

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR CROMATOGRAPHIA NEGATIVA EM
DIAMINAS IMOBILIZADAS EM GÉIS DE AGAROSE**

Eng^a Química Maria Cristiane Martins de Souza

Autora

Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

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

Campinas – São Paulo

Março de 2009

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

So89p Souza, Maria Cristiane Martins de
Purificação de IgG humana por cromatografia
negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose /
Maria Cristiane Martins de Souza. --Campinas, SP:
[s.n.], 2009.

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

1. Imunoglobulina G. 2. Proteínas - Purificação. 3.
Adsorção. I. Bueno, Sônia Maria Alves . II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Purification of human IgG by negative chromatography on
immobilized diamines in agarose gels

Palavras-chave em Inglês: Immunoglobulin G, Negative chromatography, Diamine
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Everson Alves Miranda , Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Data da defesa: 03/03/2009

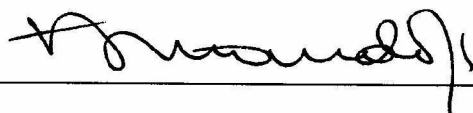
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Maria Cristiane Martins de Souza e aprovada em 03 de março de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



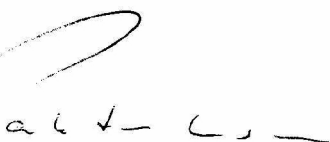
Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora – FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

IQ/UNICAMP

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Maria Cristiane Martins de Souza e aprovada pela comissão julgadora em 03 de março de 2009.

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

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora – FEQ/UNICAMP

Os resultados contidos nesta Dissertação estão protegidos pela patente depositada no INPI em 06.02.2009 - prot. 018090005938 com o título:

Processo de purificação de imunoglobulina G (IgG) a partir do soro ou plasma humano por cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose ou ω -aminodecyl-bisoxirano-agarose.

Autores: Maria Cristiane Martins de Souza, Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin, Iara Rocha Antunes Pereira, Everson Alves Miranda e Sônia Maria Alves Bueno

Agradecimentos

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

A minha família que sempre me apoiou e incentivou em todos os momentos da minha vida. Em especial ao meu pai que me deixou a mais cara herança que se pode deixar a uma filha, a educação.

Ao meu melhor amigo e carinhoso namorado, Albert Einstein, que sempre acreditou no meu potencial e me apoiou e compreendeu nos momentos mais difíceis.

Aos inigualáveis amigos (Gisele, Juliana, Itiara, Anayla, Alan e Rafael) que estiveram sempre ao meu lado em todas as situações. Em especial aos amigos Igor e Lara que sempre me acompanharam e ajudaram nos trabalhos realizados no laboratório.

A professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno pela orientação e toda dedicação, experiência e paciência no decorrer de todo o trabalho.

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

Aos professores Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa e Dr. Everson Alves Miranda pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

A todos os grandes amigos, que fiz durante o mestrado, amigos de trabalho, de república, amigos realmente imprescindíveis em minha vida.

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

A todos os amigos que doaram sangue para que esse trabalho fosse realizado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos. Mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes”.

Gilbert Chesterton

Sumário

Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xxiii
Resumo	xxix
Abstract	xxx
Capítulo 1: Introdução	1
1.1. Imunoglobulinas e sua relevância	1
1.2. Tecnologias de purificação de IgG humana	2
1.3. Cromatografia negativa para purificação de IgG humana	4
1.4. Objetivo	6
Capítulo 2: Revisão bibliográfica	9
2.1. Imunoglobulinas	9
2.2. Purificação de IgG humana	13
2.3. Purificação de proteínas por cromatografia negativa	19
2.4. Compostos químicos orgânicos nitrogenados: aminas	21
2.4.1. Aminas como ligantes em cromatografia líquida	22
2.4.2. Matrizes cromatográficas e química de ativação e imobilização de ligantes para uso em cromatografia negativa	24

Capítulo 3: Materiais e métodos	27
3.1. Materiais	27
3.1.1. Adsorventes	27
3.1.2. Reagentes	28
3.1.3. Soro e plasma humano	28
3.2. Métodos	29
3.2.1. Quantificação de proteínas totais	29
3.2.2. Eletroforese SDS-PAGE e de focalização isoeétrica (<i>Isoelectric Focusing – IEF</i>)	29
3.2.3. Quantificação de IgG, IgA, IgM, Trf e Alb	30
3.2.4. Experimentos cromatográficos em géis diaminas-agarose	30
3.2.4.1. Determinação das curvas de ruptura de IgG	32
3.2.4.2. Determinação dos pontos isoeletricos das moléculas de IgG das frações cromatográficas retidas e não retidas	34
3.2.5. Isotermas de Adsorção	35
Capítulo 4: Resultados e discussão	38
4.1. Efeito do tamanho da cadeia carbônica da diamina na purificação de IgG por cromatografia negativa: géis ativados com CNBr	39
4.1.1. Cadeia alifática de três carbonos: ω -aminopropil-agarose	39
4.1.2. Cadeia alifática de seis carbonos: ω -aminohexil-agarose	42
4.1.3. Cadeia alifática de oito carbonos: ω -aminooctil-agarose	54

4.2. Efeito do tamanho da cadeia carbônica da diamina na purificação de IgG: por cromatografia negativa: géis ativados com bisoxirano	61
4.2.1. Cadeia alifática de seis carbonos: ω -aminohexil-bisoxirano-agarose	61
4.2.2. Cadeia alifática de dez carbonos: ω -aminodecil-bisoxirano-agarose	81
4.2.3. Cadeia alifática de doze carbonos: ω -aminododecil-bisoxirano-agarose	96
4.3. Gel de troca iônica usado como controle: DEAE-agarose	97
4.4. Pontos isoelétricos das moléculas de IgG retidas e não retidas nos géis ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose	100
4.5. Isotermas de adsorção de IgG e Alb em ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose	102
Capítulo 5: Conclusões	109
Capítulo 6: Sugestões para próximos trabalhos	111
Capítulo 7: Referências	112
Apêndice A	124
Apêndice B	129
Apêndice C	142
Apêndice D	148
Apêndice E	157

Lista de figuras

Figura 1-1: Diagrama contendo as etapas realizadas para a realização do trabalho.

8

Figura 2-1. Estrutura da imunoglobulina G (IgG) e seus fragmentos Fab e Fc (adaptado de Alberts *et al.*, 1997).

10

Figura 2-2. Representação esquemática de fragmentos de imunoglobulinas geradas por digestão enzimática. Fc é identificado com o subscrito “c” por ser cristalizável (adaptado de Holliger e Hudson, 2005).

11

Figura 2-3. Esquema de ativação e reações de acoplamento de ligantes diaminas. (a) ativação com CNBr, seguido por acoplamento da diamina; (b) ativação com bisoxirano, seguido por acoplamento da diamina; (c) ativação com epiclorldrina, seguido por acoplamento da diamina (R = cadeia carbônica). Adaptado de (a) <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/productinformationsheetc9210pis.pdf>; (b) Houen, 2001 e (c) Castilho *et al.*, 2000.

26

Figura 3-1. Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão. 1) reservatório de solução; 2) bomba peristáltica; 3) coluna cromatográfica; 4) monitor de medida de absorbância a 280 nm; 5) registrador; 6) coletor de frações. (Adaptado de Bresolin, 2006).

31

Figura 4-1. Porcentagens de Proteínas Totais: PA (proteínas adsorvidas) e PNA (proteínas não adsorvidas) em ω -aminopropil-agarose em presença dos tampões MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. Alimentação: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (3,4 mg de proteínas totais/mL). Eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. Volume de leito de 3,0 mL.

40

Figura 4-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. (I)

Injeção: 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,14 mg de proteínas totais/mL). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (19-21) eluição; (N) marcador de IgG. 41

Figura 4-3. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvida em ω -aminohexil-agarose em presença do tampão MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9 e eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. Alimentação: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (3,98 mg de proteínas totais/mL). Volume de leito de 3,0 mL. 44

Figura 4-4. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvida das cromatografias em ω -aminohexil-agarose em HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2. Alimentação: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (3,98 mg de proteínas totais/mL). Volume de leito de 3,0 mL. 45

Figura 4-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (4,15 mg de proteínas totais/mL). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (23-25) eluição; (N) marcador de IgG. 47

Figura 4-6. Porcentagens de proteínas não adsorvidas e adsorvidas da cromatografia em ω -aminohexil-agarose em HEPES 6,8. 48

Figura 4-7. (a) Início da curva de ruptura de IgG em gel ω -aminohexil-agarose para proteínas totais. Volume de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,37 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese

SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-20: frações da lavagem; 21-22: frações da eluição; N: marcador de IgG. 50

Figura 4-8. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e proteínas recuperadas nas etapas de lavagem e eluição da cromatografia em ω -aminohexil-agarose em HEPES pH 6,8. 53

Figura 4-9. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvidas em ω -aminooctil-agarose em MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. 55

Figura 4-10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,31 mg de proteínas totais /mL). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (20-22) eluição; (N) marcador de IgG. 56

Figura 4-11. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminooctil-agarose, volume final de alimentação: 15 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (2,91 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-21: frações da lavagem; 22-23: frações da eluição; N: marcador de IgG. 58

Figura 4-12. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e proteínas recuperadas na lavagem e eluição em ω -aminooctil-agarose em presença do tampão de adsorção HEPES pH 6,8 e eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. 59

Figura 4-13 (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,29 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 3-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-23: frações da lavagem; 24-26: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG. 62

Figura 4-14. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e lavagem e proteínas recuperadas na eluição em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose em presença do tampão HEPES pH 6,8. Volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes. 63

Figura 4-15. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,24 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: HMW: marcador de alta massa molecular; I: amostra de injeção; 6-30: pontos da curva de ruptura (alimentação); 31-38: frações da lavagem; 60-62: frações da eluição; R: fração de regeneração; M: marcador de IgG. 65

Figura 4-16. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e lavagem e proteínas recuperadas na eluição em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose em presença do tampão HEPES pH 6,8. Volume final de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes. 66

Figura 4-17. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído dez vezes (6,46 mg de proteínas totais/mL). I: Injeção da amostra; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: amostra de injeção; 4-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-24: frações

da lavagem; 44-46: frações da eluição; R: fração de regeneração; N: marcador de IgG. 68

Figura 4-18. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 106,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,39 mg de proteínas totais/mL). I: Injeção da amostra; L: Lavagem. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: amostra de injeção; 4-43: pontos da curva de ruptura (alimentação); 72-74: frações da eluição; R: fração de regeneração; N: marcador de IgG. 70

Figura 4-19. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (3,40 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 6-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 44-45: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG. 73

Figura 4-20. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 8,2 (3,29 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 6-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 60-61: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG. 74

Figura 4-21. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 8,0 mL de solução de plasma humano diluído dez vezes em tampão MOPS pH 7,9 (6,46 mg de

proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 4-8: frações da alimentação; 9-16: frações da lavagem; 35-37: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG. 77

Figura 4-22. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 50,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (2,60 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 4-25: frações da alimentação; 26-27: frações da lavagem; 35-36: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG. 79

Figura 4-23. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,38 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-21: frações da lavagem; 22-23: frações da eluição; N: marcador de IgG. 82

Figura 4-24. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvidas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em presença dos tampões MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2, eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. 83

Figura 4-25. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,09 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-30: pontos da curva de ruptura

(alimentação); 31-36: frações da lavagem; 65-66: frações da eluição; M: marcador de IgG. 85

Figura 4-26. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e proteínas recuperadas na lavagem e eleuição em ω -aminodecil-agarose em presença do tampão HEPES pH 6,8 e eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. 87

Figura 4-27. Curva de ruptura do experimento em gel ω -aminodecil-agarose, volume de alimentação 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes. Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-8: pontos da curva de ruptura (alimentação); 9-15: pontos da lavagem; 16-17: pontos da eluição; N: marcador de IgG. 88

Figura 4-28. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (3,40 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 1-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 40-42: frações da eluição; N: marcador de IgG. 91

Figura 4-29. (a) Início da curva de ruptura do experimento em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 8,2 (3,34 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 1-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 40-43: frações da eluição; N: marcador de IgG. 92

Figura 4-30. (a) Experimento com ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 8,0 mL de solução de plasma humano diluído dez vezes em tampão HEPES pH 8,2 (6,35 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem, eluição e regeneração: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 4-8: frações da alimentação; 9-16: frações da lavagem; 30-33: frações da eluição; N: marcador de IgG. 95

Figura 4-31. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas em DEAE-agarose, Início da curva de ruptura, volume de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8 (3,26 mg/mL de proteínas totais). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 1-27: frações da alimentação; 28-32: frações da lavagem; 55-57: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG. 98

