uma cauda com seis histidinas, esperava-se que este suporte apresentasse maior capacidade para adsorção da proteína a partir da solução clarificada do que as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, o que não ocorreu. O comportamento dos adsorventes foi avaliado para adsorção de PIS a partir de solução não clarificada e os resultados foram comparados com os atuais obtidos com a solução clarificada.

## 4.4.2. Adsorção de PIS a partir de solução não clarificada

Nestes experimentos, as membranas PEVA-IDA finamente cortadas, contendo os íons Cu<sup>2+</sup> ou Ni<sup>2+</sup> imobilizados, foram alimentadas com solução não clarificada diluída 1:1 no tampão de adsorção (aproximadamente 100 mg de proteína total). As etapas cromatográficas obtidas durante a adsorção de PIS nas membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> estão representadas nos gráficos da Figura 4.7 (a) e (b). As proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelos suportes foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida a 15% (Figura 4.7 c).

As quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas cromatográficas, para ambos suportes, foram determinadas, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC e estão apresentadas na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4:** Quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração durante as cromatografias em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, analisadas, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC.

Analito	Suporte	Alimentação	Lavagem	Eluição	Regeneração	Recuperação
t total	PEVA- IDA-Ni <sup>2+</sup>	98,80	87,61	6,18	0,11	94,00
Proteína (mg	PEVA- IDA-Cu <sup>2+</sup>	92,00	78,85	2,34	0,08	81,30
Analito	Suporte	Alimentação	Lavagem	Eluição	Recuperação	PIS adsorvida (%)
(gu	PEVA- IDA-Ni <sup>2+</sup>	24,00	12,44	6,11	18,55	26
) SIG	PEVA- IDA-Cu <sup>2+</sup>	24,20	21,97	nd	21,97	0

nd = abaixo do limite detectável em HPLC.



**Figura 4.7:** Cromatografia para adsorção de PIS a partir de solução não clarificada em membranas de (a) PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e (b) PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Alimentação: 20 mL de solução a 4,6 mg/mL.Tampões de lavagem: (A) Tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (Tampão A) contendo 0,02 M de imidazol; (B) Tampão A; (C) Tampão A contendo 6 M de uréia. Tampões de eluição: (D) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,1 M de imidazol; (E) Tampão A contendo 6 M de uréia, 50 mM NaCl e 0,3 M de imidazol. (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. (c) Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. **Faixa 1:** marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). **Faixa 2:** PIS-NC. **Faixa 3:** Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>. **Faixa 4:** Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>. **Faixa 5:** Fração de lavagem da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>.

Em acordo aos resultados obtidos com solução clarificada, as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> também demonstraram uma maior seletividade para a purificação de PIS, quando empregada solução não clarificada, do que as membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> (Faixas 4 e 6 da eletroforese SDS-PAGE, Figura 4.7 c).

Nas condições tamponantes propostas, obteve-se uma maior adsorção de proteína total e PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, sendo respectivamente, 6,4 (6,29 mg para 98.80 mg de alimentação) e 26% (6,11 mg para 24,00 mg de alimentação) do total de proteína alimentada, do que em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, as quais demonstraram uma porcentagem de, respectivamente, 2,6 (2,42 mg para 92,00 mg de alimentação) e 0% do total de proteína alimentada. Como a quantidade de PIS adsorvida nas membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> não foi detectável por HPLC, considerou-se inicialmente, que a proteína talvez estivesse muito diluída nas amostras. Foi realizada, então, uma outra cromatografia em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> (nas mesmas condições tamponantes e injetando a mesma quantidade de proteína), com a finalidade de coletar volumes menores (de 0.5 mL) das frações da etapa de eluição, possivelmente contendo quantidades mais concentradas de PIS detectáveis por HPLC. As frações foram analisadas, sem prévio congelamento, e novamente não foi possível quantificar a PIS presente nas amostras. Devido a baixa quantidade de proteína total obtida nas frações de regeneração, estas não foram analisadas por HPLC (onde a PIS estaria abaixo do limite de detecção do equipamento). Apesar de ter sido constatada, através da eletroforese SDS-PAGE (Faixa 4, Figura 4.7c), a presença de pró-insulina nas frações adsorvidas em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, as análises quantitativas demonstraram que não houve adsorção da proteína de interesse (pró-insulina sulfonada) neste suporte, sugerindo que possivelmente a banda correspondente é constituída basicamente de pró-insulina não sulfonada.

Para discutir melhor estes resultados foi realizada uma análise comparativa da adsorção de PIS em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> quando empregadas as soluções parcialmente purificada, clarificada e não clarificada.

# 4.4.3. Análise comparativa da adsorção de PIS em PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

As quantidade de proteínas adsorvidas e não adsorvidas em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> obtidas durante os experimentos cromatográficos para a

adsorção de PIS a partir das soluções PISR, clarificada e não clarificada são apresentados novamente na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5:** Quantidades de proteína total e PIS obtidas nas etapas de lavagem e eluição referentes às cromatografias em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> com diferentes soluções de alimentação.

Soluções alimentadas na coluna	Alimentação (mg)		Lavagem (mg)		Eluição (mg)		Recuperação (mg)		PIS adsorvida (%)	
	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
PISR *	18,00	15,40	0,60	0,53	17,23	13,65	18,01	14,50	97	90
PIS-C **	16,00	16,00	13,61	8,20	1,13	4,60	14,74	13,00	7,0	29
PIS-NC **	24,20	24,00	21,97	12,44	nd	6,11	21,97	18,55	0,0	26

nd= abaixo do limite de detecção do HPLC; \* As frações cromatográficas foram analisadas a 280 nm por espectrofotometria; \*\* As frações cromatográficas foram analisadas por HPLC.

A solução PISR (pureza 76%), a qual encontra-se totalmente ou parcialmente desnaturada pelo tampão de adsorção, foi eficientemente adsorvida pelas membranas e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, cujas porcentagens de adsorção foram, PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> respectivamente, 97 e 90% do total de proteína alimentada. Entretanto, guando as soluções PIS-b e PIS-NC (ambas com pureza de apenas 35%) foram alimentadas em ambos suportes, obteve-se uma diminuição significativa na adsorção de PIS (em relação aos resultados obtidos com PISR), com porcentagens de adsorção de, respectivamente, 7 e 0% (em PEVA- $IDA-Cu^{2+}$ ) e 29 e 26 % (em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>) do total de proteína alimentada. Tais observações indicaram, que a presença de impurezas influenciaram significativamente o desempenho dos adsorventes. Os experimentos de purificação de PIS em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> demonstraram uma adsorção de 7% de pró-insulina sulfonada (em relação ao total de proteína alimentada) quando utilizada solução clarificada e indicaram ausência de PIS nas frações de eluição, quando soluções não clarificadas foram utilizadas como alimentação. Por esta proteína conter uma cauda com seis histidinas, esperava-se uma forte adsorção em suportes-IDA-Cu<sup>2+</sup>, o que não ocorreu. O fato da PIS não ter sido

adsorvida, em quantidades significativas, em membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup>, pode ser explicado através de duas hipóteses. Uma seria a ocorrência de adsorção competitiva entre a PIS e proteínas contaminantes contendo também resíduos de histidinas, visto que a presença de um único resíduo de histidina disponível na superficie é suficiente para a adsorção em íons cobre. Como as soluções clarificada e não clarificada podem conter, além da PIS, agentes redutoras e peróxidos provenientes da solubilização de corpos de inclusão e da sulfitólise, uma outra hipótese seria que estes constituintes possam ter ocasionado reações oxidativas na presença do íon cobre durante o processo cromatográfico, as quais provocaram a perda parcial dos resíduos de histidina disponíveis na superfície da proteína (inclusive na cauda de poli(histidina)), impedindo a interação entre a proteína e o ligante.

Pesquisadores como Krishnamurthy *et al.* (1995) e Bush e Lumpkin (1998) têm demonstrado perda na atividade da enzima lactato desidrogenase, de 30 a 38%, devido a ocorrência de reações oxidativas, denominadas reações de Fenton, entre metais de transição, em particular ferro e cobre, e compostos como peróxidos, agentes redutores e tióis, tais como: ascorbato, cisteínas e  $\beta$ -mercaptoetanol. Estes compostos tendem a reagir com o cobre imobilizado, gerando produtos oxidativos que atacam os resíduos de aminoácidos localizados nos sítios de adsorção das proteínas, sendo mais suscetíveis os resíduos de histidinas, lisinas, cisteínas, prolinas, argininas e metioninas. Estas reações podem ocorrer em adsorventes IMAC que empregam amostras impuras resultantes da solubilização de corpos de inclusão por agentes redutores. Os danos provocados às proteínas incluem perdas de atividade, fragmentação, reticulação ("crosslinking"), agregação ou suscetibilidade à proteólise. Além disso, a presença de agentes redutores nas amostras pode ocasionar desprendimento do íon metálico devido a redução para Cu<sup>+</sup>.

Tendo a membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentado, nas condições tamponantes propostas, uma maior seletividade e capacidade para adsorção de PIS, esta foi selecionada para avaliar o comportamento de adsorção da proteína através da determinação de isoterma de adsorção e das constantes cinéticas de adsorção e dessorção, parâmetros estes importantes para a modelagem, simulação do processo de purificação e ampliação de escala.

65

# 4.5. Determinação da capacidade máxima de adsorção, da constante de dissociação e dos parâmetros cinéticos da adsorção de PIS em membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

#### 4.5.1. Análise de equilíbrio de adsorção em tanques agitados

A análise de equilíbrio de adsorção de PIS-IMAC em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, foi realizada como descrito no item 3.2.7 de "Materiais e Métodos". Inicialmente, o adsorvente esteve em contato com a solução protéica na concentração de 1,0 mg/mL, a 25 °C, por um período de 3 h e verificou-se que o equilíbrio (onde não há variação da concentração do soluto no meio com o tempo) foi atingido em 60 min, conseqüentemente o tempo total de 3 h foi suficiente para atingir o equilíbrio em todas as concentrações de PIS-IMAC utilizadas para a obtenção da isoterma de adsorção.

A isoterma de adsorção foi determinada utilizando as concentrações iniciais da solução PIS-IMAC variando entre 0,45 e 10,0 mg/mL, as quais foram mantidas em contato com o adsorvente por um período de 3 h. Os sobrenadantes obtidos foram analisados por espectrofotometria para determinar as concentrações de equilíbrio ( $C_{eq}$ ). A quantidade de PIS adsorvida pelo suporte (Q) foi calculada de acordo com a diferença entre as concentrações inicias e finais ( $C_{eq}$ ) dos sobrenadantes. Os valores calculados de  $C_{eq}$  e Q estão apresentados na Tabela 1A do Apêndice A. A partir dos valores de Q e  $C_{eq}$  foi obtida a isoterma de adsorção com o intuito de determinar a capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo IDA-Ni<sup>2+</sup>-PIS.

Os parâmetros  $Q_m$  e  $K_d$  foram ajustados aos dados experimentais, através de regressão não linear do modelo de Langmuir representado pela equação 2.4 do item 2.5 da "Revisão Bibliográfica". A isoterma de adsorção e os parâmetros obtidos estão apresentados, respectivamente, na Figura 4.8 e na Tabela 4.6.



Figura 4.8: Isoterma de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, obtida em tanques agitados à temperatura de 25 °C. Ajuste dos parâmetros do modelo de Langmuir aos dados experimentais. Tampão de adsorção: Tris-HCl 30 mM pH 7,5 com 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia.

Tabela 4.6 : Parâmetros determinados para a adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA- $Ni^{2+}$ .

Parâmetros do modelo de Langmuir	Valores
$Q_m \pm erro padrão (mg/g de membrana seca)$	184,28 ± 10,78
$K_d \pm erro padrão (M)$	$(7,73 \pm 1,72) \ge 10^{-5}$
Coeficiente de correlação	0,99
Variância	84,34
Desvio padrão	9,18

Variância =  $\sum (\text{Qcalculado} - \text{Qexperimental})^2 / (N-1); \text{Desvio padrão} = (variância)^{1/2}$ .

Erro padrão = desvio padrão/ $(N)^{1/2}$  (gerado pela regressão não linear dos parâmetros).

