

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

**Despirogenação de Soluções de Imunoglobulina G Humana:**  
**Adsorção de Endotoxinas em Membrana de Quitosana**

Eng. Romi Lamb Machado

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

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

Campinas – SP  
Fevereiro de 2003.

UNICAMP

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTR  
SEÇÃO CIRCULAN

UNIDADE	B2
Nº CHAMADA	7/UNICAMP M18d
V	EX
TOMBO BC/	53249
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	23/04/03
Nº CPD	

CM00182276-2

1B ID 289739

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

M18d

Machado, Romi Lamb

Despirogenação de soluções de imunoglobulina G humana: adsorção de endotoxinas em membrana de quitosana / Romi Lamb Machado.--Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química  
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Despirogenação de Soluções de Imunoglobulina G Humana:  
Adsorção de Endotoxinas em Membrana de Quitosana**

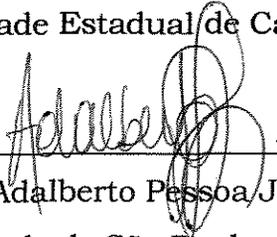
Autora: Romi Lamb Machado

Orientadora: Sônia Maria Alves Bueno



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Universidade Estadual de Campinas - FEQ



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Universidade de São Paulo - FCF



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu

Universidade Estadual de Campinas - FEQ



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Universidade Estadual de Campinas - FEQ

00113516

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Romi Lamb Machado e aprovada pela comissão julgadora em 25 de fevereiro de 2003.

---

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

*Ao Rodrigo, minha fortaleza.*

## **Agradecimentos**

Meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais Milton e Sandra, responsáveis por ser quem sou.

Aos meus irmãos Gabriel e Márcia, por alegrarem minha vida.

Ao Rodrigo, meu exemplo, por me fazer continuar cada vez que tentei fraquejar.

À Sônia pela paciência, dedicação, incentivo e orientação.

Ao CNPq (auxílio à pesquisa e bolsa de mestrado), FAEP e CAPES/PROAP pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Uso Comum (LUC-FEQ) pelo uso do MEV e ao seu responsável na época Dr. Luiz Carlos Ferracin.

Laboratório de Química de Proteínas do IB e seu técnico responsável Paulo Baldasso pelo uso do liofilizador.

Laboratório de Biosseparações e seu responsável, o professor César C. Santana, pelo empréstimo da leitora ELISA e Phast System.

À Banca de Qualificação, composta pelos professores César C. Santana e Marisa M. Beppu, pelas correções e sugestões para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários da FEQ: Daniel, Alexandre e Sr. Waldemir da Oficina, Rosa, Mônica e Gilson do DPB.

À Sindélia, Paula, Marisa Beppu, Eduardo Arruda, Rodrigo Vieira e Marco pelas orientações, sugestões e dúvidas.

Ao pessoal dos Laboratórios do DPB: Gisele, Mariana, Luciana, Isa, Rosana, Cristiane, Neemias, Érika, Lucimara, Érika Durão, Adriano, André, Antenor, Oselys, Marco, Ivanildo, Vinicius, Elcimar, que com simples gestos facilitaram o cotidiano.

Aos amigos Júnior, Gilvan, Viktor, Virgínia, Itaciara, Pablo e Paulinho, minha família em Campinas.

***"Seja como sândalo que perfuma  
o machado que o fere."***

## RESUMO

A contaminação por endotoxinas (ET) em produtos para injeção parenteral é um problema para a indústria farmacêutica devido à dificuldade de remoção destas moléculas e sua alta toxicidade. Diversas técnicas têm sido estudadas visando a despirogenação (remoção de ET) de soluções protéicas, dentre as quais a cromatografia em membranas apresenta-se como promissora.

Neste trabalho, membranas porosas de quitosana reticuladas com epicloridrina foram obtidas com boa característica de vazão, visando a despirogenação de soluções tampão, de soro fisiológico e de soluções de IgG. Experimentos de filtração com solução de IgG humana diluída em tampão foram realizados para verificar a existência de adsorção da IgG na membrana, sendo que as soluções tamponantes que favoreceram uma menor adsorção foram fosfato de sódio pH 8,0 e Tris-HCl pH 7,0 (0,49 mg/cm<sup>3</sup> e 0,73 mg/cm<sup>3</sup>, respectivamente). Os resultados dos experimentos de adsorção com soluções tampão contaminadas artificialmente com ET revelaram que a solução tamponante Tris-HCl pH 7,0 favorecia uma maior adsorção de ET na membrana de quitosana, obtendo valores de concentração no filtrado de 0,58 EU/mL e 8,36 EU/mL para alimentações, respectivamente, de 18,63 EU/mL e 541,40 EU/mL. Testou-se a influência da presença de sal no meio através da remoção de ET de soro fisiológico contaminado artificialmente, resultando em uma adsorção, das ET alimentadas à membrana, de 50,68% em baixa concentração de ET (42,49 EU/mL) e de 92,23% em alta concentração (889,61 EU/mL). A presença de IgG (1 mg/mL) em solução tampão Tris-HCl pH 7,0 reduziu a adsorção das endotoxinas permitindo obter filtrados com concentração de 4,05 e 71,15 EU/mL de uma alimentação de 116,43 e 796,93 EU/mL, respectivamente, e recuperação protéica, na ordem, de 100 e 96,37%. Em face destes dados, percebe-se que a membrana de quitosana tem potencial para o uso como matriz de adsorção visando a remoção de ET de soluções, embora na presença de proteína, no processo proposto, não se tenha alcançado valores que permitam uma injeção parenteral.

Palavras-chave: adsorção seletiva, despirogenação, endotoxina, Imunoglobulina G, membrana, quitosana

## ABSTRACT

Endotoxin (ET) contamination in intravascular injection products is a problem for the pharmaceutical industry due to the difficulty of its removal and elevated toxicity. Many techniques have been studied aiming the depyrogenation (ET removal) of protein solutions, among them the membrane chromatography seems to be a promising one.

In this work, cross-linked macroporous chitosan membranes were obtained having a good flow dynamics, focusing the depyrogenation of buffering solutions, physiologic serum and human IgG solutions. Filtration experiments with human IgG diluted in buffering solution were conducted to verify the IgG adsorption on the membrane. The buffering solutions that resulted a lower IgG adsorption were sodium phosphate pH 8.0 and Tris-HCl pH 7.0 (0.49 mg/cm<sup>3</sup> and 0.73 mg/cm<sup>3</sup>, respectively). The adsorption experiments results using buffer solutions artificially contaminated with ET showed that the Tris-HCl pH 7.0 buffering solution favoured a higher ET adsorption on the chitosan membrane being the filtrated concentrations 0.58 EU/mL and 8.36 EU/mL to the feed flow of 18.63 EU/mL and 541.4 EU/mL, respectively. The influence of salt presence in the solution was tested for the ET removal of artificially contaminated physiologic serum resulting in a 50.68% adsorption at a low ET concentration (42.49 EU/mL) and 92.23% at a high ET concentration (889.61 EU/mL). The IgG presence (1 mg/mL) in Tris-HCl pH 7.0 buffer reduced the ET adsorption so that a filtrated concentration of 4.05 and 71.15 EU/mL were obtained from a 116.43 and 796.93 EU/mL feed, respectively, and a protein recovery of 100% and 96.37%. These results showed that chitosan membrane has a potential to be used as an adsorption matrix for ET removal in solutions, eventhought safety concentration values that allows a parenteral injection have not been achieved in samples containing proteins.

Key-works: selective adsorption, depyrogenation, endotoxins, human Immunoglobulin G, membrane, chitosan

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	8
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>NOMENCLATURA</b>	12
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b>	14
<b>CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
2.1. Imunoglobulinas	16
2.2. Endotoxinas	20
2.2.1. Estrutura e propriedades das endotoxinas	21
2.3. Métodos para promover a despirogenação	25
2.3.1. Inativação de endotoxinas	25
2.3.2. Remoção de endotoxinas	27
2.4. Membranas e seu emprego em processo de despirogenação	31
2.4.1. Síntese de membranas e modo de operação	31
2.4.2. Utilização de membranas adsortivas para a despirogenação de soluções protéicas	33
2.4.3. Membrana de quitosana como matriz adsortiva	36
2.5. Métodos para detectar endotoxinas	40
<b>CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	42
3.1. Materiais	42
3.2. Métodos	43
3.2.1. Obtenção da membrana	43
3.2.1.1. Síntese das membranas	43
3.2.1.2. Silanização das placas de Petri	44
3.2.1.3. Reticulação das membranas porosas de quitosana	44
3.2.2. Caracterização da matriz adsorvente	45
3.2.2.1. Espessura	45
3.2.2.2. Volume	46
3.2.2.3. Porosidade no estado úmido	46
3.2.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
3.2.2.5. Vazão a pressão atmosférica	47
3.2.3. Eletroforese de focalização isoeletrica	48

	11
3.2.4. Ensaios de adsorção de imunoglobulina G humana em membrana de quitosana porosa	48
3.2.4.1. Descrição do sistema de cromatografia	49
3.2.4.2. Determinação da concentração protéica	50
3.2.5. Despirogenação de material	50
3.2.5.1. Despirogenação do sistema de filtração	50
3.2.5.2. Despirogenação da vidraria	51
3.2.6. Remoção de endotoxinas por adsorção em membranas de quitosana	51
3.2.6.1. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes	51
3.2.6.2. Remoção de endotoxinas de soro fisiológico contaminado artificialmente	52
3.2.6.3. Remoção de endotoxinas de soluções com IgG contaminadas artificialmente	52
3.2.7. Quantificação de endotoxinas	53
3.2.8. Isoterma de adsorção de endotoxinas em membrana porosa de quitosana	54
<b>CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	57
4.1. Obtenção e caracterização da membrana macroporosa de quitosana reticulada	57
4.2. Determinação do ponto isoelétrico da IgG humana	59
4.3. Ensaios de adsorção de imunoglobulina G humana em membrana de quitosana	60
4.4. Remoção de endotoxinas por adsorção em membranas de quitosana	67
4.4.1. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes	67
4.4.2. Influência do sal NaCl na remoção de endotoxinas	69
4.4.3. Remoção de endotoxinas de soluções de IgG humana contaminadas artificialmente	71
4.5. Isoterma de adsorção de endotoxinas em membrana de quitosana	73
<b>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS</b>	76
5.1. Conclusões	76
5.2. Sugestões para os próximos trabalhos	77
<b>CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	78
ANEXO A	89
ANEXO B	91

## NOMENCLATURA

$C_{eq}$	concentração de soluto em equilíbrio na solução (mg/mL)
$K_d$	constante de dissociação do complexo sorbato-adsorvente (mL/mg ou M)
$M_1$	massa seca de membrana (g)
$M_2$	massa úmida de membrana (g)
$Q$	quantidade de soluto adsorvido por massa ou volume de adsorvente em equilíbrio com a quantidade de soluto não adsorvido em solução (mg/g, mg/mL ou mg/cm <sup>3</sup> )
$Q_m$	Quantidade máxima possível de ser adsorvida (mg/g, mg/mL ou mg/cm <sup>3</sup> )
S:Q	proporção sílica / quitosana
$V$	volume de membrana no estado úmido (cm <sup>3</sup> )
$\Delta P$	variação de pressão (atm)
$\rho_{H_2O}$	densidade da água na temperatura (°C) do ensaio (g/cm <sup>3</sup> )
<sup>60</sup> Co	cobalto
BSA	albumina do soro bovino
$C_f$	concentração de ET no permeado (EU/mL)
$C_i$	concentração de ET na alimentação (EU/mL)
DEAE	dietilaminoetano
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ET	endotoxinas
EU	unidades endotóxicas (1EU = 100 pg de ET)
Fab	fragmento para ligação com o antígeno
Fc	fragmento com função efetora
FDA	Food and Drugs Administration
Gal	galactose
Glc	glicose

H	cadeia polipeptídica pesada das Ig
Hep	L-glicero-D-manose heptose
HPV	<i>Papilloma</i> vírus humano
HSA	albumina do soro humano
IEF	eletroforese de focalização isoeétrica
Ig	imunoglobulinas
KDO	ácido 2-keto-3-deoxiotônico
kV	quilovolts
L	cadeia polipeptídica leve das Ig
LAL	lisado do amebócito de <i>Limulus</i>
LPS	lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia de Varredura Eletrônica
MPQ	membrana porosa de quitosana
Nga	N-acetil-glucosamina
NGc	N-acetil-galactosamina
PEI	poli(etilenoimina)
PEVA	álcool poli(etilenovinílico)
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoeétrico
PMLG	poli( $\gamma$ -metil L-glutamato)
PVA	álcool poli(vinílico)
rpm	rotações por minuto
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UF	ultrafiltração

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas (Ig), ou anticorpos, são produzidas na membrana de ligação ou secretadas pelos linfócitos B, sendo sintetizadas por um animal em resposta à presença de uma molécula diferente (antígeno), imprópria do indivíduo, pela qual apresentam alta afinidade (STRYER, 1996).

Uma das classes de Ig é a imunoglobulina G (IgG), cujas prescrições terapêuticas intravenosas são indicadas nos casos de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, no tratamento de deficiências seletivas de anticorpos, de doenças auto-imunes e de alguns tipos de câncer (BURNOUF, 1995), refletindo num consumo anual de 27 toneladas (HASNAOUI *et al.*, 1997). Devido ao uso parenteral da IgG, esta deve apresentar-se dentro dos limites estabelecidos pelas farmacopéias de algumas substâncias, tais como as endotoxinas (ET).

Endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa de bactérias Gram negativas, e que possuem toxicidade capaz de produzir, entre outros sintomas, febre e até a morte, quando presentes na corrente sangüínea de homens e animais, mesmo em baixas concentrações (1 ng/kg de peso corporal) (RIETSCHER *et al.*, 1993). Devido a esta toxicidade, as farmacopéias estipulam níveis para a presença de ET em soluções protéicas e fármacos para administração parenteral. Quando as soluções protéicas são acidentalmente contaminadas com ET, a sua concentração deve ser reduzida a níveis que não causem sintomas indesejáveis (PEARSON, 1985).

Diversos métodos de remoção de ET têm sido estudados, visando a despirogenação de soluções protéicas, dentre os quais a cromatografia em membranas adsorptivas tem se apresentado atrativa, visto que permite a operação a altos fluxos, favorecendo sua aplicação em larga escala. Nos últimos anos, membranas de quitosana têm sido estudadas por apresentarem baixo custo, hidrofílicidade, boa resistência química e física quando tratadas com agentes reticulantes (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996-A, 1996-B, 1998-A e 1998-B; RUCKENSTEIN e ZENG, 1998; BEPPU, 1999; FREITAS, 2001; YANG *et al.*, 2002), além de apresentarem grupos catiônicos e afinidade por LPS (DAVYDOVA *et al.*,

2000). A quitosana é obtida da desacetilação da quitina, a qual é o polímero natural mais abundante depois da celulose, presente nas carapaças de caranguejo e camarão (SUZUKI e MIZUSHIMA, 1997).

Neste trabalho, membranas porosas de quitosana foram preparadas, segundo o método de ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A) e modificado por FREITAS (2001), utilizando partículas de sílica como agente formador de poros e epícloridrina como agente reticulante.

Teve-se como objetivo, neste trabalho, investigar o potencial de utilização de uma matriz adsorptiva, a membrana porosa de quitosana reticulada, para a despirogenação de soluções tamponantes e de imunoglobulina G humana.

Visando o objetivo global, foram estabelecidas as seguintes etapas:

- Síntese da membrana (preparo e caracterização) segundo o método de ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A) e modificado por FREITAS (2001), utilizando quitosana como matriz e reticulação com epícloridrina.
- Estudo das interações entre membrana e IgG e entre ET e membrana.
- Remoção de ET de soluções aquosas e protéicas, buscando a máxima despirogenação sem sacrifício do rendimento ou da qualidade da solução.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo são abordados conhecimentos necessários para o entendimento deste trabalho, sendo dividido em imunoglobulinas, endotoxinas, métodos utilizados para sua remoção, dentre os quais a membrana porosa de quitosana, e métodos para a quantificação de endotoxinas.

#### 2.1. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, ou anticorpos, das quais a imunoglobulina G (IgG) faz parte, formam uma população de moléculas protéicas solúveis, de estrutura relacionada com glicoproteínas, produzidas na membrana de ligação ou secretadas pelos linfócitos B (STRYER, 1996; ABBAS *et al.*, 2000), sendo sintetizadas por um animal em resposta à presença de uma molécula diferente (antígeno), imprópria do indivíduo, pela qual apresentam alta afinidade. A combinação do antígeno com os receptores da superfície dispara a divisão celular e a síntese de grandes quantidades do anticorpo. Em geral são heterogêneos (policlonais), pois são produzidos por diferentes células. Quando feitos por uma única célula ou seu clone (monoclonais), são homogêneos (STRYER, 1996).

As imunoglobulinas diferem de tamanho, carga elétrica, composição de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos (ROITT *et al.*, 1999) e são constituídas de cadeias polipeptídicas leves e pesadas. A cadeia leve (L) apresenta massa molecular de aproximadamente 23 kDa, e pode ser distinguida em dois tipos: cadeias  $\kappa$  (kappa) e  $\lambda$  (lambda). A classificação  $\kappa$  e  $\lambda$  é baseada em diferenças de aminoácidos, contudo, não é conhecida diferença funcional entre elas. Ambas ocorrem em todas as classes de imunoglobulinas (G, M, A, D e E), mas uma molécula de imunoglobulina apresenta apenas um tipo de cadeia leve, ou  $\kappa$  ou  $\lambda$ , nunca ambas. A porção amino terminal de cada cadeia leve contém parte do local de ligação do antígeno (JAWETZ *et al.*, 1991; STITES *et al.*, 1994).

As cadeias pesadas (H) apresentam de 50 a 70 kDa como massa molecular e são diferentes para cada uma das cinco classes de imunoglobulina, sendo denominadas  $\gamma$  (gama) na IgG,  $\mu$  (mi) na IgM,  $\alpha$  (alfa) na IgA,  $\delta$  (delta) na IgD e  $\epsilon$  (epsilon) na IgE (JAWETZ *et al.*, 1991).

A porção amino terminal de cada cadeia H localiza-se no fragmento Fab, local de ligação do antígeno, e a porção carbonila terminal encontra-se no fragmento Fc que não possui atividade de anticorpo, mas está envolvido na transferência placentária, na fixação de complemento, na ligação às células e outras atividades biológicas (confere atividade biológica) (JAWETZ *et al.*, 1991).

As cadeias L e H são divididas em regiões constantes e variáveis, e cada domínio (constante ou variável) tem mais ou menos 110 aminoácidos, sendo a cadeia L formada por uma região constante e uma variável e a cadeia H por uma variável e três ou mais regiões constantes. Localizando as cadeias variável e constante no anticorpo, pode-se dizer que estão, respectivamente, nos fragmentos Fab e Fc (JAWETZ *et al.*, 1991).

Como já foi dito, temos cinco classes de anticorpos: IgG (principal no soro), IgM (primeira classe a aparecer na resposta primária), IgA (principal classe nas secreções externas), IgE (confere defesa contra parasitas e desencadeia reações alérgicas) e IgD (cujo papel ainda não é bem conhecido) (STRYER, 1996).

A principal imunoglobulina produzida na fase inicial da resposta imune primária é a IgM. A Imunoglobulina M é mais eficiente nas reações de aglutinação, na fixação de complemento e outras reações antígeno-anticorpo, pois tem a maior capacidade de todas imunoglobulinas, apresentando 10 locais para interação (JAWETZ *et al.*, 1991). Assim como a IgG, apresenta atividade anticoagulante (STEIN, 1990). Corresponde a uma massa molecular de cerca de 900 kDa.