Figura 4-32. (a) e (b) Cromatogramas dos experimentos realizados com IgG de alta pureza diluída em Hepes pH 6,8, em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, respectivamente. (I) injeção; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (c) Eletroforese de focalização isoelétrica (IEF): marc. IEF: marcador de ponto isoelétrico; IgG: IgG de alta pureza, 1: "pool" das frações de lavagem da cromatografia em ω -aminohexil-agarose; 2: "pool" das frações de eluição da cromatografia em ω -aminohexil-agarose; 3: "pool" das frações de lavagem da cromatografia em ω -aminodecil-agarose; 4: "pool" das frações de eluição da cromatografia em ω -aminodecil-agarose. 101

Figura 4-33. Isotermas de adsorção de IgG humana em (a) ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e (b) ω -aminodecil-bisoxirano-agarose: pontos experimentais e curvas ajustadas segundo os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich. 103

Figura A-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,7. 124

Figura A-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9. 125

Figura A-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. 126

Figura A-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2. 127

Figura B-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 5,5. 129

Figura B-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,5. 130

Figura B-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 5,5. 131

Figura B-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,5. 132

Figura B-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 6,5. 133

Figura B-6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,2. 134

Figura B-7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9. 135

Figura B-8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. 136

- Figura B-9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 7,5. 137
- Figura B-10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2. 138
- Figura C-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,7. 142
- Figura C-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9. 143
- Figura C-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. 144
- Figura C-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2. 145
- Figura D-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 6,5. 148
- Figura D-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,2. 149
- Figura D-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9. 150
- Figura D-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. 151
- Figura D-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 7,5. 152
- Figura D-6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2. 153

Figura D-7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. 154

Figura D-8. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (5,07 mg/mL de proteínas totais). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); N: marcador de IgG. 155

Figura E-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,7. 157

Figura E-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9. 158

Figura E-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. 159

Figura E-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2. 160

Figura E-5. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvidas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em presença dos tampões MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2, eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. 162

Figura E-6. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,01 mg/mL de proteínas totais). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta

massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-26: frações da lavagem; 27-29: frações da eluição; N: marcador de IgG. 164

Lista de tabelas

Tabela 2-1. Concentração das principais proteínas do plasma humano (adaptado de Andrade e Hlady, 1987).	14
Tabela 3-1. Especificações dos adsorventes	27
Tabela 3-2. Condições cromatográficas das curvas de ruptura de IgG.	34
Tabela 4-1. Balanço de massa da cromatografia referente ao adsorvente ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.	41
Tabela 4-2. Balanço de massa da cromatografia referente ao gel ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.	47
Tabela 4-3. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em ω -aminohexil-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.	49
Tabela 4-4. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em ω -aminohexil-agarose. Tampão de adsorção: HEPES pH 6,8.	52
Tabela 4-5. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em ω -aminooctil-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.	57
Tabela 4-6. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminooctil-	

agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 60

Tabela 4-7. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 63

Tabela 4-8. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 66

Tabela 4-9. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 69

Tabela 4-10. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 71

Tabela 4-11. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG a partir do plasma humano em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 75

Tabela 4-12. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG a partir do plasma humano em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: MOPS pH 7,9. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 78

Tabela 4-13. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG a partir do plasma humano em gel ω -aminohehexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: MOPS pH 7,9. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 80

Tabela 4-14. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: por acréscimo de 1,0 M NaCl em tampão de adsorção. 83

Tabela 4-15. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 86

Tabela 4-16. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminodecil-agarose. Volume de alimentação 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes. 89

Tabela 4-17. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose a partir do plasma diluído vinte vezes. Adsorção: MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 93

Tabela 4-18. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel DEAE-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 99

Tabela 4-19. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG humana em ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. 104

Tabela A-1. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção MES pH 6,7 e MOPS pH 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 127

Tabela A-2. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões HEPES pH 6,8 e pH 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 128

Tabela B-1. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MES pH 5,5 e 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 130

Tabela B-2. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MES pH 5,5 e 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 132

Tabela B-3. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 138

Tabela B-4. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 139

Tabela B-5. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: MOPS a pH 6,5, 7,2 e 7,9. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 140

Tabela B-6. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: HEPES a pH 6,8, 7,5 e 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

141

Tabela C-1. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção MES pH 6,7 e MOPS pH 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

145

Tabela C-2. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção HEPES pH 6,8 e pH 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

146

Tabela C-3. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

147

Tabela D-1. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

150

Tabela D-2. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

153

Tabela D-3. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão HEPES pH 6,8, e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

154

Tabela D-4. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão HEPES pH 6,8, e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

156

Tabela E-1. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção MES pH 6,7 e MOPS pH 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 160

Tabela E-2. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção HEPES pH 6,8 e pH 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 de NaCl no tampão de adsorção. 161

Tabela E-3. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção. 163

Tabela E-4. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção HEPES 25 mM pH 6,8, e dessorção por acréscimo de 1,0 M de NaCl no tampão de adsorção. 165

Resumo

As imunoglobulinas (em particular, Imunoglobulina G (IgG)) têm uma aplicação ampla, sendo essenciais em testes de diagnóstico *in vitro*, em terapia, análises e investigação em diversas áreas. Muitos estudos têm sido realizados visando à purificação de IgG, destacando-se as técnicas de adsorção seletiva, como as cromatografias de troca iônica, negativa e de afinidade. Neste contexto, aplicou-se a cromatografia negativa com diaminas imobilizadas para purificação de IgG a partir do soro e plasma humano em uma única etapa, visando à obtenção de um alto grau de pureza. Os experimentos cromatográficos envolveram cinco etapas: condicionamento, alimentação, lavagem, eluição e regeneração da coluna cromatográfica. Para determinação do melhor ligante para adsorção de impurezas, realizaram-se ensaios com os adsorventes ω -aminopropil-agarose, ω -aminohexil-agarose, ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, ω -aminooctil-agarose, ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, ω -aminododecil-bisoxirano-agarose e DEAE-agarose na presença de diferentes sistemas tamponantes. De acordo com eletroforeses SDS-PAGE e análises nefelométricas das frações dos picos de proteínas obtidos, a melhor condição utilizada para a purificação de IgG a partir de soro e plasma humano diluído em HEPES 25 mM a pH 6,8 e MOPS pH 7,9, respectivamente, em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, atingindo fator de purificação de 6,8 vezes e pureza superior a 95%. As isotermas de adsorção de albumina, principal impureza do soro e do plasma humano, ajustadas pelo modelo de Langmuir, indicaram alta capacidade de adsorção de albumina dos géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, de 206,6 e 78,6 mg/mL de adsorvente, respectivamente. Os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose mostraram-se mais eficientes para purificação de IgG em termos de rendimento (76,8 e 74,7%, respectivamente) e capacidade dinâmica (4,23 e 4,51 mg de IgG/mL de adsorvente, respectivamente), do que o gel controle DEAE-agarose (51,9% de rendimento e 3,19 mg de IgG/mL de adsorvente).

Abstract

Immunoglobulins, in particular immunoglobulin G (IgG), have a broad application range and are essential to *in vitro* diagnostic tests, in therapies and researches in several fields. Many studies have been done aiming IgG purification, mainly using techniques of selective adsorption, such as ion exchange chromatography and negative affinity. In this context, the concept of negative chromatography with immobilized diamines was used for IgG purification from human serum and plasma in a single step, aiming to obtain high pure IgG. Chromatographic experiments involved five steps: conditioning, feeding, washing, elution and regeneration of the column. In order to determine the best condition for adsorption of impurities, trial experiments were performed with ω -aminopropyl-agarose, ω -aminohexyl-agarose, ω -aminooctyl-agarose, ω -aminodecyl-agarose, ω -aminododecyl-agarose and DEAE-agarose using different buffer systems. According to SDS-PAGE and nephelometry analysis, the most selective adsorbent was ω -aminohexyl-bisoxirane-agarose using HEPES 25 mM pH 6.8 and MOPS pH 7.9 buffers for IgG purification from human serum and plasma, respectively, reaching purification factor of 6.8 times and purity of over 95%. Adsorption isotherms of albumin, main impurity of the human serum and plasma, adjusted by the Langmuir model, showed a high capacity of absorption of albumin by the gels ω -aminohexyl-bisoxirane-agarose and ω -aminodecyl-bisoxirane-agarose, of 206,6 and 78,6 mg/mL of adsorbent, respectively. The absorbents ω -aminohexyl-bisoxirane-agarose and ω -aminodecyl-bisoxirane-agarose showed more efficient for the purification of IgG regarding the yielding (76,8 and 74,7%, respectively) and dynamic capacity (4,23 and 4,51 mg of IgG/mL of absorbent, respectively), than the control gel DEAE-agarose (51,9% of yield and 3,19 mg of IgG/mL of adsorbent).

Capítulo 1: Introdução

1.1. Imunoglobulinas e sua relevância

A indústria de hemoderivados (produtos obtidos a partir do plasma ou soro humano) nos anos de 1940 a 1970 tinha a albumina como produto principal. O panorama se alterou nos anos 80 e 90 do século passado, cujo foco foi o fator VIII, quando ainda não se produzia o fator VIII via tecnologia do DNA recombinante. Com a regulamentação da produção em larga escala do fator VIII recombinante, as imunoglobulinas assumiram o papel preponderante dentre todos os hemoderivados na primeira década deste século, transformando o fator VIII e a albumina quase que em subprodutos do fracionamento do plasma e, conseqüentemente, intensificando o estudo sobre purificação de imunoglobulinas (Hemoderivados, 2006).

Imunoglobulinas são os principais constituintes do sistema imune humano, atuando no reconhecimento de antígenos (Roque *et al.*, 2004). As imunoglobulinas G (IgGs) de origem humana, com alto grau de pureza, têm sido empregadas como prescrições terapêuticas nos seguintes casos (Bernard *et al.*, 1990; Kempf *et al.*, 2007):

a) de imunodeficiências congênitas ou adquiridas (por exemplo, AIDS), onde o paciente pode apresentar deficiência global ou de alguma subclasse de IgG;

b) de 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) de tratamento de doenças auto-imunes. Por exemplo, no caso da púrpura trombocitopênica, a injeção intravenosa de IgG eleva em poucas horas o nível de plaquetas;

d) de tratamento de alguns tipos de câncer (por exemplo, leucemia linfocítica crônica).

As doenças acima citadas requerem, geralmente, grandes doses de IgG para o seu tratamento, doses essas que podem chegar a vários gramas por paciente por ano (Bernard *et al.*, 1990; Kempf *et al.*, 2007). Como a demanda de imunoglobulinas é alta, os países que não as produzem em larga escala necessitam importá-las (Hemoderivados, 2006). A necessidade atual de imunoglobulinas no Brasil é de 25,5 ton, porém, no Brasil, a produção de hemoderivados é restrita, no momento, a uma única planta piloto localizada em Recife, que produz exclusivamente albumina (produção esta que atende somente a 6% da demanda nacional de albumina) (Hemoderivados, 2006). Assim, o Brasil despendeu, no ano de 2005, aproximadamente R\$ 430 milhões com a importação de hemoderivados, sendo 37% deste valor correspondente às imunoglobulinas (Hemoderivados, 2006).

Devido a estes problemas de produção de hemoderivados no Brasil, foi criada a empresa pública de Hemoderivados e Biotecnologia – HEMOBRÁS, que tem previsão para início de operação no ano de 2010. A fábrica terá capacidade de fracionar 500 mil litros de plasma por ano, tornando assim o país auto-suficiente na produção de albumina, imunoglobulinas e fator IX, além de poder suprir de 35% a 40% da demanda do fator VIII. Em relação à tecnologia, a HEMOBRÁS vai permitir que o país domine todas as etapas do processo produtivo num setor atualmente concentrado em poucos países (Hemobrás, 2006).

1.2. Tecnologias de purificação de IgG humana

Tradicionalmente as indústrias farmacêuticas purificam IgG a partir do plasma humano (seja para aplicações intravenosas ou intramusculares) pela técnica de precipitação com etanol, de acordo com o procedimento descrito por Cohn *et al.*, (1946). Atualmente, a purificação de proteínas do plasma utilizando

métodos mais seletivos (cromatográficos), tem sido vista pela indústria farmacêutica como uma operação indispensável antes da utilização destas no campo terapêutico, uma vez que proteínas altamente purificadas limitam os riscos de efeitos colaterais nos pacientes, aumentando a eficácia clínica (Burnouf, 1995; Burnouf e Radosevich, 2001). Processos cromatográficos têm sido empregados após as etapas de precipitação com etanol com o intuito de remover proteínas contaminantes ou para eliminar produtos químicos para a inativação viral da solução de IgG (Burnouf e Radosevich, 2001). Tais processos são baseados em técnicas envolvendo cromatografia de troca iônica e, como os adsorventes empregados não apresentam alta seletividade, são necessárias etapas adicionais para eliminação de contaminantes para obter-se, no final do processo, IgG com grau de pureza acima de 95% (Tanaka *et al.*, 1998 e 2000; Burnouf e Radosevich, 2001).