Neste trabalho, foi observado que a adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> foi bem representada pelo modelo de Langmuir, onde o coeficiente de correlação obtido foi de 0,99. O valor da capacidade máxima obtida (184,28 mg/g seca) está em acordo com o ponto experimental máximo obtido pela isoterma, e a constante de

dissociação ( $K_d$ ) da ordem de 10<sup>-5</sup> M indicou uma afinidade média entre a proteína e o ligante, característica de ligantes pseudobioespecíficos (Vijayalaskhmi, 1989).

No entanto, pesquisadores tais como Sharma e Agarwal (2001), Johnson e Arnold (1995) e Jiang e Hearn (1996), têm demonstrado que a adsorção de proteínas (lisozima, ovalbumina, albumina do soro bovino, conalbumina e aglutinina) em sistemas IMAC, os quais empregam géis de agarose como matriz suporte, não segue o modelo de Langmuir devido a fatores como, ligação da proteína em múltiplos sítios de adsorção, natureza heterogênea da superfície sólida e interações não específicas do tipo proteína-proteína. Outros modelos têm sido testados (Temkin, Freundlich, Langmuir-Freundlich), dentre os quais o modelo de Langmuir-Freundlich tem melhor representado o comportamento de adsorção dessas proteínas em sistemas IMAC.

Alguns pesquisadores (Todd et al., 1994) têm analisado o equilíbrio de adsorção de vários citocromos c recombinantes (contendo diferentes quantidades de resíduos de histidina disponíveis na superficie) em gel-IDA-Cu<sup>2+</sup> contendo diferentes densidades de ligantes imobilizados. Tendo em vista que a densidade e distribuição de ligantes no suporte influencia fortemente o tipo de interação (específica ou não específica) entre a proteína e o adsorvente, os pesquisadores observaram que a adsorção da proteína (citocromo c) com múltiplos resíduos de histidina apresentou comportamento langmuriano quando empregados géis contendo de 6 a 12 µmol de Cu<sup>2+</sup>/mL e comportamento não langmuriano quando empregados géis contendo de 14 a 18 µmol de Cu<sup>2+</sup>/mL. Baseado nestas observações e tendo as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentado uma densidade de ions níquel imobilizados em torno de 10 µmol/mL (40 µmol/g membrana seca), foi sugerido que o comportamento Langmuriano da adsorção de PIS, nas condições propostas, tenha sido influenciado pela presença de íons metálicos suficientemente espaçados e pela presença de uma cauda com seis histidinas, os quais contribuíram para a interação específica entre a proteína e o ligante, em detrimento de interações não específicas que afetariam o equilíbrio da adsorção.

# 4.5.2. Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

Foram realizados experimentos cinéticos como descrito no item 3.2.8 de "Materiais e Métodos", para determinar o tempo de equilíbrio e as constantes cinéticas de adsorção e

dessorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. As constantes cinéticas de adsorção, para diferentes concentrações de PIS, foram determinadas através da regressão não linear da expressão da taxa de variação da concentração de proteína na fase líquida com o tempo (equação 2.6). Neste modelo simplificado, proposto por Skidmore *et al.* (1990), é considerado que a taxa de reação na superfície é a etapa mais lenta do processo de adsorção. Os dados experimentais e teóricos da concentração de proteína na fase líquida com o tempo para as diferentes concentrações iniciais de solução protéica estão apresentados nas Tabelas 2A a 4A do Apêndice A. As curvas cinéticas teóricas e experimentais obtidas para as concentrações iniciais 1,0, 5,0 e 9,0 mg/mL estão representadas nas Figuras 4.9 a 4.11.



**Figura 4.9:** Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. Concentração inicial de PIS-IMAC: 1,0 mg/mL. Temperatura de 25°C. Curvas experimental (**II**) e ajustada (--).



**Figura 4.10:** Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. Concentração inicial de PIS-IMAC: 5,0 mg/mL. Temperatura de 25°C. Curvas experimental (■) e ajustada (--).



**Figura 4.11:** Cinética de adsorção de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> em tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. Concentração inicial de PIS-IMAC: 9,0 mg/mL. Temperatura de 25℃. Curvas experimental (■) e ajustada (--).

A cinética de adsorção em PEVA-IDA- $Ni^{2+}$  demonstrou que o tempo de equilíbrio (onde não há variação da concentração do soluto no meio com o tempo) foi atingido em 60, 60 e 30 minutos, respectivamente, para as concentrações de PIS de 1,0, 5,0 e 9,0 mg/mL, indicando que nesta última, a PIS foi mais rapidamente adsorvida pelo suporte (Figuras 4.9 a 4.11).

As constantes cinéticas de adsorção ( $k_a$ ) determinadas pelo modelo e as constantes de dessorção ( $k_d$ ), para cada concentração de PIS, determinadas pela equação  $K_d = k_d/k_a$ , utilizando a constante de dissociação ( $K_d$  equivalente a 7,73 x 10<sup>-5</sup> M, obtida pelo modelo de Langmuir no item 4.5.1) estão apresentadas na Tabela 4.7.

O ajuste dos parâmetros do modelo aos dados experimentais nas concentrações de PIS de 1,0, 5,0 e 9,0 mg/mL, com os quais obteve-se coeficientes de correlação entre 0,96 e 0,97, indicou que a adsorção de PIS nas membranas foi governada pela taxa de reação na superfície.

C <sub>0</sub> (mg/mL)	1,0	5,0	9,0 (4,0 $\pm$ 1,0) x 10 <sup>-2</sup> 2,8 x 10 <sup>-2</sup> 0,96	
k <sub>a</sub> (mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	$(1,62\pm0,3) \ge 10^{-2}$	$(0,58\pm0,08) \ge 10^{-2}$		
k <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	1,13 x 10 <sup>-2</sup>	0,4 x 10 <sup>-2</sup>		
Coeficiente de correlação	0,96	0,97		
Variância	0,0073	0,05	0,118	
Desvio padrão	0,086	0,223	0,343	

**Tabela 4.7:** Constantes de adsorção ( $k_a$ ) e dessorção ( $k_d$ ) de PIS em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>.

Variância =  $\sum (Qcalculado - Qexperimental)^2 / (N-1).$ 

Desvio padrão =  $(variancia)^{1/2}$ .

Erro padrão = desvio padrão/ $(N)^{1/2}$ 

Nas condições tamponantes propostas, a pró-insulina foi mais rapidamente adsorvida pelo sistema PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> quando empregada solução inicial na concentração de 9,0 mg/mL, cuja constante de adsorção foi de 4,0 x  $10^{-2}$  mL.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, do que nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg/mL, para as quais as constantes de adsorção foram de 1,62 x  $10^{-2}$  mL.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e 0,58 x  $10^{-2}$  mL.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectivamente. Para as concentrações

iniciais de 1,0 (k<sub>a</sub> de 1,62 x  $10^{-2}$  mL.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e k<sub>d</sub> de 1,13 x  $10^{-2}$  min<sup>-1</sup>) e 5,0 mg/mL (k<sub>a</sub> de 0,58 x  $10^{-2}$  mL.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e k<sub>d</sub> de 0,4 x  $10^{-2}$  min<sup>-1</sup>) não houve diferença significativa entre os valores das taxas de adsorção e dessorção. Por outro lado quando empregada solução inicial de 9,0 mg/mL (k<sub>a</sub> de 4,0 x  $10^{-2}$  mL.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e k<sub>d</sub> de 2,8 x  $10^{-2}$  min<sup>-1</sup>), o fato de ter sido obtida uma taxa de adsorção maior do que a taxa de dessorção, sugere que nesta concentração houve uma maior afinidade entre a proteína e o sistema PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>.

Determinados os parâmetros capacidade máxima, constante de dissociação e constantes cinéticas de adsorção de PIS em membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, este adsorvente foi avaliado em relação as suas características de filtração através de experimentos em módulo em escala laboratorial.

# 4.6. Experimentos de filtração em módulo de membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

# 4.6.1. Determinação da densidade de ligantes das membranas de PEVA-IDA contidas no módulo

As membranas de PEVA contidas no módulo de filtração foram ativadas com epicloridrina e IDA foi imobilizado como descrito no item 3.2.2.2 e 3.2.2.3 de "Materiais e Métodos".

A eficiência da imobilização do agente quelante IDA na membrana de PEVA foi medida através da determinação da densidade de metal quelatado. O adsorvente derivatizado foi saturado com uma solução de sulfato de cobre 50 mM e após a remoção do metal fracamente quelatado (lavagem do módulo com água ultrapura e tampão de pH 4,0), o cobre adsorvido foi eluído com uma solução de EDTA 50 mM e as frações obtidas foram analisadas a 730 nm, utilizando uma curva de calibração previamente construída. Como o cobre se liga ao IDA na proporção 1:1, a quantidade de cobre obtida nas frações de eluição corresponde a quantidade de IDA imobilizado nos suportes. Através desta análise obteve-se uma densidade de Cu<sup>2+</sup> (IDA imobilizado) equivalente a 184 µmol de Cu<sup>2+</sup>/g membrana seca. Em comparação ao resultado obtido com as membranas PEVA-IDA finamente cortadas (40 µmol de Cu<sup>2+</sup>/g de membrana seca), observou-se que, no módulo, a densidade de ligantes imobilizados foi cerca de 5 vezes maior. Este resultado pode ser atribuído ao

fato de que no módulo as soluções de ativação e imobilização de IDA passam por todos os espaços da membrana através da filtração nos modos frontal, tangencial, espaço interno e espaço concha, permitindo, desta maneira, a introdução de uma maior quantidade de grupos epóxi e ligantes, do que quando empregadas as membranas finamente cortadas, onde o transporte da solução é governado pela difusão.

# 4.6.2. Seleção do modo operacional para a filtração de PIS no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

Foram realizados experimentos de filtração da solução clarificada em modo frontal e tangencial (como descrito no item 3.2.9 de "Materiais e Métodos"), com o objetivo de selecionar as melhores condições para a adsorção de PIS. Com base na experiência adquirida no nosso laboratório em trabalhos anteriores, para purificação de imunoglobulina G através de filtração em membranas de afinidade de soluções de soro humano ou sobrenadante de cultura celular, neste trabalho foram propostas quatro estratégias de operação:

- 1) Filtração em modo frontal da solução de alimentação até atingir a saturação;
- Filtração em modo tangencial da solução de alimentação até a saturação sem recirculação do retentado e filtrado;
- Filtração em modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado ao reservatório de alimentação por um período de uma hora;
- Filtração em modo tangencial com recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL (para obter o tempo de recirculação de 2h).

Nestes experimentos utilizou-se a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação  $(Q_f/Q_i)$  igual a 0,7 (experimentos preliminares demonstraram que valores de  $Q_f/Q_i$  maiores que 0,7 provocam colmatagem no módulo de filtração (Serpa, 2002)), com vazão de alimentação de 0,7 mL/min, vazão de filtrado de 0,5 mL/min e tempo de residência de PIS nas membranas de 14 s. Estas condições foram escolhidas baseado em outros trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório, onde o tempo de residência de 10 a 15 s foi o mais adequado para a adsorção de imunoglobulina G em módulo de fibras ocas de PEVA.

Tempos de residência menores que 10 s podem, dependendo da proteína a ser purificada, contribuir para uma diminuição da capacidade de adsorção das membranas de afinidade.

As quantidades de proteína total e PIS determinadas, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC nas etapas de lavagem, eluição e regeneração, bem como a capacidade dinâmica do módulo em miligrama de proteína por grama de membrana seca para as diferentes filtrações estão apresentadas na Tabela 4.8.

A capacidade de adsorção em termos de proteína total foi similar (em torno de 20 mg/g de membrana seca) para todos os modos de filtração empregados, com exceção da filtração tangencial sem recirculação do retentado e filtrado, onde obteve-se uma capacidade de adsorção de 12,46 mg/g de membrana seca. Diante deste resultado, concluiu-se que a recirculação do retentado e filtrado ao reservatório influenciou positivamente na eficiência do módulo para a realização da filtração tangencial.