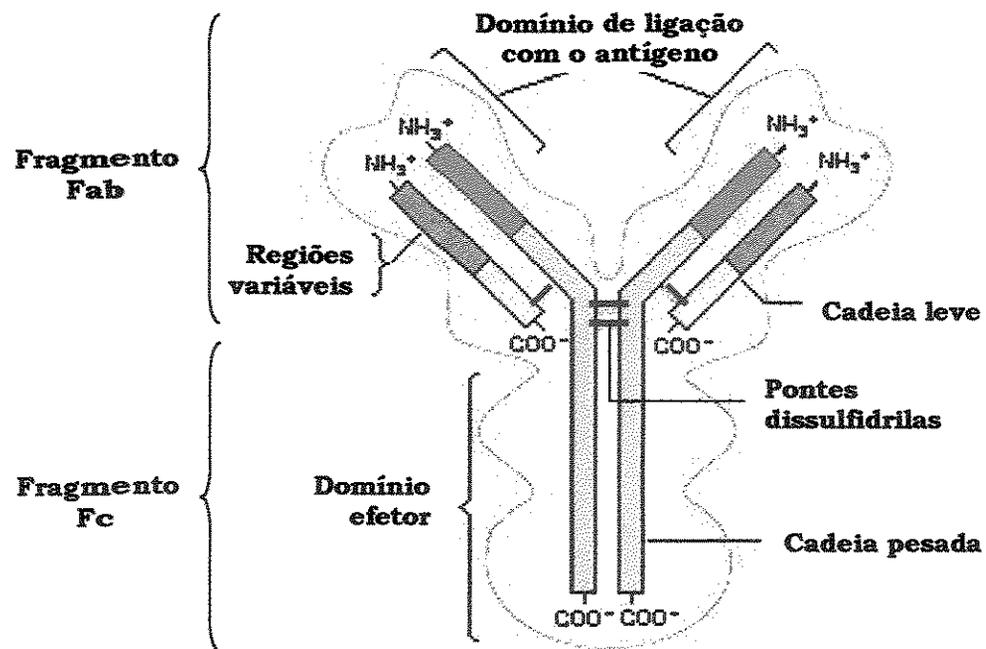
A IgA protege as mucosas do ataque de vírus e de bactérias, bloqueando a sua aderência (STEIN, 1990); está presente nas secreções intestinais, genitais, respiratórias, no leite, saliva e lágrimas (JAWETZ *et al.*, 1991). O soro, do total de imunoglobulinas, apresenta 10 a 15% de IgA, que na forma de monômero tem 160 kDa aproximadamente.

Atuando como receptor para o antígeno que estimulou sua produção e o complexo antígeno-anticorpo resultante, a IgE deflagra respostas alérgicas do tipo

imediatamente, relativo à defesa do trato respiratório e antiparasitas (STEIN, 1990). Esta classe, que tem massa molecular em torno de 190 kDa, apresenta-se aumentada em pessoas com este tipo de alergia (JAWETZ *et al.*, 1991).

A IgD não tem função conhecida como anticorpo. Atuaria como receptor do antígeno, pois está presente na superfície dos linfócitos (STEIN, 1990).

A IgG é o anticorpo predominante nas respostas secundárias, cerca de 20% das proteínas plasmáticas (JAWETZ *et al.*, 1991), constitui importante defesa contra bactérias e vírus (STEIN, 1990). É o único anticorpo que atravessa a placenta, sendo portanto o tipo de imunoglobulina mais abundante nos recém-nascidos (JAWETZ *et al.*, 1991). Apresentando dois locais idênticos de ligação de antígeno é chamada bivalente e pode ser visualizada na Figura 2.1. A digestão enzimática com papaína produz dois fragmentos Fab, que se ligam ao antígeno, mas não formam precipitado, e um fragmento Fc, que tem função efetora como a ligação do complemento (JAWETZ *et al.*, 1991; STRYER, 1996).



**Figura 2.1.** Modelo esquemático de uma IgG<sub>1</sub>. As regiões verdes e laranjas correspondem às áreas variáveis das cadeias pesadas e leves, respectivamente (adaptado de [www.people.virginia.edu/~rjh9u/imresp.html](http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/imresp.html), acesso em 02/10/2002).

O "pool" total de imunoglobulinas do soro é formado por cerca de 70 a 75% de IgG (ROITT *et al.*, 1999), a qual está uniformemente distribuída entre os espaços intra e extracelulares. Estruturalmente a molécula de IgG é constituída de 1328 resíduos de aminoácidos, sendo composta por duas cadeias L e duas H (L<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), ligadas por pontes dissulfidrilas, resultando numa massa molecular de aproximadamente 150 kDa (CALICH e VAZ, 1989).

Diferenças antigênicas das cadeias H e do número e localização de pontes sulfidrilas, leva à existência de quatro subclasses de IgG: de IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>4</sub>. A IgG<sub>1</sub> representa de 60 a 70% do total de IgG e a IgG<sub>2</sub> (de 14 a 20%) é conhecida por reagir a antígenos polissacarídeos, constituindo importante defesa contra bactérias encapsuladas (JAWETZ *et al.*, 1991). Em adultos normais, proteínas podem induzir anticorpos da subclasse IgG<sub>1</sub> e, em menor quantidade, das subclasses IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> (VLUG e VAN REMORTEL, 1989). A migração placentária da IgG<sub>2</sub> ocorre em menor quantidade que nas outras subclasses. A IgG<sub>3</sub> (4 a 8%) apresenta a maior eficiência quanto à fixação de complemento e a IgG<sub>4</sub> (2 a 6%) é incapaz de fixar complemento pela via clássica (JAWETZ *et al.*, 1991; STITES *et al.*, 1994). As propriedades das imunoglobulinas humanas podem ser observadas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Propriedades das imunoglobulinas humanas, adaptado de STEIN (1990) e STITES *et al.* (1994).

Classe de Ig	Meia vida (dias)	Concentração no soro (mg/mL)	Taxa de síntese (mg/kg/dia)	% do total de Ig	Massa Molecular aproximada (kDa)
IgG	23	10	33	80	150
IgA (soro)	6	2	24	16	160
IgM	5	1,2	6	4	900
IgD	3	0,03	0,4	0,001	185
IgE	3	0,0005	0,02	0,00003	190

As prescrições terapêuticas intravenosas de IgG são indicadas nos seguintes casos (CALICH e VAZ, 1989):

- a) imunodeficiências congênitas ou adquiridas, onde o paciente pode apresentar deficiência global ou de algumas subclasses de IgG;
- b) tratamento de deficiências seletivas de anticorpos, como no caso de inflamações crônicas, no qual a produção de anticorpos é insuficiente para combater a doença;
- c) tratamento de doenças auto-imunes e
- d) tratamento de alguns tipos de câncer.

Como a IgG está presente no plasma a uma concentração de 8 a 11 mg/mL, para obter-se 1 grama de IgG, seria necessário fracionar cerca de 100 mL de plasma, o que pode representar para as indústrias farmacêuticas o processamento de centenas de litros de plasma por dia para atender a população necessitada.

A maioria das indústrias farmacêuticas obtém IgG a partir do plasma de doadores sadios, precipitando-a pelo método de Cohn, obtendo-se IgG ligeiramente contaminada com albumina e com outras proteínas que se encontram presentes em menores concentrações.

Segundo BURNOUF (1995), cerca de 17 milhões de litros de plasma humano são coletados por ano no mundo para fracionamento, sendo que dos diferentes anticorpos produzidos industrialmente a partir do plasma, a IgG é especialmente importante, refletindo num consumo anual de 27 toneladas (HASNAOUI *et al.*, 1997).

O uso parenteral da IgG impõe cuidados para o processo de obtenção e purificação da matéria-prima, sendo necessário o enquadramento do produto em padrões internacionais e restrições à presença de algumas substâncias como as endotoxinas.

## **2.2. Endotoxinas**

No decorrer do processo produtivo, apesar da adoção de métodos preventivos, a solução de IgG pode ser contaminada com endotoxinas (ET), as quais são reconhecidas pela indústria de biotecnologia como a maior causa das

reações pirogênicas encontradas durante a administração de produtos biológicos contaminados (HOU e ZANIEWSKI, 1990). O meio mais seguro de evitar esta contaminação é a esterilização absoluta durante o processo (ANSPACH, 1997), mas tendo em vista a característica onipresente das bactérias Gram negativas, das quais a ET é derivada, a remoção destes agentes fisiologicamente ativos, de bioprodutos finais, pode ser considerada um desafio para a indústria biotecnológica (WALSH e HEADON, 1974; HOU e ZANIEWSKI, 1990; KANG e LUO, 1998).

As ET bacterianas, pirogênios ou lipopolissacarídeos (LPS), como também são chamadas, apresentam forte efeito biológico, mesmo em concentrações muito baixas (com concentração de 1 ng/kg de peso corporal) em seres humanos e em muitos animais quando entram na corrente sangüínea. A ação das ET não é diretamente através de células e órgãos, mas pela ativação do sistema imune (PETSCH e ANSPACH, 2000).

A contaminação com ET pode ocorrer durante uma infecção bacteriana, por inalação, pela aplicação intravenosa de um medicamento contaminado (RIETSCHEL *et al.*, 1993; ANSPACH, 1997; ACCONCI *et al.*, 2000; PETSCH e ANSPACH, 2000; DING e HO, 2001), pelo aumento de permeabilidade do intestino devido ao “stress”, esquemia, queimaduras, ferimentos e lesões em geral (McCUSKEY *et al.*, 1996).

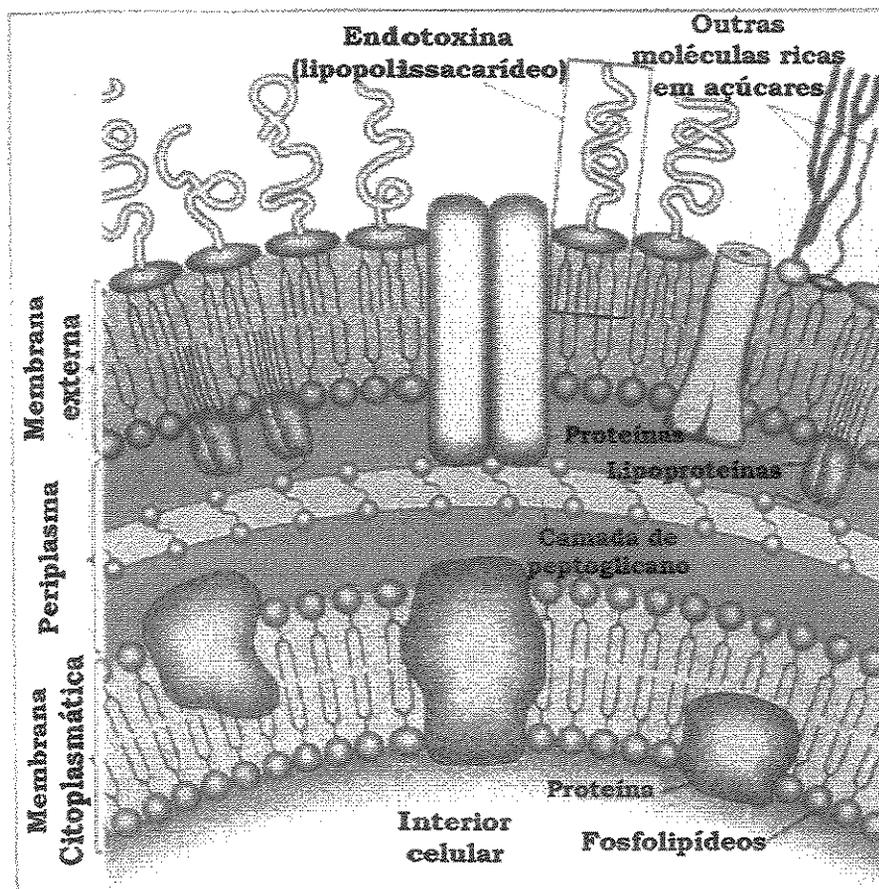
MARTICH e colaboradores, em trabalho publicado em 1993, listam como resposta humana à presença de ET a resposta cardiovascular, pulmonar, inflamatória e humoral, são notados efeitos como a febre, o choque séptico, a hipotensão, a coagulação intravascular disseminada (RIETSCHEL *et al.*, 1993) e a produção de interleucinas, fator de necrose tumoral e prostaglandinas a nível celular (MARTICH *et al.*, 1993).

A prevenção ou tratamento dos efeitos nocivos das ET nas células imunes pode ser feita por alguns métodos como o uso de anticorpos anti-endotoxina (ZIEGLER *et al.*, 1991) e de estruturas parciais de ET para bloquear os receptores endotóxicos (LYNN e GOLENBOCK, 1992).

### **2.2.1. Estrutura e propriedades das endotoxinas**

A significância biomédica das ET, devido ao amplo espectro de atividades biológicas e sua estrutura peculiar, tem estimulado pesquisas mundiais sobre sua natureza química, estrutura primária, conformação molecular e estrutura física tridimensional (RIETSCHER *et al.*, 1993; PETSCH e ANSPACH, 2000).

O termo ET foi introduzido por Richard Pfeiffer (1858-1945), e caracteriza uma classe de LPS, que é parte integrante da parede externa de bactérias Gram negativas, como pode ser visualizado na Figura 2.2, sendo essencial para a viabilidade e crescimento bacterianos. Exerce importante papel na organização, estabilidade e função de barreira da membrana e apresenta estabilidade ao calor (ANSPACH, 1997). As ET constituem aproximadamente três quartos da superfície bacteriana (RAETZ, 1990), e em contraste com a bactéria, uma vez presente, a ET não pode ser removida por métodos padrões como uso de autoclave ou filtração estéril, podendo-se dizer então que uma preparação estéril não é necessariamente apirogênica (PETSCH *et al.*, 1997).



**Figura 2.2.** Localização das endotoxinas na parede celular das bactérias Gram negativas (adaptado de ANSPACH, 1997).



A cadeia de heteropolissacarídeo fica exposta ao meio e é formada pelo centro oligossacarídeo (região central) e por um antígeno superficial (antígeno O). O sítio antigênico O-específico, com cadeias laterais contendo unidades repetidas de oligossacarídeo, determina a especificidade e identidade sorológica do lipopolissacarídeo, e portanto da respectiva bactéria. Sabe-se ainda que estão envolvidos na iniciação ou inibição da ativação do complemento. Geralmente inclui dideoxi açúcares, amino açúcares, ácido urônico e O-metil açúcares de pentoses, hexoses e amino hexoses. Muitos dos açúcares e derivados encontrados nas cadeias O-específicas são únicos no LPS (RIETSCHER *et al.*, 1993).

O lipídeo A é composto de um dissacarídeo de glucosamina, altamente substituído por ácidos graxos de cadeia longa com grupamentos amida e éster. Esta parte hidrofóbica da ET assume um arranjo ordenado hexagonal, que resulta numa estrutura mais rígida comparada com o resto da molécula (PETSCH e ANSPACH, 2000).

Foi postulado, nos anos 50 que o lipídeo A é o centro endotóxico, ou seja, é responsável pela atividade biológica, induzindo a pirogenicidade e letalidade das ET (RIETSCHER *et al.*, 1993). O mecanismo de indução de febre envolve a fagocitose do lipídeo A, sendo produzido pirogênio endógeno, que então atravessa a barreira hematoencefálica e altera o ponto de equilíbrio dos neurônios reguladores de temperatura do hipotálamo anterior. O lipídeo pode ser parcialmente fosforilado, permitindo a ET exibir carga negativa (com  $pK_1 = 1,3$  e  $pK_2 = 8,2$ ) (HOU e ZANIEWSKI, 1990).

A massa molecular das subunidades (monômeros) de ET é cerca de 10 a 20 kDa (diâmetro de 8 a 12 Å e comprimento de 200 a 700 Å) (PEARSON, 1985), dependendo principalmente do tipo de bactéria. Por causa das interações não polares entre cadeia carbônica e o lipídeo A, tanto quanto das pontes geradas entre grupos fosfato e íons alcalinos, como sódio, potássio, magnésio e cálcio, micelas e vesículas de grande estabilidade são formadas, podendo gerar estruturas supramoleculares, alcançando uma massa molecular com cerca de 1000 kDa (RIETSCHER *et al.*, 1993; KANG e LUO, 1998; ANSPACH e PETSCH, 2000).

Percebe-se agregação de ET na presença dos eletrólitos citados acima, os quais são freqüentemente usados como excipientes para parenterais. A desagregação destas estruturas pode ser obtida por agentes quelantes, tais como

EDTA (ácido etilendiaminotetracético) e por surfactantes aniônicos (BAMBA *et al.*, 1996).

Muitas proteínas também podem desagregar ET e formar complexos com LPS em soluções biológicas, o que torna a remoção de ET de produtos biofarmacêuticos mais complicada (KANG e LUO, 1998). Além disso, uma alta concentração protéica aumenta esta desagregação, permitindo que maior quantidade de monômeros de ET fiquem disponíveis em solução e possam, pelo reduzido tamanho, chegar ao filtrado, num processo de filtração (LI e LUO, 1997). O estado final do processo de agregação ET-proteína não pode ser predito, pois depende das propriedades das proteínas (carga, hidrofobicidade), de sua concentração em solução e das características das soluções (pH e força iônica) (PETSCH e ANSPACH, 2000). Percebe-se este comportamento quando tem-se em solução lipoproteínas e anticorpos monoclonais, na presença de ET (ZIEGLER *et al.*, 1991).

Devido sua toxicidade e por ser a espécie humana a mais suscetível aos LPS, a remoção de ET, para quantidades mínimas é essencial para a segurança da administração de parenterais (ANSPACH, 2001), sendo esta remoção complicada, visto que a estrutura da ET permite interagir com diferentes bioprodutos.

### **2.3. Métodos para promover a despirogenação**

A escolha do método utilizado para a despirogenação (remoção de pirogênicos), de equipamentos e soluções depende da molécula de interesse, da concentração de ET no meio, do custo do processo e de fatores particulares da solução. A despirogenação pode ser obtida de duas formas: inativação ou remoção de ET.

#### **2.3.1. Inativação de endotoxinas**

A inativação de ET pode ser obtida pela perda de toxicidade da molécula de LPS usando tratamentos químicos ou físicos que quebrem pontes lábeis ou bloqueiem sítios necessários à atividade pirogênica; como alternativa, a molécula pode ser totalmente destruída usando altas temperaturas. Esses tratamentos são

geralmente utilizados para despirogenizar equipamentos ou soluções que podem ser submetidas a condições extremas (NAKATA, 1994; ANSPACH e HILBERCK, 1995), tendo em vista que a inativação compreende técnicas como hidrólise ácida ou alcalina, oxidação, tratamento com calor seco, uso de polimixina B sob certas condições e radiação ionizante com cobalto, condições estas muito drásticas para a aplicação em biomoléculas.

A hidrólise ácida quebra o KDO (ácido 2-keto-3-deoxiotônico), cuja localização na molécula de ET pode ser vista na Figura 2.3, reduzindo ou eliminando a pirogenicidade, mas deixa o lipídio A livre, podendo mascarar sítios necessários ao reconhecimento; enquanto que a hidrólise alcalina gera uma alteração maior que a ácida, alteração esta tanto química quanto biológica da molécula, devido a saponificação dos ácidos graxos.

Peróxido de hidrogênio pode ser adicionado ao sistema, visando a oxidação, que é dependente do tempo, do pH e da concentração adicionada e exibe as vantagens de permitir segurança no manuseio e facilidade na eliminação, contudo, pode alterar a solução ou produto (PEARSON, 1985).

A despirogenação de materiais também pode ser feita pela incineração das ET, ou seja, utilizando calor seco. O fato de que temperaturas inferiores a 175°C não são efetivas na despirogenação deve ser observado e uma melhor despirogenação é obtida a 200°C por 60 minutos, segundo NAKATA (1994).

A polimixina B é um antibiótico policatiônico, muito freqüentemente adicionado para neutralizar os efeitos do LPS *in vitro*, sob determinadas condições. Estabelece ligação com a região do lipídio A, motivo pelo qual também pode mascarar o LPS quando da quantificação por LAL (PEARSON, 1985; KARPLUS *et al.*, 1987).

Foi relatada destruição do lipídio A e portanto eliminação da pirogenicidade e da atividade frente ao LAL com alta dose de radiação ionizante com <sup>60</sup>Co, contudo a exposição a elevadas doses de radiação pode gerar modificações químicas às drogas e soluções parenterais (PEARSON, 1985).

### **2.3.2. Remoção de endotoxinas**

A remoção de ET, segundo PEARSON (1985), pode ocorrer por diferentes métodos, baseados em características físicas e químicas da ET, como tamanho, massa molecular, hidrofobicidade, carga eletrostática ou afinidade de ET a

diferentes superfícies, métodos estes como a ultrafiltração, a osmose reversa, a cromatografia de afinidade e de troca iônica, adsorção em carvão ativo e filtração em membranas de afinidade ou adsorptivas. Os métodos de despirogenação variam extremamente, devendo portanto ser delineados para cada situação particular, sendo fator de extrema importância a manutenção das características da molécula de interesse (SHARMA, 1986).