A purificação de IgG tem sido também realizada por cromatografia de afinidade com proteínas A e G imobilizadas. Nestes processos, devido à alta especificidade do ligante acoplado a fase estacionária, a etapa inicial de precipitação pode ser evitada, possibilitando a purificação de IgG em uma única etapa. Contudo, a contaminação do produto com traços do ligante devido ao desprendimento deste sob as condições de eluição a valores de pH muito baixos, representa um sério problema para soluções protéicas destinadas a aplicação terapêutica. Além disso, a sanitização sob condições drásticas pode inativar com o tempo estes ligantes, levando a perda da capacidade de adsorção. Em adição, o alto custo desta técnica tem limitado a sua utilização (Anspach *et al.*, 1996).

A fim de contornar os problemas inerentes a cromatografia de afinidade para purificação de IgG em uma única etapa, tem sido proposto o emprego de ligantes de menor tamanho, mais simples e de baixo custo, tais como aminoácidos (El-Kak e Vijayalakshmi, 1991; Bueno *et al.*, 1995, 1996; Ventura *et al.*, 2001; Çanak *et al.*, 2004), peptídeos (Yang *et al.*, 2005) quelatos metálicos (Vançan *et al.*, 2002; Bayramoglu *et al.*, 2006), ligantes tiofílicos (Boschetti *et al.*, 2002), além

de outras técnicas cromatográficas, como a cromatografia negativa (Lowe *et al.*, 1982; Bird *et al.*, 1984; Persson 1987; Tanaka *et al.*, 1998 e 2000, Pitiot *et al.*, 2001, Bresolin *et al.*, 2009).

1.3. Cromatografia negativa para purificação de IgG humana

A técnica de cromatografia negativa, empregada há várias décadas para purificação de IgG de diversas fontes, é baseada na não interação da proteína alvo com o adsorvente, enquanto as outras proteínas contidas na solução de alimentação são adsorvidas. Em 1959, Fahey e Horbett estudaram o desempenho de adsorventes aniônicos, como DEAE, para purificação de IgG humana por cromatografia negativa. Na década de 80, Lowe e colaboradores (1982), Bird e colaboradores (1984) e Persson (1987) utilizaram DEAE-celulose para pré-purificar IgG humana total (contendo todas as subclasses) por cromatografia negativa com a finalidade de separar subclasses de IgG por cromatografia de afinidade (positiva e negativa) em agarose contendo anticorpos monoclonais anti-subclasses 1, 2, 3 e 4 imobilizados. Os autores, não divulgaram, no entanto, o grau de pureza da IgG total pré-purificada por cromatografia negativa em DEAE-celulose, tampouco o rendimento obtido no processo.

Mais recentemente, Tanaka e colaboradores (1998, 2000) e Martin (2006) relatam o emprego de cromatografia negativa em trocadores aniônicos (DEAE- e Q-Sepharose FF) como uma das etapas do processo de purificação de IgG humana. Como os autores descrevem um processo multietapas para purificação de IgG, somente o rendimento global e pureza final do produto são divulgados.

Pitiot e colaboradores (2001) demonstraram a potencialidade da técnica da cromatografia negativa para a purificação de IgG a partir do plasma humano empregando o ligante pseudobioespecífico histidina imobilizado via espaçador aminohexil em gel de agarose (aminohexil-histidina-agarose), obtendo-se IgG humana nas frações não retidas. Neste trabalho, os autores dosaram somente IgG e albumina (Alb) nas frações cromatográficas, não fornecendo informações a

respeito da não retenção ou adsorção de outras proteínas que se encontram relativamente em altas concentrações no plasma (não dosaram imunoglobulina M (IgM), imunoglobulina A (IgA) e transferrina (Trf), por exemplo). Para obter IgG com alta pureza eletroforética, o plasma necessitou ser diluído 20 vezes antes de ser alimentado na coluna. Contudo, para menores fatores de diluição, IgG foi obtida nas frações não retidas contaminada com outras proteínas, principalmente albumina e transferrina.

Ainda segundo Pitiot *et al.*, (2001), proteínas do plasma humano são adsorvidas em aminohexil-histidina-agarose a baixos valores de força iônica. A adsorção pode ser devido a propriedades estruturais da biomolécula como a presença de uma repartição particular de cargas, e não devido a uma função biológica. Os grupamentos NH_3^+ e o anel imidazol do aminoácido histidina imobilizado contribuem predominantemente nas interações eletrostáticas (carga-carga e carga-dipolo), em cooperação com outras interações tais como hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e Van der Waals.

Com base nos estudos dos diversos autores citados (Lowe *et al.*, 1982; Bird *et al.*, 1984; Persson, 1987; Tanaka *et al.*, 1998 e 2000; Pitiot *et al.*, 2001 e Martin, 2006), pode-se concluir que ligantes com carga positiva contendo grupamentos amina (primária, secundária ou terciária) são candidatos a serem empregados em processos de purificação de IgG por cromatografia negativa.

Fundamentado nisso, nosso grupo de pesquisa desenvolveu trabalhos na área de cromatografia negativa utilizando a poliamina TREN (Tris (2-aminoetil amina)) imobilizada em géis de agarose, nos quais IgG foi purificada em uma única etapa a partir do soro humano, atingindo-se um grau de pureza superior a 90% (Santos *et al.*, 2006a, 2006b; Bresolin *et al.*, 2009). Diante dos resultados de purificação de IgG por cromatografia negativa com TREN imobilizado, investigou-se, neste trabalho, o potencial de utilização de diaminas lineares, tais como 1,3 propanodiamina, 1,6 hexanodiamina, 1,8 octanodiamina, 1,10 decanodiamina e

1,12 dodecanodiamina como ligantes para a purificação de IgG humana por cromatografia negativa.

1.4. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de adsorventes com diaminas lineares imobilizadas através de uma das aminas em gel de agarose visando purificar IgG humana por cromatografia negativa, em uma única etapa, com alto grau de pureza (no mínimo de 90%) a partir do soro e plasma humano.

Para atingir o objetivo proposto, esta pesquisa constou das seguintes etapas:

- Estudo do efeito do número de carbonos (3, 6, 8, 10 e 12) da diamina linear imobilizada e do tipo de ativação do gel (CNBr e bisoxirano) no grau de pureza da IgG humana purificada por cromatografia negativa. Foram realizados ensaios cromatográficos com soro e plasma humano, pois são as matérias-primas empregadas para purificação de IgG. Nestes estudos variou-se o sistema tamponante (MES, MOPS e HEPES) e pH do tampão utilizado na etapa de alimentação;

- Estudo do efeito da diluição do soro e plasma humano na purificação de IgG por cromatografia negativa. Foram realizados inicialmente ensaios com a diluição de 20 vezes para todos os adsorventes testados, pois na literatura consultada (Pitiot *et al.*, 2001) obtiveram melhores resultados de purificação de IgG para esta condição. A diluição de 10 vezes para soro e plasma humano foi analisada para os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, visto que os pesquisadores citados também estudaram esta condição;

- Determinação das curvas de ruptura ("breakthrough"), que permitem determinar a capacidade dinâmica dos adsorventes, quanto soluto é perdido no efluente e, o tempo de processo. Definiu-se que o ponto de ruptura destas curvas

é o ponto em que a IgG começa a ser detectada com impurezas na saída da coluna. Este procedimento é utilizado em processos industriais para minimizar a perda de produtos na linha de saída durante a etapa de alimentação (Charcosset *et al.*, 1995);

- Ensaios cromatográficos com o adsorvente controle DEAE-agarose, que é um gel utilizado também por vários autores para purificação de IgG, a fim de comparar os resultados desta cromatografia clássica com os obtidos neste trabalho da purificação empregando-se diaminas lineares imobilizadas em agarose;

- Determinação dos pontos isoelétricos (pI) das moléculas de IgG que são adsorvidas e não adsorvidas nas matrizes ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose (adsorventes cuja IgG purificada foi obtida com pureza acima de 95%). Experimentos cromatográficos e eletroforese de focalização isoelétrica (*Isoelectric Focusing* – IEF) foram realizados para a obtenção destes resultados;

- Determinação de isotermas de adsorção de IgG e albumina por meio de ensaios em tanques agitados, utilizando os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose (adsorventes cuja IgG purificada foi obtida com pureza acima de 95%) para determinação dos parâmetros capacidade máxima de adsorção e da constante de dissociação (parâmetros úteis para o escalonamento do processo).

Para a melhor visualização e entendimento das etapas realizadas, tem-se o diagrama da Figura 1-1.

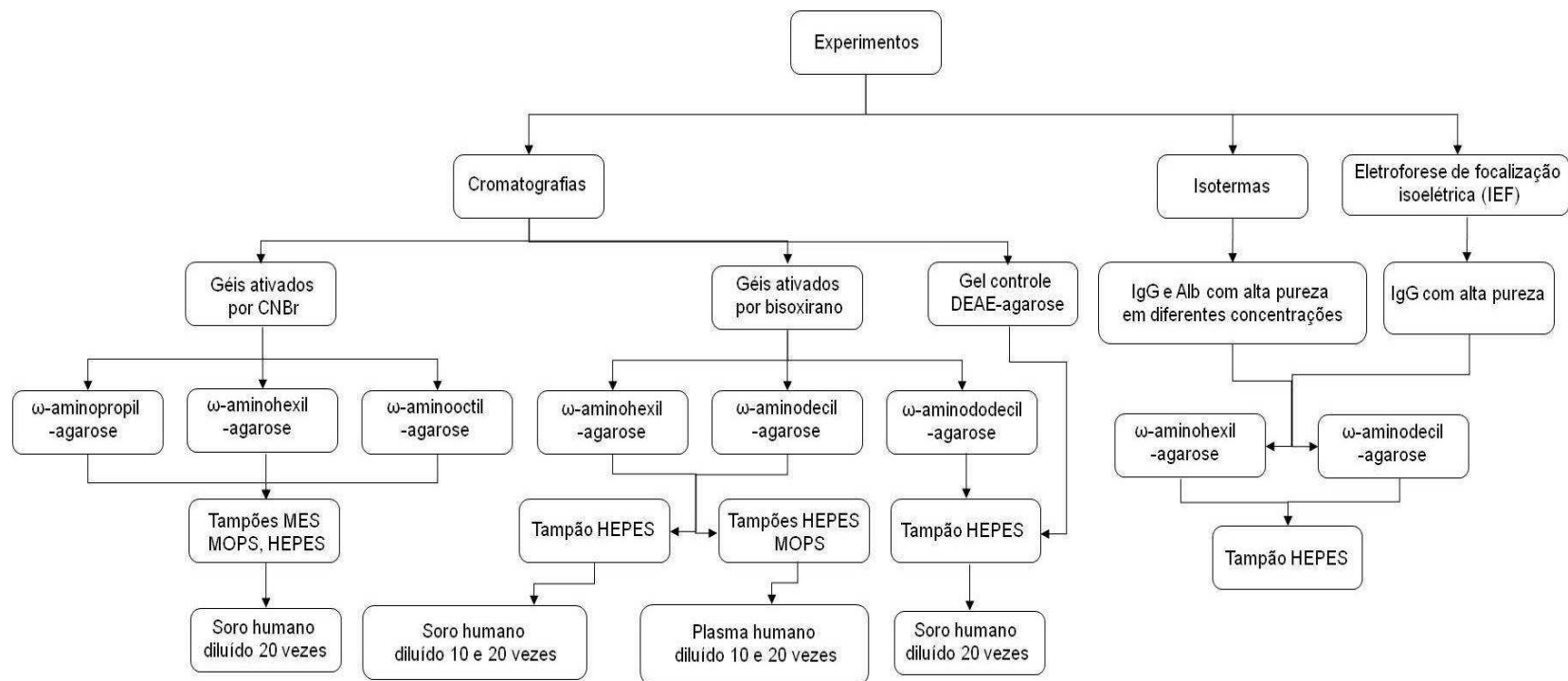


Figura 1-1: Diagrama contendo as etapas realizadas para a realização do trabalho.

Capítulo 2: Revisão bibliográfica

2.1. Imunoglobulinas

Quando um antígeno entra no organismo humano, um mecanismo de resposta imune que pode ser ativado é a secreção de anticorpos pelos linfócitos B do sangue. Estes linfócitos produzirão moléculas de anticorpos (imunoglobulinas) que apresentam sítios de ligação que reconhecem um determinado sítio na estrutura da substância estranha e a ele se liga. A combinação do anticorpo com o antígeno desencadeia um processo que pode neutralizar e eliminar a substância estranha (Milstein, 1980).

Todos os anticorpos são específicos em maior ou menor grau para determinadas substâncias, mas possuem estruturas químicas diferentes, e se ligam ao mesmo, porém com diferentes graus de afinidade. Desde sua descoberta eles vêm sendo produzidos em laboratórios, quase sempre pela imunização de animais apropriados (camundongos, ratos e coelhos, entre outros). Anticorpos que são formados por diversos clones de células, são chamados de anticorpos policlonais e anticorpos de especificidade única são ditos monoclonais (Augusto e Oliveira, 2001).