No entanto, as capacidades de adsorção de PIS (obtidas por HPLC) foram equivalentes a 0,92, 0,05, 0,54 e 1,4 mg de PIS/g de membrana seca, respectivamente, para as filtrações em modo frontal (experimento 1), em modo tangencial sem recirculação da solução (experimento 2), em modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado por um período de uma hora (experimento 3) e em modo tangencial com recirculação do retentado (até o volume de alimentação atingir 10 mL) (experimento 4). Foi necessário a recirculação do retentado por um tempo superior a uma hora (como obtido pelo experimento 4) para obter uma maior capacidade de adsorção de PIS através de filtração em modo tangencial.

Em comparação às membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas (onde a capacidade de adsorção de PIS a partir de solução clarificada foi aproximadamente 4,0 mg/g de membrana seca), a capacidade no módulo para adsorção de PIS foi cerca de 3 vezes menor (1,4 mg/g de membrana seca). Uma hipótese para este resultado seria que no módulo, o acúmulo de biomoléculas na superfície e no interior dos poros da membrana pode ter reduzido a acessibilidade da PIS aos sítios de adsorção, resultando conseqüentemente, na baixa capacidade de adsorção deste sistema em relação às membranas finamente cortadas.

Durante os experimentos de filtração, a vazão do filtrado foi monitorada e constatou-se, no início do ensaio, a queda da vazão em torno de 10%, sendo estabilizada rapidamente neste valor sem ocasionar problemas de entupimento na membrana.

Tendo sido obtida uma maior capacidade de adsorção de PIS através do experimento de filtração tangencial com recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL (1,40 mg de PIS/g de membrana seca), esta condição operacional foi então selecionada para a obtenção das curvas de ruptura de PIS e para a determinação da capacidade dinâmica do módulo empregando-se as soluções PIS-IMAC, clarificada e não clarificada.

Modo de operação	Vazão de alimentação (mL/min)	Razão (Qť/Qi)	Método de análise	Concentração (mg/mL)	Alimentação (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Capacidade de adsorção (mg/g seca)
Frontal	0,5	-	Bradford	3,10	186,00	2,26	0,35	20,00
			HPLC (PIS)	0,93	58,60	0,12	**	0,92
Tangencial*	0,7	0,7	Bradford	3,20	192,00	1,34	0,28	12,46
			HPLC (PIS)	0,93	56,00	0,0062	-	0,05
Tangencial**	0,7	0,7	Bradford	3,10	186,00	2,60	0,32	22,50
			HPLC (PIS)	1,00	60,00	0,07	10	0,54
Tangencial***	0,7	0,7	Bradford	3,30	198,00	2,10	0,60	20,77
			HPLC (PIS)	0,93	56,00	0,18	-	1,40

Tabela 4.8: Adsorção de PIS a partir de solução clarificada em diferentes condições operacionais.

\* Filtração tangencial sem recirculação do retentado e filtrado. \*\* Filtração tangencial com recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL. Volume inicial de alimentação igual a 60 mL. Vazão de filtrado de 0,5 mL/min.

# 4.6.3. Determinação das curvas de ruptura de PIS a partir de soluções PIS-IMAC, clarificada (PIS-C) e não clarificada (PIS-NC)

As curvas de ruptura ("breakthrough curves") foram determinadas para descrever o perfil da concentração de PIS no efluente em função da massa alimentada ou volume do efluente. Em condições ideais, o ponto de ruptura ocorreria somente após a saturação da ligação proteína-ligante, onde a concentração da proteína no efluente aumentaria instantaneamente de zero para àquela da solução de alimentação. Nos processos industriais de purificação de proteínas é desejável minimizar a perda de produto na corrente do filtrado durante a etapa de alimentação. Conseqüentemente, a adsorção deve proceder até ocorrer o "breakthrough" (ponto de ruptura), ponto no qual a proteína começa a ser detectada no efluente, sendo necessário finalizar a etapa de alimentação. Em contraste, nos processos que envolvem tratamento extracorpóreo cujo objetivo é a remoção do agente patogênico do plasma ou do sangue do paciente, é desejável que a adsorção continue até atingir a saturação do adsorvente. Neste caso a alimentação é finalizada quando a concentração de proteína no efluente é aproximadamente igual a concentração de proteína na alimentação (Kochan *et al.*, 1996, Charcosset *et al.*, 1995).

Os experimentos foram realizados através da filtração tangencial e frontal da solução PIS-IMAC e filtração tangencial das soluções clarificada e não clarificada. A filtração tangencial foi realizada com recirculação do retentado (até o volume de alimentação atingir 10 mL), utilizando a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação (Q<sub>f</sub>/Q<sub>i</sub>) igual a 0,7, vazão de alimentação de 0,7 mL/min e vazão de filtrado 0,5 mL/min. O ponto de ruptura foi determinado em termos de proteína total e PIS através das análises das frações do filtrado, respectivamente, pelos métodos de Bradford e HPLC. Em termos qualitativos, o ponto de ruptura foi visualizado através de eletroforese SDS-PAGE das frações do filtrado, quando empregadas as soluções clarificada e não clarificada.

## 4.6.3.1. Curvas de ruptura de PIS a partir da solução PIS-IMAC

Com a finalidade de comparar a influência do modo de filtração nas curvas de ruptura de PIS a partir da solução de alimentação PIS-IMAC (solução onde a PIS encontra-

se parcialmente purificada), estas foram obtidas através das filtrações em modo tangencial e em modo frontal e estão representadas nos gráficos das Figuras 4.12 e 4.13. As frações do filtrado foram analisadas a 280 nm utilizando um coeficiente de extinção, previamente determinado para PIS-IMAC, equivalente a 0,47 cm<sup>2</sup>/mg.



Figura 4.12: Curva de ruptura de PIS obtida por filtração tangencial a partir de solução PIS-IMAC. Vazão de alimentação de 0,7 mL/min. Vazão de filtrado de 0,5 mL/min. Volume coletado: frações de 2,0 mL. Frações do filtrado analisadas por espectrofotometria a 280 nm.



**Figura 4.13:** Curva de ruptura de PIS obtida por filtração frontal a partir de solução PIS-IMAC. Vazão de alimentação de 0,5 mL/min. Volume coletado: frações de 2,0 mL. Frações do filtrado analisadas por espectrofotometria a 280 nm.

No início da alimentação a concentração de PIS no filtrado foi zero, para ambos modos de filtração, indicando a adsorção das moléculas de proteína pelos ions níquel imobilizados. A medida que os sítios de ligação tornam-se saturados, a alimentação contínua refletiu no surgimento da proteína nas frações do filtrado, indicando neste momento o ponto de ruptura. Definindo-se o ponto de ruptura em C/C<sub>0</sub> igual a 0,1, como descrito em Charcosset *et al.* (1995), verificou-se que a perda de proteína no filtrado ocorreu após a passagem de 10 e 8 mL de solução de alimentação PIS-IMAC, ou seja, após a passagem de 30 e 20 mg de proteína total, respectivamente, para as filtrações nos modos tangencial e frontal. Este resultado significou que o modo de filtração influenciou o ponto de ruptura de PIS no módulo. No modo tangencial a recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL, pode ter retardado a saída da proteína de interesse no filtrado (após 20 min de alimentação) em relação ao modo frontal (após 16 min de alimentação) favorecendo a adsorção.

Diante disto, a filtração em modo tangencial foi selecionada para a obtenção das curvas de ruptura de PIS a partir de soluções clarificada e não clarificada, visando avaliar a influência da presença de contaminantes no desempenho do módulo.

## 4.6.3.2. Curvas de ruptura de PIS a partir de solução clarificada (PIS-C)

Experimentos de filtração em modo tangencial da solução clarificada foram realizados para a obtenção de curvas de ruptura em termos de proteína total e PIS. As frações do filtrado foram analisadas quantitativamente pelos métodos de Bradford e por HPLC e qualitativamente por eletroforese SDS-PAGE, com o objetivo de verificar o ponto de ruptura da pró-insulina recombinante no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. As curvas de ruptura obtidas, bem como a eletroforese das frações do filtrado estão apresentadas nas Figuras 4.14 a 4.16.



Figura 4.14: Curva de ruptura de proteína total a partir de solução clarificada (PIS-C). Vazão de alimentação de 0,7 mL/min. Vazão de filtrado de 0,5 mL/min. Volume coletado: frações de 2,0 mL. Frações do filtrado analisadas pelo método de Bradford.



**Figura 4.15:** Curva de Ruptura de PIS a partir de solução clarificada (PIS-C). Vazão de alimentação de 0,7 mL/min. Vazão de filtrado de 0,5 mL/min. Volume coletado: frações de 2,0 mL. Frações do filtrado analisadas por HPLC.



Figura 4.16 : Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras sob condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1 e 9: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixas 2 a 8: frações 2 a 8 do filtrado. Faixas: 10 a 16: frações 10 a 16 do filtrado.

Definindo-se o ponto de ruptura em termos de proteína total em C/C<sub>0</sub> igual a 0,1, como descrito em Charcosset *et al.* (1995) e em termos de PIS em C/C<sub>0</sub> igual a 0,5 (ponto a partir do qual a PIS foi detectável por HPLC), verificou-se que a perda de proteína total e PIS no filtrado ocorreu, respectivamente, após a passagem de 11 (36 mg de proteína total) e 18 mL (16 mg de PIS) de solução clarificada, ou seja, após 22 e 36 min de alimentação. No ponto de ruptura a concentração de PIS na fração de filtrado (volume de 1,0 mL) foi de 0,46 mg/mL. Em comparação às curvas obtidas para solução PIS-IMAC (parcialmente purificada), onde a perda de proteína ocorreu no filtrado após 20 min de alimentação, observou-se que a presença de contaminantes na solução clarificada influenciou o ponto de ruptura de PIS no módulo (ponto de ruptura após 36 min de alimentação), retardando a saída da proteína. Entretanto, este resultado não implica que a PIS tenha sido adsorvida em maior quantidade quando empregada a solução clarificada (do que com PIS-IMAC), visto que a presença de contaminantes pode diminuir a capacidade de adsorção do suporte devido a competitividade entre a proteína de interesse e as impurezas pelos sítios de ligação imobilizados no suporte. Através da eletroforese SDS-PAGE da Figura 4.16, foi demonstrado que a perda de proteína (pró-insulina sulfonada e não sulfonada) ocorreu a partir da décima fração do filtrado (cuja quantidade de PIS não foi detectável por HPLC).

# 4.6.3.3. Curvas de ruptura de PIS a partir de solução não clarificada (PIS-NC)

Com a finalidade de avaliar o comportamento do módulo para adsorção de PIS a partir de solução não clarificada, foram obtidas curvas de ruptura de proteína total e PIS, através de análises quantitativas do filtrado, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC e qualitativas por eletroforese SDS-PAGE (Figuras 4.17 a 4.19). Os resultados foram comparados aos obtidos com solução clarificada e PIS-IMAC.



Figura 4.17: Curva de Ruptura de proteína total a partir de solução não clarificada (PIS-NC), determinada pelo método de Bradford.



Figura 4.18: Curva de Ruptura de PIS no filtrado a partir de solução não clarificada (PIS-NC), determinada em análise por HPLC.



Figura 4.19: Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixas 1 e 9: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixas 2 a 8: frações 2 a 8 do filtrado. Faixas 10 a 16: frações 10 a 16 do filtrado.

Definindo-se o ponto de ruptura em termos de proteína total em C/C<sub>0</sub> igual a 0,1, como descrito em Charcosset *et al.* (1995) e em termos de PIS em C/C<sub>0</sub> igual a 0,46 (ponto a partir do qual a PIS foi detectável por HPLC), verificou-se que a perda de proteína total e PIS ocorreu no filtrado, respectivamente, após a passagem de 8 (28 mg de proteína total) e

16 mL (15 mg de PIS) de solução não clarificada, ou seja, após, respectivamente, 16 e 32 min de alimentação. No ponto de ruptura a concentração de PIS na fração de filtrado (volume de 2,0 mL) foi de 0,44 mg/mL. Em comparação, observou-se que a perda de proteína total e PIS no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> ocorreu mais rapidamente quando empregada solução não clarificada (após, respectivamente, 16 e 32 min de alimentação) do que quando empregada solução clarificada (após, respectivamente, 16 e 32 min de alimentação) do que quando empregada solução clarificada (após, respectivamente, 22 e 36 min de alimentação). Neste caso, a perda de PIS no filtrado pode ter sido influenciada pela presença de um número maior de contaminantes na solução não clarificada (em relação a solução clarificada e PIS-IMAC), os quais provavelmente provocaram um maior acúmulo de proteínas na superfície e no interior dos poros (tendo em vista que obteve-se uma queda no fluxo do permeado em torno de 15%, a qual manteve-se constante neste valor), ocasionando a inacessibilidade da PIS aos íons metálicos imobilizados e maior adsorção competitiva.