A ultrafiltração (UF) é eficiente na separação de compostos que apresentem sensível diferença de tamanho físico, diferença esta compreendida por um fator de 10. Tendo em vista a possibilidade da ET estar em solução, dependendo das condições do meio, na forma de monômeros ou agregados, e portanto, apresentar aproximadamente o mesmo tamanho que as biomoléculas, o uso de UF não é eficiente para a remoção de ET de soluções protéicas (ANSPACH, 1997). YAMAMOTO e KIM (1996) avaliaram a capacidade de remoção de LPS de soluções não protéicas utilizando membranas de fibra oca, com poros de tamanho nominal de corte de 20 a 30 kDa. Obtiveram como resposta a ausência de ET no filtrado das membranas compostas de poliéster e poli(metil-metacrilato), concentração de 6,4 EU/L em membrana de poli(acrilonitrila) e 10,3 EU/L em polisulfona, numa alimentação de 40.000 EU/L. O emprego da UF foi aprovado para produção de água para injeção no Japão e Europa (EVANS-STRICKFADEN *et al.*, 1996).

A osmose reversa tem seu uso limitado a despirogenação de água devido ao pequeno tamanho de corte de suas membranas, o qual não permite a passagem de biomoléculas. Já o uso da adsorção de ET em carvão ativado, misturado em pó à solução ou através de filtros elaborados, exhibe as desvantagens de apresentar alta afinidade por moléculas com alta massa molecular e substâncias não ionizadas, podendo adsorver quantidade de substâncias ativas (adsorção não específica) e da dificuldade de proceder a completa remoção deste adsorvente do produto final (PEARSON, 1985; SHARMA, 1986).

Como dito no item 2.2.1, a endotoxina apresenta carga negativa, a partir de pH 1,3, devido especialmente à presença dos grupos fosfolipídicos (HOU e ZANIEWSKI, 1990; PETSCH *et al.*, 1997), sendo possível, portanto, acima deste pH adsorvê-las em superfícies catiônicas, através do mecanismo de interação de cargas (HOU e ZANIEWSKI, 1990; HIRAYAMA *et al.*, 1999). A cromatografia de

troca iônica utiliza-se deste mecanismo, mas apresenta baixa seletividade, retendo também as moléculas de interesse, levando a perdas consideráveis do produto (NEIDHARDT *et al.*, 1992). Os ligantes de troca aniônica imobilizados em suportes cromatográficos empregados são o DEAE (dietilaminoetano) ou grupos amino quaternários, os quais adsorvem a ET durante a passagem pela matriz da solução contaminada.

Devido igualmente às atrações eletrostáticas, a presença de proteínas básicas, como a lisozima, ribonuclease A e IgG humana, dificulta a remoção de ET, visto que podem interagir com estes pirogênios, indisponibilizando acesso para interação ET-adsorvente, levando ao insucesso do processo de despirogenação (ANSPACH, 2001). Proteínas com uma carga negativa, como BSA, podem interagir somente com os ligantes, competindo então com a ET pelos sítios de ligação do adsorvente (PETSCH *et al.*, 1997). Sabe-se também que pequenas quantidades de ET são mais difíceis de remover de soluções com proteínas básicas que de ácidas (ANSPACH e PETSCH, 2000), e que o uso de detergentes (surfactantes) como o Triton X-114 reduz a interação ET-proteína, facilitando a remoção de ET de soluções com catalase, IgG, proteínas recombinantes e outras (KARPLUS *et al.*, 1987; LIU *et al.*, 1997).

Da mesma forma, podem ser empregadas matrizes com grupos funcionais catiônicos como a quitosana e o poli( $\gamma$ -metil L-glutamato) para remoção de ET. HIRAYAMA e colaboradores (1990, 1992-A, 1992-B, 1995, 1999) desenvolveram esferas de poli( $\gamma$ -metil L-glutamato) (PMLG), aminadas ou não, cuja adsorção de ET é baseada em atrações eletrostáticas e hidrofóbicas, motivo pelo qual a força iônica pode ser variada de 0,05 a 1 sem interferir na adsorção da ET, nem afetar significativamente a recuperação dos compostos de interesse, como no caso de remoção de 99,7% da ET do toxóide tetânico e recuperação de 100% deste antígeno em PMLG aminado.

Por outro lado, a atração hidrofóbica de LPS a polímeros alifáticos tem sido estudada, através do emprego de matrizes de polipropileno, polietileno, fenil-agarose e outras. A atração de ET a este tipo de material ocorre provavelmente pela interação entre o lipídio A, o centro hidrofóbico do LPS, e a superfície da membrana polimérica (PEARSON, 1985). A cromatografia de interação hidrofóbica foi empregada por WILSON *et al.* (2001), visando a despirogenação de HPV (*Papilloma vírus humano*) e da vacina para este vírus, os quais estabelecem forte

interação com ET; remoção esta feita através da passagem das soluções por fenil-Sepharose.

DING e colaboradores (2001) desenvolveram uma matriz para adsorção específica de ET. Imobilizaram em agarose o S3Δ, peptídeo de caráter catiônico alifático, derivado do domínio de ligação (Fator C) do *Limulus polyphemus*, peptídeo este capaz de ligar-se ao lipídio A; observaram, em meio de cultura celular com 1000 e 10 EU/mL, respectivamente, efluentes com 0,1 e 0,005 EU/mL.

Visando igualmente à despirogenação de biomoléculas, tem sido explorado o princípio da afinidade entre as moléculas de endotoxinas e ligantes, imobilizados em matrizes porosas (HIRAYAMA *et al.*, 1990). A cromatografia de afinidade baseia-se em interações moleculares específicas e reversíveis entre substâncias biologicamente ativas (MOHR e POMMERENING, 1986), ou seja, explora-se o fenômeno de reconhecimento específico no processo de separação (HAUPT e BUENO, 2000).

Os ligantes comumente utilizados para a despirogenação de soluções protéicas são histidina, histamina, polimixina B, poli-L-lisina e poli(ε-lisina), poli(etilenoimina) (PEI), os quais possuem de moderada à alta eficiência (ANSPACH e PETSCH, 2000). Estes ligantes são utilizados imobilizados em sistemas particulados (gel) como agarose, partículas esféricas de quitosana e de celulose (TODOKORO *et al.*, 2002), ou em membranas de Nylon<sup>®</sup>, PVA (álcool poli(vinílico)), de PEVA (álcool poli(etilenovinílico)), e celulose (PETSCH *et al.*, 1998), na presença ou não de espaçadores.

Polimixina B e histamina podem ser usadas como ligantes e apresentam aproximadamente a mesma eficácia, mas como são substâncias biologicamente ativas, causadoras de reações indesejáveis ao organismo, não são apropriadas para remoção de ET de uma solução para injeção parenteral (KARPLUS *et al.*, 1987; LYNN e GOLENBOCK, 1992; TODOKORO *et al.*, 2002).

MINOBE e colaboradores (1988) sugeriram que histidina imobilizada poderia ser usada para remoção de pirogênios de várias fontes de diversos componentes como aminoácidos, antibióticos, vitaminas, bases de ácidos nucléicos, açúcares, peptídeos e proteínas. Na presença de compostos com baixa massa molecular a concentração de ET no produto final ficou menor que 0,1

EU/mL, com recuperação de 100% da substância de interesse, enquanto que compostos com altas massas moleculares permitiram obter uma concentração final de ET de 0,01 EU/mL, com recuperação de 95% de BSA (albumina do soro bovino), 99% de mioglobina e de HSA (albumina do soro humano) e 98% de insulina e lisozima.

Adsorventes com poli( $\epsilon$ -lisina) foram preparados por HIRAYAMA *et al.* (1999) e TODOKORO *et al.* (2002) para remover ET de soluções. Ambos os trabalhos apresentam efluentes, de BSA e  $\gamma$ -globulina, com concentração de ET dentro dos limites estabelecidos pela FDA (Food and Drugs Administration) para uso como parenterais e recuperação protéica de 99%.

PETSCH e colaboradores (1998) imobilizaram PEI e compararam a influência da matriz (gel de agarose, membrana plana de Nylon<sup>®</sup> e membranas de fibras ocas de PVA e de PEVA), para a remoção de ET de solução não protéica e com BSA. Perceberam que a membrana de Nylon<sup>®</sup>, a qual apresenta o maior diâmetro de poro dentre os materiais utilizados, permitiu em todos os ensaios a maior remoção de ET, com um filtrado de 0,1 EU/mL em solução não protéica e 0,15 EU/mL na presença de proteínas, oriundo de uma alimentação de 6000 EU/mL.

Como confirmado por vários pesquisadores, a membrana permite vencer as limitações dos sistemas particulados (UNARSKA *et al.*, 1990; PETSCH *et al.*, 1997 e 1998; ACCONCI *et al.*, 2000). O alto fluxo através da membrana combinado a ausência de limitações difusionais representa a mais importante vantagem de sua utilização, pois facilita grandemente as etapas de lavagem, eluição e regeneração e com isso diminui a probabilidade de desativação das biomoléculas por diminuir o tempo de sua exposição a um meio não favorável. Permite uma maior produtividade, pois embora apresente menor capacidade de adsorção, pode ter ciclos muito mais rápidos (BRANDT *et al.*, 1988; UNARSKA *et al.*, 1990; ZENG e RUCKENSTEIN, 1996-B; CHARCOSSET, 1998; KLEIN, 2000). Além disso, apresenta fácil escalonamento, estabilidade mecânica (ACCONCI *et al.*, 2000), e membranas têm sido associadas com sucesso a ligantes biológicos e não biológicos, formando suportes de cromatografia em membrana de afinidade (BRANDT *et al.*, 1988; CHARCOSSET, 1998; KLEIN, 2000; HAUPT e BUENO, 2000).

## **2.4. Membranas e seu emprego em processos de despirogenação**

### **2.4.1. Síntese de membranas e modo de operação**

Uma membrana pode ser definida como uma fina barreira entre dois fluidos que restringe o movimento de um ou mais componentes ou de um ou ambos fluidos através da barreira, sendo que a transferência de massa através da membrana ocorre devido à presença de uma força motriz. A força motriz pode ser o gradiente de pressão, potencial químico ou elétrico e eventualmente força térmica (HOWELL *et al.*, 1993).

As propriedades das membranas podem ser ajustadas, como função do fim ao qual se destinam, sendo o tipo e a eficiência da separação determinados pela morfologia da membrana e pelo tipo de material utilizado.

As membranas, quanto à morfologia, podem ser chamadas de porosas e não porosas (densas). Uma membrana porosa pode apresentar macroporos (diâmetro de poro maior que 50 nm), mesoporos (diâmetro de poro entre 2 e 50 nm) e microporos (diâmetro de poro inferior a 2 nm), empregada, respectivamente, para microfiltração (poros de 0,05 a 5  $\mu\text{m}$  -  $\Delta P$  de 0,5 a 2 atm), ultrafiltração (poros de 2 a 50 nm -  $\Delta P$  de 1 a 7 atm), e osmose reversa ( $\Delta P$  de 18 a 80 atm) e nanofiltração (poros inferiores a 2 nm -  $\Delta P$  de 5 a 25 atm), enquanto que, a membrana não porosa é usada para separação de gases e pervaporação, apresentando, poros a nível molecular (HOWELL *et al.*, 1993).

A membrana porosa pode ser dividida ainda em dois tipos, quanto à distribuição dos poros: simétrica ou assimétrica. Uma membrana porosa simétrica tem seus poros distribuídos uniformemente ao longo de sua espessura, ao passo que uma membrana porosa assimétrica tem gradiente de distribuição de poros no sentido da espessura da membrana, podendo ambas, simétricas ou assimétricas também serem compostas, devido à adição de uma fina camada de outro material na sua superfície.

As diferentes morfologias de uma membrana, porosa ou não, são oriundas de sua preparação, cujos métodos utilizados são: sinterização, estiramento, gravação, "coating", inversão de fases e outras (SCOTT, 1995).

No processo de sinterização, as partículas do material são pressionadas a altas temperaturas, desaparecendo as superfícies de contato.

O estiramento consiste em esticar um filme de material semicristalino perpendicularmente à direção de extrusão. Devido à tensão mecânica, pequenas rupturas são obtidas gerando uma estrutura porosa.

Durante a gravação, um filme de material polimérico é submetido a uma radiação de alta energia, formando-se a matriz porosa quando este filme é imerso em um banho ácido ou alcalino.

"Coating" consiste de um conjunto de técnicas utilizadas para a obtenção de membranas densas.

A inversão de fases, método utilizado para a confecção da membrana utilizada neste trabalho, consiste em tornar sólido um polímero em condições controladas; controle este que governará as características morfológicas da membrana. Este método cobre uma grande variedade de técnicas, tais como:

- a) precipitação por evaporação controlada: o polímero é dissolvido num solvente volátil, que é então evaporado, gerando um ambiente instável, causando a precipitação;
- b) precipitação por evaporação do solvente: uma solução polimérica é submetida a uma atmosfera de nitrogênio, para evitar a presença de vapor de água, sendo evaporado o solvente e dando origem a uma membrana densa e homogênea;
- c) precipitação de fase vapor: neste método o filme de solução polimérica é submetido a uma atmosfera constituída de um não solvente e saturada pelo solvente. A condição de saturação dificulta a evaporação do solvente do filme e força a difusão do não solvente, causando a precipitação da fase diluída, conseguindo-se assim uma membrana porosa no topo do filme;
- d) precipitação térmica: a solução do polímero é resfriada, mudando as condições de solubilidade, formando a membrana;
- e) precipitação por imersão: um filme de solução polimérica sobre um suporte inerte é colocado em um banho de não solvente, onde a precipitação ocorre por causa da troca de solvente para o banho e de não solvente para dentro do filme.

As membranas poliméricas são preparadas com duas geometrias básicas: plana e tubular, as quais são acondicionadas em cartuchos ou módulos visando aumento de seu desempenho.

O sistema de filtração adotado para uma membrana pode ser tangencial (fluxo cruzado) ou frontal (perpendicular à superfície). O modo de filtração frontal é o mais clássico, possibilita mais facilmente a obstrução dos poros da membrana pois há acúmulo de soluto na interface membrana-solução, gerando polarização de concentração; já o modo tangencial, no qual a alimentação se faz tangencialmente à superfície da membrana, ao mesmo tempo que permite a filtração (perpendicular ao fluxo), remove o material retido, não permitindo a aglomeração deste na superfície da membrana, minimizando o efeito da polarização de concentração.

Visando utilizar o princípio de separação com membranas é necessário escolher ou sintetizar uma membrana com propriedades estabelecidas pelas características da solução. Ou seja, escolher uma matriz apropriada ao fim que se destina, a qual deve apresentar, nas condições de operação, características como alta seletividade, alta permeabilidade, estabilidade mecânica combinada à macroporosidade, estabilidade frente à temperatura, estabilidade química mas que permita ser facilmente modificada ou apresente grupos funcionais, hidrofiliçidade, insolubilidade em água, baixa ou nenhuma adsorção não específica, resistência contra microrganismos, biocompatibilidade, forma de poro e tamanho que não permitam bloqueio e alta relação área por volume (MOHR e POMMERENING, 1986; RAUTENBACH e ALBRECHT, 1989; HARRIS e ANGAL, 1995; HAUPT e BUENO, 2000).

#### **2.4.2. Utilização de membranas adsortivas para a despirogenação de soluções protéicas**

Membranas adsortivas são aquelas que contêm sítios de adsorção (ligantes imobilizados e grupos carregados ou hidrofóbicos).

O princípio de separação, utilizando membranas adsortivas, visando a despirogenação de soluções, consiste em adsorver nos sítios de ligação da membrana a endotoxina e recolher o composto de interesse, não adsorvido, no filtrado (cromatografia negativa). O fato do produto de interesse ser recolhido no

filtrado faz com que não se recorra a eluição da endotoxina adsorvida, realizando então a despirogenação da matriz para utilizá-la no próximo ciclo de produção. Para estabelecer as melhores condições de processo, tendo como objetivo uma máxima remoção de endotoxinas e uma máxima recuperação do produto de interesse, deve-se estudar condições tais (pH, força iônica, concentração dos compostos) que a endotoxina adsorva na matriz e o produto de interesse não interaja com ela. Alguns trabalhos publicados visando a remoção de ET de soluções protéicas são apresentados na Tabela 2.2.

Os resultados mostrados na Tabela 2.2 demonstram que a capacidade da membrana e a recuperação do produto de interesse, de sistemas com membrana para remoção de ET, variam muito em função da concentração de proteína e de ET presentes na alimentação, assim como com o tipo de membrana empregada, como observado por PETSCH *et al.* (1998), PETSCH e ANSPACH (2000), ACCONCI (2000) e FREITAS (2001).

Na literatura consultada predominam trabalhos em que membranas comerciais foram modificadas superficialmente, visando a imobilização de ligantes para adsorção de ET, sendo usadas membranas planas de Nylon®, de fibras ocas de PEVA e PVA, às quais são imobilizados, por exemplo, PEI ou histidina.

O sistema de membranas de fibra oca de álcool poli(etileno vinílico) com histidina imobilizada (His-PEVA) utilizado por LEGALLAIS e colaboradores (1997) e ACCONCI e colaboradores (2000) para a despirogenação de soluções de IgG humana, anticorpo monoclonal e soro antiofidico, não apresentou afinidade pelas imunoglobulinas, favorecendo a adsorção das ET com a preservação dos constituintes da solução protéica.

Esta mesma configuração (membrana de fibra oca) mas de PVA, foi utilizada por PETSCH *et al.* (1998), para comparar com os resultados de uma membrana plana, ambas com PEI imobilizado, permitindo identificar a membrana plana como a de melhor desempenho, pois forneceu maior remoção de ET (aproximadamente 100%) e maior recuperação de BSA (96%), obtendo uma

**Tabela 2.2.** Alguns exemplos de trabalhos publicados visando a remoção de endotoxinas de soluções protéicas

Material da membrana	Ligante imobilizado	Configuração	Proteína	C <sub>i</sub> ET (EU/mL)	C <sub>f</sub> ET (EU/mL)	Recuperação da proteína	Referência
PEVA	histidina	fibras ocas	IgG	856	238	83%	LEGALLAIS <i>et al.</i> , 1997
				228	44	78%	
Nylon®	PEI	plana	BSA	6000	0,15	96%	PETSCH <i>et al.</i> , 1998
PVA	PEI	fibras ocas	BSA	6000	3,0	92%	PETSCH <i>et al.</i> , 1998
Nylon®	PEI	plana	BSA	65	< 0,15	98%	ANSPACH e PETSCH, 2000
				303	29,4	próximo de 100%	
PEVA	histidina	fibras ocas	Soro antiofidico	350	27	70%,	ACCONCI <i>et al.</i> , 2000
Quitosana	sem ligante imobilizado	plana	Soro antiofidico	1184,5	34,2	79%	FREITAS, 2001

(BSA): albumina do soro bovino, (IgG): imunoglobulina G humana, (C<sub>i</sub>): concentração de ET na alimentação, (C<sub>f</sub>): concentração de ET no permeado, (PEI): poli(etilenoimina), (PVA): álcool polivinílico, (PEVA): álcool poli(etilenovinílico).

concentração de ET no filtrado dentro dos níveis da FDA para injeção parenteral, oriunda de uma alimentação com 6000 EU/mL.

Em trabalho seqüencial, ANSPACH e PETSCH (2000) utilizaram a membrana plana de Nylon®, com PEI imobilizado, e testaram-na na despirogenação da mesma proteína (BSA), mas variando a concentração de alimentação de ET, obtendo valores ainda maiores de recuperação protéica. No caso de uma concentração de ET alimentada de 65 EU/mL obteve-se concentração de ET no filtrado abaixo de 0,15 EU/mL (com fator de purificação de 4333), contudo com concentração intermediária alimentada à membrana (303 EU/mL) o produto apresentou concentração de ET de 29,4 EU/mL, caindo o fator de purificação (10,2).

FREITAS, em trabalho publicado em 2001, adaptando um método da literatura (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996-A), no qual a membrana é empregada na purificação de proteínas, obteve uma membrana de quitosana para a despirogenação de soro antiofídico. Como resultado deste trabalho obteve elevada remoção de ET em soluções com altas concentrações iniciais, embora tenha alcançado baixa recuperação de anticorpos.