As imunoglobulinas pertencem ao grupo das glicoproteínas e são compostas de 82 a 96% de proteínas e de 4 a 18% de carboidratos. Estruturalmente, essas moléculas possuem uma configuração comum em forma de “Y” (Figura 2-1) constituídas de duas cadeias polipeptídicas leves e duas cadeias pesadas, sempre em pares idênticos. As quatro cadeias mantêm-se unidas por ligações covalentes de dissulfeto e por interações não covalentes. As duas cadeias leves (CL) (de massa molecular de 25 kDa) são menores e comuns a todas as classes de imunoglobulinas e as cadeias pesadas (CH) (50 a 70 kDa) são maiores, com estruturas distintas em cada classe ou subclasse (Holt *et al.*, 2003).

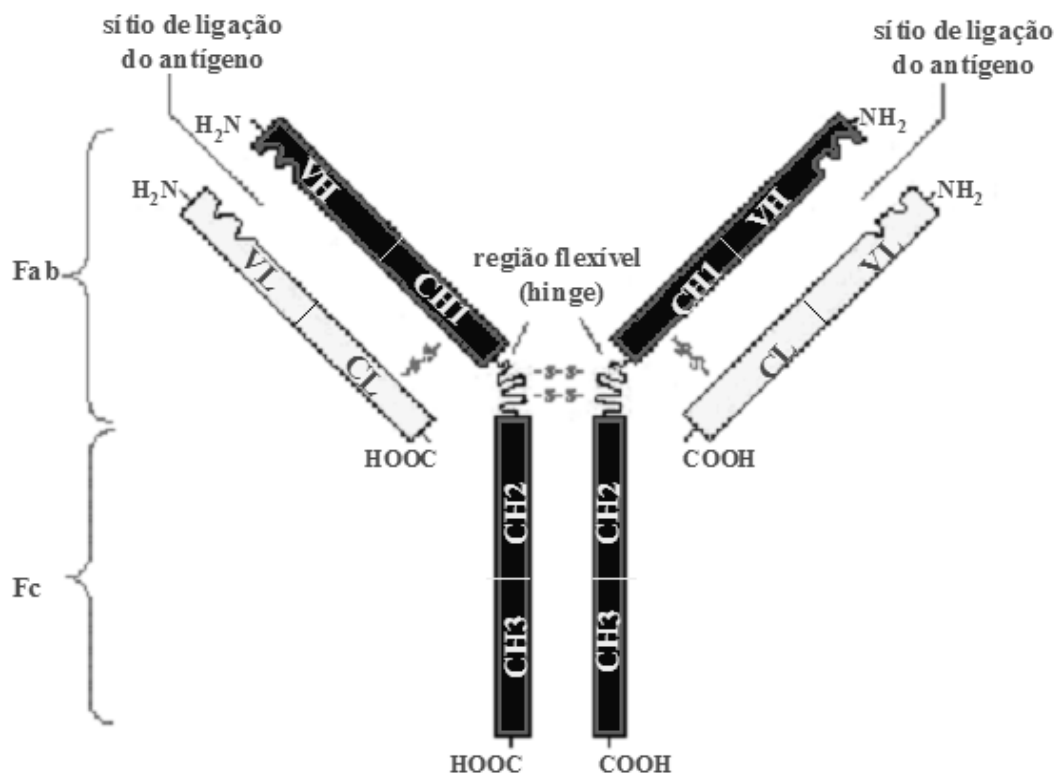


Figura 2-1. Estrutura da imunoglobulina G (IgG) e seus fragmentos Fab e Fc (adaptado de Alberts *et al.*, 1997).

As imunoglobulinas podem ser clivadas por enzimas proteolíticas, como a papaína e pepsina, em diferentes fragmentos característicos conforme ilustrado na Figura 2-2. A papaína produz dois fragmentos Fab idênticos, cada um contendo um sítio que se liga ao antígeno, e um fragmento Fc. A pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ e o restante da molécula é clivada em fragmentos menores, do tipo pFc' (Jawets *et al.*, 1998).

A produção de fragmentos Fab (região amino terminal que se liga ao antígeno) e $F(ab')_2$ (constituído por dois fragmentos Fab ligados covalentemente) reduz significativamente as reações de hipersensibilidades no organismo, pois o fragmento Fc (região carboxila terminal) que causaria esta sensibilidade não estaria presente, sendo por esta razão, imprescindível a purificação dos fragmentos $F(ab')_2$ e Fab por diversas técnicas. Apesar do fragmento Fc não possuir atividade antigênica, este está envolvido em processos importantes de

transferência placentária, na fixação de complemento, na ligação a várias células e outras atividades biológicas (Newcombe e Newcombe, 2007).

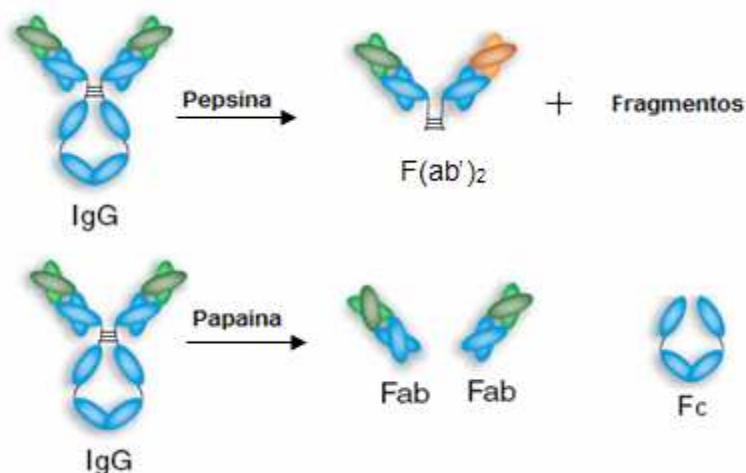


Figura 2-2. Representação esquemática de fragmentos de imunoglobulinas geradas por digestão enzimática. Fc é identificado com o subscrito “c” por ser cristalizável (adaptado de Holliger e Hudson, 2005).

As cadeias leves que fazem parte da região Fab podem ser do tipo κ (kappa) ou λ (lambda) e são formadas por dois domínios, um variável (V_L) e outro constante (C_L) (Vlug e Van Remortel, 1989). As cadeias pesadas são características dos tipos de imunoglobulinas e diferem entre si a partir da estrutura das cadeias pesadas: IgG (γ), IgM (μ), IgA (α), IgD (δ) e IgE (ϵ) (Vlug e Van Remortel, 1989). As cadeias pesadas possuem uma parte variável (V_H) e três partes constantes C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} , sendo que as IgM e IgE possuem um domínio constante extra (C_{H4}). A região constante da cadeia leve (C_L) da IgG tem aproximadamente 110 aminoácidos, enquanto a região constante da cadeia pesada (C_H) possui 330. Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas constituem os sítios ligantes de antígeno (Abbas e Lichtman, 1994).

As propriedades específicas para ligação de um antígeno em uma molécula de IgG, são dadas pelo arranjo tridimensional, inerentes à seqüência de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias leve e pesada da molécula. Esta

porção das imunoglobulinas é chamada determinante idiotípico ou idiotipo. Apenas um determinante antigênico terá um perfeito encaixe com esta disposição, garantindo assim uma grande especificidade na resposta imune. O restante da molécula de imunoglobulina de qualquer classe é relativamente constante (Male, 1986).

Devido a diferenças biológicas, antigênicas e estruturais da cadeia pesada, cinco classes de imunoglobulina foram diferenciadas no soro humano (Alberts *et al.*, 1997): IgE, IgD, IgA, IgM e IgG.

A IgE (massa molecular de 190 kDa) está presente no soro humano sob a forma de monômero, e dentre todas as classes de imunoglobulinas, é aquela encontrada em quantidades ínfimas no soro (17-450 ng/mL, correspondendo a um total de 0,002% das imunoglobulinas), podendo estar associada a reações alérgicas.

A IgD (massa molecular próxima de 180 kDa) representa menos de 1% das imunoglobulinas séricas, estando presente no soro humano sob a forma de monômero. Sua função biológica ainda não é bem conhecida, mas possivelmente age como um dos principais receptores para antígenos na superfície dos linfócitos B.

A IgA (massa molecular de 160 kDa) corresponde de 10 a 15% das imunoglobulinas séricas. É a imunoglobulina predominante nas secreções como saliva, lágrima e leite, dentre outros. A IgA desempenha um papel importante na defesa do corpo quando se verifica a invasão de microorganismos através da membrana mucosa e está presente no soro humano usualmente em forma de dímero.

A IgM (massa molecular próxima de 900 kDa) representa cerca de 10% do total de imunoglobulinas séricas e atua no início da resposta imune. Está presente no soro humano usualmente em forma de pentâmero.

A IgG (massa molecular em torno de 150 kDa) é a imunoglobulina predominante em todas as idades e responde por 75 a 80% das imunoglobulinas séricas na fase adulta. É produzida nos últimos estágios da resposta imune, encontrando-se na forma de monômero. A IgG humana apresenta quatro subclasses distintas (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), que possuem quatro cadeias pesadas, similares, que são diferenciadas, principalmente, pela região flexível (Figura 2-1) em termos de números de resíduos envolvidos e número de pontes dissulfeto intercadeias pesadas. As subclasses de IgG possuem pontos isoelétricos (pI) distintos: IgG₁ e IgG₃ possuem pI mais altos (de 7,8 a 9,0) que os da IgG₂ e IgG₄ (de 6,3 a 8,0) (Vlug e Van Remortel, 1989). As concentrações relativas das subclasses no soro humano variam de 68-71% para IgG₁, 19-31% para IgG₂, 4-8% para IgG₃ e 1-7% para IgG₄.

A IgG (geralmente obtidas de fluidos biológicos ou de sobrenadantes de cultura celular) são de grande interesse para aplicações terapêuticas (preparação de antisoro e anticorpos autocatalíticos), para diagnósticos (imunotestes, testes ELISA) e para purificação de anticorpos e antígenos (ligantes em cromatografia de imunoafinidade). Essas aplicações requerem aparatos eficientes para purificação e manutenção da atividade dos constituintes (Balvay *et al.*, 2004).

2.2. Purificação de IgG humana

Diversas técnicas têm sido empregadas para purificação de imunoglobulinas do soro/plasma humano ou de sobrenadante de culturas de células de hibridomas, destacando-se a precipitação e as cromatografias de troca iônica, de afinidade e de permeação em gel. Para aplicações terapêuticas e testes diagnósticos, requer-se IgG com grau de pureza elevado (maior que 90% para aplicação intramuscular), assim, é importante que se faça uso de uma metodologia de purificação IgG que resulte em bom rendimento, alto grau de pureza, e que não eleve o custo do produto final (Gagnon, 1994).

IgG humana é purificada a partir das demais proteínas do plasma ou do soro, onde a albumina (Alb) é a proteína mais abundante, seguida de IgG, transferrina (Trf), IgA e IgM. As concentrações plasmáticas das principais proteínas do plasma humano são apresentadas na Tabela 2-1 (Andrade e Hlady, 1987), ressaltando-se que o plasma possui outros constituintes em menor quantidade, como os complementos C₃ e C₄, fatores anti-hemofílicos (fator VIII e fator IX), fibrinogênio, dentre outros.

Tabela 2-1. Concentração das principais proteínas do plasma humano (adaptado de Andrade e Hlady, 1987).

Proteínas	Massa molecular (kDa)	Concentração plasmática (mg/mL)
IgG	150	8,0 a 18,0
IgA	160	0,9 a 4,5
IgM	900	0,6 a 2,5
Alb	66,3	35,0 a 55,0
Trf	76,5	2,0 a 4,0

Cohn *et al.*, (1946) desenvolveu uma técnica para purificação de IgG a partir do plasma humano, a precipitação com etanol a frio. Este método é baseado na mudança de solubilidade das proteínas por ajuste de pH, temperatura, concentração de sal e etanol. O plasma humano é descongelado até uma determinada temperatura, na qual algumas proteínas têm baixa solubilidade (fibrinogênio e fator VIII). O precipitado formado (crioprecipitado) é removido e o sobrenadante (criosobrenadante) é fracionado por sucessivas precipitações com etanol. Os produtos resultantes do processo consistem num concentrado de IgG (fração II ou fração II e III) e Alb (fração V) (Cohn *et al.*, 1946, Martin, 2006).

Outros processos para purificação de IgG humana foram descritos na literatura, sendo baseados no método de Cohn *et al.*, (1946), por exemplo, o

método de Kistler-Nitschmann. Este método foi desenvolvido para obtenção de um melhor rendimento e menor tempo de manipulação do produto, sendo uma metodologia utilizada apenas pela empresa ZLB-Behring e empresas autorizadas (Kistler e Nitschmann, 1962, Martin, 2006).

Métodos mais seletivos (cromatográficos) para a purificação de IgG para aplicação terapêutica tem sido estudados nas últimas décadas com o intuito de obter maior grau de pureza, em uma única etapa. Industrialmente a empresa Danish possui um produto viável produzido por cromatografia e a empresa Bayer HealthCare (Talecris Biotherapeutics) introduziu uma nova tecnologia, baseada na cromatografia, na indústria de fracionamento de plasma após aproximadamente 20 anos de estagnação (Martin, 2006).