A influência da presença de contaminantes (em maior quantidade na solução não clarificada) no ponto de ruptura do módulo foi confirmada comparando-se as eletroforeses SDS-PAGE das Figuras 4.16 e 4.19, onde observou-se que a perda de proteína (PIS sulfonada e não sulfonada) no filtrado ocorreu mais rapidamente quando empregada a solução não clarificada (banda de pró-insulina visualizada a partir da fração 2, cuja quantidade de PIS não foi detectável por HPLC) do que quando empregada solução clarificada (onde a PIS foi detectada a partir da fração 10).

# 4.6.4. Capacidade dinâmica do módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

A capacidade dinâmica do módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> para adsorção de PIS a partir das soluções PIS-IMAC, clarificada e não clarificada foi determinada através de experimentos de filtração tangencial com recirculação do retentado (até o volume de alimentação atingir 10 mL), utilizando a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação  $(Q_f/Q_i)$  igual a 0,7, vazão de alimentação de 0,7 mL/min e vazão de filtrado de 0,5 mL/min. As proteínas adsorvidas e não adsorvidas no módulo foram analisadas, quatitativamente, em termos de proteína total e PIS, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC (Tabela 4.9) e qualitativamente por eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.20).
Foi observado que o módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentou uma maior capacidade dinâmica para adsorção de PIS quando empregada solução PIS-IMAC (17,0 mg/g de membrana seca) do que quando empregadas soluções clarificada (1,4 mg/g de membrana seca) e não clarificada (0,3 mg/g de membrana seca). Este resultado implica que a presença de contaminantes nas soluções clarificada e não clarificada influenciou significativamente para a diminuição da capacidade dinâmica do módulo. Apesar da capacidade de adsorção de PIS no módulo ter sido maior quando empregada solução clarificada, em termos de seletividade (Faixas 5 e 11, Figura 4.20) o adsorvente apresentou similaridade para ambas soluções (clarificada e não clarificada).



Figura 4.20 : Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Filtração no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> com injeção tangencial e recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL. Faixas 1 e 7: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Filtração de solução clarificada. Faixa 2: Fração da injeção. Faixa 3: Fração do retentado. Faixa 4: Fração das etapas de lavagem. Faixa 5: Fração das etapas de eluição. Filtração de solução não clarificada. Faixa 8: Fração da injeção. Faixa 9: Fração do retentado. Faixa 10: Fração das etapas de lavagem. Faixa 11: Fração das etapas de eluição. Faixas 6 e 12: marcador de PIS de alta pureza.

Tabela 4.9: Filtração tangencial com recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL: Adsorção de PIS em diversas soluções de alimentação.

Modo de operação	Solução de alimentação	Método de análise	Concentração (mg/mL)	Alimentação (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Capacidade de adsorção (mg/g seca) *
Tangencial	PIS-IMAC	Bradfodr	2,70	162,00	2,17	0	17,00
Tangencial	PIS-C	Bradford	3,30	198,00	2,10	0,60	20,77
		HPLC (PIS)	0,93	56,00	0,18	-	1,40
Tangencial	PIS-NC	Bradford	3,50	247,30	1,80	0,20	15,40
		HPLC (PIS)	0,97	69,30	0,035	-	0,30

Vazão de alimentação de 0,7 mL/min.

Vazão de filtrado de 0,5 mL/min.

Razão vazão de filtrado por vazão de alimentação igual a 0,7. \* a capacidade de adsorção foi calculada pelo somatório das massas obtidas nas etapas de eluição e regeneração dividido pela massa seca das membranas no módulo (0,13 g de membrana seca).

Em comparação, as capacidades de adsorção de PIS obtidas em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas (aproximadamente 4,0 mg/g de membrana seca e 5,0 mg/g de membrana seca, respectivamente, quando empregadas soluções clarificada e não clarificada) foram cerca de 3 e 5 vezes maior do que as obtidas no módulo (1,4 e 0,3 mg/g de membrana seca, quando empregadas, respectivamente, soluções clarificada e não clarificada), apesar da densidade de ligantes no módulo ter sido 5 vezes maior (184  $\mu$ mol/g de membrana seca) do que a obtida nas membranas finamente cortadas (40  $\mu$ mol/g de membrana seca). Estes resultados sugerem, que no módulo, o acúmulo de biomoléculas (impurezas) na superfície e no interior dos poros pode ter reduzido a acessibilidade da PIS aos sítios de adsorção.

Em todos os experimentos de filtração, devido a baixa quantidade de proteína total obtida nas frações de regeneração, estas não foram analisadas por HPLC (onde a PIS estaria abaixo do limite de detecção do equipamento).

A capacidade dinâmica das membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> para adsorção de PIS pode ainda ser comparada em relação à capacidade estática obtida através da isoterma de adsorção (item 4.5.1). Alguns pesquisadores tais como Charcosset et al. (1995) têm obtido similaridade entre as capacidades estática e dinâmica para adsorção de imunoglobulina G em membranas de fibras ocas (constituídas de poliétersulfona e óxido de polietileno) contendo proteína A imobilizada. Entretanto, neste trabalho a capacidade dinâmica para adsorção de PIS-IMAC (17 mg/g de membrana seca) foi cerca de 10 vezes menor do que a obtida em modo estático (184 mg/g de membrana seca). Klein et al. (1994) e Kochan et al. (1996) obtiveram, respectivamente, uma capacidade dinâmica 1,5 e 7 vezes menor do que a capacidade estática, para adsorção de IgG, respectivamente, em membranas de poliétersulfona contendo proteína A imobilizada e membranas de celulose com proteína G imobilizada. Os pesquisadores verificaram que esta diferença pode ocorrer em fibras que apresentam heterogeinidade na distribuição dos poros, como as membranas de PEVA e poliétersulfona. Durante a filtração (modo dinâmico) nestas membranas, a solução protéica, a qual é conduzida por convecção, tende a fluir preferencialmente para os poros de diâmetros grandes, saturando rapidamente os sítios de ligação. Já os sítios de ligação presentes nos poros de diâmetros menores, os quais exibem uma maior resistência ao fluxo, tendem a não ser completamente saturados durante a convecção, principalmente quando

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCI II ANTE

empregadas vazões elevadas de filtrado. Geralmente esta utilização preferencial dos poros não ocorre quando o processo de adsorção é realizado sob condições não convectivas, modo estático, onde suponhe-se que no tempo de equilíbrio todos os ligantes acessíveis à proteína foram completamente saturados (Klein *et al.*, 1994).

Em suma, tendo o módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentado uma baixa capacidade para adsorção de PIS a partir de solução clarificada (1,4 mg/g de membrana seca) e não clarificada (0,3 mg/g de membrana seca) resolveu-se investigar o efeito do tempo de residência no desempenho do adsorvente.

### 4.6.5. Efeito do tempo de residência no desempenho do módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

O efeito do tempo de residência no desempenho do módulo foi avaliado através de de experimentos de filtração em modo frontal, utilizando vazão de alimentação de 0,3 mL/min e em modo tangencial com recirculação do retentado (até o volume de alimentação atingir 10 mL), utilizando a razão vazão de filtrado por vazão de alimentação (Q<sub>f</sub>/Q<sub>i</sub>) igual a 0,7, vazão de alimentação de 0,43 mL/min e vazão de filtrado de 0,3 mL/min. As proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelo suporte foram analisadas, em termos de proteína total e PIS, respectivamente, pelo método de Bradford e por HPLC e estão apresentadas na Tabela 4.10.

Foi verificado na filtração em modo frontal que a capacidade de adsorção de PIS a partir de solução clarificada aumentou por um fator de 5 quando a vazão de alimentação foi diminuída de 0,5 mL/min (capacidade de adsorção de PIS 0,92 mg/g de membrana seca) para 0,3 mL/min (capacidade de adsorção de PIS 4,62 mg/g de membrana seca). Nas filtrações em modo tangencial das soluções clarificada e não clarificada foram obtidas capacidades de adsorção de PIS de 4,23 e 0,93 mg/g seca, respectivamente, quando empregada a vazão de filtrado de 0,3 mL/min. Em comparação as capacidades obtidas quando utilizada vazão de filtrado de 0,5 mL/min (1,4 e 0,3 mg de PIS/g de membrana seca, respectivamente, para solução clarificada e não clarificada), verificou-se que houve um aumento na capacidade de adsorção de PIS no módulo da ordem de 3, quando utilizada vazão de filtrado de 0,3 mL/min.

Estes resultados indicaram que o aumento do tempo de residência de 14,1 (com vazão de 0,5 mL/min) para 23,6 s (com vazão de 0,3 mL/min) foi essencial para melhorar a

eficiência do adsorvente para a adsorção da proteína de interesse. Outros pesquisadores como Charcosset *et al.* (1995), também demonstraram que o aumento do tempo de residência de IgG em membranas de fibras ocas contendo proteína A imobilizada, proporcionou um aumento na capacidade de adsorção desta proteína pelo suporte. Tendo em vista que impurezas contidas na solução clarificada podem dificultar o acesso da PIS aos ligantes imobilizados, devido ao acúmulo no interior dos poros e competitividade, um maior tempo de residência da proteína no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> pode ter proporcionado maior acessibilidade aos sítios de ligação ocasionando o aumento na capacidade de adsorção.

Foi também constatado que no tempo de residência de 23,6 s, a filtração da solução clarificada pôde ser realizada, tanto em modo frontal quanto em modo tangencial, visto que foram obtidos valores de capacidade de adsorção de PIS muito próximos, sendo respectivamente, 4,62 e 4,23 mg/g de membrana seca. Quando soluções não clarificadas são utilizadas na alimentação, recomenda-se a operação em modo tangencial para se evitar a colmatagem das membranas e a queda do fluxo do permeado.

Com a finalidade de avaliar a possível vantagem de se utilizar membranas como matrizes de afinidade em substituição aos géis tradicionalmente utilizados em processos de purificação, comparou-se a seletividade e a capacidade de adsorção de PIS nas membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (estudada neste trabalho) com o gel de afinidade Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>.

Modo de operação	Vazão de alimentação (mL/min)	Vazão de filtrado (mL/min)	Tempo de residência (s)	Solução de alimentação	Método de análise	Concentração (mg/mL)	Alimentação (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Capacidade de adsorção (mg/g seca)
Frontal	0.50	0,50	14,1	Clarificada	Bradford	3,10	186,00	2,26	0,35	20,00
					HPLC (PIS)	0,93	58,60	0,12	-	0,92
Frontal 0,30	0.20	0,30 0,30	) 23,6	Clarificada	Bradford	3,60	187,20	5,10	0,37	42,00
	0,30				HPLC (PIS)	1,00	52,00	0,60		4,62
Tangencial *	0,43	0,30	23,6	6 Clarificada	3,40	187,00	4,75	0,38	40,00	
					HPLC (PIS)	1,17	64,44	0,55	-	4,23
Tangencial *	0,43	0,30	23,6	Não clarificada	Bradford	3,70	222,30	6,90	0,44	56,46
					HPLC (PIS)	0,97	58,13	0,12		0,93

Tabela 4.10: Efeito do tempo de residência na capacidade de adsorção de PIS em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>.

\* Filtração tangencial com recirculação do retido até o volume de alimentação atingir 10 mL.

# 4.7. Potencial de utilização das membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>: Comparação entre géis tradicionais e membranas

Com a finalidade de comparar o desempenho da membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> para adsorção de PIS a partir de solução clarificada em relação aos géis tradicionais utilizados industrialmente em IMAC, foi realizado um experimento cromatográfico em Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> como descrito no item 3.2.6.1 de "Materiais e Métodos". As quantidades de PIS adsorvida e não adsorvida em membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (módulo e finamente cortadas) e gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>, obtidas por HPLC, estão apresentadas na Tabela 4.11.

O gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentou uma maior capacidade de adsorção de PIS a partir de solução clarificada (12,26 mg/g de gel seco) do que as obtidas pelas membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas (aproximadamente 4,0 mg/g de membrana seca) e no módulo de filtração (4,62 mg/g de membrana seca). Apesar da alta capacidade de adsorção obtida no gel, foi verificado, durante a cromatografia em Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> (em leito fixo), um acúmulo de proteínas na parte inferior da coluna, além de tempos bem mais elevados para efetuar as etapas de lavagem, eluição e regeneração do que os obtidos durante a cromatografia em membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Como conseqüência, não seria possível o processamento da solução não clarificada na coluna, a qual provocaria a colmatagem do gel.

A seletividade para adsorção de PIS a partir de solução clarificada foi comparada entre as membranas e o gel através dos experimentos de cromatografia em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas e em gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>, filtração tangencial no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> com e sem recirculação do retentado até o volume de alimentação atingir 10 mL e filtração em modo frontal. As proteínas adsorvidas pelos suportes foram totalmente removidas durante a etapa de eluição, e então agrupadas para a realização da eletroforese SDS-PAGE, a qual pode ser visualizada através da Figura 4.21.

Tabela 4.11: Quantidades de PIS obtidas na alimentação e nas etapas de lavagem, eluição e regeneração dos experimentos cromatográficos e da filtração frontal realizados com solução clarificada.

Adsorvente	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Capacidade de adsorção (mg/g seca)
PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup> (módulo) <sup>(1)</sup>	52,00	42,23	0,60	4,62
PEVA-IDA-Ni <sup>2+</sup> (finamente cortadas) <sup>(2)</sup>	16,00	8,20	4,60	3,68
Sepharose-IDA-Ni <sup>2+ (3)</sup>	26,37	4,75	20,23	12,26

(1) vazão de 0,3 mL/min. (2) e (3) vazão de 0,5 mL/min. OBS: Não foi detectada PIS nas frações de regeneração. Volume de leito (membranas ou gel): 5 mL.



Figura 4.21: Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixas 1 e 7: marcadores de massa molecular (Amersham Biosciences, EUA). Faixa 2: Eluição da filtração com injeção frontal. Faixa 3: Eluição da filtração tangencial sem recirculação do retentado. Faixas 4 e 9: Eluição da filtração tangencial com recirculação do retentado até diminuir volume de injeção para 10 mL. Faixas 5 e 10: Eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas. Faixa 8: Eluição da cromatografia em Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Faixas 6 e 11: solução PIS-IMAC (BIOMM).

A seletividade do módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> para adsorção de PIS a partir de solução clarificada não variou com os modos de filtração utilizados neste trabalho, visto que as mesmas proteínas foram adsorvidas pelo suporte quando empregadas as filtrações em modo frontal e em modo tangencial com e sem recirculação do retentado (até o volume de alimentação diminuir para 10 mL) (Faixas 2, 3 e 4 da Figura 4.21). Por outro lado, comparando-se as faixas 9 e 10, as quais correspondem, respectivamente, as proteínas adsorvidas no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e nas membranas finamente cortadas, observou-se que esta última apresentou uma maior seletividade para adsorção de PIS, visto que não foi adsorvida a impureza em torno de 40 kDa presente nas frações de eluição obtidas pelo módulo.

O gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> (utilizado neste trabalho) apresentou uma seletividade diferente das membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas e no módulo (como visualizado, respectivamente, nas Faixas 8, 9, 10 da Figura 4.21) visto que, além da PIS, foi adsorvida uma proteína de massa molecular em torno de 30 kDa e traços de proteínas de massa molecular de aproximadamente 50 kDa. Em relação ao gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizado pela BIOMM (Faixa 11), observou-se que o gel empregado neste trabalho (Faixa 8) apresentou uma menor seletividade adsorvendo, além do contaminante em torno de 30 kDa. Provavelmente, os métodos de ativação e imobilização de IDA no gel de agarose podem ter sido fatores primordiais para as diferenças na seletividade observada para ambos suportes.

Estes resultados comprovam que a mesma eficiência de separação pode não ser obtida quando membranas são empregadas em substituição aos géis convencionais, visto que esses sistemas podem proporcionar diferenças de afinidade pela proteína alvo e, conseqüentemente, diferentes cinéticas de adsorção (Suen *et al.*, 2003). Como exemplos destas afirmações podem ser citados os trabalhos desenvolvidos por Suen e Etzel (1994), os quais obtiveram uma maior afinidade pela enzima quimosina do que pela pepsina, utilizando membranas contendo pepstatina A imobilizada. Resultados opostos foram obtidos por Suen *et al.* (1993) utilizando partículas de gel, como suporte de afinidade, nas mesmas condições de adsorção. Em um outro trabalho, desenvolvido por Suen *et al.* (2000), obteve-se uma capacidade de adsorção de albumina do soro bovino em partículas de gel, contendo corante imobilizado, equivalente a 14 mg/mL, e ausência de adsorção da

mesma quando membranas foram utilizadas como suporte, nas mesmas condições de adsorção.

Em conclusão, constatou-se que emprego do gel de agarose em leito fixo utilizado apresentou menor seletividade para a purificação de PIS e longos tempos para efetuar as etapas de lavagem, eluição e regeneração, apesar da elevada capacidade de adsorção em comparação as membranas finamente cortadas. Estes fatores tornam inviável a utilização deste gel em escala industrial, podendo ser indicado como alternativa a utilização das membranas de afinidade para a purificação de PIS, as quais apesar de uma menor capacidade de adsorção (comparada aos géis), demonstraram uma boa seletividade e possibilitam o processamento de alimentações contendo material particulado (solução não clarificada).

Tendo as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentado uma menor capacidade de adsorção de PIS do que o gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> tentou-se melhorar o desempenho da membrana para a adsorção da proteína desejada através do aumento da densidade de ligantes imobilizados. Com este objetivo foi desenvolvido um método para a imobilização do ligante VBIDA através da ativação das membranas com cloreto de metacriloil e subseqüente polimerização utilizando o monômero HEMA, o catalisador AIBN e luz ultravioleta.

4.8. Avaliação do efeito do aumento da densidade de ligantes na capacidade de adsorção de PIS

# 4.8.1. Membranas de PEVA finamente cortadas: Ativação com cloreto de metacriloil, imobilização de VBIDA e determinação da densidade de ligantes

Nesta etapa do trabalho realizada no Laboratoire de Tecnologie Enzimatique, França, sob a supervisão do Professor Karsten Haupt foi desenvolvido um método de polimerização para a imobilização do ligante VBIDA (monômero previamente sintetizado) nas membranas de PEVA com o objetivo de aumentar a densidade de ligantes imobilizados. Inicialmente as membranas de PEVA finamente cortadas, as quais contém disponibilidade de grupamentos hidroxilas, foram ativadas com cloreto de metacriloil para introduzir duplas ligações na estrutura da membrana, como descrito no item 3.2.1.3 de "Materiais e

Métodos". O método de polimerização, empregado para a formação de cadeias poliméricas nas membranas ativadas, foi baseado na indução de radicais livres iniciada pelo catalisador AIBN na presença de luz ultravioleta utilizando os monômeros VBIDA e HEMA.

A ordem e magnitude com que os radicais livres são formados e os monômeros são introduzidos na membrana são difíceis de serem medidos; por conta disto, as etapas de polimerização foram descritas de maneira geral, segundo Sellergran (2001). A primeira etapa, chamada iniciação, foi baseada na formação de radicais livres a partir do catalisador AIBN, na presença de luz ultravioleta. A segunda etapa, denominada propagação do polímero, consistiu na introdução de monômeros na superfície da membrana através da reação entre os radicais livres do catalisador e as duplas ligações contidas nos monômeros HEMA, VBIDA e na superfície das membranas de PEVA ativadas, na presença de luz ultravioleta. Na terceira etapa denominada terminação, os radicais livres (quando presentes em elevadas concentrações) tendem a reagir entre si resultando em ligações covalentes inativas finalizando a propagação do polímero. Através deste procedimento foram formadas nas membranas de PEVA longas cadeias poliméricas a partir dos monômeros HEMA, VBIDA e do catalisador AIBN, resultando na estrutura proposta apresentada na Figura 3.3 do item 3.2.1.3 de "Materiais e Métodos", denominada de membranas PEVA-VBIDA.

A eficiência da imobilização do agente quelante VBIDA na membrana de PEVA foi avaliada através da determinação da densidade de metal quelatado. A densidade dos metais cobre e níquel imobilizados nas membranas foi determinada através de espectrofotometria UV-VIS (dos complexos EDTA-metal), respectivamente, a 730 e 384 nm, como descrito no item 3.2.3.1 de "Materiais e Métodos". A densidade dos ions níquel e cobre imobilizados nas membranas PEVA-VBIDA foi comparada as obtidas em membranas PEVA-IDA, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.12.

Matriz*	Densidade o (µmol/g mem	le ligantes brana seca)
	Cu <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>
PEVA-IDA	40	37
PEVA-VBIDA	163	148

**Tabela 4.12:** Densidade de íons níquel e cobre imobilizados nas membranas PEVA-IDA e PEVA-VBIDA.

\*1,0 mL de leito de membrana = 0,25 g de membrana seca.

As membranas PEVA-VBIDA apresentaram uma densidade de íons níquel e cobre imobilizados, 4 vezes maiores do que as obtidas pelas membranas PEVA-IDA. Em relação aos géis tradicionalmente utilizados em sistemas IMAC, cuja densidade de íons cobre varia entre 45 e 126 µmol/g suporte seco, as membranas PEVA-VBIDA também apresentaram uma maior densidade de cobre da ordem de 3,6 e 1,3, respectivamente, demonstrando que o método empregado para ativação, polimerização e imobilização de VBIDA foi bastante eficiente para aumentar a densidade de ligantes imobilizados nas membranas de PEVA.

O desempenho das membranas PEVA-VBIDA contendo íons níquel imobilizados foi avaliado para a purificação de PIS a partir de soluções clarificada e não clarificada. As capacidades de adsorção da proteína de interesse foram comparadas as obtidas quando empregado membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>.

# 4.8.2. Adsorção de PIS a partir das soluções clarificada e não clarificada: Comparação do desempenho de membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>

Foram realizados experimentos de adsorção de PIS em membranas finamente cortadas de PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> com o intuito de avaliar o potencial deste adsorvente para a purificação desta proteína a partir de soluções clarificada (PIS-C) e não clarificada (PIS-NC). Os resultados foram comparados aos obtidos com as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> finamente cortadas.

Para estes experimentos, as membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> foram alimentadas com as soluções PIS-C ou PIS-NC diluídas na proporção 1:1 no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 com 0,5 M de NaCl e 7,5 M de uréia, como descrito no item 3.2.6.1. de "Materiais e

Métodos". As proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelos suportes foram quantificadas pelo método de Bradford (em termos de proteína total) e por HPLC (em termos de PIS). As capacidades de adsorção foram comparadas as obtidas pelas membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, cujos valores estão apresentados nas Tabelas 4.13 e 4.14. A capacidade dos suportes para purificação de pró-insulina foi avaliada qualitativamente através da análise das frações cromatográficas por eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.22).

**Tabela 4.13:** Quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração, durante as cromatografias em 5,0 mL de membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e 4,0 mL de PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> empregando solução clarificada.

Método de análise	Suporte	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Adsorção de proteína total (mg/g seca)
fod	PEVA -IDA-Ni <sup>2+</sup>	68,00	61,00	5,20	0,22	4,33
Bradf	PEVA -VBIDA-Ni <sup>2+</sup>	54,40	48,89	4,95	0,11	5,06
Método de análise	Suporte	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Adsorção de PIS (mg/g seca)
 ب	PEVA -IDA-Ni <sup>2+</sup>	16,00	8,20	4,60	•	3,70
IHPI	PEVA -VBIDA-Ni <sup>2+</sup>	13,40	9,20	1,53	-	1,52

1,0 mL de leito de membrana = 0,25 g de membrana seca.

As membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+,</sup> e PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram valores similares de capacidades de adsorção em termos de proteína total (Tabela 4.13). Entretanto, em termos de PIS (análises por HPLC) as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+,</sup> apresentaram capacidade de adsorção de PIS (3,70 mg/g de membrana seca) 2,4 vezes maior do que a obtida pelas membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+,</sup>(1,52 mg/g de membrana seca). Como apenas uma pequena quantidade de proteína total foi removida durante a etapa de regeneração,

estas não foram analisadas por HPLC, visto que a quantidade de PIS estaria abaixo do limite de detecção pelo equipamento.

Tendo as membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> uma densidade de ligantes 4 vezes maior do que as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (Tabela 4.12), esperava-se que este adsorvente apresentasse uma maior capacidade de adsorção de PIS, o que não ocorreu. Para fins de comparação, o desempenho dos adsorventes foi avaliado utilizando a solução não clarificada.

Quando empregada solução não clarificada, foi demonstrado que as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram, em termos de proteína total e PIS, uma capacidade de adsorção (5,04 mg de proteína total/g de membrana seca e 4,88 mg de PIS/g de membrana seca), de respectivamente, 1,5 e 8,0 vezes maior do que as obtidas pelas membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> (3,20 mg de proteína total/g de membrana seca e 0,60 mg de PIS/g de membrana seca) (Tabela 4.14).

**Tabela 4.14:** Quantidades de proteína total e de PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração, durante as cromatografias em 5,0 mL de membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e 4,0 mL de PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> empregando solução não clarificada.

Método de análise	Suporte	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Adsorção de proteína total (mg/g seca)
ord	PEVA -IDA-Ni <sup>2+</sup>	98,80	87,61	6,18	0,11	5,04
Bradf	PEVA -VBIDA-Ni <sup>2+</sup>	70,00	64,53	3,00	0,23	3,20
Método de análise	Suporte	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Regeneração (mg)	Adsorção de PIS (mg /g seca)
Método de análise	Suporte PEVA -IDA-Ni <sup>2+</sup>	Alimentação (mg) 24,00	Lavagem (mg) 12,44	Eluição (mg) 6,11	Regeneração (mg) 1,22	Adsorção de PIS (mg /g seca) 4,88

1 mL de leito = 0,25 g de membrana seca.

Apesar de uma maior densidade de ligantes (148 µmol de Ni<sup>2+</sup>/g membrana seca), as membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram uma menor capacidade de adsorção de PIS do que a obtida pelas membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (37 µmol de Ni<sup>2+</sup>/g de membrana seca) quando empregadas soluções clarificada e não clarificada. Através do monitoramento das frações das etapas cromatográficas de adsorção, lavagem e eluição, por espectrofometria a 384 nm (comprimento de onda de detecção do íon níquel), verificou-se que durante a cromatografia em membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> houve o desprendimento de metal durante o processo, principalmente na etapa de lavagem (desprendimento de cerca de 19% do total de íons imobilizados), o que não ocorreu quando empregadas membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Provavelmente o desprendimento de metal nas membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> ocorreu devido as condições tamponantes empregadas ou pela forte interação entre a proteína e o metal, ocasionando a baixa capacidade de adsorção do suporte pela proteína de interesse.

Por outro lado, através da eletroforese SDS-PAGE da Figura 4.22, observou-se que as membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram uma melhor seletividade para adsorção de PIS a partir de soluções clarificada e não clarificada (Faixas 2 e 3) do que as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (Faixas 4 e 5). Com a finalidade de avaliar a influência da proteína (massa molecular de 9,5 kDa) e das condições tamponantes no desprendimento de metal em PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>, foram realizados experimentos cromatográficos para adsorção de outras proteínas de elevado grau de pureza (IgG, lisozima e BSA) em ambos suportes. Os resultados foram comparados aos obtidos para adsorção de PIS-IMAC.



**Figura 4.22:** Eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida homogêneo 20%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: solução não clarificada. Faixa 2: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 3: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> Utilizando solução não clarificada. Faixa 4: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 5: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 5: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução clarificada. Faixa 5: Fração de eluição da cromatografia em PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> utilizando solução não clarificada. Faixa 6: PIS purificada por IMAC (BIOMM).

# 4.10. Adsorção de proteínas altamente purificadas em PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup>

Foi avaliado o potencial das membranas PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> (sendo Me<sup>2+</sup> os íons cobre ou níquel) para adsorção de proteínas de diferentes massas moleculares, IgG (150 kDa), BSA (65 kDa) e lisozima (14,32 kDa). Os experimentos cromatográficos foram realizados em membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> para adsorção de IgG e em membranas de PEVA-VBIDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> para adsorção de BSA e lisozima, como descrito no item 3.2.6.2 de "Materiais e Métodos". Os resultados foram comparados aos obtidos em membranas de PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> para adsorção de PIS (9,5 kDa). As proteínas adsorvidas e não adsorvidas pelos suportes foram quantificadas pelo método de Bradford (para IgG, BSA e PIS) e a 280 nm (para lisozima), cujos valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.15.

a the format of the format o format of the format oo the f		PEVA-II	DA-Ni <sup>2+</sup>			PEVA-VBIDA-Ni <sup>2+</sup>			
Proteínas (massa molecular em kDa)	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Proteína adsorvida (%)	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Proteína adsorvida (%)	
IgG* (150)	10,00	7,00	2,94	29,4	10,00	8,60	0,70	7,0	
PIS* (9,5)	10,00	3,70	6,30	63,0	10,00	5,0	3,00	30,0	
		PEVA-ID	)A-Cu <sup>2+</sup>		PEVA-VBIDA-Cu <sup>2+</sup>				
Proteínas (massa molecular em kDa)	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Proteína adsorvida (%)	Alimentação (mg)	Lavagem (mg)	Eluição (mg)	Proteína adsorvida (%)	
Lisozima** (14,32)	5,00	1,02	3,44	68,8	5,00	1,57	3,36	67,0	
BSA* (65)	10,0	3,10	5,50	55,0	10,0	7,11	2,84	28,4	

**Tabela 4.15:** Adsorção de IgG, PIS, lisozima e BSA em membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup>.

\*Análise pelo método de Bradford. \*\* Análise por espectrofotometria a 280 nm. volume de leito de membranas = 3,5 mL.

As membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram adsorção de IgG, respectivamente, de 29,2 e 7,0% e as membranas PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Cu<sup>2+</sup> apresentaram adsorção de BSA, respectivamente, de 55,0 e 28,4%. Apesar das membranas de PEVA-VBIDA-Me<sup>2+</sup> terem apresentado uma maior densidade de ligantes do que as membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup>, uma hipótese para a menor adsorção de IgG e BSA neste suporte, pode ser atribuída a efeitos de impedimento estérico, ocasionados devido ao tamanho das proteínas, tornando-as inacessíveis aos íons metálicos imobilizados.

Por outro lado, para adsorção de PIS, uma proteína de massa molecular em torno de 9,5 kDa, obteve-se porcentagens de proteína adsorvida de 63 e 30%, respectivamente, em membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>. Em relação a lisozima, uma proteína de massa molecular também pequena, em torno de 14,32 kDa, porém maior que a PIS, verificou-se uma porcentagem de adsorção em torno de 68% para ambos adsorventes. Sendo a PIS, a proteína de menor massa molecular dentre as testadas, esperava-se como no caso da lisozima, que não houvesse uma diferença significativa de porcentagem de adsorção de proteína entre os suportes, visto que neste caso não haveria problemas de impedimento estérico devido ao tamanho da molécula, o que não ocorreu.

As frações das etapas de adsorção, lavagem e eluição obtidas em todos os experimentos cromatográficos, para ambos adsorventes, foram monitoradas por espectrofotometria a 730 nm (para detecção de íons cobre) e 384 nm (para detecção de íons níquel). Os resultados indicaram que somente ocorreu o desprendimento do íon metálico durante a adsorção de PIS em membranas de PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>. Diante deste fato, concluiu-se que o desprendimento do íon metálico imobilizado nas membranas de PEVA-VBIDA pode ter sido ocasionado pelas condições tamponantes empregadas ou pela forte interação entre a proteína (a qual contém uma cauda com seis histidinas) e o íon metálico. Apesar de ter sido verificado que, na presença do tampão MMA (empregado para a adsorção de IgG, BSA e lisozima), não houve desprendimento de metais em ambos suportes, este tampão não poderia ser usado nos experimentos de adsorção de PIS, visto que a proteína nestas condições, precipitou.

As membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>, apesar da baixa capacidade de adsorção, demonstraram seletividade para adsorção de pró-insulina recombinante a partir de soluções impuras e capacidade de adsorção de lisozima comparável a obtida pelas membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>. Além disso, os métodos de ativação e polimerização desenvolvidos foram

102

bastante eficientes para aumentar a densidade de ligantes imobilizados nas membranas de PEVA. Em condições otimizadas (de tampão, vazão de alimentação e vazão de filtrado) este adsorvente talvez possa demonstrar potencial para futuras aplicações com fins de purificação.

# **CAPÍTULO 5**

### CONCLUSÕES

A cromatografia em membranas de álcool poli(etileno) vinílico (PEVA) com íons metálicos imobilizados foi utilizada, neste trabalho, como uma alternativa aos sistemas IMAC que empregam géis de agarose como matrizes suporte, para a purificação de próinsulina recombinante com cauda de poli(histidina) a partir de soluções clarificada e não clarificada.

Inicialmente, demonstrou-se que o método comumente utilizado para a modificação de géis de agarose destinados a aplicação em IMAC (ativação com epicloridrina e imobilização do agente quelante IDA), pode ser eficientemente empregado para as membranas de PEVA, visto que estas apresentaram capacidade de imobilização de metal comparável aos valores encontrados para géis na literatura consultada. A seguir, dentre as membranas PEVA-IDA-Me<sup>2+</sup> testadas (sendo Me<sup>2+</sup> os íons Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup>), somente as membranas PEVA-IDA-Mi<sup>2+</sup> e PEVA-IDA-Cu<sup>2+</sup> apresentaram maior capacidade para adsorção de pró-insulina de alta pureza, dentre as quais as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> demonstraram a melhor seletividade e capacidade para adsorção de PIS a partir de soluções clarificada e não clarificada.

A análise de equilíbrio demonstrou que adsorção de PIS em membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> segue o modelo de Langmuir, provavelmente devido a presença de íons metálicos suficientemente espaçados no suporte e a cauda com seis histidinas na proteína, os quais contribuíram para a interação específica entre a proteína e o ligante, em detrimento de interações não específicas que provocariam o desvio do comportamento de Langmuriano, comumente ocasionado em sistemas IMAC. Os experimentos cinéticos demonstraram que a adsorção de PIS a partir de solução PIS-IMAC em membrana PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> foi limitada

105

pela taxa de reação na superfície e que o equilíbrio foi mais rapidamente atingido (em 30 min) quando empregada solução na concentração de 9,0 mg/mL.

A construção do módulo de filtração em escala laboratorial contendo fibras ocas de PEVA-IDA possibilitou a imobilização de uma maior densidade de ligantes (184 µmol de  $Cu^{2+}/g$  de membrana seca) do que a obtida em membranas PEVA-IDA finamente cortadas (40 µmol de  $Cu^{2+}/g$  de membrana seca), devido a passagem das soluções de ativação e imobilização de IDA por todos os poros da membrana. A adsorção de PIS a partir de solução clarificada foi realizada em diferentes modos operacionais, dos quais a filtração no módulo PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> em modo tangencial com recirculação do retentado (até o volume de alimentação atingir 10 mL), utilizando a razão vazão de filtrado (0,5 mL/min) por vazão de alimentação (0,7 mL/min) (Qt/Qi) igual a 0,7, foi a condição que demonstrou maior capacidade de adsorção de PIS, sendo então selecionada para a obtenção de curvas de ruptura e determinação da capacidade dinâmica do módulo.

As membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> contidas no módulo apresentaram capacidade de adsorção de PIS cerca de 3 e 5 vezes menor que as obtidas pelas fibras finamente cortadas, respectivamente, quando utilizadas soluções clarificada e não clarificada, sugerindo que no módulo, o acúmulo de proteínas (impurezas) na superficie e no interior dos poros pode ter reduzido a acessibilidade da PIS aos sítios de adsorção. Devido a baixa capacidade de adsorção de PIS no módulo (onde a vazão de filtrado foi de 0,5 mL/min), investigou-se o efeito do tempo de residência no desempenho do adsorvente, através da filtração em modo frontal e em modo tangencial utilizando, respectivamente, vazão de alimentação e de filtrado de 0,3 mL/min. Nestas condições, a capacidade de adsorção de PIS a partir de solução clarificada aumentou por um fator de 5 e 3, respectivamente, nas filtrações em modo frontal e tangencial, quando comparadas as obtidas com vazão de alimentação (no modo frontal) e de filtrado de 0,5 mL/min (no modo tangencial). Constatou-se, então, que o tempo de residência da PIS no módulo é fundamental para o desempenho do adsorvente no processo de purificação.

A comparação entre o desempenho de membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> e o gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>, tradicionalmente empregado pela indústria, demonstrou que o gel apresentou uma maior capacidade para a adsorção de PIS a partir de solução clarificada, provavelmente devido a uma maior densidade de ligantes imobilizados por mL de gel. No entanto, verificou-se durante a cromatografia em Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup> um acúmulo de proteínas na parte inferior da coluna, além de tempos bem mais elevados para efetuar as etapas de lavagem, eluição e regeneração, não sendo possível o processamento da solução não clarificada.

Como as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> apresentaram menor capacidade de adsorção de PIS do que o gel Sepharose-IDA-Ni<sup>2+</sup>, tentou-se melhorar a capacidade para adsorção da proteína desejada através do aumento da densidade de ligantes imobilizados nas membranas. O método desenvolvido para este fim (ativação com cloreto de metacriloil e polimerização com HEMA e VBIDA) foi eficiente, tendo em vista que obteve-se uma densidade de ligantes nas membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> 4 vezes maior (148 µmol/g seca) do que a obtida com as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup> (37 µmol/g seca). Apesar disto, as membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup> (37 µmol/g seca). Apesar disto, as membranas PEVA-VBIDA-Ni<sup>2+</sup>, devido ao desprendimento do íon metálico durante o processo cromatográfico, ocasionado provavelmente, pelas condições tamponantes empregadas e pela forte afinidade entre a proteína e o metal. No entanto, a melhor seletividade em relação as membranas PEVA-IDA-Ni<sup>2+</sup>, demonstrou o potencial deste adsorvente para a purificação de PIS a partir de soluções impuras.

Em suma, as membranas de PEVA seja com o agente quelante IDA ou VBIDA imobilizado, demonstraram melhores condições cromatográficas (baixos tempos de processo e mínimos problemas de entupimento do suporte) do que o gel Sepharose-IDA, possibilitando o processamento de solução contendo material particulado (solução não clarificada), o qual seria impossível em géis tradicionais. Tais observações ressaltam que, dentro de condições otimizadas (tampão, vazão de alimentação, vazão de filtrado, configuração), as membranas de PEVA talvez poderiam ser utilizadas industrialmente, em substituição aos géis de agarose, como suportes de afinidade para aplicações futuras com fins de purificação.

# **CAPÍTULO 6**

### SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

As membranas de PEVA-IDA, apesar de uma boa seletividade, demonstraram menor capacidade de adsorção de PIS do que o gel Sepharose-IDA, seja como fibras finamente cortadas como em módulo de filtração. No módulo, o efeito do tempo de residência influenciou na capacidade de adsorção de PIS, mas mesmo assim esta continuou sendo inferior a obtida pelo gel. Para melhorar a capacidade neste suporte, seria necessário realizar estudos muito mais detalhados, como por exemplo testar outras razões vazão de alimentação por vazão de filtrado ou manter a mesma razão e variar as vazões de filtrado.

As membranas PEVA-VBIDA apesar de uma menor capacidade de adsorção de PIS, apresentaram uma melhor seletividade do que as membranas PEVA-IDA. Tendo sido constatado que a menor capacidade de adsorção de PIS em membranas PEVA-VBIDA foi ocasionada pelo desprendimento de metal durante o processo cromatográfico, devido provavelmente as condições tamponantes e a forte interação entre a proteína e o metal, pode-se propor algumas sugestões para trabalhos futuros tais como:

 Selecionar dentre os metais Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup> imobilizados nas membranas PEVA-VBIDA, aquele que apresentar maior capacidade para adsorção de pró-insulina (PIS-IMAC).

 Testar outras condições tamponantes (tampão, pH, força iônica) onde não haja desprendimento de metal e a PIS seja estável;

 Obtidas as condições tamponantes adequadas, realizar experimentos de purificação de PIS utilizando as soluções clarificada e não clarificada e comparar com resultados obtidos pelas membranas PEVA-IDA e gel Sepharose-IDA;

### Sugestões para próximos trabalhos

4) Se a capacidade de adsorção nas membranas PEVA-VBIDA for próxima a obtida pelo gel, podem ser construídos módulos em escala laboratorial para os experimentos de filtração. Para a obtenção do módulo é necessário otimizar os métodos de ativação e polimerização das fibras.

Como sugestões ainda, as membranas PEVA-VBIDA podem ser testadas para a purificação de outras proteínas, como anticorpos monoclonais e outras membranas tais como celulose, quitosana, nylon, PVA, polisulfona e poliétersulfona podem ser ativadas e polimerizadas para a imobilização do VBIDA, visando aplicações futuras como sistemas de purificação de proteínas.

# CAPÍTULO 7

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDERSSON, L., PORATH, J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, v.154, p.250-254, 1986.

ANSPACH, F.B., JOHNSTON, A., WIRTH, H.J., UNGER, K.K., HEARN, T.W. High performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. Thermodynamic and kinetic investigations on rigid and soft affinity gels with varying particle and pore sizes. *Journal of Chromatography*, v.476, p.205-225, 1989.

ASHCROFT, F.M., ASHCROFT, S.J.H. Insulin: Molecular Biology to Pathology. New York: Oxford University Press, 1992, 64-66p. e 265-268p.

BAILEY, S.M., MEAGHER, M.M. Separation of soluble protein form inclusion bodies in *Escherichia coli* lysate using crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, v.166, p.137-146, 2000.

BEESKOW, T.C., KUSHARYOTO, W., ANSPACH, F.B., KRONER, K.H., DECKWER, W.D. Surface modification of microporous polyamide membranes with hydroxyethyl cellulose and their application as affinity membranes. *Journal of Chromatography A*, v.715, p.49-65, 1995.

BELEW, M., YIP, T.T., ANDERSSON, L., PORATH, J. Interaction of proteins with immobilized Cu<sup>2+</sup> - Quantitation of adsorption capacity, adsorption-isotherms and

111

equilibrium-constants by frontal analysis. Journal of Chromatography, v.403, p.197-206, 1987.

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.

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

BRANDT, S., GOFFE, R.A., KESSLER, S.B., O'CONNOR, J.L., ZALE, S.E. Membranebased affinity technology for commercial scale purifications. *Bio-Technology*, v.6, p.779-782, 1988.

BUSH, K.D., LUMPKIN, J.A. Structural damage to lactate dehydrogenase during copper iminodiacetic acid metal affinity chromatography. *Biotechnology Progress*, v.14, p.943-950, 1998.

CAMPERI, S.A., GRASSELLI, M., SMOLKO, E.E., CASCONE, O. Preparation and characterization of immobilized metal ion hollow-fiber polysulphone membranes. Their application in high-speed pectic enzyme fractionation. *Process Biochemistry*, v.39, p.1017-1024, 2004.

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

CHARCOSSET, C., SU, Z.G., KAROOR, S., DAUN, G., COLTON, C.K. Protein-A immunoaffinity hollow-fiber membranes for immunoglobulin-G purification - Experimental characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, v.48, n.4, n.415-427, 1995.

112

CHARCOSSET, C. Purification of proteins by membrane chromatography. Journal of Chemical and Technology Biotechnology, v.71, p.95-10, 1998.

CHASE, H.A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. Journal of Chromatography, v.297, p.179-202, 1984.

COWAN, G.H., GOSLING, I.S., SWEETENHAM, W.P. Modelling methods to aid the design and optimisation of batch stirred-tank and packed-bed column adsorption and chromatography units. *Journal of Chromatography*, v.484, p.187-210, 1989.

COWLEY, D.J., MACKIN, R.B. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. *FEBS Letters*, v.402, p.124-130, 1997.

DYR, J.E., SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. *Journal* of Chromatography B, v.699, p.383-401, 1997.

DENIZLI, A., ALKAN, M., GARIPCAN, B., OZKARA, S., PISKIN E. Novel metalchelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma. *Journal of Chromatography B*, v.795, p.23-103, 2003.

FINETTE, G.M.S., QUI-MING, M., HEARN, M.T.W. Comparative studies on the isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. *Journal of Chromatography A*, v.763, p.71-90, 1997.

FLASCHEL, E., FREIHS, K. Improvement of downstream processing of proteins by means of genetic engineering methods. *Advances in Biotechnology*, v.11, p.31-78, 1993.

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

BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

GHOSH, R. Separation of proteins using membrane chromatography: Opportunities and challenges. *Journal Membrane Science*, v.192, p.243-247, 2002.

HAUPT, K., BUENO S.M.A. Affinity membranes – In Encyclopedia of Separation Science. Academic Press., 2000, 225-229p.

HEMDAN, E.S., PORATH, J. Development of immobilized metal affinity-chromatography 2. Interaction of amino-acids with immobilized nickel iminodiacetate. *Journal of Chromatography*, v.323, p.255-264, 1985.

HOCHULI, E. Large-scale chromatography of recombinant proteins. Journal of Chromatography, v.444, p.293-302, 1988a.

HOCHULI, E., BANNWARTH, W., BOBELI, H., GENTZ, R., STUBER, D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio-Technology*, p.1321-1325, novembro 1988b.

HOU, K.C., HOU, C.J., ROY, S., ZANIEWSKI, R. Immobilization of protein G on nylon membrane for the removal of IgG from human plasma. *Polymer Material Science Engineering*, v.61, p.670-674, 1989.

IWATA, H., SAITO, K., FURUSAKI, S., SUGO, T., OKAMOTO, J. Adsorption characteristics of an immobilized metal affinity membrane. *Biotechnology Progress*, v.7, n.5, p.412-418, 1991.

JIANG, W., HEARN, T.W. Protein interaction with immobilized metal ion affinity ligands under high ionic strength conditions. *Analytical Biochemistry*, v.242, p.45-54, 1996.

JOHNSON, R.D., ARNOLD, F.H. Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, v.48, p.437-443, 1995.

JOHNSON, R.D., TODD, R.J., ARNOLD, F.H. Multipoint binding in metal-affinity chromatography .2. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c. *Journal of Chromatography A*, v.725, n.2, p.225-235, 1996.

KIYOHARA, S., KIM, M., TOIDA, Y., SAITO, K., SUGITA, K., SUGO, T. Selection of a precursor monomer for the introduction of affinity ligands onto a porous membrane by radiation-induced graft polymerization. *Journal of Chromatography*, v.758, p.209-215, 1997.

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

KLEIN, E., EICHHOLZ, E., THEIMER, F., YEAGER, D. Affinity membranes prepared from hydrophilic coatings on microporous polysulfone hollow fibers. *Journal of Membrane Science*, v.90, p.69-80, 1994.

KLEIN, E., YEAGER, D., SESHADRI, R., BAURMEISTER, U. Affinity adsorption devices prepared form microporous poly(amide) hollow fibers and sheet membranes. *Journal of Membrane Science*, v.129, p.31-46, 1997.

KOCHAN, J.E., WU, Y.J., ETZEL, M.R. Purification of bovine immunoglobulin G via protein G affinity membranes. *Industrial & Engineering Chemical Research*, v.35, p.1150-1155, 1996.

KRISHNAMURTHY, R., MADURAWE, R.D., BUSH, K.D., LUMPKIN, J.A. Conditions promoting metal-catalysed oxidations during immobilized Cu<sup>2+</sup>-iminodiacetic acid metal affinity chromatography. *Biotechnology Progress*, v.11, p.643-650, 1995.

KUBOTA, N., KONNO, Y., SAITO, K., SUGITA, K., WATANABE, K., SUGO, T. Module performance of anion-exchange porous hollow-fiber membranes for high-speed protein recovery. *Journal of Chromatography A*, v.782, p.159-165, 1997.