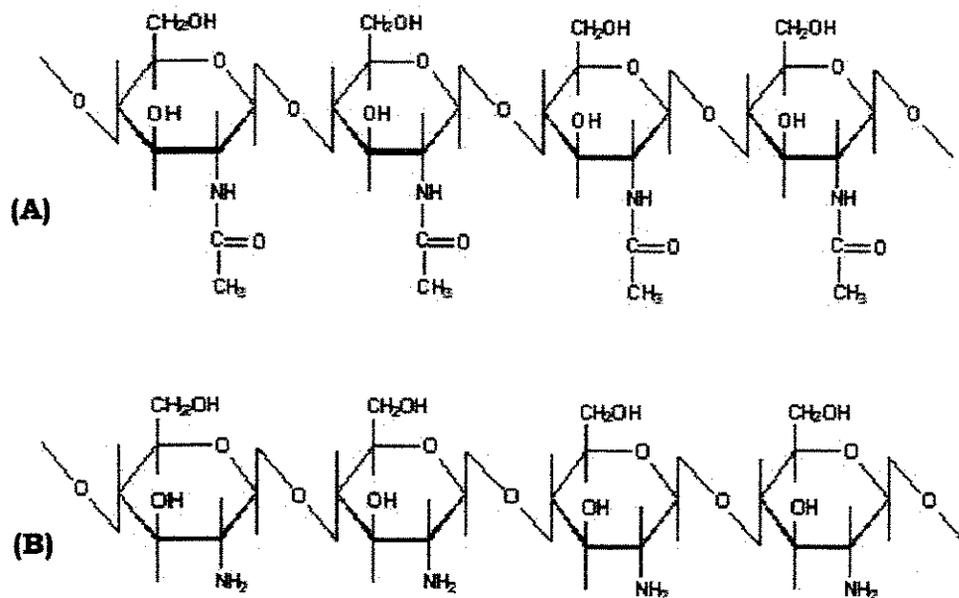
Não há trabalhos publicados, na literatura consultada, visando a despirogenação de IgG humana, através da adsorção em membrana porosa de quitosana; embora a literatura indique a existência de afinidade entre ET e quitosana (DAVYDOVA *et al.*, 2000) e os valores de capacidade de remoção de ET, nesta membrana, sem ligantes imobilizados, sejam comparáveis aos obtidos por sistemas que empregam ligantes imobilizados, apresentando, portanto, potencialidade para ser empregada em processos de despirogenação.

#### **2.4.3. Membrana de quitosana como matriz adsortiva**

A partir de 1996, o emprego de membranas de quitosana para purificação de biomoléculas vem sendo estudado visando recuperação e purificação de proteínas devido a quitosana apresentar hidrofiliabilidade, excelente habilidade de formação de filmes, alta reatividade, alta capacidade de adsorção protéica, tanto quanto baixo custo (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996-B e 1998-B; KURITA, 1998; YANG *et al.*, 2002).

Quitosana, poli(2-amino-2-deoxi-D-glicose), é a forma desacetilada da quitina; e quitina, poli(N-acetil-D-glicosamina), está presente em exoesqueletos de insetos, em paredes celulares de fungos e em crustáceos, mas é obtida geralmente desta última fonte, especialmente de camarões e caranguejos (SUZUKI e MIZUSHIMA, 1997). As estruturas da quitina e da quitosana são apresentadas na Figura 2.4.

Assim como a celulose, a quitina é um polissacarídeo, e juntas, celulose e quitina são os mais importantes polímeros naturais devido a sua abundância e fácil processo de obtenção (KURITA, 1998).



**Figura 2.4.** Estruturas das moléculas de (A) quitina e de (B) quitosana (adaptado de ARRUDA, 1999).

A quitosana, obtida da desacetilação da quitina, utilizada como matriz para adsorção, confere características como solubilidade em ácidos orgânicos diluídos, sendo insolúvel em soluções alcalinas; apresenta um grande número de grupos hidroxila e amino reativos, permitindo o acoplamento de ligantes; biodegradabilidade; grande afinidade por metais pesados, dentre outras, as quais justificam seu uso para fins farmacológicos, biomédicos, alimentícios, na agricultura e no tratamento de água e esgoto (KURITA, 1998). Além disso,

segundo DAVYDOVA e colaboradores (2000), a quitosana é capaz de interagir com LPS, mostrando ser promissor seu uso em medicina como inibidora da ação de ET.

O método sugerido por ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A), para a obtenção de membranas macroporosas de quitosana, apresenta sílica como agente formador de poros, visto que, em contraste com a quitosana, as partículas de sílica são insolúveis em soluções ácidas, mas solúveis em meios alcalinos. Com base nesta oposição de propriedades a membrana de quitosana-sílica é preparada solubilizando a quitosana em ácido acético diluído e acrescentando as partículas de sílica, com tamanho pré-estabelecido. Depois de remover a água por evaporação, solubiliza-se a sílica e neutraliza-se a membrana com solução aquosa de hidróxido de sódio. O local antes ocupado pelas partículas de sílica, com a solubilização destas, dá origem aos poros.

Como a quitosana é mais desacetilada que a quitina, tem maior hidrofiliabilidade, perdendo portanto em resistência à tensão quando úmida. Um aumento da resistência pode ser obtido submetendo a membrana macroporosa de quitosana a um processo de reticulação, ou seja, ampliando as interações entre as cadeias do polímero. Algumas substâncias, tais como bisoxirano, epicloridrina e glutaraldeído (ARRUDA, 1999; BEPPU, 1999) podem ser utilizadas como agente reticulante, o qual interage com radicais da matriz, como hidroxila e amino, para interconectar as cadeias poliméricas. Quando se utiliza epicloridrina a baixas concentrações como agente para a reticulação não se elimina a função amina catiônica da quitosana, pois ela forma ligações covalentes somente com os radicais hidroxila (WEI *et al.*, 1992).

Devido a manutenção do seu alto conteúdo de grupos amino livres, mesmo após a reticulação, a membrana de quitosana reticulada pode servir como um fraco trocador de ânions, uma matriz em que ocorram atrações eletrostáticas, apresentando em pH menor que sete carga positiva. Conseqüentemente, não é necessária, dependendo da natureza da adsorção visada, a introdução de grupos trocadores de íons ou de ligantes, que com freqüência deterioram a estrutura e a resistência mecânica em tal material (ZENG e RUCKENSTEIN, 1998-A).

A fração dos grupos amino não protonados da quitosana pode ser estimada em função do pH, segundo a Equação 2.1, onde  $\alpha$  é a fração dos grupos amino não protonados (ANTHONSEN e SMIDSROD, 1995).

$$pKa = pH + \log (1-\alpha)$$

$$\alpha = [1/(10^{pKa-pH} + 1)]$$

Eq 2.1

Sendo o pK da membrana da quitosana entre 6,3 a 7,0, dependendo do modo e fonte de obtenção e do grau de desacetilação, e admitindo pK 7,0, obtemos a Tabela 2.3, que permite visualizar a fração protonada e desprotonada da membrana de quitosana em função do pH.

**Tabela 2.3.** Fração de grupos amino na membrana de quitosana como função do pH, supondo pK da quitosana igual a 7,0

pH	$\alpha$ (fração não protonada)	1- $\alpha$ (fração protonada)
6,0	0,09	0,91
6,5	0,24	0,76
7,0	0,50	0,50
7,3	0,67	0,33
7,5	0,76	0,24
8,0	0,91	0,09
8,5	0,97	0,03

O uso da membrana macroporosa reticulada de quitosana para estudar a remoção de ET de soluções de IgG é baseado nas características dos materiais envolvidos, ou seja, na carga positiva da quitosana em pH inferiores a sete e na carga negativa da ET nesta mesma condição. As características apresentadas permitem prever a adsorção de ET na membrana, mas tornam necessária a verificação das interações entre IgG e ET, ET e membrana e IgG e membrana, da recuperação protéica e a quantificação de ET remanescente no filtrado, para comprovar sua viabilidade como processo de remoção de ET a níveis parenterais.

## 2.5. Métodos para detectar endotoxinas

Os métodos de remoção de pirogênios, tanto de soluções aquosas quanto protéicas, necessitam de uma quantificação de endotoxinas para confirmar sua efetividade.

O primeiro método para detecção de endotoxinas aprovado pela FDA foi o método *in vivo* que usa a elevação de temperatura corpórea de coelhos como resposta positiva para a presença de ET, após a injeção da solução teste (ACCONCI, 1998). Este método não só é caro como demorado, pois um teste em coelho requer 48 horas para obtenção do resultado e torna necessária a manutenção de grandes colônias destes animais (<http://www.mbl.edu/animals/Limulus/blood/bang.html>).

Atualmente, outro método aprovado pela FDA, com a mesma finalidade, é o teste *in vitro*, com lisado de amebócito de *Limulus* (LAL), que vem sendo utilizado devido sua facilidade de manipulação, além do reduzido tempo, quando comparado ao teste *in vivo*, necessitando de algo como 45 minutos para verificação da resposta. Pode ser utilizada, além do *Limulus*, a espécie *Tachypleus* (PEARSON, 1985).

Estudos seqüenciais permitiram identificar os amebócitos, células circulantes no *Limulus polyphemus*, responsáveis pela reação de coagulação intravascular, levando à morte, quando em presença de bactérias marinhas Gram negativas, ou melhor, de um derivado termoestável destas bactérias, isto é, endotoxinas. O uso do lisado dos amebócitos de *Limulus* baseia-se no reconhecimento específico e com elevada sensibilidade de ET (PEARSON, 1985; LEMKE, 1994).

O teste LAL, utilizado para formação de gel na presença de ET, pode ser adaptado ao formato de teste cromogênico quantitativo, que envolve incubação a 37°C da amostra testada com o lisado de amebócito por 10 minutos e um substrato cromogênio adicionado à amostra-LAL. A ativação da cascata de coagulação pela endotoxina resulta na degradação proteolítica do substrato, deixando livre o cromogênio, a p-nitroanilina. A formação da cor amarela na presença de ET é rápida e o teste é completado em 16 minutos (WALSH e HEADON, 1974). Então, é possível dimensionar a atividade da amidase induzida pela ET na dependência da liberação do cromóforo, medida pela leitura em

absorbância a 405 nm em espectrofotômetro, sendo que o teste LAL pode detectar pequenas quantidades de ET. Como o LAL é composto de uma série de enzimas coagulantes, pH, temperatura e tempo de reação têm uma influência crucial sobre as reações (DING e HO, 2001). A concentração de ET pode ser calculada a partir de uma curva padrão, pois a absorbância é uma proporção direta da quantidade de ET presente, plotando-se absorbância em função da concentração de ET. As amostras devem apresentar concentração entre 0,1 e 1 EU/mL, pH compreendido entre 7,0 e 8,0, e quando forem amostras protéicas estas devem ser submetidas à 70°C por 10 minutos.

Os limites atualmente considerados aceitáveis pela FDA, em resposta ao teste LAL, para ET bacteriana são: para produtos farmacêuticos e biológicos 5 EU/kg; radiomarcadores 2,5 EU/kg; parenterais de grande volume 0,5 EU/mL; água para injeção 0,25 EU/mL (PEARSON, 1985). A unidade endotóxica (EU) descreve a atividade biológica das ET no teste usando lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) (ANSPACH, 1997), sendo que 1 EU corresponde a 100 pg de ET.

Segundo PEARSON (1985) a concentração limite de ET para soluções com IgG e de soro fisiológico (0,9% de NaCl) é de respectivamente 0,91 EU/mL e 0,50 EU/mL, ambos por kg de peso corporal.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais e procedimentos utilizados na realização deste trabalho. Na seção de materiais, dentro de parênteses, encontram-se o fabricante e o país de origem.

#### 3.1. Materiais

Para a obtenção e reticulação da membrana foi utilizada quitosana de carapaças de caranguejo com 85% de desacetilação (Sigma, EUA), sílica gel para HPLC com tamanho de partículas de 15 a 40  $\mu\text{m}$  e pureza de 99% (Sigma, EUA), ácido acético glacial (Synth, Brasil), hidróxido de sódio p.a. (Synth, Brasil), epicloridrina (Merck, Alemanha) e, como molde, placas de Petri com diâmetro e altura, em centímetros, respectivamente, de 7 e 1 (Anumbra, Brasil), previamente silanizadas com gel de silicone. A água ultrapura utilizada foi obtida do sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

Para a eletroforese de focalização isoeletrica (IEF) utilizou-se gel de poliacrilamida 5% - Phast Gel IEF 3-9 e marcadores para IEF (Pharmacia, Suécia) e na revelação nitrato de prata p.a. (Cennabrás, Brasil), ácido tricloroacético e acético (Synth, Brasil), glutaraldeído 25% em água (Nuclear, Brasil), carbonato de sódio anidro (Merck, Brasil) e formaldeído (Synth, Brasil).

Utilizaram-se, nos ensaios de adsorção, albumina do soro bovino (BSA) (Sigma, EUA), acetato de sódio anidro (Synth, Brasil), ácido acético glacial (Synth, Brasil), ácido clorídrico p.a. (Synth, Brasil), ácido fosfórico p.a. a 85% de pureza (Synth, Brasil), álcool etílico p.a. (Synth, Brasil), cloreto de sódio p.a. (Synth, Brasil), azul de Comassie brilhante G-250 (Vetec Química Fina, Brasil), fosfatos de sódio mono e dibásico anidros p.a. (Synth, Brasil), imunoglobulina G humana, com 95% de pureza (Aventis Behring, Alemanha), Tris(hidroximetil) amino metano (Tris) (Merck, Alemanha) e a membrana obtida no laboratório, usada com

diâmetro de 4,5 cm, suportada na célula de ultrafiltração AMICON, modelo 8050 (Millipore, EUA).

Para a dosagem de endotoxinas usou-se o teste QCL-1000 cromogênico quantitativo LAL, água apirogênica (BioWhittaker, EUA) e ponteiras apirogênicas em embalagem individual (Eppendorf, Alemanha). As soluções tampões foram feitas com água para injeção intravenosa (Ariston, Brasil). Utilizou-se soro fisiológico, com NaCl 0,9% p/v da marca Aster (Brasil). Para a contaminação artificial de soluções aquosas e protéicas utilizou-se endotoxina de alta concentração de *E. coli* O55:B5 (BioWhittaker, EUA). Na despirogenação de materiais e membranas foram utilizados hidróxidos de sódio e de potássio e álcool etílico (Ecibra, Brasil).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Obtenção da membrana**

A matriz adsorvente utilizada neste trabalho, membrana porosa de quitosana, foi obtida através do procedimento desenvolvido por ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A) e adaptado por FREITAS (2001).

#### **3.2.1.1. Síntese das membranas**

A uma solução de ácido acético 1% adicionou-se quitosana em flocos, também em concentração de 1% (p/p), submetendo-a a agitação. A solução permaneceu em repouso por um período de 24 a 48 horas para a completa solubilização da quitosana, em temperatura ambiente, sendo então filtrada em filtro de placa sinterizada (G1), visando a remoção de insolúveis e impurezas. Foi adicionada a esta solução a massa de sílica na proporção final desejada, no caso a proporção sílica-quitosana corresponde a 12:1 em massa, valor determinado por FREITAS (2001) para obtenção de maior resistência mecânica. Em banho térmico, aqueceu-se a solução entre 40 e 50°C e desgaseificou-se a vácuo, evitando a evaporação do solvente pelo controle de temperatura. Promoveu-se a homogeneidade do meio, agitando a solução, buscando a completa dispersão da sílica, espalhando-a então rapidamente na placa de Petri silanizada, numa massa

total de 19 gramas. Colocaram-se as placas em dessecador, sob vácuo, até o total desaparecimento das bolhas (cerca de 15 minutos). Em estufa, as membranas foram secas sob temperatura de 80°C por 5 horas. Após, foram neutralizadas por imersão em solução 1,25 M de NaOH, numa temperatura de 80°C por um período de 2 horas. Lavaram-se as membranas porosas com água destilada até completa remoção do NaOH, obtendo-se o pH da água de lavagem igual ao da água destilada, e armazenou-se a 4°C, em água ultrapura.

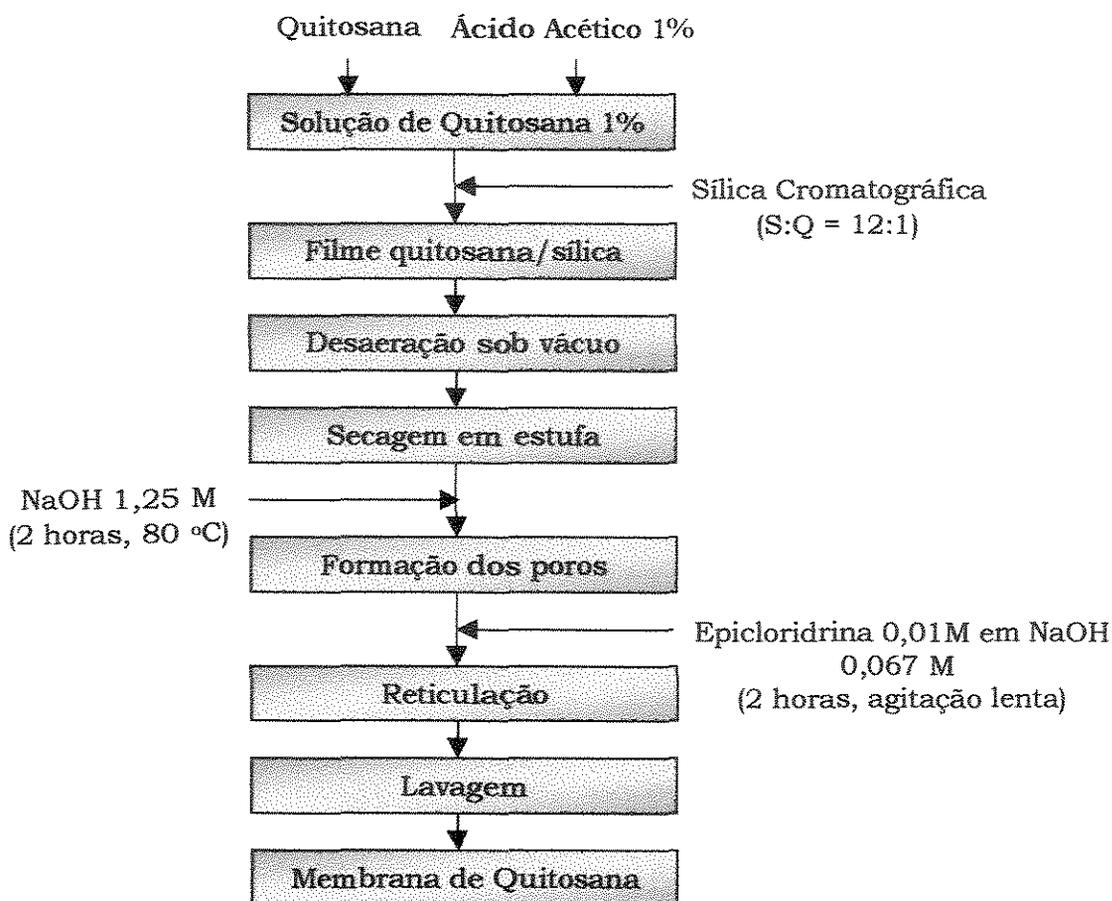
#### **3.2.1.2. Silanização das placas de Petri**

As placas silanizadas foram obtidas passando uma fina camada de silicone na parede interna das placas de Petri. Deixou-se em estufa a 120°C por 2 horas. Terminado este tempo, lavou-se as placas com detergente para a remoção do silicone em excesso, que, se não removido, gera retração da solução na placa.

#### **3.2.1.3. Reticulação das membranas porosas de quitosana**

As membranas de quitosana foram reticuladas com epicloridrina, buscando melhores propriedades mecânicas, como sugerido por WEI e colaboradores (1992), preservando os grupos amino-reativos, importantes para o nosso trabalho.

As membranas, depois de lavadas, foram imersas em solução de epicloridrina, na concentração de 0,01 M, contendo 0,067 M de NaOH (pH 10). Agitou-se suavemente, evitando o rompimento das membranas, por 2 horas, sob uma temperatura de 50°C. Após, lavou-se com água destilada até igualar-se ao pH da água e armazenou-se, até o uso, em água ultrapura, sob 4°C. O esquema da obtenção da membrana pode ser visualizado na Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Fluxograma da obtenção da membrana da quitosana (adaptado de FREITAS, 2001).

### 3.2.2. Caracterização da matriz adsorvente

#### 3.2.2.1. Espessura

A medida de espessura das membranas foi realizada utilizando-se um paquímetro manual digital da Digimess, com escala de 0 a 150 mm e precisão de 0,01 mm. A membrana foi colocada entre duas barras de aço padronizadas, com espessuras constantes para evitar deformação, e fez-se as medidas, diminuindo-se ao final, a espessura conhecida das barras. Fez-se medidas ortogonais (de 90 em 90°), num total de quatro, sendo a espessura final a média dos valores obtidos.

### 3.2.2.2. Volume

O volume foi determinado a partir da espessura de cada membrana, e em função do diâmetro útil da membrana, que corresponde a 13,39 cm<sup>2</sup>, na célula de filtração, como o volume de um cilindro.