A matéria-prima utilizada para obtenção de IgG pela empresa Bayer HealthCare são as frações Cohn II+III, em que é adicionado caprilato de sódio (forma não ionizada do ácido caprílico) para precipitação de proteínas. IgG é obtida no sobrenadante; a solução obtida contendo IgG e caprilato (forte agente inativador de vírus) é incubada por 1 h a 25°C para inativação viral. O material é clarificado e filtrado (retirada de vírus) (Lebing *et al.*, 2003).

Após este processo, a solução passa por um sistema cromatográfico que contém duas colunas de troca aniônica. Este procedimento foi desenvolvido para a purificação de IgG e remoção de caprilato simultaneamente. O princípio cromatográfico, neste caso, é a não interação da IgG com o adsorvente (IgG coletada com elevada pureza) e a retenção de caprilato e demais proteínas que estão carregadas negativamente no adsorvente (Lebing *et al.*, 2003). A solução de IgG com alta pureza é diafiltrada para ajuste de pH e força iônica. Após esta etapa, IgG é novamente ultrafiltrada para remoção de água. A produto final é formulado a pH 4,25 e uma concentração de 100 mg de IgG/mL e 0,2 M de glicina (Lebing *et al.*, 2003, Martin, 2006). Este processo diminui as etapas que consistiam na continua precipitação por etanol a frio (Martin, 2006).

Dada a importância do estudo da técnica de cromatografia para o melhoramento da purificação de IgG industrialmente, tem-se a seguir os fundamentos dos tipos de cromatografia mais estudadas.

A cromatografia de afinidade, por ser altamente seletiva, tem sido empregada nas plantas de fracionamento do plasma humano com o objetivo de aumentar a pureza dos hemoderivados de um modo geral e, conseqüentemente, eliminar os efeitos colaterais tais como hemólise, hipotensão e febre, que são associados ao uso clínico de IgG com baixo grau de pureza. Com esta técnica, pode-se obter IgG altamente purificada em uma única etapa, com maior rendimento, evitando as perdas causadas por clivagem proteolítica ou pela clivagem de ligações dissulfeto, que acarretam na liberação de cadeias leves e pesadas no meio (Huse *et al.*, 2002).

A cromatografia de afinidade é uma técnica altamente seletiva baseada na ligação reversível e específica de substâncias a moléculas complementares chamadas de ligantes, os quais são imobilizados covalentemente a uma matriz cromatográfica. A cromatografia de afinidade para purificação de IgG baseia-se na capacidade desta proteína reconhecer e ligar-se a antígenos (características relativas à região Fab da molécula) ou de interagir com diversas outras moléculas, por exemplo, proteínas e aminoácidos. Esta função é devido a região constante ou cristalizável Fc da molécula (Huse *et al.*, 2002; Verdoliva *et al.*, 2002).

Um dos parâmetros importantes a ser considerado é o tipo de ligante utilizado na cromatografia de afinidade. Dentre esses ligantes encontram-se os antígenos, cujas cromatografias apresentam fatores elevados de recuperação e purificação. Esta característica é devido a forte interação com a proteína alvo (constante de dissociação (K_d) entre 10^{-9} e 10^{-15} M), porém esta propriedade leva a necessidade de condições drásticas de eluição (valores extremos de pH e força iônica) que podem afetar a atividade dos ligantes imobilizados e da proteína purificada (Muronetz e Korpela, 2003).

Outros ligantes utilizados em cromatografia de afinidade para purificação de IgG são as proteínas A, G e L, considerados ligantes bioespecíficos (Balvay et al., 2004). A proteína A possui elevada afinidade pela porção Fc das imunoglobulinas humanas das subclasses 1, 2 e 4, contudo essa característica não é observada para a subclasse 3. Este fato é explicado pela posição do resíduo de histidina nas moléculas de imunoglobulinas, pois todas as IgG que interagem com a proteína A contém histidina na posição 435, enquanto que as IgG humanas que não interagem possuem arginina nesta posição. Além da interação com a IgG, a proteína A apresenta afinidade média pelas proteínas IgA e IgM humana (Burton, 1985; Burton *et al.*, 1986).

A diferença de afinidade entre a proteína A e a G é que a última interage com todas as subclasses de IgG humana, ligando-se as partes Fc e a Fab da IgG, porém essa proteína não apresenta interação com as demais classes de imunoglobulinas humanas (IgA, IgM, IgE e IgD) (Erntell *et al.*, 1988). A proteína L apresenta afinidade pelas cadeias leves do tipo kappa das imunoglobulinas (Nilson *et al.*, 1993) e tendo sido usada em estudos *in vitro* que visavam o tratamento extracorpóreo de doenças auto-imunes para remoção de IgG de cadeia leve kappa (Duarte *et al.*, 2005).

Os ligantes bioespecíficos apresentam alta especificidade por IgG, porém esta característica mostra-se limitada em relação a obtenção de produtos protéicos com alta pureza destinados a aplicação terapêutica, uma vez que as condições drásticas de eluição (pH extremos) proporcionam o desprendimento do ligante, tornando, assim, o produto alvo contaminado. Outra condição drástica que pode afetar a atividade do ligante é a sanitização da coluna com hidróxido de sódio, que leva a perda da capacidade de adsorção com o tempo. Além dos problemas apresentados, tem-se o alto custo dos ligantes utilizados (Anspach et al., 1996; Hale e Beidler, 1994).

Uma alternativa promissora a esses ligantes bioespecíficos são os ligantes pseudobioespecíficos tais como triptofano e histidina (aminoácidos), íons

metálicos quelatados e corantes. Esta família de ligantes poderá ser estendida a ligantes tiofílicos e pequenos peptídeos produzidos por combinações de bibliotecas de peptídeos (Balvay *et al.*, 2004).

Ligantes pseudobioespecíficos possuem a vantagem de terem baixo custo, de serem moléculas menores e mais simples do que os ligantes bioespecíficos, de terem estabilidade química e física mais alta do que os bioespecíficos e apresentarem condições brandas de eluição (as constantes de dissociação são da ordem de 10^{-2} a 10^{-6} M). Porém, possuem a desvantagem de serem menos específicos. Dentre os ligantes pseudobioespecíficos, os quelatos metálicos (Porath e Olin, 1983; Boden *et al.*, 1995; Vançan *et al.*, 2002; Serpa *et al.*, 2005), os peptídeos (Yang *et al.*, 2005), o aminoácido histidina (Bueno *et al.*, 1995, 1996; Ventura *et al.*, 2001; Çanak *et al.*, 2004) e os agentes tiofílicos (Boschetti *et al.*, 2002) são os ligantes mais utilizados nos processos de purificação de imunoglobulinas.

A cromatografia de troca iônica é uma técnica comumente empregada para a purificação de anticorpos policlonais e monoclonais (Huse *et al.*, 2002). Essa técnica é baseada na capacidade que adsorventes com grupos carregados ligados a matriz tem de trocar íons com proteínas também carregadas. Os adsorventes trocadores de íons são diferenciados em catiônicos e aniônicos, sendo os catiônicos trocadores de cátions (matriz carregada negativamente) e os aniônicos trocadores de ânions (matriz carregada positivamente). A escolha da matriz deve ser baseada nas interações entre a proteína alvo e o adsorvente, sendo essas influenciadas pela carga líquida e sua distribuição na superfície da proteína, natureza e força iônica do tampão e pH e aditivos do tampão (substâncias orgânicas, detergentes, estabilizantes, dentre outros) (Jan e Rydén (1989)).

O adsorvente de troca iônica DEAE (dietil aminoetil) é utilizado para purificação de IgG, sendo empregado em 1959 por Fahey e Horbett para purificação de imunoglobulinas por cromatografia de troca iônica em DEAE-

celulose (Fahey e Horbett, 1959) e pelos pesquisadores Persson (1987), Bird *et al.* (1984) e Lowe *et al.* (1982) para purificação de IgG total (contendo todas as subclasses) em gel DEAE-celulose como uma pré-purificação para a separação de subclasses de IgG em colunas Sepharose contendo anticorpos monoclonais imobilizados. Nestes trabalhos, IgG foi obtida nas frações cromatográficas não retidas, não interagindo, portanto, com o adsorvente de troca iônica.

Os trocadores aniônicos DEAE-, Q- e CM-Sepharose FF foram utilizados em duas etapas cromatográficas distintas em processos de purificação de IgG multietapas, a partir das frações Cohn e de criossobrenadante (Tanaka *et al.*, 1998, 2000). Os procedimentos cromatográficos constaram da adsorção de impurezas da fração Cohn ou do criossobrenadante, em colunas Q- e DEAE-Sepharose FF, respectivamente, sendo o efluente (contendo IgG não retida) destas colunas alimentado, respectivamente, em uma coluna contendo o gel CM-Sepharose FF e em duas colunas conectadas em série, a primeira contendo 40% de arginina e 60% DEAE-Sepharose FF e a segunda contendo o gel CM-Sepharose FF com o intuito de separar IgG das impurezas. A solução de IgG purificada obtida foi ainda alimentada em coluna de filtração em gel, concentrada, passando por um processo de inativação viral. Estes processos podem ser realizados para produção de IgG em larga escala (Tanaka *et al.*, 1998, 2000).

A partir dos exemplos citados sobre purificação de IgG por cromatografia de troca iônica, observa-se que para alguns processos IgG não é adsorvida na coluna cromatográfica, enquanto que as impurezas são adsorvidas. O processo que envolve a não adsorção da proteína alvo e retenção das impurezas e contaminantes contidos na solução de alimentação na coluna cromatográfica é chamado de cromatografia negativa.

2.3. Purificação de proteínas por cromatografia negativa

A cromatografia negativa tem sido vista como uma opção de baixo custo e de fácil escalonamento para purificação de IgG a partir do soro e plasma humano.

Esta técnica cromatográfica consiste na adsorção das impurezas da solução proteica (neste caso as proteínas do soro e plasma humano) no ligante imobilizado na matriz sólida, enquanto a proteína alvo (neste caso a IgG) é eliminada na etapa de lavagem do adsorvente.

Esta técnica vem sendo estudada por diversos autores, pois apresenta menor contaminação da proteína alvo (pouca ou nenhuma interação com o adsorvente). Dentre estes autores pode-se citar: Fahey e Horbett, (1959); Lowe *et al.* (1982); Bird *et al.* (1984); Persson (1987); Levison *et al.* (1990); Tanaka *et al.* (1998 e 2000); Pitiot *et al.* (2001); Levison (2003) e Bresolin *et al.* (2009).

Os ligantes bioespecíficos e pseudobioespecíficos podem também ser utilizados em cromatografia negativa. Um exemplo é o uso do aminoácido histidina, cujas propriedades como hidrofobicidade branda, habilidade de transferência de carga e ataque nucleofílico devido ao seu anel imidazol (Vijayalakshmi, 1989) sugerem que este aminoácido, quando imobilizado em suportes sólidos, possa interagir com proteínas de várias formas, dependendo das condições (pH, temperatura, força iônica) empregadas e orientação da imobilização (Vijayalakshmi, 1989; El-Kak e Vijayalakshmi, 1991; Haupt *et al.*, 1995). A carga positiva do ligante, no caso de histidina imobilizada, promove a adsorção da maioria das proteínas do plasma e soro humano e uma parte das moléculas de IgG são adsorvidas no gel, devido ao fato da IgG ser policlonal e possuir ampla faixa de pI (Pitiot *et al.*, 2001).

Pitiot *et al.* (2001) estudaram a purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia negativa utilizando o adsorvente histidina-aminohexil-Sepharose 4B. A massa de IgG não retida obtida neste processo foi de 6,46 mg de IgG (correspondendo a 72,6% da IgG alimentada) quando 1,0 mL de plasma humano foi diluído vinte vezes no tampão Mops a pH 7,2 foi alimentado na coluna. As moléculas de IgG que não interagiram com histidina imobilizada em agarose via braço espaçador aminohexil foram obtidas com alto grau de pureza nas frações não retidas (Pitiot *et al.*, 2001).

Bresolin e colaboradores (2006) também utilizaram a técnica de cromatografia negativa para purificar IgG a partir do soro humano em matriz agarose com o ligante Tris(2-aminoetil)amina (TREN) imobilizado (Bresolin *et al.*, 2006), obtendo-se grau de pureza acima de 90%.

Processos de purificação de IgG que possuem as frações Cohn como alimentação também usam a técnica de cromatografia negativa em uma das etapas de purificação. O processo desenvolvido pela Bayer HealthCare usa o princípio cromatográfico de não interação da IgG com o adsorvente e a retenção de caprilato e demais proteínas que estão carregadas negativamente (Lebing *et al.*, 2003). Tanaka e colaboradores (1998 e 2000) empregaram o princípio da cromatografia negativa uma das etapas do processo de purificação de IgG, em que as proteínas IgA, IgM, Trf e outras proteínas do plasma foram adsorvidas nas colunas Q- e DEAE-Sepharose FF (Tanaka *et al.*, 1998, 2000).