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

LEHNINGER, A.L. Princípios da Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1984, 41-46p.

LIESIENE, J., RACAITYTE, K., MORKEVICIENE, M., VALANCIUS, P., BUMELIS, V. Immobilized metal affinity chromatography of human growth hormone. Effect of ligand density. *Journal of Chromagraphy A*, v.764, p.27-33, 1997.

LIU, Y.-C., CHANGCHIEN C.C., SUEN, S.-Y. Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.794, p.67-76, 2003.

LUCENA, S.L. Modelagem e simulação da separação das proteinas  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ lactoglobulina por cromatografia preparativa em resinas trocadoras de ânions utilizando leito móvel simulado. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 47p. Tese (Doutorado).

MA, X.H., MOHAMMAD, S.F., KIM, S.W. Heparin removal from blood using poly(llysine) immobilized hollow fiber. *Biotechnology and Bioengineering*, v.40, n.4, p.530-536, 1992.

MACHADO, R.L. Despirogenação de soluções de imunoglobulina G humana: Adsorção de endotoxinas em membranas de quitosana. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003. Tese (Mestrado).

MACKIN, R.B. Streamlined procedure for the production of normal and altered versions of recombinant human proinsulin. *Protein Expression and Purification*, v.15, p.308-313, 1999.

MACKIN, R.B., CHOQUETTE, M.H. Expression, purification and PC1-mediated processing of (H10D, P28K, and K29P)-human proinsulin. *Protein Expression and Purification*, v.27, p.210-219, 2003.

MERGULHÃO, F.J.M., TAIPA, M.A., CABRAL, J.M.S., MONTEIRO, G.A. Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v.109, p.31-43, 2004.

MORRIS, L.R., MOCK, R.A., MARSHALL, C.A., HOWE, J.H. Synthesis of some amino acid derivatives of styrene. *Journal of the American Chemical Society*, v.81, n.2, p.377-382, 1959.

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.

NIEBA, L., NIEBA-AXMANN, S.E., PERSSON, A., HAMALAINEN, M., EDEBRATT, F., HANSSON, A., LIDHOLM, J., MAGNUSSON, K., KARLSSON, A.F., PLUCKTHUN, A. Biacore analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Analytical Biochemistry*, v.252, p.217-228, 1997.

NILSSON, J., JONASSON, P., SAMUELSSON, E., STAHL, S., UHLÉN, M. Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology*, v.48, p.241-250, 1996.

OSWALD, T., HORNBOSTEL, G., RINAS, U., ANSPACH, F.B. Purification of (His)<sub>6</sub>RcorRV [recombinant restriction endonuclease EcoRV fused to a (His)<sub>6</sub> affinity domain] by metal-chelate affinity chromatography. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.25, p.109-115, 1997.

PETRIDES, D., SAPIDOU, E., CALANDRANIS, J. Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production. A case study. *Biotechnology and Bioengineering*, v.48, p.529-541, 1995.

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

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

REIF, O.W., NIER, V., BAHR, U., FREITAG, R. Immobilized metal affinity membrane adsorbers as stationary phases for metal interaction protein separation. *Journal of Chromatography A*, v.664, p.13-25, 1994.

ROPER, D.K., LIGHTFOOT, E.N. Separation of biomolecules using adsorptive membranes. Journal of Chromatography A, v.702, p.3-26, 1995.

SAKURADA, Y., SUEOKA, A., KAWAHASHI, M. Blood purification device using membranes derived from poly(vinyl alcohol) and copolymer of ethylene and vinyl alcohol. *Polymer Journal*, v.19, n.5, p.501-513, 1987.

SCOBLE, J.A., SCOPES, R.K. Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimization of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions. *Journal of Chromatography A*, v.752, p.67-76, 1996.

SELLERGRAN, B. Molecularly imprinted polymers. New York: Elsevier, 2001, 21-26p.

SERPA, G. 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. 46-49p. Tese (Mestrado).

SENEL, S., SAY, R., ARICA, Y., DENIZLI, A. Zinc ion-promoted adsorption of lysozyme to cibacron blue F3GA-attached microporous polyamide hollow-fiber membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.182, p.161-173, 2001.

SHARMA, S., AGARWAL, G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions -Role of ionic strength and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.243, n.1, p.61-72, 2001.

SKIDMORE, G.L., HORSTMAN, B.J., CHASE, H.A. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose FF. *Journal of Chromatography*, v.498, p.113-128, 1990.

SMITH, M.C., FURMAN, T.C., INGOLIA, T.D., PIDGEON, C. Chelating peptideimmobilized metal ion affinity chromatography, a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.263, n.15, p.7211-7215, 1988.

SUEN, S., ETZEL, M. A mathematical analysis of affinity membrane bioseparations. Chemical Engineering Science, v.47, n.6, p.1355-1364, 1992.
SUEN, S.Y., CARACOTSIOS, M., ETZEL, M.R. Sorption kinetics and axial diffusion in binary-solute affinity-membrane bioseparations. Chemical Engineering Science, v.48, n.10, p.1801-1812, 1993.

SUEN, S.Y., ETZEL, M.R. Sorption kinetics and breakthrough curves for pepsin and chymosin using pepstatin-A affinity membranes. *Journal of Chromatography A*, v.686, n.2, p.179-192, 1994.

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

SUEN, S.Y., TSAI, Y.H., CHEN, R.L. Comparison of breakthrough performance using dye-affinity membrane disks and gel bead columns. *Separation Science and Technology*, v.35, n.4, p.573-591, 2000.

SUEN, S.Y., LIU, Y.-C., 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 IDA-Fe<sup>3+</sup>. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia*, v.17, p.334-335, 1988.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. Bio Essays, v.10, p.70-175, 1989.

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

TIKHONOV, R.V., PECHENOV, S.E., BELACHEU, I.A., YAKIMOV, S.A., KLYUSHNICHENKO, V.E., BOLDIREVA, E.F., KOROBKO, V.G., TUNES, H., THIEMANN, J.E., VILELA, L., WULFSON, A.N. Recombinant human insulin. VIII. Isolation of fusion protein-S-sulfonate, biotechnological precursor of human insulin, from the biomass of transformed *Escherichia coli* cells. *Protein Expression and Purification*, v.21, p.176-182, 2001.

TODD, R.J., JOHNSON, R.D., ARNOLD, F.H. Multiple-site binding interactions in metalaffinity chromatography. I. Equilibrium binding of engineering histidine-containing cytochromes c. *Journal of Chromatography*, v.662, p.13-26, 1994.

TSAI, Y.H., WANG, M.Y., SUEN, S.Y. Purification of hepatocyte growth fator using polyvinyldiene fluoride-based immobilized metal affinity membranes: Equilibrium adsorption study. *Journal of Chromatography B*, v.766, p.133-143, 2001.

TSUNEDA, S., SAITO, K., FURUSAKI, S., SUGO, T. High-through processing of proteins using a porous and tentacle anion-exchange membrane. *Journal of Chromatography*, v.689, p.211-218, 1995a.

TSUNEDA, S., SAITO, K., SUGO, T., MAKUUCHI, K. Protein adsorption characteristics of porous and tentacle anion Exchange membrane prepared by radiation-induced graft polymerization. *Radiation Physical Chemistry*, v.46, p.239-245, 1995b.

VIDYASANKAR, S., RU, M., ARNOLD, F.H. Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized aminoacids. *Journal of Chromatography A*, v.775, n.18, p.51-63, 1997.

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

WEISSENBORN, M., HUTTER, B., SINGH, M., BEESKOW, T.C., ANSPACH, F.B. A study of combined filtration and adsorption on nylon-based dye-affinity membranes: Separation of recombinant L-alanine dehydrogenase from crude fermentation broth. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.25, p.159-168, 1997.

WINTER, J., NEUBAUER, P., GLOCKSHUBER, R., RUDOLPH, R. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *Journal of Biotechnology*, v.84, p.175-185, 2000.

WINTER, J., LILIE, H., RUDOLPH, R. Renaturation of human proinsulin - A study on refolding and conversion to insulin. *Analytical Biochemistry*, v.310, n.2, p.148-155, 2002.

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

WU, C.Y., SUEN, S.Y., CHEN, S.C., TZENG, J.H. Analysis of protein adsorption on regenerated cellulose-based immobilized copper ion affinity membranes. *Journal of Chromatography A*, v.996, p.53-70, 2003.

YANG, L., JIA, L., ZOU, H., ZHOU, D., ZHANG, Y. Immobilized metal ion affinity composite membrane base don cellulose for separation of biopolymers. *Science in China Series B Chemistry*, v.41, p.596-605, 1998.

ZENG, X., RUCKENSTEIN, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. *Industrial Engineering Chemical Research*, v.35, p.4169-4175, 1996.

ZENG, X., RUCKENSTEIN, E. Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation. *Biotechnology Progress*, v.15, p.1003-1019, 1999.

ZOU, H., LUO, Q., ZHOU, D. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. *Journal of Biochemistry and Biophysical Methods*, v.49, p.199-240, 2001.
## **APÊNDICE** A

1 - Dados utilizados para a construção da isoterma de adsorção

Estão apresentados na Tabela 1A os valores experimentais das concentrações iniciais ( $C_0$ ) e de equilíbrio ( $C_{eq}$ ) obtidos através dos experimentos descritos no item 3.2.7 de "Materiais e Métodos". Os valores da quantidade de proteína adsorvida pelo suporte (Q) foram calculados através da equação 2.5 do item 2.5 da "Revisão Bibliográfica".

C <sub>0</sub>	C <sub>eq</sub>	Q	Desvio de Q
0	0	0	0
0,454	0,02128	22,32	0
0,888	0,115	39,69	0,05567
1,84	0,48	70,10	0
3,20	1,05	110,05	1,70007
5,00	2,4	135,62	1,42926.
6,90	3,87	155,93	0,84251
10,0	6,48	172,98	3,22

Tabela 1A: Valores experimentais de Co e Ceq e valores calculados de Q.

## 2 - Dados da cinética de adsorção

Nas Tabelas 2A a 4A estão apresentados os valores da concentração de proteína no sobrenadante (C) com o tempo obtidos através dos experimentos cinéticos descritos no item 3.2.8. de "Materiais e Métodos" e os valores de C teóricos correspondentes a curva tracejada dos gráficos 4.9 a 4.11 do item 4.5.2 de "Resultados e Discussão". Os valores de

C teóricos foram obtidos utilizando a solução analítica de Skidmore *et al.* (1990) para o modelo da taxa cinética constante de Chase (1984) como descrito na equação 2.7 do item 2.5 da "Revisão Bibliográfica".

Tabela 2A: Variação da concentração de proteína no sobrenadante com o tempo para uma solução na concentração inicial de 1,0 mg/mL. Valores experimentais e teóricos.

Tempo (min)	C (mg/mL)	C teórico (mg/mL)
0,166	0,95617	0,99046
0,333	0,93468	0,98099
0,5	0,9040	0,97165
1	0,76085	0,94448
5	0,64468	0,76283
10	0,61638	0,60235
20	0,47106	0,41186
30	0,39000	0,31423
60	0,22809	0,21925
120	0,15617	0,20121
180	0,12021	0,2007

Tempo (min)	C (mg/mL)	C teórico (mg/mL)
0,166	5,11702	4,98296
0,333	4,73191	4,96596
0,5	4,5766	4,94911
1	4,70851	4,89955
5	4,4234	4,5455
10	4,1234	4,18867
20	4,02766	3,66951
30	3,04043	3,316
60	2,76596	2,7442
120	2,51277	2,38089
180	2,42979	2,29358

Tabela 3A: Variação da concentração de proteína no sobrenadante com o tempo para uma solução na concentração inicial de 5,0 mg/mL. Valores experimentais e teóricos.

Tempo (min)	C (mg/mL)	C teórico (mg/mL)
0,166	8,82128	8,79286
0,5	9,09574	8,42621
1	7,40426	7,97778
5	6,38298	6,39455
10	6,22128	5,945
20	6,16383	5,8169
30	5,95745	5,8092
60	5,99149	5,8087
120	5,95745	5,8087
180	5,90426	5,8087

Tabela 4A: Variação da concentração de proteína no sobrenadante com o tempo para uma solução na concentração inicial de 9,0 mg/mL. Valores experimentais e teóricos.