### 3.2.2.3. Porosidade no estado úmido

A porosidade no estado úmido foi determinada de modo indireto, visto que este método, desenvolvido por ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A), quantifica a água que ocupa os poros da membrana. A membrana foi levemente seca em papel absorvente, por aproximadamente um minuto, não se percebendo acúmulo de água na superfície, foi então pesada, correspondendo à massa no estado úmido ( $M_2$ ). A membrana foi acomodada em um filtro de placa sinterizada, sendo submetida à sucção por cerca de três minutos, tempo no qual não se observou deformação visual na estrutura da membrana. A membrana foi novamente pesada, determinando a massa no estado seco ( $M_1$ ). Esta análise foi realizada em triplicata, sendo que se estabeleceu como vinte e quatro horas o intervalo de uma análise para a seguinte, permitindo que os poros fossem novamente ocupados pela água. A Equação 3.1 fornece o valor em porcentagem da porosidade no estado úmido.

$$Porosidade(\%) = \left( \frac{M_2 - M_1}{\rho_{H_2O}} \right) \cdot \frac{1}{V} \cdot 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde,  $M_1$  e  $M_2$  representam as massas (g), respectivamente, da membrana seca e da membrana úmida,  $\rho_{H_2O}$  é a densidade da água na temperatura do ensaio (g/cm<sup>3</sup>) e  $V$  (cm<sup>3</sup>) representa o volume da membrana no estado úmido.

### 3.2.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica das membranas foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual é uma técnica para exame superficial de

sólidos. O exame superficial é traduzido por um estreito feixe de elétrons que varre a superfície da amostra, ponto a ponto, em seqüência de tempos pré-determinadas. Os elétrons utilizados para a formação da imagem são captados por detectores especiais gerando um sinal elétrico, usado para produzir uma imagem de aspecto tridimensional em anteparo de observação, de até 500.000 vezes de aumento.

As membranas analisadas no MEV foram previamente liofilizadas, submetidas a nitrogênio líquido para obtenção de uma fratura a frio e metalizada através da deposição de uma fina camada de metal, no caso ouro. As micrografias de corte transversal foram obtidas no Laboratório de Uso Comum (LUC) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ-UNICAMP), no equipamento Leica, modelo Leo 440i (EUA). As condições utilizadas de ampliação variaram de 300 a 1500 vezes, e a barra indicando o tamanho da medida está indicada na parte inferior das micrografias. Utilizou-se 10 kV como valor de corrente elétrica e a metalização da amostra liofilizada depositou uma camada de ouro de aproximadamente 92 Å <sup>(1)</sup>.

A liofilização foi executada no aparelho Savant-Novalyphe NL150 (EUA), sob vácuo por vinte e quatro horas, numa temperatura de 60°C negativos, no Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) do Instituto de Biologia (IB-UNICAMP).

### 3.2.2.5. Vazão a pressão atmosférica

Alimentou-se 15 mL de água ultrapura à célula Amicon com a membrana de quitosana suportada e foi determinado o tempo necessário para escoamento do líquido, em temperatura ambiente e pressão atmosférica. Esta determinação foi realizada em triplicata.

---

<sup>(1)</sup> Cálculo da metalização. A metalização foi realizada com gás Argônio, por 180 segundos, visando depositar uma camada de ouro sobre a superfície da amostra liofilizada. Utilizando-se a equação  $d = K \times I \times V \times t$ , onde  $K$  é uma constante definida pelo tipo de gás, tempo de processo e tipo de metal depositado (no caso: Argônio, 180 segundos, Ouro), tendo valor igual a 0,17;  $I$  corresponde a corrente de metalização empregada (3 mA),  $V$  é a tensão (1 V) e  $t$  é o tempo de exposição (180 segundos), podemos determinar  $d$ , que corresponde a espessura da camada de ouro depositada; correspondendo a 92 Å.

### 3.2.3. Eletroforese de focalização isoelétrica

Visando determinar o pI da IgG humana utilizada, foi realizada uma focalização isoelétrica no Phast System (Pharmacia, Suécia), em um gel de poliacrilamida 5%, com faixa de pH de 3 a 9, sendo a amostra e os marcadores injetados a dois terços do cátodo. A coloração foi feita por nitrato de prata. Os métodos, de coloração e de focalização, foram executados segundo o manual do fabricante do equipamento.

### 3.2.4. Ensaios de adsorção de imunoglobulina G humana em membrana de quitosana porosa

A possibilidade de adsorção de imunoglobulina G humana pela membrana de quitosana não poderia ser descartada simplesmente. Visando verificar a adsorção membrana-IgG e sua relevância, realizaram-se ensaios de filtração da proteína, em soluções tampões, assim como descrito por FREITAS (2001). As soluções tampões testadas, na concentração de 0,025 M, nos respectivos pH foram: tampão acetato de sódio (pH 6,0), tampão fosfato de sódio (pH 6,5 a 8,0) e tampão Tris-HCl (pH 7,0 a 8,5). O intervalo de pH utilizado foi de 0,5 em 0,5, e todas as soluções foram degaseificadas antes do uso.

Através destes ensaios, realizados em duplicata, pode-se também observar a influência do pH e da natureza dos tampões utilizados, buscando uma região em que estas duas condições resultam em menor adsorção protéica.

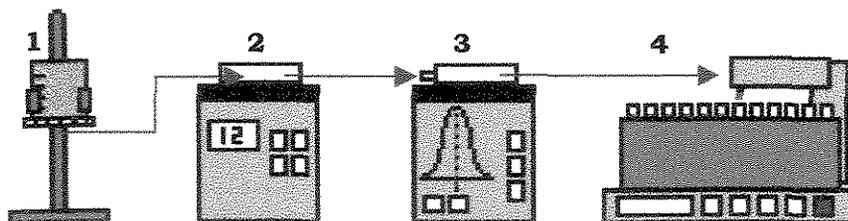
As vazões empregadas, em mL/min para a fase móvel nas etapas de injeção, lavagem, eluição e regeneração foram, respectivamente, de 1, 5, 2 e 2 (FREITAS, 2001). Primeiramente o sistema foi equilibrado com a solução tampão, seguido da injeção de uma solução de IgG humana no referido tampão, com concentração de 1 mg/mL, sendo a massa total de injeção mantida em 12 mg de IgG humana. Ao fim da injeção, procedeu-se a lavagem, com o mesmo tampão, visando a remoção das proteínas não adsorvidas na membrana, gerando um primeiro pico. A eluição serviu para remoção das proteínas adsorvidas, visto que, com o aumento da força iônica do meio, com a adição de NaCl, nas concentrações sucessivas de 0,5 e 1,0 M na solução tampão, as proteínas eluídas forneciam um segundo e um terceiro pico, dependendo do caso. Procedeu-se então a regeneração, utilizando NaOH, na concentração de 1 M, obtendo-se um pico

formado pelas proteínas removidas de forma drástica, interferindo nas forças hidrofóbicas de adsorção. A troca de solução, ou seja, de etapa cromatográfica, foi estabelecida pelo acompanhamento da absorbância das frações recolhidas a 280 nm, em espectrofotômetro (Beckman DU 650), padronizando como valor de equilíbrio 0,0005, ou inferior. Ao término da cromatografia, lavou-se a membrana com água ultrapura, até a remoção total do hidróxido, guardando-a em água ultrapura, sob 4°C.

Os volumes das frações coletadas, em mL, nas etapas de equilíbrio, injeção, lavagem, eluição e regeneração foram, na ordem de 1,6; 7,0; 8,0; 3,2 e 3,2. Cada pico teve suas frações reunidas em "pools", para determinar a concentração protéica, via método de BRADFORD (1976), sendo usado como branco a solução da fase móvel do referido pico.

#### 3.2.4.1. Descrição do sistema de cromatografia

O sistema para a realização dos ensaios de filtração pode ser visualizado, de forma esquemática, na Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Esquema do sistema cromatográfico experimental empregado no estudo. Onde: (1) Célula de filtração, modelo Amicon 8050, Millipore (EUA), (2) Bomba peristáltica, modelo Miniplus 3, Gilson (França), (3) Monitor de absorbância, modelo EconoUV Monitor, Bio-Rad (EUA), (4) Coletor de frações, modelo RediFrac, Pharmacia Biotech (EUA).

A célula de filtração (Fig. 3.2-1), suportando a membrana, estava ligada à bomba peristáltica (Fig. 3.2-2), que succionava a fase móvel através da membrana, nas respectivas vazões determinadas para injeção, lavagem, eluição e regeneração. Monitorava-se este fluido em termos de absorbância a 280 nm (Fig. 3.2-3), informação necessária para a troca de etapa cromatográfica. Recebia-se o fluido, saído do monitor de absorbância, em tubos de ensaio, adaptados ao

coletor de frações (Fig. 3.2-4), em volumes pré-definidos. As tubulações utilizadas eram de silicone e as conexões da marca Gilson (França).

#### **3.2.4.2. Determinação da concentração protéica**

A concentração de proteínas, tanto das soluções de injeção, quanto das etapas de lavagem, eluição e de regeneração dos ensaios de adsorção na membrana, foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina do soro bovino como proteína de referência. Também se procedeu a determinação de concentração protéica em função da absorção a 280 nm em espectrofotômetro (Beckman DU 650).

#### **3.2.5. Despirogenação de material**

A natureza apirogênica do meio no qual executou-se o experimento deve ser garantida, evitando a inserção de endotoxinas de fontes aleatórias, o que geraria erro na futura quantificação. Surge assim, a necessidade de realizar etapas prévias, visando a despirogenação do material a ser utilizado, ou seja, da célula de filtração, conexões, tubulações, e naturalmente da membrana. Para o preparo das soluções utilizadas durante os ensaios, nos quais a quantificação de endotoxinas era necessária, foi utilizada água apirogênica e estéril. Os tampões foram feitos em água para injeção intravenosa da marca Ariston (Brasil) e as diluições das amostras para uso no teste LAL cromogênico com água apirogênica distribuída pela BioWhittaker (EUA). As ponteiros apirogênicos utilizados foram adquiridas em embalagem individual (Eppendorf, Alemanha).

##### **3.2.5.1. Despirogenação do sistema de filtração**

A despirogenação da célula de filtração foi feita com uma solução de KOH, 2 M. Na membrana e nas linhas do sistema, a despirogenação foi feita pela passagem de uma solução de NaOH 0,1 M com 20% de álcool etílico, seguida de uma solução de NaCl 1,5 M, método este sugerido por PETSCH e colaboradores (1997). O volume injetado das duas soluções e a vazão foram, respectivamente, de 15 mL e de 2 mL/min. Após, removeu-se completamente as soluções com a injeção de água apirogênica.

### **3.2.5.2. Despirogenação da vidraria**

O material a ser despirogenado foi deixado de um dia para o outro submerso em solução 1,5 M de NaOH, feita com água ultrapura. Após este período, lavou-se com água, sempre ultrapura, até que fosse removido todo o hidróxido, operação esta facilitada com o uso de ultrassom (Branson, EUA) por 20 minutos, seguida de lavagem com água ultrapura. Colocou-se na estufa apenas com a intenção de remover a água (cerca de 50°C) e esperou-se atingir a temperatura ambiente. Embalou-se com papel alumínio todas as peças, sendo que os tubos de ensaio devem ser ainda acondicionados em envelopes deste mesmo material, não devendo ficar superfícies expostas. Colocou-se então todo o material na estufa para despirogenação, numa temperatura de 200°C por um período de 2 horas. Guardou-se em recipiente fechado até o uso, sendo que o material não utilizado foi novamente despirogenado após uma semana (ACCONCI, 1998 e 2000).

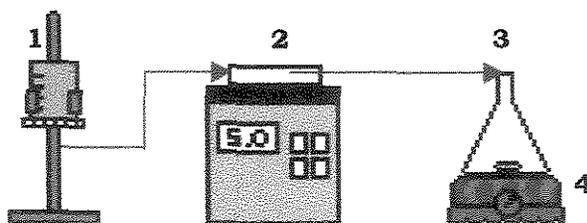
### **3.2.6. Remoção de endotoxinas por adsorção em membranas de quitosana**

#### **3.2.6.1. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes**

A adsorção de endotoxinas nas membranas de quitosana foi testada na presença dos tampões que menos favoreceram a adsorção de anticorpos na membrana. No caso, fosfato de sódio pH 8,0 e Tris-HCl pH 7,0.

Estes experimentos foram realizados num sistema representado na Figura 3.3, segundo método desenvolvido por FREITAS (2001), onde a membrana foi equilibrada com solução tampão e, em seguida, injetou-se 15 mL da solução contaminada com endotoxinas, em concentração conhecida, na vazão de 2 mL/min.

O filtrado foi coletado num erlenmeyer, sob agitação vigorosa. Como o objetivo é determinar a remoção de endotoxinas, foram determinadas as concentrações de ET na injeção e no filtrado, e não se procedeu a lavagem visando remoção da ET adsorvida. Regenerou-se a membrana com solução de NaOH 1 M, e o cálculo de remoção foi feito pela diferença de concentração entre injeção e filtrado.



**Figura 3.3.** Aparato utilizado para remoção de endotoxinas de solução tampão, adaptado de FREITAS (2001). Onde: (1) Célula de filtração, (2) Bomba peristáltica, (3) Erlenmeyer para armazenamento do filtrado, (4) Agitador magnético, modelo Poly Labo, Ika (Alemanha).

### **3.2.6.2. Remoção de endotoxinas de soro fisiológico contaminado artificialmente**

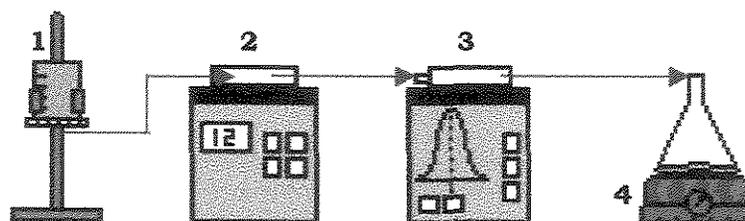
Os medicamentos parenterais, dependendo do caso, podem ser injetados em soluções salinas, tais como o soro fisiológico. Visando determinar a influência da presença do sal, no caso NaCl, procedeu-se o mesmo método descrito no item 3.2.6.1, substituindo as soluções tampões por soro fisiológico, com concentração de NaCl igual a 0,9% p/v, em pH 7,3. As concentrações de ET foram medidas na alimentação e no filtrado.

### **3.2.6.3. Remoção de endotoxinas de soluções com IgG contaminadas artificialmente**

As soluções de IgG humana foram preparadas com concentrações de 1 mg/mL, em tampão Tris-HCl, pH 7,0, na concentração de 25 mM, o qual permitiu uma adsorção maior de ET e menor de IgG, visando estudar o efeito da presença de proteína na remoção de endotoxinas. O aparato experimental utilizado é apresentado na Figura 3.4. A contaminação com endotoxinas foi feita com 116 e 797 EU/mL.

A solução de IgG contaminada com ET, nas concentrações determinadas, foi injetada em volume de 15 mL na célula de filtração, sendo succionada pela bomba peristáltica numa vazão de 2 mL/min, e então coletada em erlenmeyer, sendo chamada de filtrado. Após injetou-se, numa vazão de 5 mL/min, o tampão para a etapa de lavagem, sendo esta fração, chamada de lavagem, coletada em

outro erlenmayer. As frações de injeção, de filtrado e de lavagem, foram quantificadas em relação a endotoxinas e proteínas.



**Figura 3.4.** Aparato utilizado para remoção de endotoxinas de solução de IgG contaminada artificialmente, adaptado de FREITAS (2001). Onde: (1) Célula de filtração, (2) Bomba peristáltica, (3) Monitor de absorvância, (4) Agitador magnético.

### 3.2.7. Quantificação de endotoxinas

Visando a determinação da concentração de ET, foi utilizado o método do LAL (lisado de amebócito de *Limulus*) cromogênico, o qual é um método quantitativo e aprovado pelo FDA. O kit QCL-1000, fornecido pela BioWhittaker (EUA), apresenta seus componentes (endotoxina, lisado de amebócito de *Limulus* e o substrato cromogênico) liofilizados, necessitando de reconstituição com água apirogênica. O material que compõe o kit deve ser reconstituído, manuseado e armazenado conforme as instruções do fabricante.

As soluções com endotoxinas devem ser agitadas por 45 minutos para garantir a homogeneidade do meio, tanto antes da quantificação, quanto para adicionar no sistema de filtração.

A utilização do kit para a determinação quantitativa de endotoxinas é baseada na construção de uma curva de calibração concentração *versus* absorvância a 405 nm, sendo a absorvância diretamente proporcional à concentração de endotoxinas. A cada novo kit deve-se elaborar nova curva padrão.

A obtenção da curva padrão seguiu os procedimentos do kit, onde a endotoxina foi reconstituída e elaboraram-se soluções com concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1 EU/mL. Após agitação por 30 minutos, as soluções foram colocadas, em volume de 50  $\mu$ L, em tubos apirogênicos. Acrescentou-se 50  $\mu$ L de LAL

reconstituído, agitou-se e levou-se ao banho térmico, por 10 minutos, a 37°C  $\pm$ 1°C, coberto com papel alumínio. Este período de tempo é marcado a partir da adição do LAL no primeiro tubo. Ao fim dos dez minutos, adicionam-se 100  $\mu$ L de substrato em cada tubo, agita-se e espera-se, sem remover os tubos do banho nem zerar o cronômetro, o tempo total completar 16 minutos de reação. Ao final deste período, adicionam-se 100  $\mu$ L de solução de ácido acético numa concentração de 25%, o qual atua como reagente de parada. O branco foi obtido pelo mesmo procedimento, substituindo a solução com concentração conhecida de ET por água apirogênica para teste LAL (BioWhittaker, EUA).

As determinações foram feitas em microplacas, a 405 nm, em leitora do tipo ELISA, Bio-Kinetics Reader, modelo EL-312e (Bio-Tek Instruments, EUA). Adicionaram-se 100  $\mu$ L do produto da reação na microplaca, sendo colocada água destilada como branco da leitora. Fez-se as leituras a 405 nm e elaborou-se a curva, plotando absorbância em função da concentração de ET.

As amostras são analisadas da mesma forma, ajustando na curva os valores de absorbância observados, sabendo-se que são necessárias diluições para que os valores sejam compatíveis com a escala da curva previamente elaborada, no intervalo que corresponde à linearidade.

### **3.2.8. Isotherma de adsorção de endotoxinas em membrana porosa de quitosana**

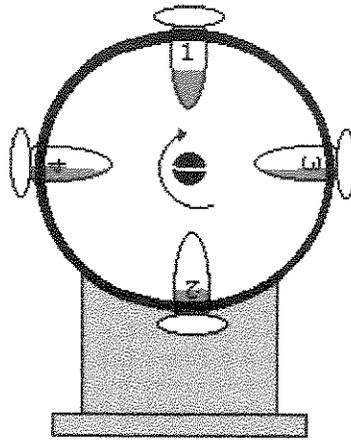
O experimento para a obtenção da isoterma de adsorção de ET em membrana de quitosana foi realizado em batelada, em tanques agitados de dois mililitros (tubos eppendorf) apirogênicos, a temperatura de 25°C, em duplicata com réplica de análise.

As membranas, obtidas no item 3.2.1, foram cortadas em quadrados de 0,2 cm de lado (área equivalente a 0,04 cm<sup>2</sup>), despirogenadas e lavadas conforme descrito no item 3.2.5.1, sendo necessária a cada etapa, agitação por 15 minutos para permitir o contato das membranas com as soluções. As membranas foram filtradas a vácuo para a remoção de cada uma das soluções utilizadas no processo de despirogenação.

Após a despirogenação e lavagem com água ultrapura, as membranas foram equilibradas com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 (tampão de adsorção) e,

em seguida, colocadas nos tubos eppendorf em uma quantidade de aproximadamente 60 mg em massa úmida. Após a obtenção da isoterma as membranas foram secas e determinada a massa seca, em cada tubo eppendorf. A cada frasco foi adicionado 1 mL de solução de ET, em concentrações de 700 a 40.000 EU/mL (correspondem a  $7 \times 10^{-5}$  e  $4 \times 10^{-3}$  mg ET/mL, respectivamente).

Uma alíquota da injeção foi reservada para a determinação, com LAL, da concentração alimentada a cada eppendorf e, após o período de três horas, sob agitação constante, numa rotação de 20 rpm, em aparato esquematizado na Figura 3.5, o sobrenadante também foi analisado quanto à concentração de ET. A diferença entre a concentração de ET alimentada e a remanescente depois do ensaio representa a quantidade adsorvida pela membrana.



**Figura 3.5.** Aparato experimental para a obtenção da isoterma de adsorção de ET em membrana de quitosana (adaptado de LUCENA, 1999). (1 a 4) tanques agitados (tubos eppendorf).