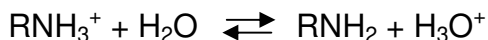
Em todos os processos cromatográficos descritos, a escolha do grupo funcional (ligante) é tão importante quanto a matriz e as condições cromatográficas empregadas (sistema tamponante, pH, temperatura e força iônica). Os ligantes mais empregados em cromatografia negativa para purificação de IgG humana são as aminas (trocares aniônicos). Deste modo, é necessário o conhecimento das propriedades desse composto químico, como descrito a seguir.

2.4. Compostos químicos orgânicos nitrogenados: aminas

As aminas pertencem a uma classe de compostos químicos orgânicos nitrogenados derivados da amônia (NH_3). Como a amônia, as aminas contêm um átomo de nitrogênio com um par de elétrons não compartilhados. A presença deste par de elétrons explica o seu comportamento básico e nucleofílico (McMurry, 2005).

As aminas são bases mais fortes do que a água, mas são bases muito mais fracas do que os íons hidróxido, íons alcóxidos e ânions alcaneto (Solomons

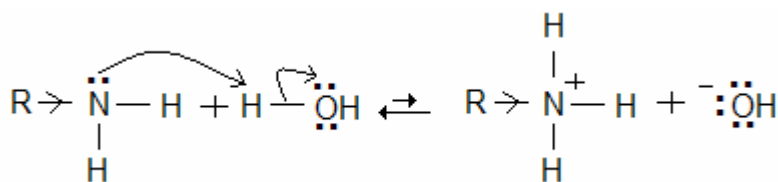
e Fryhle, 2002). Quando se pretende comparar as basicidades das aminas, é conveniente utilizar a constante de dissociação do correspondente íon alquilamínio (RNH_3^+). Esta constante de equilíbrio designada por K_a é dada pela seguinte expressão:



$$K_a = [\text{RNH}_2] [\text{H}_3\text{O}^+] / [\text{RNH}_3^+]; \quad \text{p}K_a = -\log K_a$$

Quanto mais ácido for um íon alquilamínio (maior K_a ou menor $\text{p}K_a$), mais fraca é a base. Assim, o íon amônio, que a 25º possui $\text{p}K_a = 9,26$, é levemente mais ácido do que os íons alquilamínios simples (metilamina, etilamina e propilamina), já que os $\text{p}K_a$ desses íons variam entre 10 e 11, portanto levemente mais básicos do que o NH_3^+ (McMurry, 2005).

A basicidade dos íons alquilamínios em relação ao íon amônio pode ser explicada com base na capacidade de um grupo alquila em ceder elétrons. A liberação de elétrons pelo grupo alquila estabiliza o íon alquilamínio (resultante da reação ácido-base) através da dispersão de sua carga positiva. Esse processo pode ser simplificado pela reação (Solomons, 2002):



As ligações realizadas pelos compostos aminas são caracterizadas pelo potencial eletrostático da molécula, que é a “nuvem” eletrônica presente na molécula (Solomons, 2002).

2.4.1. Aminas como ligantes em cromatografia líquida

Adsorventes com diaminas imobilizadas (por exemplo, 1,6 hexanodiamina, 1,5 pentanodiamina e aminododecil) são utilizados em cromatografia de afinidade para purificação de proteínas que apresentam afinidade por grupamentos amino,

dentre eles amino oxidases, lactoferrina, plasminogênio e proteínas contendo grupamentos tioésteres (Houen, 2001; Houen e Svendsen, 1998; Thomas *et al.*, 2001; Houen *et al.*, 1996).

A literatura relata também o emprego de poliaminas como ligante, tais como poli-L-lisina para remoção de certas moléculas de soluções protéicas (endotoxinas e bilirrubinas) (Anspach e Petsch, 2000; Shi *et al.*, 2005) e espermina para purificação de receptor de rianodina (Shoshanbarmatz e Zarka, 1992). Outra aplicação citada na literatura para poliaminas é o seu uso como braços espaçadores, como, por exemplo, nos adsorventes histidina-aminoxil-Sepharose para purificação de IgG (Pitiot *et al.*, 2001) e Nw-homocisteína-aminoxil-agarose para purificação de anticorpos contra as proteínas N-homocisteinadas (Perta *et al.*, 2004).

As poliaminas, por conterem dois ou mais grupamentos aminos em sua estrutura, estão sujeitas a interações de natureza eletrostática com as biomoléculas e de acordo com o tamanho da cadeia da poliamina imobilizada, os pares eletrônicos da poliamina estarão mais disponíveis para interações. Os ligantes contendo grupamento amina primária e secundária são trocadores de íons fracos, pois estes grupos normalmente estão protonados nos pH empregados para a adsorção de biomoléculas. Dependendo do comprimento da cadeia de hidrocarboneto, as interações de natureza hidrofóbica desempenharão um papel importante na adsorção e podem ser também exploradas para a purificação de biomoléculas.

Segundo os trabalhos publicados, o número de carbonos e o agente de ativação utilizado para a derivatização da matriz cromatográfica têm forte efeito na purificação, em adição às condições cromatográficas (sistema tamponante, pH, temperatura e força iônica), que devem ser minuciosamente estudadas para obtenção de alto fator de purificação.

As interações hidrofóbicas entre proteínas e matrizes com poliaminas imobilizadas dependem do tamanho do braço espaçador, e estas propriedades

têm sido exploradas para purificação de proteínas por cromatografia de interação hidrofóbica. Contudo, em relação à cromatografia de afinidade, braços espaçadores longos e hidrofóbicos podem contribuir para ocorrência de interações não específicas entre moléculas de proteínas e o braço espaçador (Houen *et al.*, 2001).

2.4.2. Matrizes cromatográficas e química de ativação e imobilização de ligantes para uso em cromatografia negativa

As matrizes cromatográficas utilizadas em cromatografia negativa devem apresentar as mesmas características dos suportes empregados em cromatografia de afinidade, ou seja, devem possuir como principal característica a hidrofiliidade, visando não favorecer adsorção não-específica de biomoléculas (Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Gutiérrez, 2007). Além disto, é essencial a presença de grupos funcionais que possibilitem a modificação química (ativação) do material para imobilização de ligantes. É importante que a matriz apresente também as seguintes características: alta resistência mecânica, elevada área superficial e porosidade, estabilidade em uma ampla faixa de pH, na presença de sais e solventes orgânicos (Porath, 1988; Chaga, 2001; Ueda, 2003; Gutiérrez, 2007; Porath e Olin, 1983; Bresolin, 2006; Ribeiro, 2006; Steinmann, 1994).

Dentre as matrizes mais comumente empregadas em cromatografia (agarose, celulose e dextrana) destaca-se a agarose, que é hidrofílica, química e fisicamente estável e relativamente inerte. Devido a estas propriedades, a agarose pode ser facilmente ativada para permitir a formação de uma estrutura química que proporcione a interação com biomoléculas (Wong *et al.*, 1991).

Os métodos de ativação mais empregados no gel agarose são a ativação por brometo de cianogênio (CNBr), epícloridrina (1- cloro - 2,3 - epóxiopropano) e bisoxiranos (por exemplo, 1,4-bis(2,3-epoxipropano)butano). Nestes processos de ativação, CNBr, epícloridrina e bisoxirano reagem com os grupos OH da matriz, tornando-a ativada (Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Gutiérrez, 2007).

Com a finalidade de evitar impedimentos estéricos usa-se, normalmente acoplar covalentemente braços espaçadores, ou seja, moléculas com a função de distanciar o ligante da matriz (por exemplo, poliaminas, que além de serem usadas como braço espaçador, são acopladas à matriz também como ligantes) (Gaberc-Porekar e Menart, 2001; Gutiérrez, 2007). A Figura 2-3 ilustra os esquemas de ativação da matriz agarose e as reações envolvidas no acoplamento dos ligantes diaminas.

O reagente utilizado para ativação de matrizes cromatográficas é de fundamental importância em cromatografia, pois diferentes ativações acoplam moléculas formando ligações covalentes distintas, resultando em adsorventes com diferentes características que podem influenciar na adsorção da molécula alvo.

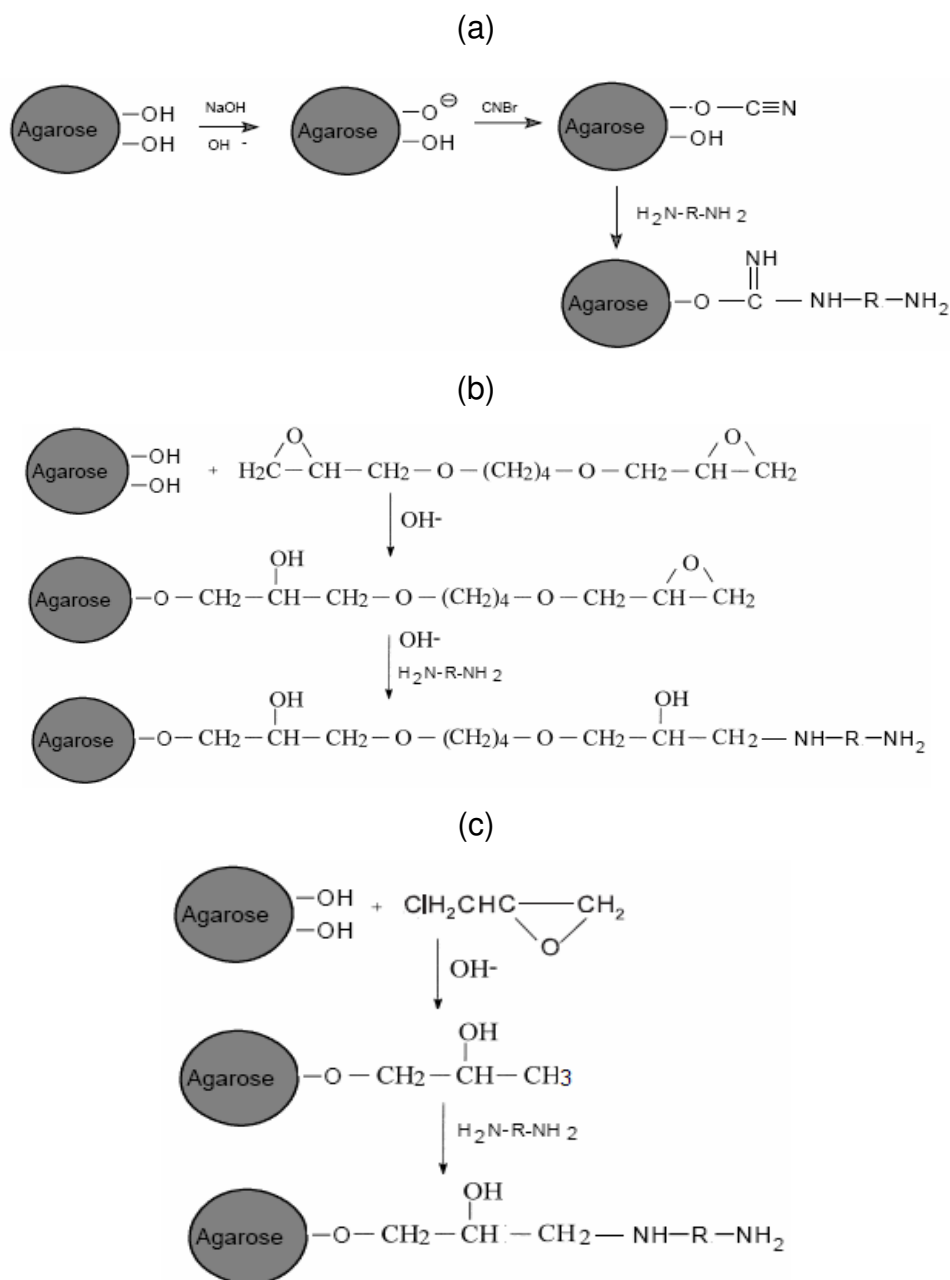


Figura 2-3. Esquema de ativação e reações de acoplamento de ligantes diaminas. (a) ativação com CNBr, seguido por acoplamento da diamina; (b) ativação com bisoxirano, seguido por acoplamento da diamina; (c) ativação com epicloridrina, seguido por acoplamento da diamina (R = cadeia carbônica). Adaptado de (a) <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/productinformationsheetc9210pis.pdf>; (b) Houen, 2001 e (c) Castilho *et al.*, 2000.

Capítulo 3: Materiais e métodos

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Adsorventes

Os géis ω -aminopropil-agarose (1), ω -aminohexil-agarose (2), ω -aminooctil-agarose (3), ω -aminohexil-bisoxirano-agarose (4), ω -aminodecil-agarose (5), ω -aminododecil-agarose (6) e o gel DEAE-agarose (7) utilizados nos experimentos cromatográficos foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). As especificações são apresentadas na Tabela 3-1. Todos os adsorventes são constituídos de agarose com 4% de reticulação.