Os dados experimentais obtidos para a concentração de ET no equilíbrio e da quantidade de ET adsorvida pela membrana foram utilizados para ajustar os parâmetros do modelo de Langmuir, cuja equação é apresentada na Eq. 3.2.

$$Q = \frac{Q_m * C_{eq}}{K_d + C_{eq}}$$

**Eq. 3.2**

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 (mg/g ou mg/mL),  $Q_m$  é a quantidade máxima possível de ser adsorvida,  $C_{eq}$  é a concentração de soluto em equilíbrio na solução (mg/mL) e  $K_d$  é a constante de dissociação do complexo adsorbato-adsorvente (mL/mg ou M).

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. Obtenção e caracterização da membrana macroporosa de quitosana reticulada

O procedimento adaptado por FREITAS (2001), do método desenvolvido por ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A), foi utilizado neste trabalho para a síntese da matriz adsorvente, uma membrana macroporosa de quitosana reticulada, a qual foi empregada para remoção de ET de soluções aquosas.

A caracterização física da membrana de quitosana reticulada, obtida como descrito no item 3.2.1, foi feita através da determinação de espessura (item 3.2.2.1), volume (item 3.2.2.2), porosidade (item 3.2.2.3) e vazão a pressão atmosférica (item 3.2.2.5), todas com a membrana no estado úmido; no estado seco foram feitas micrografias de varredura eletrônica (item 3.2.2.4), permitindo a determinação de tamanho médio de poro e da estrutura da membrana. O diâmetro da membrana utilizada foi determinado pela área efetiva da célula de filtração. Os resultados das análises citadas podem ser visualizados na Tabela 4.1, e mostram que a membrana obtida apresenta fluxo adequado para o desenvolvimento deste trabalho, e sua resistência pode ser confirmada pela reutilização de até 12 vezes de uma mesma membrana. Além disto, os resultados estão similares com os dados encontrados na literatura, obtidos por ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A), RUCKENSTEIN e ZENG (1998) e por FREITAS (2001), disponíveis no Anexo A.

A análise de área superficial para adsorção no estado seco, pelo método de BET não foi realizada, sendo que o valor esperado seria em torno de 1,6 m<sup>2</sup>/g, concordando com os valores de RUCKENSTEIN e ZENG (1998), cuja membrana de quitosana reticulada tem aproximadamente o mesmo tamanho médio de poro. O método de BET é realizado com nitrogênio gasoso, para áreas superficiais maiores que 10 m<sup>2</sup>/g, pois o erro inerente do uso de nitrogênio altera em muito os resultados de áreas efetivas menores. Para áreas superficiais inferiores a 10 m<sup>2</sup>/g, como esperado para a membrana obtida, o método deve ser realizado com o

gás criptônio, de alto custo. Devido a não disponibilidade no Laboratório, este ensaio não foi realizado.

**Tabela 4.1.** Resultado das análises de caracterização da membrana macroporosa de quitosana reticulada

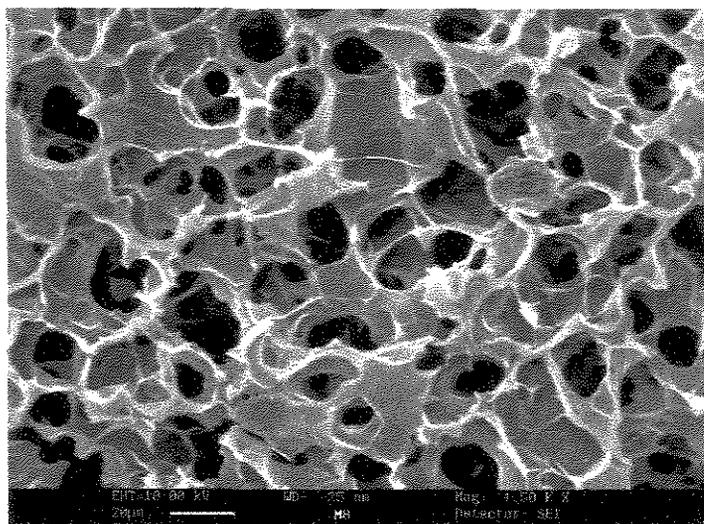
Espessura no estado úmido	313 $\mu\text{m}$
Volume no estado úmido	0,42 $\text{cm}^3$
Diâmetro no estado úmido	4,13 cm
Porosidade no estado úmido <sup>a</sup>	62,4%
Vazão a pressão atmosférica <sup>b</sup>	12,8 mL/min
Área efetiva para adsorção no estado úmido	13,4 $\text{cm}^2$
Fluxo	0,96 cm/min
Tamanho médio dos poros no estado seco	22 $\mu\text{m}$

(a) Desvio padrão médio de 11,06.

(b) fluido empregado: água ultrapura.

A matriz de adsorção, cuja morfologia foi determinada por MEV, apresenta uniformidade de distribuição de poros, indicando dispersão satisfatória da sílica durante a obtenção da membrana, não sendo observadas áreas não porosas, nem regiões com poros de mesmo tamanho concentrados. Esta informação pode ser confirmada na Figura 4.1, onde a micrografia de corte transversal da membrana porosa de quitosana reticulada é observada.

A membrana obtida, devido ao seu tamanho de poro, somado às características da solução utilizada para a filtração, tais como reduzido tamanho e concentração das moléculas de interesse (ET e IgG) e a ausência de contaminantes de tamanho semelhante ao dos poros da membrana, permitem desconsiderar a formação de colmatagem.



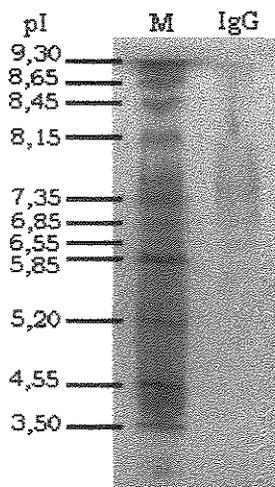
**Figura 4.1.** Micrografia eletrônica de varredura da membrana de quitosana reticulada. A barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2. Determinação do ponto isoelétrico da IgG humana**

Visando determinar o pI da IgG humana utilizada, foi realizada uma eletroforese de focalização isoelétrica no Phast System (Pharmacia, Suécia), num gel de poliacrilamida 5%, com faixa de pH de 3 a 9, método este descrito no item 3.2.3.

Obteve-se um intervalo de pI, e não um valor, devido ao fato da natureza policlonal da IgG empregada e por ser esta constituída de várias subclasses com pIs distintos. O intervalo pode ser observado na Figura 4.2, e corresponde a faixa de valores de pI 6,85 a 8,15 (com traços de proteínas na faixa de 8,5 a 9,0).

O conhecimento dos valores de pI da imunoglobulina G humana é importante para despirogenação de soluções contendo esta proteína, uma vez que a membrana apresenta a pH abaixo de 7,0 (pK de 6,3 a 7,0) carga positiva na superfície pela presença dos grupos amino, mesmo após a reticulação com epícloridrina através do método sugerido por WEI *et al.* (1992). As moléculas de ET, acima de pH 1,3, apresentam carga negativa (HOU e ZANIEWSKI, 1990), e pode-se utilizar desta diferença de cargas para adsorvê-las em matrizes de quitosana. Para despirogenação de soluções protéicas, busca-se a máxima adsorção de ET e a mínima adsorção de IgG, selecionando-se, portanto, tipos de tampão e valores de pH que permitam carga positiva ou neutra da IgG, minimizando sua adsorção na membrana.



**Figura 4.2.** Eletroforese IEF em gel de poliacrilamida 5%, com faixa de pH de 3 a 9. Onde: (M) marcadores de pI (Pharmacia), (IgG) imunoglobulina G humana.

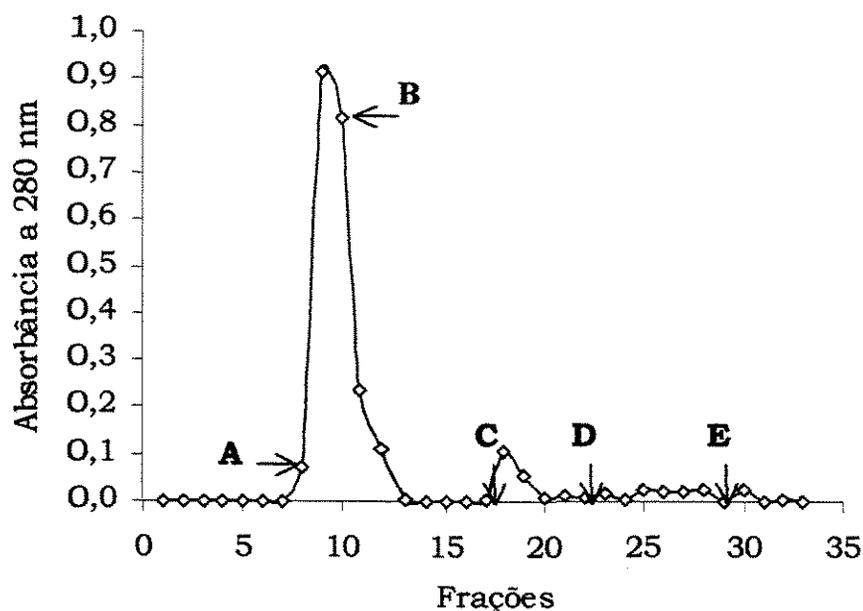
#### **4.3. Ensaio de adsorção de imunoglobulina G humana em membrana de quitosana**

A investigação da adsorção de IgG humana na membrana de quitosana em diferentes tampões e pH foi realizada visando determinar a condição em que menor quantidade de IgG ficasse adsorvida, para que um maior número de sítios para adsorção estivessem disponíveis para a remoção de ET do meio, além de permitir, a princípio, uma maior recuperação de anticorpos no produto final. Com objetivo de verificar a influência do pH e da natureza dos tampões utilizados, realizaram-se ensaios de filtração da proteína, em três soluções tampões, assim como descrito no item 3.2.4. As soluções tampões testadas, na concentração de 25 mM, nos respectivos pH foram: tampão acetato de sódio (pH 6,0), tampão fosfato de sódio (pH 6,5 a 8,0) e tampão Tris-HCl (pH 7,0 a 8,5), cujas características de pKa e faixa de pH tamponante estão citadas na Tabela 4.2.

Os balanços de massa para cada cromatografia, com base em proteína total, foram calculados e não apresentaram perda maior que 10%, com exceção do pH 8,5 em tampão Tris-HCl, no qual a recuperação dos anticorpos chegou a apenas 84,3%. Um cromatograma característico dos ensaios de filtração pode ser visualizado na Figura 4.3.

**Tabela 4.2.** Características dos tampões utilizados nos experimentos

Tampão	faixa de pH de tamponamento	pK <sub>a</sub>
acetato de sódio	$\text{H}_3\text{C}-\text{COO}^-$	3,7 a 5,6
fosfato de sódio	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{O}^- \\   \\ \text{O}^- \end{array}$	5,8 a 8,0
Tris-HCl	$\begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{HO}-\text{C}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	7,0 a 9,0



**Figura 4.3.** Perfil cromatográfico de adsorção de IgG em membrana de quitosana, utilizando Tris-HCl, 25 mM, pH 7,0. Espessura da membrana: 318  $\mu\text{m}$ . Onde: **(A)** Injeção (1 mL/min, fração de 7,0 mL), **(B)** Lavagem (5 mL/min, fração de 8,0 mL), **(C)** Eluição com Tris-HCl, 0,5 M de NaCl, (2 mL/min, fração de 3,2 mL), **(D)** Eluição com Tris-HCl, 1,0 M de NaCl, (2 mL/min, fração de 3,2 mL), **(E)** Regeneração com NaOH 1 M (2 mL/min, fração de 3,2 mL). As frações de 1 a 7 correspondem a etapa de equilíbrio, com vazão de 1 mL/min e volume de 1 mL coletado por fração.

A Figura 4.4 apresenta os resultados do estudo da adsorção de IgG humana em membrana de quitosana mediante variação de tampões e de pH, e permite observar que em todas as condições estudadas há adsorção de IgG, em quantidades diversas. Os tampões fosfato de sódio pH 8,0 e Tris-HCl pH 7,0 foram os que favoreceram uma menor retenção de proteínas pela membrana, com capacidades de adsorção (Q) de 0,49 mg/cm<sup>3</sup> e de 0,73 mg/cm<sup>3</sup>, respectivamente. A maior adsorção de IgG foi obtida em tampão fosfato de sódio com pH ajustado em 6,5, correspondendo a uma capacidade de adsorção de 2,88 mg/cm<sup>3</sup>.

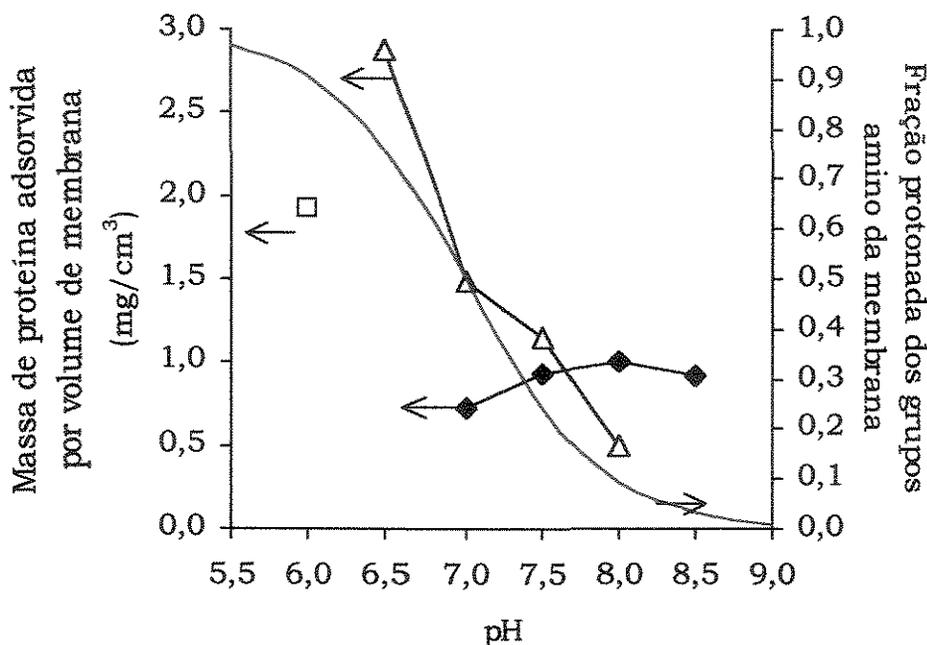
O aumento do pH do tampão fosfato a partir de 6,5 tende a diminuir a adsorção de anticorpo na membrana, visto que ultrapassando o pK da quitosana (6,3 a 7,0), haveria a desprotonação dos grupamentos amino, e portanto a capacidade de adsorção seria diminuída. Em presença de tampão fosfato, percebe-se uma dependência do comportamento de adsorção da IgG com a fração de grupamentos amino protonados em função do pH. Isso leva a supor que o tampão fosfato interage com a membrana e com a IgG de forma que permita em pH menores (6,5 e 7,0 por exemplo), nos quais a membrana está mais fortemente protonada (Figura 4.4) e a IgG está com carga líquida de positiva a nula, uma adsorção mais intensa, confirmando os dados de FREITAS (2001).

Em presença de Tris-HCl a capacidade de adsorção de anticorpos na matriz foi mantida em toda a faixa de pH estudada. Estas observações experimentais sugerem que ocorra um impedimento eletrostático entre a IgG e a membrana na presença de tampão Tris-HCl, visto que, este tampão (solvatando a IgG) por apresentar o mesmo radical (amino) para a interação com a proteína que a quitosana, não possibilite uma interação mais forte entre IgG e membrana, e levando a supor que a adsorção observada seria fruto de outro tipo de interação, que não eletrostática. Deve-se notar que a natureza anfifílica do LPS sugere que a ligação da ET em materiais poliméricos pode se dar tanto por interações hidrofóbicas quanto iônicas (DARKOW *et al.*, 1999).

O pI da IgG humana (6,85 a 8,15 e com traços de proteínas entre 8,15 e 9,0) permite também supor que esta menor adsorção, com o aumento de pH na faixa estudada, tem relação com a carga líquida da proteína (de fracamente positiva a zero), havendo repulsão com as cargas da membrana.

Comparando os dados da Figura 4.4 com os obtidos por FREITAS (2001), percebe-se que a adsorção de IgG de cavalo é maior (com exceção do uso de

tampão Tris-HCl pH 8,5) que a da IgG humana na membrana porosa de quitosana, possivelmente por estar na forma de fragmentos  $(Fab')_2$  e ter menor  $pI$  (4,55 a 8,15).

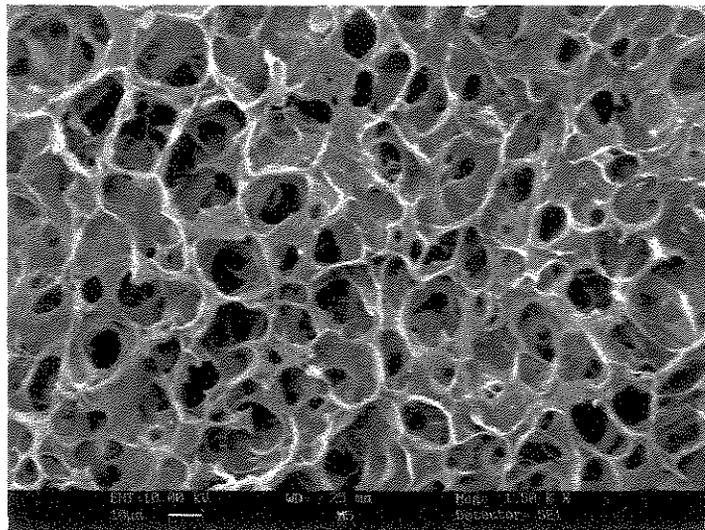


**Figura 4.4.** Adsorção de imunoglobulina G humana em membrana de quitosana (massa de proteína por volume de membrana) nas diferentes soluções tamponantes e pH. Onde: (□) Tampão acetato de sódio, 25 mM, pH de 6,0, (Δ) Tampão fosfato de sódio, 25 mM, pH de 6,5 a 8,0, (◆) Tampão Tris-HCl, 25 mM, pH de 7,0 a 8,5. As setas indicam o eixo a que se referem as seqüências de pontos. A linha vermelha refere-se à fração protonada, em função do pH, dos grupos amino da membrana de quitosana, calculada segundo a Equação 2.1.

A princípio, era de interesse estudar a adsorção de IgG na faixa de tamponamento dos três tampões citados, desde que não prejudicasse a estrutura da membrana. Com base nisto, decidiu-se empregar soluções de tampão acetato de sódio em pH de 5,0 a 6,0, tampão fosfato de sódio com pH de 6,0 a 8,0 e tampão Tris-HCl em pH de 7,0 a 8,5. O único tampão que permitiu realizar todos os experimentos previstos foi o tampão Tris-HCl, pois tanto o tampão acetato quanto o tampão fosfato causaram deformações visíveis na membrana quando do estudo de adsorção, fato este que motivou a adoção dos limites de pH apresentados no primeiro parágrafo deste item.

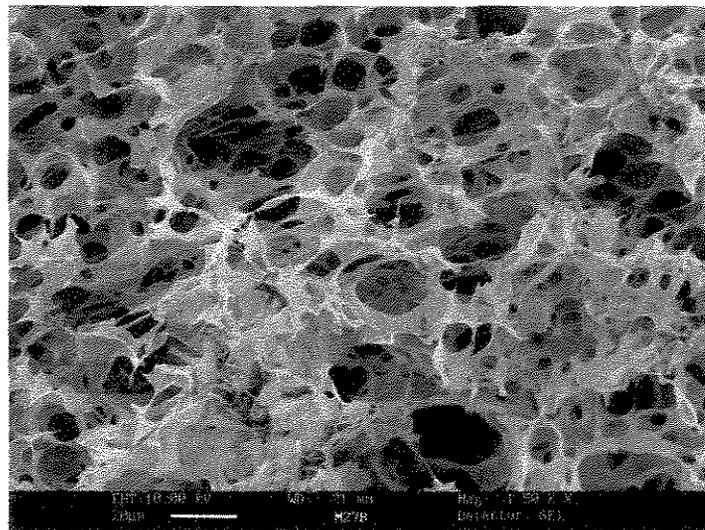
O tampão acetato a pH 6,0 causou entumescimento da membrana, ampliando suas dimensões, levando a crer que este tampão tenha solubilizado as



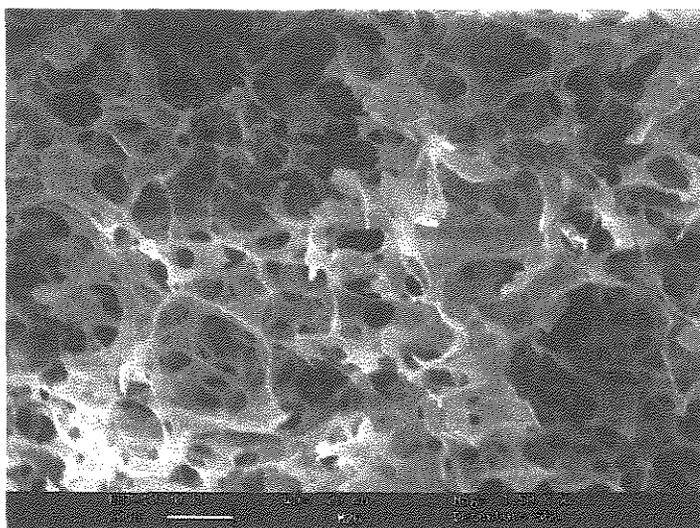


**Figura 4.6.** Micrografia eletrônica de varredura, em corte transversal, da membrana de quitosana reticulada, utilizada para adsorção de IgG humana em tampão fosfato de sódio, 25 mM, em pH 7,0, apresentando deformação da estrutura original. A barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

Visando a comparação da estrutura das membranas que foram obstruídas a pH 6,0 e 6,5, com as membranas que não se deformaram (tampões Tris-HCl e fosfato, a pH 7,0 e 8,0, respectivamente), e que, além disso, possibilitaram uma menor adsorção protéica, obteve-se micrografias também destas membranas, as quais podem ser observadas nas Figuras 4.7 e 4.8.



**Figura 4.7.** Micrografia eletrônica de varredura, em corte transversal, da membrana macroporosa de quitosana reticulada, utilizada para adsorção de IgG humana em tampão Tris-HCl, 25 mM, em pH 7,0. A barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.8.** Micrografia eletrônica de varredura, em corte transversal, da membrana macroporosa de quitosana reticulada, utilizada para adsorção de IgG humana em tampão fosfato de sódio, 25 mM, em pH 8,0. A barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ .

VARUM e colaboradores citam, em trabalho publicado em 1994, que uma quitosana com 17% de acetilação (a usada neste trabalho tem 15%), em pH 7,0, tem 95% em massa insolúvel, ao passo que se reduzirmos o pH para 6,0, a massa insolúvel reduz-se para somente 13,3%. O pH e a força iônica influenciam as propriedades físico-químicas da quitosana (VARUM *et al.*, 1994), podendo-se sugerir que as modificações da estrutura a pH aproximadamente 6,0 tenham sido por uma parcial solubilização das cadeias poliméricas no meio.

ZENG e RUCKENSTEIN (1998-A) apresentam o uso de membrana porosa de quitosana a pH 6,0, com tampão fosfato de sódio, mas não relatam deformação da membrana, possivelmente pelo fato de aplicarem uma vazão máxima de 2 mL/min (fluxo de 0,15 cm/min), que pode ser obtida com a membrana utilizada neste trabalho.

A adsorção protéica dos anticorpos não é desejada para o estudo de remoção de ET desta solução, em membrana de quitosana. A partir deste princípio, selecionou-se as soluções tampões de fosfato de sódio pH 8,0 e Tris-HCl pH 7,0 para investigar a adsorção de ET em membrana de quitosana, a fim de definir o tampão que melhor se adequa a finalidade de remover as ET de solução de IgG.

#### 4.4. Remoção de endotoxinas por adsorção em membranas de quitosana

##### 4.4.1. Remoção de endotoxinas de soluções tamponantes

Determinados os tampões que favoreceram em menor intensidade a adsorção de anticorpos na membrana (item 4.3), estes foram utilizados para o estudo da remoção de endotoxinas.

As soluções tamponantes, com concentrações de 25 mM, foram contaminadas artificialmente com duas concentrações de ET, uma alta (500 a 600 EU/mL) e uma baixa (18 a 22 EU/mL), visando verificar a influência da concentração de ET na despirogenação da solução. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.3 e são comparados com base no fator de purificação (FP), que é definido como a relação entre a quantidade de ET injetada e a quantidade de ET no filtrado, ambas em unidades totais de ET.

**Tabela 4.3.** Influência do tampão na adsorção de ET em membrana macroporosa de quitosana reticulada

Tampão	Tris-HCl		Fosfato de sódio	
	pH 7,0		pH 8,0	
<b>Concentração inicial (EU/mL)</b>	<b>18,63</b>	<b>541,40</b>	<b>22,28</b>	<b>635,55</b>
Unidades na injeção (EU)	279,42	8120,94	334,21	9533,28
<b>Concentração final (EU/mL)</b>	<b>0,58</b>	<b>8,36</b>	<b>5,80</b>	<b>215,57</b>
Unidades no filtrado (EU)	8,66	125,46	86,93	3233,52
Endotoxinas remanescente (%)	3,09	1,54	26,01	33,92
Q (EU/cm <sup>3</sup> )	735,77	21.726,86	671,96	17.118,91
Fator de Purificação	32,27	64,73	3,84	2,95

Volume de alimentação: 15 mL, volume da membrana utilizada nos experimentos: 0,368 cm<sup>3</sup>, espessura da membrana 275 µm. (Q) capacidade de adsorção de ET por volume de membrana, (Fator de purificação) corresponde à quantidade de ET na alimentação inicial (EU)/quantidade de ET remanescente no filtrado (EU).

O tampão Tris-HCl pH 7,0 favoreceu a maior adsorção de ET na membrana de quitosana, permitindo obter filtrados com concentrações de 0,58

EU/mL e de 8,36 EU/mL, na condição de menor e maior concentração alimentadas à membrana, respectivamente.

A baixa adsorção de ET em presença de tampão fosfato pode ser explicada com base no pH de adsorção, pois a pH 8,0, independente da natureza do tampão, já há menos de 10% dos grupos catiônicos disponíveis para a interação com a ET.

Os dados mostrados na Tabela 4.3 aproximam-se dos encontrados por FREITAS (2001), disponíveis no Anexo B, podendo-se dizer que a membrana apresentou as mesmas características para a adsorção de ET em tampão Tris-HCl pH nos dois trabalhos.

Alguns trabalhos publicados na literatura descrevem a remoção de ET de soluções em que a sua concentração supera 6000 EU/mL. Visando a comparação da capacidade de adsorção da membrana obtida neste trabalho com as da literatura, procedeu-se a contaminação de solução tampão Tris-HCl a pH 7,0 com ET, na concentração de aproximadamente 8100 EU/mL. A solução tampão foi escolhida com base nos dados de maior fator de remoção de ET, nos experimentos anteriores. Obteve-se, nesta condição, um fator de purificação maior (113) que nas concentrações inferiores (32 e 65), utilizando este tampão (Tabelas 4.3 e 4.4).

PETSCH e colaboradores (1997) obtiveram filtrados, utilizando membrana de Nylon<sup>®</sup> com ligantes imobilizados, com concentrações de 0,02 EU/mL com PEI imobilizado, 0,02 EU/mL com polimixina B imobilizada e 0,06 EU/mL com poli(L-lisina) imobilizada, de uma alimentação de 6300 EU/mL a pH 7,0, em tampão fosfato, 20 mM. Infelizmente a membrana porosa de quitosana não se comporta da mesma forma, pois apesar de apresentar um alto fator de purificação (113), não permitiu, na condição estudada, alcançar níveis de ET permitidos para injeção parenteral. Contudo, deve-se ressaltar que não foram imobilizados ligantes na membrana, como no caso da literatura, e que provavelmente, dentro da faixa de concentração estudada (18 a 8100 EU/mL), a capacidade máxima da membrana não tenha sido atingida.

**Tabela 4.4.** Influência da alta concentração na adsorção de ET em membrana macroporosa de quitosana reticulada

Tampão	Tris-HCl pH 7,0
<b>Concentração inicial (EU/mL)</b>	<b>8092,53</b>
Unidades na injeção (EU)	121.387,98
<b>Concentração final (EU/mL)</b>	<b>71,59</b>
Unidades no filtrado (EU)	1073,86
Endotoxinas remanescente (%)	0,88
Q (EU/cm <sup>3</sup> )	326.940,54
Fator de Purificação	113,04

Volume de alimentação: 15 mL, volume da membrana utilizada nos experimentos: 0,368 cm<sup>3</sup>, espessura da membrana 275 µm. (Q) capacidade de adsorção de ET por volume de membrana, (Fator de purificação) corresponde à quantidade de ET na alimentação inicial (EU)/quantidade de ET remanescente no filtrado (EU).

#### 4.4.2. Influência do sal NaCl na remoção de endotoxinas

A determinação da influência da presença de sal na adsorção de ET foi realizada segundo o método descrito no item 3.2.6.2, utilizando soro fisiológico, o qual apresenta concentração de NaCl igual a 0,9% p/v, e pH igual 7,3 em condições apirogênicas. As concentrações de ET foram medidas na alimentação e no filtrado, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.5.

A remoção de ET de soluções na presença de sal foi menor que a remoção de ET de soluções onde o cloreto de sódio não estava presente. Este fato pode, provavelmente, ser explicado pela associação de duas possíveis causas. A primeira seria a interferência dos íons do sal nas interações eletrostáticas entre ET e membrana. A segunda causa seria o deslocamento do pH de 7,0, do tampão Tris-HCl, para pH 7,3 do soro fisiológico, diminuindo as cargas positivas na superfície da membrana cerca de 34% pela desprotonação da mesma com o aumento do pH.

**Tabela 4.5.** Influência da presença de soro fisiológico na remoção de ET por adsorção em membrana macroporosa de quitosana reticulada

Solução	Soro fisiológico	
	pH 7,3	
<b>Concentração inicial (EU/mL)</b>	<b>42,49</b>	<b>889,61</b>
Unidades na injeção (EU)	637,38	13.344,15
<b>Concentração final (EU/mL)</b>	<b>20,96</b>	<b>69,09</b>
Unidades no filtrado (EU)	314,39	1.036,36
Endotoxinas remanescente (%)	49,32	7,77
Q (EU/cm <sup>3</sup> )	877,69	33.445,08
Fator de Purificação	2,03	12,88

Volume de alimentação: 15 mL, volume da membrana utilizada nos experimentos: 0,368 cm<sup>3</sup>, espessura da membrana 275 µm. (Q) capacidade de adsorção de ET por volume de membrana, (Fator de purificação) corresponde à quantidade de ET na alimentação inicial (EU)/quantidade de ET remanescente no filtrado (EU).

Visando uma confirmação experimental do fato observado, realizaram-se dois experimentos de filtração utilizando-se o tampão Tris-HCl, primeiro a pH 7,3 (pH do soro fisiológico) e depois a pH 7,0 com adição de NaCl 0,9%, ou seja 0,15 M (concentração no soro fisiológico), com concentrações aproximadas de 739 e 691 EU/mL, respectivamente, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.6.

Relacionando os resultados obtidos nos experimentos de filtração com tampão Tris-HCl, na presença ou não de sal, pode-se perceber que a adição de sal, numa mesma condição, causou uma diminuição do fator de purificação (de 64,7 para 8,6), ampliando aproximadamente dez vezes a concentração de endotoxinas no produto final (de 8,36 para 80,71 EU/mL, respectivamente), indicando, ou melhor, confirmando a primeira hipótese sugerida no início da página anterior, de que a interação eletrostática, entre a membrana de quitosana e endotoxinas, foi inibida parcialmente pelo aumento da força iônica da solução.

**Tabela 4.6.** Influência do pH e da presença de NaCl na remoção de ET por adsorção em membrana macroporosa de quitosana reticulada

Solução	<b>Tris-HCl pH 7,3</b>	<b>Tris-HCl pH 7,0 com NaCl 0,9%</b>
Concentração inicial (EU/mL)	<b>739,17</b>	<b>691,34</b>
Unidades na injeção (EU)	11.087,50	10.370,00
Concentração final (EU/mL)	<b>13,95</b>	<b>80,71</b>
Unidades no filtrado (EU)	209,24	1.210,72
Endotoxinas remanescente (%)	1,89	11,68
Q (EU/cm <sup>3</sup> )	27.080,55	22.801,29
Fator de Purificação	52,99	8,57

Volume de alimentação: 15 mL, volume da membrana utilizada nos experimentos: 0,402 cm<sup>3</sup>, espessura da membrana 300 µm. (Q) capacidade de adsorção de ET por volume de membrana, (Fator de purificação) corresponde à quantidade de ET na alimentação inicial (EU)/quantidade de ET remanescente no filtrado (EU).

Comparando-se os resultados obtidos durante a filtração em membrana de quitosana de solução com endotoxinas com o tampão Tris-HCl a pH 7,0 e 7,3, nota-se também uma diminuição do fator de purificação (de 64,73 para 52,99), que neste caso pode ser explicada pela diminuição dos grupamentos amino protonados na superfície da membrana, confirmando a segunda causa sugerida para a redução da adsorção de endotoxinas na membrana de quitosana, mas não de forma tão acentuada como a presença do sal.

Estes resultados sugerem que predomina, entre a membrana e a endotoxina, interação do tipo eletrostática.

#### **4.4.3. Remoção de endotoxinas de soluções de IgG humana contaminadas artificialmente**

Os experimentos visando a despirogenação de soluções de IgG humana foram realizados na concentração de 1 mg/mL devido a levantamento de dados de literatura que trazem esta concentração, para remoção de ET, como a mais

utilizada (HIRAYAMA *et al.*, 1995 e 1999; ANSPACH, 1997; LEGALLAIS *et al.*, 1997; PETSCH *et al.*, 1998; ANSPACH e PETSCH, 2000).

Além desta concentração são citadas 5 e 10 mg/mL (MINOBE *et al.*, 1988; HOU e ZANIEWSKI, 1990; ANSPACH, 1997 e 2001). O teste LAL, quando na presença de proteínas, deve ser realizado precedido de uma etapa para desnaturação protéica. Optou-se por não realizar experimentos com concentração de IgG maiores que 1 mg/mL pela dificuldade de garantir a veracidade da medida final (durante a desnaturação a altas concentrações de IgG percebeu-se precipitação de proteínas e/ou ET (FREITAS, 2001)). Os experimentos foram realizados segundo o método descrito no item 3.2.6.3 deste trabalho, e os resultados são apresentados na Tabela 4.7.

Em ambos os experimentos, apresentados na Tabela 4.7, realizou-se uma etapa de lavagem, contudo, ela não foi considerada para a avaliação do desempenho dos experimentos, visto que a recuperação protéica da etapa de filtração dos dois experimentos já foi suficientemente elevada (100 e 96,37 %) para garantir a viabilidade do processo.

A IgG, introduzida ao sistema, promoveu uma mudança de comportamento da adsorção de ET pois, enquanto sem IgG um aumento de ET alimentada significa aumento de fator de purificação e redução de endotoxinas remanescentes, com a presença de IgG este aumento de ET alimentada reflete-se numa redução do fator de purificação e maior percentual de ET remanescentes no filtrado. Provavelmente a IgG esteja interagindo com as moléculas de ET, não permitindo que estas adsorvam na membrana de quitosana de forma efetiva, fato não observado em presença de IgG de cavalo (FREITAS, 2001).

Em ambos os experimentos de filtração na presença de IgG não se obteve produtos com concentração de ET compatível com o uso para injeção parenteral.

Apesar de não terem sido obtidos valores de remoção de ET a níveis recomendados para injeção parenteral demonstrou-se, por teste realizado em nosso laboratório que, diminuindo o volume de injeção para dez mililitros obteríamos um filtrado com 0,73 EU/mL, com volume de 12 mL coletados, mas com recuperação protéica de apenas 51,4%.

**Tabela 4.7.** Influência da presença de IgG na remoção de ET por adsorção em membrana de quitosana

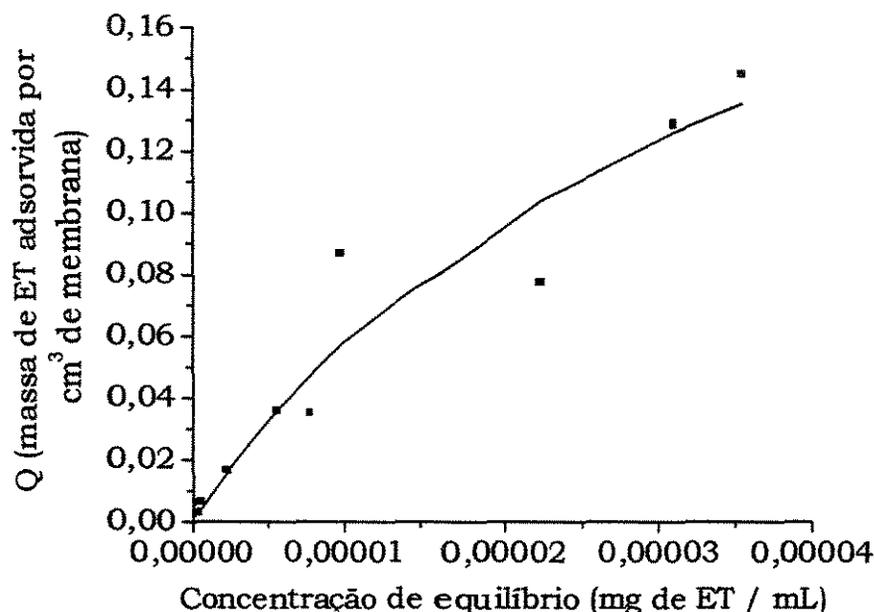
Solução	Tris-HCl pH 7,0	
	com 1 mg/mL de IgG	
<b>Concentração inicial de endotoxinas (EU/mL)</b>	<b>116,43</b>	<b>796,93</b>
Unidades na injeção (EU)	1.746,39	11.953,97
<b>Concentração final de endotoxinas (EU/mL)</b>	<b>4,05</b>	<b>71,15</b>
Unidades no filtrado (EU)	74,55	1309,09
Endotoxinas remanescente (%)	4,27	10,95
Q (EU/cm <sup>3</sup> )	4.161,91	26.499,58
Fator de Purificação	23,45	9,13
Concentração inicial de IgG (mg/mL)	0,93	0,96
Concentração no filtrado de IgG (mg/mL)	0,64	0,66
<b>Recuperação protéica (%)</b>	<b>100</b>	<b>96,37</b>
Concentração de ET na lavagem (EU/mL)	14,89	59,12
Unidades na lavagem (EU)	159,35	620,71
Concentração na lavagem de IgG (mg/mL)	0,02	0,04
Volume coletado na lavagem (mL)	13,3	13,1

Volume de alimentação: 15 mL, volume coletado: 21 mL, volume da membrana utilizada nos experimentos: 0,402 cm<sup>3</sup>, espessura da membrana 300 µm. (Q) capacidade de adsorção de ET por volume de membrana, (Fator de purificação) corresponde à quantidade de ET na alimentação inicial (EU)/quantidade de ET remanescente no filtrado (EU), (Recuperação protéica) obtida pela relação entre a quantidade de proteína presente no filtrado e a quantidade de proteína alimentada à membrana.

#### 4.5. Isoterma de adsorção de endotoxinas em membrana de quitosana

Uma vez determinada a melhor condição de remoção de ET, que consistiu no emprego de solução tampão Tris-HCl pH 7,0, foram realizados experimentos em frascos agitados, em batelada, a temperatura ambiente controlada (20°C), visando a determinação da isoterma de adsorção de ET.

Os experimentos foram realizados como descrito no item 3.2.8, com o objetivo de determinar a capacidade máxima de adsorção ( $Q_m$ ) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo ET-quitosana. Os resultados experimentais obtidos para a adsorção de ET na membrana de quitosana são apresentados na Figura 4.9. Apesar de não ter-se atingido um platô bem definido (dificuldades experimentais inerentes a medidas com altas concentrações de ET na solução), ajustou-se parâmetros do modelo de Langmuir através do método de regressão não linear de Levenberg-Marquart (Figura 4.9). Os valores de  $Q_m$  e de  $K_d$  obtidos para o modelo são apresentados na Tabela 4.8, juntamente com dados de literatura para fins de comparação.



**Figura 4.9.** Isoterma de adsorção de ET em membrana de quitosana, na presença de tampão Tris-HCl, pH 7,0. Ajuste não-linear segundo modelo de Langmuir. Coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9192.

O valor da constante de dissociação ( $K_d$ ) do complexo ET-quitosana ( $4 \times 10^{-11}$  M), ligeiramente menor que os encontrados para os outros adsorventes) é um valor típico de constantes de dissociação que caracterizam um sistema de alta afinidade, cujos valores estão na faixa de  $10^{-7}$  a  $10^{-15}$  M (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Este resultado confirma os dados de DAVYDOVA *et al.*(2000), o qual afirma que existe uma afinidade entre quitosana e LPS.