Tabela 3-1. Especificações dos adsorventes

Adsorventes	Matrizes			Capacidade adsorção BSA (mg/mL)
	Ativação	Ligante	Espaçador (átomos)	
1	CNBr	1,3-diaminopropano	1	2,0-4,0
2	CNBr	1,6-diaminohexano	1	mínimo 5,0
3	CNBr	1,8-diaminooctano	1	5,0-20
4	Bisoxirano	1,6-diaminohexano	12	-
5	Bisoxirano	1,10-diaminodecano	12	7,0-15,0
6	Bisoxirano	1,12-diaminododecano	12	7,0-15,0
7	Bisoxirano	Dietilaminoetil	12	-

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog>

BSA: Albumina do soro bovino

3.1.2. Reagentes

A acrilamida, bis-acrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da BioRad (EUA). Albumina de soro bovino (BSA), MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfônico) e persulfato de amônio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), MES (ácido morfolinoetanolsulfônico) foi obtido da Merck (Alemanha). N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) foi obtido da BioRad (EUA); glicerol e ditiotrietoil foram adquiridos da PlusOne (EUA). A IgG humana (contendo 98,3% de IgG, de acordo com análise nefelométrica de IgG, IgM, IgA, Alb e Trf realizada no LIMBio), usada como marcador em eletroforese e em ensaios para determinação de isothermas de adsorção e determinação de ponto isoelétrico, foi obtida da Aventis Behring (Alemanha). O marcador de alta massa molecular contendo as seguintes proteínas: miosina 212 kDa, α_2 -macroglobulina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica 53 kDa, foi adquirido da GE Healthcare (EUA). Os demais reagentes e tampões utilizados foram todos de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

3.1.3. Soro e plasma humano

Amostras de sangue de indivíduos sadios (doadores) foram coletadas em tubos para sorologia (Greiner Bio-one, Brasil) contendo partículas de sílica micronizada para coleta de soro, as quais ativam a coagulação proporcionando a separação do soro dos demais componentes do sangue e tubos contendo anticoagulante heparina para coleta do plasma. Estas amostras foram centrifugadas a 4°C durante 5 min a 1000g e o sobrenadante (soro ou plasma) foi coletado em alíquotas de 0,5 mL e posteriormente congelado a -10°C para posterior utilização nos ensaios cromatográficos. Não foram realizados "pool" das amostras de soro e plasma humano coletadas para posterior alimentação nas colunas cromatográficas.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nas frações cromatográficas foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford, sendo usado o microensaio (Bradford, 1976). A curva analítica para este método foi construída utilizando-se soluções padrões de albumina do soro bovino (BSA).

3.2.2. Eletroforese SDS-PAGE e de focalização isoeétrica (*Isoelectric Focusing* – IEF)

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

A eletroforese de focalização isoeétrica (*Isoelectric Focusing* - IEF) é uma técnica baseada na separação de moléculas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI). A técnica consiste na aplicação da solução de proteína (neste estudo, solução de IgG comercial com elevada pureza) sobre um gel de acrilamida que apresenta um gradiente contínuo de pH e neste gel é aplicado um campo elétrico que promove o deslocamento da proteína até a região de pH que corresponde ao seu pI, não havendo deslocamento a partir deste ponto. O PhastSystem (Pharmacia, Sweden) e géis gradientes de pH 3 a 9 (GE, USA) foram usados para a IEF de

acordo com o método descrito pelo fabricante. A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata, de acordo com Morrissey (1981).

3.2.3. Quantificação de IgG, IgA, IgM, Trf e Alb

As proteínas IgG, IgA, IgM, Trf e Alb contidas no soro humano e nas frações cromatográficas foram quantificadas por nefelometria, de acordo com o manual do nefelômetro Array Protein System 360 (Beckman Coulter, EUA). As frações cromatográficas de cada etapa foram agrupadas em “pools” de acordo com a massa de proteínas totais em cada fração. O método nefelométrico baseia-se no espalhamento de luz obtida pelos complexos anticorpo específico-antígeno em suspensão na amostra a ser medida quando submetido a um feixe luminoso incidente. A variação da intensidade do espalhamento de luz medida pelo nefelômetro é convertida em unidades de concentração (mg/dL). As concentrações mínimas detectadas pelo equipamento são de 1,11 mg/dL, 0,93 mg/dL, 0,69 mg/dL, 0,62 mg/dL e 0,35 mg/dL para IgA, IgG, IgM, albumina e transferrina, respectivamente.

3.2.4. Experimentos cromatográficos em géis diaminas-agarose

Experimentos cromatográficos foram realizados para determinação do melhor adsorvente em condições ótimas para a purificação de IgG a partir do soro humano. Uma coluna cromatográfica de marca Amersham Biosciences (EUA) (modelo C 10/10; 10 mm de diâmetro interno x 10 cm de altura) foi preenchida com 3,0 mL de gel diamina-agarose (volume ótimo definido por ensaios preliminares com volume de 1,0 mL de gel) e conectada a um sistema de cromatografia de baixa pressão (Gilson, EUA). A corrente de saída foi conectada a um monitor de medida de absorbância a 280 nm e este ligado ao coletor de frações, conforme ilustrado na Figura 3-1.

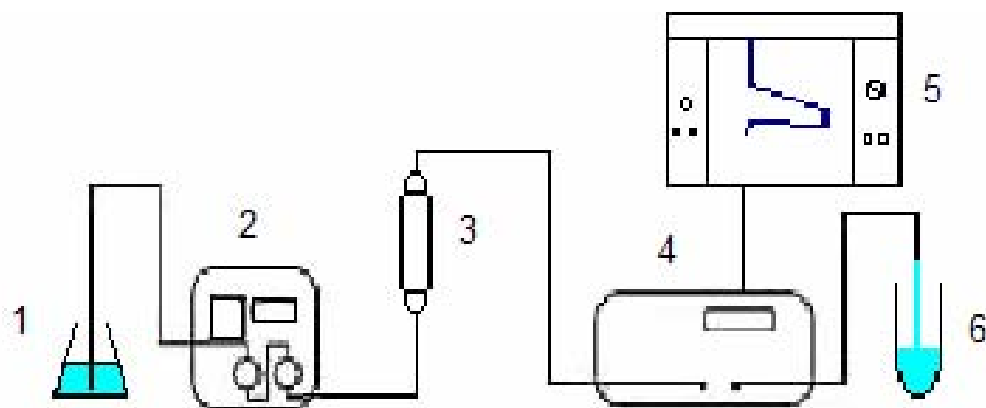


Figura 3-1. Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão. 1) reservatório de solução; 2) bomba peristáltica; 3) coluna cromatográfica; 4) monitor de medida de absorvância a 280 nm; 5) registrador; 6) coletor de frações. (Adaptado de Bresolin, 2006).

A coluna contendo os adsorventes ω -aminopropil-agarose, ω -aminohexil-agarose, ω -aminooctil-agarose, ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, ω -aminodecil-bisoxirano-agarose ou ω -aminododecil-bisoxirano-agarose foi equilibrada à temperatura ambiente a uma vazão de 0,5 ou 0,4 mL/min, conforme o experimento, com o tampão de adsorção (tampão de equilíbrio). Conforme o experimento foram utilizados na etapa de adsorção os tampões MES 25 mM a pH (5,5, 6,5 e 6,7), MOPS 25 mM a pH (6,5, 7,2 e 7,9), HEPES 25 mM a pH (6,8, 7,5 e 8,2).

A alimentação foi realizada na mesma vazão da etapa de equilíbrio. A coluna foi alimentada com uma concentração média de proteínas totais do soro humano de 3,5 mg/mL, para os experimentos realizados com 3,0 mL dos adsorventes ω -aminopropil-agarose, ω -aminohexil-agarose, ω -aminooctil-agarose, ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, na mesma vazão, até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna.

A eluição foi realizada por adição de cloreto de sódio a 1,0 M adicionado no tampão de adsorção. A coluna foi regenerada com solução de NaOH 25 mM.

A corrente de saída foi coletada durante todas as etapas cromatográficas em frações de volume de 1,0 mL. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford e por nefelometria e aquelas situadas nos picos de proteína foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE. O tempo dos ensaios cromatográficos foi de aproximadamente 1 h.

Os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata (Apêndice D e E).

3.2.4.1. Determinação das curvas de ruptura de IgG

Para a determinação das curvas de ruptura de IgG, estabeleceu-se que o ponto de ruptura é o ponto em que a IgG começa a ser detectada com impurezas na saída da coluna. Este procedimento é utilizado em processos industriais para minimizar a perda de produtos na linha de saída durante a etapa de alimentação (Charcosset, *et al.*, 1995).

Segundo Charcosset e colaboradores (1995), pode-se considerar o valor de C/C_0 igual a 0,1, em que C é a concentração de proteínas totais na saída da coluna e C_0 é a concentração inicial de proteínas totais na solução de alimentação, como um valor representativo no qual se interrompe a alimentação em aplicações industriais. O valor de massa de proteína injetada até o ponto onde C/C_0 igual 0,1 é chamada capacidade dinâmica da matriz sob as condições de adsorção estudadas. Neste trabalho, considerou-se como ponto de ruptura o ponto em que ocorre o início da não retenção de impurezas (proteínas do soro diferentes de IgG).

Outro fator importante a ser considerado é o tempo de residência (t_r), que é a razão entre o volume intersticial do gel (30% do volume total de gel na coluna) e a vazão da bomba (Charcosset, *et al.*, 1995). Nos experimentos realizados, o volume (V) do adsorvente e vazão (Q) da bomba foram constantes e iguais a 3,0 mL e 0,5 mL/min, respectivamente, assim o t_r para o processo pode ser calculado pela equação 3.1:

$$t_R = \frac{0,3 \times V}{Q} = 1,8 \text{ min} \quad (3.1)$$

Deste modo, experimentos cromatográficos foram realizados com o objetivo de identificar o ponto em que a IgG é detectada com impurezas na saída da coluna. As condições cromatográficas destes experimentos são apresentadas na Tabela 3-2. Os experimentos foram realizados em tampão de adsorção HEPES 25 mM pH 6,8 para soro humano e os tampões de adsorção MOPS 25 mM e HEPES pH 8,2 para plasma humano. O soro e plasma humano foram diluídos vinte vezes em tampão de adsorção para a alimentação da coluna. Os adsorventes testados para o soro humano foram ω -aminohexil-agarose (1), ω -aminooctil-agarose (2), ω -aminohexil-bisoxirano-agarose (3), ω -aminodecil-bisoxirano-agarose (4), ω -aminododecil-bisoxirano-agarose (5) e o gel DEAE-agarose (6) e para o plasma humano foram testados os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose.

Para analisar o efeito da diluição do plasma e soro humano na purificação de IgG, realizaram-se experimentos com os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose com alimentação de soro e plasma diluídos dez vezes. As massas de proteínas injetadas nestes ensaios foram aproximadamente iguais as dos experimentos de curvas de ruptura de 30,0 mL de soro e 15,0 mL de plasma injetados.

Os adsorventes citados anteriormente foram equilibrados, à temperatura ambiente, a uma vazão de 0,5 mL/min com o tampão de adsorção. O soro e plasma humano foram alimentados na coluna a vazão de 0,5 mL/min até que IgG

fosse obtida com impurezas na saída da coluna. Após o término da alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, na mesma vazão, até que todas as proteínas não adsorvidas fossem retiradas da coluna.

A eluição das proteínas adsorvidas nos adsorventes foi realizada, por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. Os géis foram regenerados com solução de NaOH 25 mM e lavados seqüencialmente com água ultrapura. A corrente de saída foi monitorada a 280 nm e coletada em frações de 1,0 e 2,0 mL, conforme experimento. As frações foram quantificadas pelo método de Bradford e aquelas correspondentes à etapa de alimentação e aos picos obtidos durante a etapa de eluição foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e realizado “pool” para análise nefelométrica.

Tabela 3-2. Condições cromatográficas das curvas de ruptura de IgG.

Adsorvente	VA ^a (mL)	PTI ^b (mg/mL)	Proteínas ^c (mg/mL)					TE ^d (h)
			IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	
1	15,0	50,50	7,89	39,2	2	1,95	0,66	1,5
2	15,0	43,78	7,13	37,4	2,22	1,1	0,84	1,5
3	30,0	97,28	16,53	56,1	3,36	2,14	2,12	2,0
4	30,0	92,82	18,09	54,6	2,95	2,07	2,06	2,0
5	30,0	94,53	-	-	-	-	-	12,0
6	30,0	97,90	18,45	64,5	3,69	2,11	2,15	2,0

^a VA: volume de solução de soro humano alimentada na coluna

^b Proteína Total Inicial: Dosagem pelo método de Bradford, 1976

^c Proteínas dosadas por nefelometria

^d TE: Tempo do ensaio cromatográfico

Volume do leito: 3,0 mL.

3.2.4.2. Determinação dos pontos isoeletricos das moléculas de IgG das frações cromatográficas retidas e não retidas

Experimentos cromatográficos com o gel aminohexil-bisoxirano-agarose e aminodecil-bisoxirano-agarose e eletroforese de focalização isoeletrica (*Isoelectric*

Focusing – IEF) foram realizados para determinação dos pontos isoelétricos das moléculas de IgG que são adsorvidas e não adsorvidas na matriz.