**Tabela 4.8.** Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de ET em membranas

	histidina imobilizada em agarose <sup>(1)</sup>	PL-70 <sup>(2)</sup>	PLMG- NH <sub>2</sub> <sup>(2)</sup>	DEAE <sup>(3)</sup>	DAH::DOC <sup>(3)</sup>	MPQ
Q <sub>m</sub> (mg/mL)	0,53	1	2,7	4,04	5,16	0,28
K <sub>d</sub> (M)	1,57×10 <sup>-9</sup>	3,7×10 <sup>-10</sup>	1,0×10 <sup>-10</sup>	1,8×10 <sup>-9</sup>	1,6 ×10 <sup>-9</sup>	4,0×10 <sup>-11</sup>

Onde: (1) MINOBE *et al.*, 1988, (2) HIRAYAMA *et al.*, 1999, (3) ANSPACH e PETSCH, 2000. (PL-70) adsorvente de poli ( $\epsilon$ -lisina) e clorometiloxirano reticulado na proporção de (70:30), (PLMG-NH<sub>2</sub>) poli ( $\gamma$ -metil L-glutamato) aminado, (DEAE) dietilaminoetil imobilizado em membrana de Nylon<sup>®</sup>, (DAH::DOC) deoxicolato imobilizado em membrana de Nylon<sup>®</sup> através do braço espaçador 1,6-diaminohexano, (MPQ) membrana porosa de quitosana, (Q<sub>m</sub>) capacidade máxima de adsorção, (K<sub>d</sub>) constante de dissociação. Consideração: massa molecular da ET corresponde a 1.000kDa.

Quanto à capacidade máxima de adsorção de ET, os resultados indicam que mesmo sem ter em sua superfície ligantes imobilizados, como no caso das matrizes da literatura, a membrana de quitosana apresentou valores da capacidade mais baixo, porém na mesma ordem de grandeza.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

#### 5.1. Conclusões

A membrana de quitosana foi sintetizada e reticulada com epícloridrina, apresentando características físicas similares às obtidas por FREITAS (2001), cujo trabalho serviu como referência para sua execução. Os resultados obtidos demonstram que a membrana de quitosana é apta para o uso como membrana adsorviva para filtração a pH maiores que 7,0 (apresentação de deformação quando utilizada em pH inferiores a 6,5).

A variação do pH e do tipo de tampão em experimento de filtração em membrana de quitosana permitiu identificar o tampão Tris-HCl a pH 7,0 como o que favorece a menor adsorção de IgG e maior remoção de ET, dentre os avaliados.

A presença de sal interfere na adsorção da ET na membrana de quitosana, reduzindo sua remoção do meio, provavelmente pela inibição da interação eletrostática entre a membrana de quitosana e a ET pelo aumento da força iônica.

A IgG humana prejudicou a remoção de ET, obtendo-se uma concentração maior de pirogênio no produto final e menor fator de purificação quando comparado às mesmas condições (tampão Tris-HCl, pH 7,0) sem proteína. A recuperação dos anticorpos foi superior a 96%.

Obteve-se, através da isoterma de adsorção de ET-quitosana, uma constante de dissociação ( $K_d$ ) de  $4,0 \times 10^{-11}$  M, confirmando as informações de DAVYDOVA *et al.* (2000), sobre a existência de alta afinidade entre LPS e quitosana, embora o coeficiente de correlação tenha sido de 0,92. A capacidade máxima ( $Q_m$ ) determinada para a adsorção de ET em quitosana é um pouco menor que as encontradas na literatura para outras matrizes, mas na mesma ordem de grandeza, mesmo sem ter ligantes imobilizados.

Os resultados obtidos demonstram que a membrana de quitosana reticulada remove ET das soluções testadas, devendo ser estudada uma

otimização do processo visando a remoção de ET a níveis aceitáveis pelas farmacopéias.

## **5.2. Sugestões para os próximos trabalhos**

Confeccionar um cartucho para filtração de solução com várias membranas.

Verificar mascaramento das ET no produto final de natureza protéica.

Remover ET de outras fontes protéicas.

Otimizar um processo para imobilização de ligantes com o objetivo de aumentar a capacidade de remoção de ET.

**CAPÍTULO 6****REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and Molecular Immunology*. 4ª edição. Philadelphia: Ed. W. B. Saunders Company, 2000, 553 p.

ACCONCI, CESAR. *Processo de remoção de endotoxinas de soros hiperimunes: filtração em membrana de afinidade*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 78 p. Tese (Mestrado).

ACCONCI, C.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M.; BUENO, S.M.A. Depyrogenation of snake antivenom serum solutions by hollow fiber-based pseudobioaffinity filtration. *Journal of Membrane Science*, v. 173, p. 235-245, 2000.

ANSPACH, F.B; HILBECK, O. Removal of endotoxin by affinity sorbents. *Journal of Chromatography A*, v. 711, p. 81-92, 1995.

ANSPACH, F.B. ET: A dangerous contamination in protein solutions, in GBF, Scientific Annual Report, p. 5-19, 1997.

ANSPACH, F.B.; PETSCH, D. Membrane adsorbers for selective endotoxin removal from protein solutions. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1005-1012, 2000.

ANSPACH, F.B. Endotoxin removal by affinity sorbents. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 665-681, 2001.

- ANTHONSEN, M.W.; SMIDSRØD, O. Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced  $^1\text{H-NMR}$  chemical shifts. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 303-305, 1995.
- ARRUDA, EDUARDO JOSÉ DE. *Concentração e purificação de  $\beta$ -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 203 p. Tese (Doutorado).
- BAMBA, T.; MATSUI, R.; WATABE, K. Effect of steam-heat treatment with/without divalent cations on the inactivation of lipopolysaccharides from several bacterial species. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 50, p. 129-134, 1996.
- BEPPU, MARISA MASUMI. *Estudo da calcificação "in vitro" de quitosana*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 125 p. Tese (Doutorado).
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDT, S.; GOFFE, R.A.; KESSLER, S.B.; O'CONNOR, J.L.; ZALE, S.E. Membrane-based affinity technology for commercial scale purifications. *Biotechnology*, v. 6, p. 779-782, 1988.
- BURNOUF, T. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. *Journal of Chromatography B*, v. 664, p. 3-15, 1995.

- CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Ed. Arte Médicas, 1989, 376 p.
- CHARCOSSET, C. Purification of proteins by membrane chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 71, p. 95-110, 1998.
- DARKOW, R.; GROTH, T.; ALBRECHT, W.; LÜTZOW, K.; PAUL, D. Funcionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions. *Biomaterials*, v. 20, p. 1277-1283, 1999.
- DAVYDOVA, V.N.; YERMAK, I.M.; GORBACH, V.I.; KRASIKOVA, I.N.; SOLOVEVA, T.F. Interaction of bacterial endotoxins with chitosan. Effect of endotoxin structure, chitosan molecular mass, and ionic strength of the solution on the formation of the complex. *Biochemistry (Moscow)*, v. 65, p. 1082-1090, 2000.
- DING, J.L.; ZHU, Y.; HO, B. High-performance affinity capture-removal of bacterial pyrogen from solutions. *Journal of Chromatography B*, v. 759, p. 237-246, 2001.
- DING, J.L.; HO, B. A new era in pyrogen testing. *TRENDS in Biotechnology*, v. 19, p. 277-281, 2001.
- EVANS-STRICKFADEN, T.T.; OSHIMA, K.H.; HIGHSMITH, A.K.; ADES, E.W. Endotoxin removal using 6,000 molecular weight cut-off polyacrylonitrile (PAN) and polysulfone (PS) hollow fiber ultrafilters. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 50, p. 154-157, 1996.
- FREITAS, SINDELIA SILVA DE. *Despirogenação de soro antiofídico: adsorção seletiva em membrana de quitosana*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 92 p. Tese (Mestrado).

- HARRIS, E.L.V.; ANGAL, S. *Protein Purification Methods – A practical approach*. New York: Ed. Oxford University Press, 1995, 179 p.
- HASNAOUI, M'H; DEBBIA, M.; COCHET, S.; CARTRON, J.P.; LAMBIN, P.; BERTRAND, O. Screening of a large number of dyes for the separation of human immunoglobulin G<sub>2</sub> from the other immunoglobulin G subclasses. Immunoglobulin G<sub>2</sub> enrichment on immobilized Procion Yellow HE-4R. *Journal of Chromatography A*, v. 766, p. 49-60, 1997.
- HAUPT, K.; BUENO, S.M.A. *Affinity Membranes in Affinity separation – Encyclopaedia of Separation Science*, Ed. Academic Press, p. 229-235, 2000.
- HIRAYAMA, C.; IHARA, H.; LI, X. Removal of endotoxins using macroporous spherical poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate) beads and their derivatives. *Journal of Chromatography*, v. 530, p. 148-153, 1990.
- HIRAYAMA, C.; SAKATA, M.; OHKURA, Y.; YHARA, H.; OHKUMA, K. Removal of endotoxins from culture supernatant of *Bordetella pertussis* with aminated poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate) spherical beads. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 40, p. 2106-2109, 1992-A.
- HIRAYAMA, C.; SAKATA, M.; YHARA, H.; OHKUMA, K.; IWATSUKI, M. Effect of the pore size of an aminated poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate) adsorbent on the selective removal of endotoxin. *Analytical Sciences*, v. 8, p. 805-810, 1992-B.
- HIRAYAMA, C.; SAKATA, M.; MORIMOTO, S.; TACHIBE, H.; IHARA, H.; OHKUMA, K.; MIYACHI, Y. The removal of endotoxins from protein solutions using column packings with aminated poly( $\gamma$ -methyl L-glutamate) spheres. *Chromatographia*, v. 40, p. 33-38, 1995.

- HIRAYAMA, C.; SAKATA, M.; NAKAMURA, M.; IHARA, H.; KUNITAKE, M.; TODOKORO, M. Preparation of poly( $\epsilon$ -lysine) adsorbents and application to selective removal of lipopolysaccharides. *Journal of Chromatography B*, v. 721, p. 187-195, 1999.
- HOU, K.C; ZANIEWSKI, R. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 12, p. 315-324, 1990.
- HOWELL, J.A.; SANCHEZ, V.; FIELD, R.W. *Membranes in Bioprocessing: Theory and Applications*, 1ª edição. Cambridge: Ed. Chapman & Hall, 1993, 336 p.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ALDELBERG, E.L.; BROOKS, G.F. *Microbiologia Médica*, 18ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1991, 519 p.
- KANG, Y.; LUO, R.G. Chromatographic removal of endotoxin from hemoglobin preparations: Effects of solution conditions on endotoxin removal efficiency and protein recovery. *Journal of Chromatography A*, v. 809, p. 13-20, 1998.
- KARPLUS, T.E.; ULEVITCH, R.J.; WILSON, C.B. A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions. *Journal of Immunological Methods*, v. 105, p. 211-220, 1987.
- KLEIN, E. Affinity membranes: a 10-year review. *Journal of Membrane Science*, v. 179, p. 1-27, 2000.
- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 117-120, 1998.
- LEGALLAIS, C.; ANSPACH, F.B.; BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Strategies for the depyrogenation of contaminated immunoglobulin G

- solutions by histidine-immobilized hollow fiber membrane. *Journal of Chromatography B*, v. 691, p. 33-41, 1997.
- LEMKE, H.-D. Methods for the detection of endotoxins present during extracorporeal circulation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 9, p. 90-95, 1994.
- LI, L.; LUO, R.G. Protein concentration effect on protein-lipopolysaccharide (LPS) binding and endotoxin removal. *Biotechnology Letters*, v. 19, p. 135-138, 1997.
- LIU, S.; TOBIAS, R.; McCLURE, S.; STYBA, G.; SHI, Q.; JACKOWSKI, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clinical Biochemistry*, v. 30, p. 455-463, 1997.
- LUCENA, SERGIO LUIZ DE. *Modelagem e simulação da separação das proteínas  $\alpha$ -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. 127 p. Tese (Doutorado).
- LYNN W.A.; GOLENBOCK, D.T. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunology Today*, v. 13, p. 271-276, 1992.
- MARTICH, G.D.; BOUJOUKOS, A.J.; SUFFREDINI, A.F. Response of man to endotoxin. *Immunobiology*, v. 187, p. 403-416, 1993.
- MCCUSKEY, R.S.; URBASCHEK, R.; URBASCHEK, B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovascular Research*, v. 32, p. 752-763, 1996.

- MINOBE, S.; WATANABE, T.; SATO, T.; TOSA, T. Characteristics and applications of adsorbents for pyrogen removal. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 10, p. 143-153, 1988.
- MOHR, P.; POMMERENING, K. *Affinity Chromatography: practical and theoretical aspects – Chromatographic Science Series v. 33 - Practical and Theoretical Aspects*. New York: Ed. Marcel Dekker, Inc., 1986, 301 p.
- NAKATA, T. Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 48, p. 59-63, 1994.
- NEIDHARDT, E.A.; LUTHER, M.A.; RECNY, M. Rapid, two-step purification process for the preparation of pyrogen-free murine immunoglobulin G1 monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography*, v. 590, p. 255-261, 1992.
- PEARSON, F. C. *Pyrogens – Endotoxins, LAL testing and Depyrogenation*. New York: Ed. Marcel Dekker, 1985, 372 p.
- PETSCH, D.; BEESKOW, T.C.; ANSPACH, F.B.; DECKWER, W.-D. Membrane adsorbents for selective removal of bacterial endotoxin. *Journal of Chromatography B*, v. 693, p. 79-91, 1997.
- PETSCH, D.; DECKWER, W.-D.; ANSPACH, F.B.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Endotoxin removal with poly(ethyleneimine)-immobilized adsorbents: Sepharose 4B versus flat sheet and hollow fibre membranes. *Journal of Chromatography B*, v. 707, p. 121-130, 1998.
- PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology*, v. 76, p. 97-119, 2000.

- RAETZ, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 59, p. 129-170, 1990.
- RAUTENBACH, R.; ALBRECHT, R. *Membrane process*, Chichester: Ed. John Wiley and Sons, 1989, 359 p.
- RIETSCHEL, E.T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F.U.; ULMER, A.T.; HOLST, O.; BRADE, H.; SCHMIDT, G.; MAMAT, U.; GRIMMECKE, H-D.; KUSUMOTO, S.; ZÄHRINGER, U. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology*, v. 187, p. 169-190, 1993.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*, 5ª edição. São Paulo: Ed. Manole Ltda., 1999, 423 p.
- RUCKENSTEIN, E.; ZENG, X. Albumin separation with cibacron blue carrying macroporous chitosan and chitin affinity membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 142, p. 13-26, 1998.
- SCOTT, K. *Handbook of Industrial Membranes*, 1ª edição. Oxford: Ed. Elsevier Advanced Technology, 1995, 912 p.
- SHARMA, S.K. Endotoxin detection and elimination in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 8, p. 5-22, 1986.
- STEIN, S. *Fundamentals of protein biotechnology*. New York: Ed. Marcel Dekker, Inc., 1990, 310 p.
- STITES, D.P.; TERR. A.I.; PARSLow, T.G. *Basic e Clinical Immunology*, 8ª edição. Norwalk: Ed. Appleton & Langue, 1994, 870 p.

- STRYER, L., *Bioquímica*, 4ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1996, 1000 p.
- SUZUKI, T.; MIZUSHIMA, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, p. 128-132, 1997.
- TODOKORO, M.; SAKATA, M.; MATAMA, S.; KUNITAKE, M.; OHKUMA, K.; HIRAYAMA, C. Pore-size controlled and poly( $\epsilon$ -lysine)-immobilized cellulose spherical particles for removal of lipopolysaccharides. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 25, p. 601-614, 2002.
- UNARSKA, M.; DAVIES, P.A.; ESNOUF, M.P.; BELLHOUSE, B.J. Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems. *Journal of Chromatography*, v. 519, p. 53-67, 1990.
- VARUM, K.M.; OTTOY, M.H.; SMIDSRØD, O. Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation. *Carbohydrate Polymers*, v. 25, p. 65-70, 1994.
- VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, p. 71-76, 1989.
- VLUG, A.; VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. *American Clinical Laboratory*, v. 8, p. 28-36, 1989.
- WALSH, G.; HEADON, D. *Protein Biotechnology*, 1ª edição. Chichester: Ed. Wiley, 1974, 371 p.

- WEI, Y.C.; HUDSON, S.M.; MAYER, J.M.; KAPLAN, D.L. The crosslinking of chitosan fibers. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 30, p. 2187-2193, 1992.
- WILSON, M.J.; HAGGART, C.L.; GALLAGHER, P.S.; WALSH, D. Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *Journal of Biotechnology*, v. 88, p. 67-75, 2001.
- YAMAMOTO, C.; KIM, S.-T. Endotoxin rejection by ultrafiltration through high-flux, hollow fiber filters. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, p. 467-471, 1996.
- YANG, L.; HSIAO, W.W.; CHEN, P. Chitosan-cellulose composite membrane for affinity purifications of biopolymers and immunoabsorption. *Journal of Membrane Science*, v. 197, p. 185-197, 2002.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. *Industrial Engineering Chemical Research*, v. 35, p. 4169-4175, 1996-A.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption. *Journal of Membrane Science*, v. 117, p. 271-278, 1996-B.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. *Journal of Membrane Science*, v. 148, p. 195-205, 1998-A.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Trypsin purification by p-aminobenzamidine immobilized on macroporous chitosan membranes. *Industrial Engineering Chemical Research*, v. 37, p. 159-165, 1998-B.

ZIEGLER, E.J.; FISCHER, C.J.; SPRUNG, C.L *et al.* Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *The New England Journal of Medicine*, v. 324, p. 429-436, 1991.

<http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/imresp.html>, acesso 02/10/2002.

<http://www.mbl.edu/animals/Limulus/blood/bang.html>, acesso 02/10/2002.

## ANEXO A

Resultados da caracterização física das membranas de quitosana obtidas por ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A), por RUCKENSTEIN e ZENG (1998) e por FREITAS (2001).

**Tabela A.1.** Resultado das análises de caracterização da membrana macroporosa de quitosana reticulada segundo ZENG e RUCKENSTEIN (1996-A)

Espessura no estado úmido	119 $\mu\text{m}$
Porosidade no estado úmido	75,2%
Área específica para adsorção (BET)	1,8 $\text{m}^2/\text{g}$
Área efetiva para adsorção no estado úmido	13,39 $\text{cm}^2$
Tamanho médio dos poros no estado seco	19,8 $\mu\text{m}$

**Tabela A.2.** Resultado das análises de caracterização da membrana macroporosa de quitosana reticulada segundo RUCKENSTEIN e ZENG (1998)

Espessura no estado úmido	500 $\mu\text{m}$
Porosidade no estado úmido	62%
Área específica para adsorção (BET)	1,6 $\text{m}^2/\text{g}$
Área efetiva para adsorção no estado úmido	13,8 $\text{cm}^2$
Tamanho médio dos poros no estado seco	18 $\mu\text{m}$

**Tabela A.3.** Resultado das análises de caracterização da membrana macroporosa de quitosana reticulada segundo FREITAS (2001)

---

Espessura no estado úmido	300 $\mu\text{m}$
Porosidade no estado úmido	67 %
Vazão a pressão atmosférica <sup>a</sup>	13 mL/min
Área específica para adsorção (BET)	41,5 $\text{m}^2/\text{g}$
Área efetiva para adsorção no estado úmido	13,4 $\text{cm}^2$
Tamanho médio dos poros no estado seco	18 $\mu\text{m}$
Tensão de ruptura	0,81 MPa

---

(a) fluido empregado: água ultrapura

**ANEXO B**

Resultados da remoção de ET de solução aquosas ou na presença de IgG de cavalo (soro antiofídico), por adsorção em membranas de quitosana, segundo FREITAS (2001).

**Tabela B.1.** Resultados da remoção de ET de solução tampão Tris-HCl pH 7,0 contaminada artificialmente, adaptado de FREITAS (2001).

Solução	Tampão Tris-HCl pH 7,0	
Concentração inicial (EU/mL)	149,0	1004,3
Concentração final (EU/mL)	3,5	10,4
Endotoxinas remanescente (%)	2,3	1,0
Fator de Purificação	43,0	96,5

**Tabela B.2.** Resultados da remoção de ET de soluções de IgG de cavalo, 1 mg/mL, contaminadas artificialmente adaptado de FREITAS (2001).

Solução	Tampão Tris-HCl pH 7,0 com IgG de cavalo (1 mg/mL)	
Concentração inicial (EU/mL)	88,9	1184,5
Concentração final (EU/mL)	5,1	34,2
Recuperação protéica, somente filtrado (%)	65	79
Recuperação protéica, com lavagem (%)	83	96
Fator de Purificação	18,3	36,1