Alimentaram-se 1,34 mg de IgG com elevada pureza/mL em tampão HEPES pH 6,8 (IgG obtida da Aventis Behring, Alemanha) nos géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. Esta concentração foi escolhida para a não saturar a capacidade dos géis, permitindo, assim, a identificação dos pontos isoelétricos da IgG das frações cromatográficas retidas e não retidas.

A eluição das proteínas adsorvidas nos géis foi realizada por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. Os géis foram regenerados com solução de NaOH 25 mM e lavados sequencialmente com água ultrapura. A corrente de saída foi monitorada a 280 nm e coletada em frações de 1,0 mL. As frações foram quantificadas pelo método de Bradford e aquelas correspondentes às etapas de lavagem e eluição foram agrupadas e analisadas por IEF, método descrito no item 3.2.2.

3.2.5. Isotermas de Adsorção

Para a determinação das isotermas de adsorção foram utilizadas soluções de IgG e Alb humanas de alta pureza, obtidas comercialmente (Aventis Behring, Alemanha). Os experimentos para a obtenção das isotermas de adsorção foram realizados em frascos agitados (agitação orbital), à temperatura ambiente (25°C), utilizando-se 50 mg dos adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em tubos Eppendorf de capacidade de 1,5 mL. Em cada tubo, com os adsorventes previamente equilibrados com o tampão de adsorção (HEPES 25 mM a pH 6,8), foram adicionadas 1,0 mL de soluções de IgG de alta pureza em concentrações de 0,5 a 28,0 mg/mL e Alb de alta pureza em concentrações de 0,5 a 50,0 mg/mL. Os frascos foram agitados durante 3 hs, tempo suficiente para que o equilíbrio fosse atingido, determinado previamente. Após este tempo, o sobrenadante foi recuperado e as quantificações de IgG e Alb

foram realizadas a 280 nm. A partir das absorvâncias (A_{bs}) obtidas e fatores de diluições (F_d), obteve-se a concentração de IgG e Alb no equilíbrio (C^*) (Equação 3.2).

$$C^* = \frac{F_d A_{bs}}{p} \quad (3.2)$$

Na Equação 3.1, “p” é a absorvidade específica obtida por curvas padrões que tem como referência as proteínas IgG e Alb de alta pureza. Para IgG e Alb “p” é igual a 1,36 e 0,53 (mL.cm)/mg, respectivamente.

A quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente (Q^*) foi calculada usando a Equação 3.3:

$$Q^* = \frac{(C - C^*)V}{M} \quad (3.3)$$

em que C é a concentração inicial de IgG e Alb, C^* é a concentração de IgG e Alb no equilíbrio (mg/mL), V o volume de solução adicionado no tubo Eppendorf (mL) e M a massa de adsorvente (g).

Diante dos valores de Q^* e C^* foram utilizados os modelos de Langmuir (Equação 3.4) (Langmuir, 1913) e Langmuir-Freundlich (Equação 3.5) (Andrade e Hadly, 1985), para determinar os respectivos parâmetros de cada modelo. A escolha do modelo foi baseada na melhor representação dos resultados experimentais obtidos.

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

$$Q^* = \frac{Q_m (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (3.5)$$

Em que:

Q_m = capacidade máxima de adsorção;

K_d = constante de dissociação do complexo proteína-ligante imobilizado;

$K_{d(LF)}$ = constante de dissociação aparente do complexo proteína-ligante imobilizado;

n = coeficiente de Langmuir-Freundlich, indica a cooperatividade presente no sistema de adsorção, sendo que $n = 1$, não há cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios de adsorção são independentes, $n > 1$ identifica uma cooperatividade positiva e para $0 < n < 1$, uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo (Sharma e Agarwal, 2001).

Capítulo 4: Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados e discussão do estudo da purificação de IgG humana por cromatografia negativa, que foi realizado em cinco etapas. A primeira compreendeu o estudo do efeito do tamanho da cadeia alifática da diamina contendo três, seis e oito carbonos, imobilizada em géis de agarose ativados com CNBr, na purificação de IgG (adsorventes ω -aminopropil-agarose, ω -aminohexil-agarose e ω -aminooctil-agarose). Inicialmente os experimentos foram realizados com soro humano (diluído em tampão), por apresentar composição próxima a do criossobrenadante (ausência de fibrinogênio e fatores de coagulação), que é a solução inicial utilizada pelas indústrias de hemoderivados para obtenção de IgG e outras proteínas do plasma. A segunda etapa compreendeu a análise da influência do tipo de ativação do gel, realizada por experimentos com o gel de agarose ativado com 1,4 butanodioldiglicidil éter (bisoxirano). Como ligantes, foram utilizadas diaminas com cadeias alifáticas contendo seis, dez e doze carbonos (ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, ω -aminodecil-bisoxirano-agarose e ω -aminododecil-bisoxirano-agarose). Não se realizou ensaios com o gel ω -aminooctil-agarose ativado por bisoxirano, pois este não se encontra disponível comercialmente. Nesta etapa, os experimentos foram realizados com soluções de soro e plasma humano diluídos em tampão. Na terceira etapa, comparou-se os resultados da purificação de IgG a partir do soro humano obtidos com os géis com diaminas imobilizadas com os obtidos com o adsorvente DEAE-agarose. Na quarta etapa, analisou-se os pontos isoelétricos das moléculas de IgG retidas e não retidas nos géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose a partir de experimentos cromatográficos com IgG humana de alta pureza e eletroforese de focalização isoelétrica (IEF). Na quinta etapa determinou-se isoterma de adsorção de IgG e Alb para os géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, com a finalidade de determinar os parâmetros capacidade de adsorção e constante de dissociação do complexo IgG-diamina e Alb-diamina.

4.1. Efeito do tamanho da cadeia carbônica da diamina na purificação de IgG por cromatografia negativa: géis ativados com CNBr

A influência do tamanho da cadeia carbônica da diamina imobilizada em géis ativados com CNBr na purificação de IgG por cromatografia negativa foi estudada em diaminas com cadeias alifáticas lineares de três, seis e oito carbonos. Os efeitos estéricos, hidrofóbicos e de cargas foram considerados na análise da adsorção de IgG e das outras proteínas do soro humano nestes adsorventes.

4.1.1. Cadeia alifática de três carbonos: ω -aminopropil-agarose

A capacidade de adsorção e a seletividade do adsorvente ω -aminopropil-agarose foi avaliada por meio de ensaios cromatográficos, testando-se três tampões de adsorção zwitteriônicos MES, MOPS e HEPES nas suas respectivas faixas tamponantes. Todos os experimentos foram realizados alimentando-se solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção, esta diluição foi analisada baseada em resultados obtidos por Pitiot *et al.* (2001), que mostraram ser esta condição favorável para purificação de IgG humana por cromatografia negativa. As porcentagens de proteínas totais retidas e não retidas no gel ω -aminopropil-agarose para cada sistema tamponante são mostradas na Figura 4-1.

A retenção de proteínas do soro foi possível em todos os sistemas tamponantes, entretanto, os valores foram muito baixos (Figura 4-1). Dentre todos os sistemas tamponantes testados, o tampão HEPES pH 6,8 favoreceu a maior adsorção de proteínas (17,6%), diferença significativa em relação ao tampão MES, que se encontra em pH muito próximo ao do HEPES. Analisando o pKa dos tampões, observa-se que o único que se apresenta com carga líquida zero é o HEPES a pH 6,8, enquanto que os outros se apresentam com carga negativa. A carga negativa dos tampões pode ter influenciado na adsorção das proteínas do

soro em ω -aminopropil-agarose, uma vez que os íons do tampão podem ter competido com as proteínas pelos sítios de carga positiva do adsorvente.

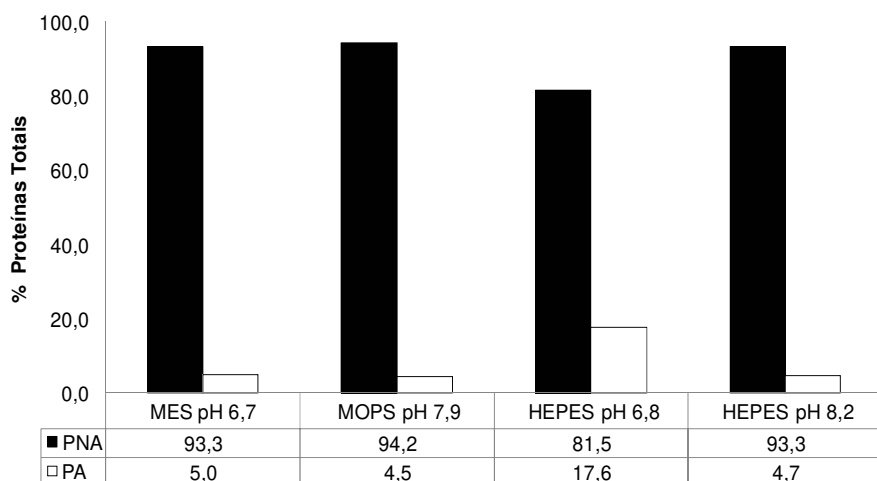


Figura 4-1. Porcentagens de Proteínas Totais: PA (proteínas adsorvidas) e PNA (proteínas não adsorvidas) em ω -aminopropil-agarose em presença dos tampões MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. Alimentação: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (3,4 mg de proteínas totais/mL). Eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. Volume de leite de 3,0 mL.

Quanto à seletividade do adsorvente ω -aminopropil-agarose, este não se mostrou adequado para purificação de IgG, visto a baixa capacidade de adsorção de proteínas do soro humano. A Figura 4-2 e Tabela 4-1 ilustram a cromatografia em tampão HEPES pH 6,8 (os experimentos realizados com os outros tampões encontram-se no Apêndice A).

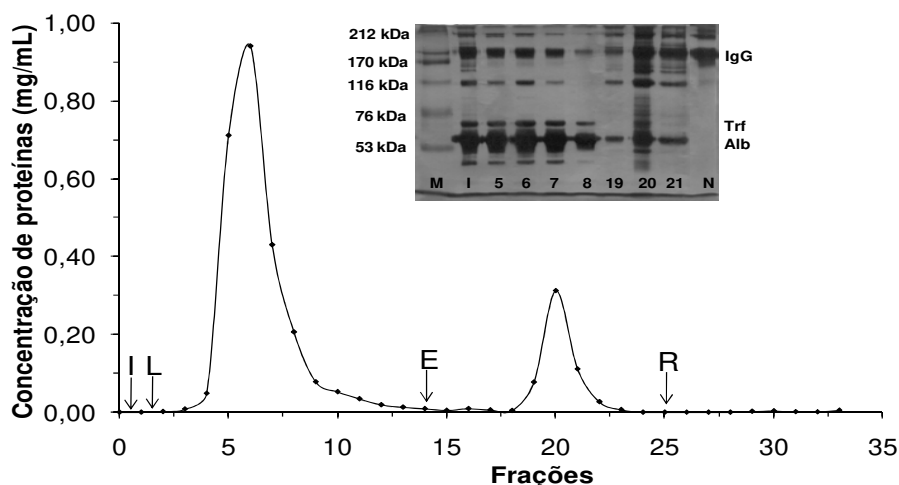


Figura 4-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,14 mg de proteínas totais/mL). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (19-21) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela 4-1. Balanço de massa da cromatografia referente ao adsorvente ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,14	100,0
Lavagem	2,55	81,5
Eluição	0,55	17,6
Regeneração	0,01	0,4
Recuperação	3,12	99,5
Proteínas totais adsorvidas	0,57	18,2

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo multiplicado por 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

De acordo com a eletroforese apresentada na Figura 4-2, praticamente todas as proteínas injetadas não foram adsorvidas, resultado obtido também nos experimentos realizados com os demais tampões (Apêndice A).

O comportamento observado nesses ensaios pode ser explicado não somente pela carga negativa dos tampões, que podem ter influenciado na adsorção das proteínas do soro em ω -aminopropil-agarose, como observado anteriormente, mas também pelo impedimento estérico, ou seja, as proteínas do soro não conseguem interagir com o sítio ativo do adsorvente devido ao fato do ω -aminopropil possuir apenas três carbonos ligados à extremidade amino. Assim, realizaram-se experimentos com o gel ω -aminohexil-agarose para análise do efeito de um maior número de carbonos do ligante na adsorção de proteínas do soro.

4.1.2. Cadeia alifática de seis carbonos: ω -aminohexil-agarose

Dando seqüência à análise da influência dos efeitos eletrostáticos e impedimentos estéricos na adsorção de proteínas do soro, realizaram-se experimentos com o gel ω -aminohexil-agarose. Quando comparado com o gel ω -aminopropil-agarose, este possui maior hidrofobicidade e o grupo amino está mais acessível às interações com as proteínas devido ao tamanho da cadeia carbônica.

Inicialmente alimentaram-se a coluna cromatográfica com volume de 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes para análise do melhor sistema tamponante para purificação de IgG (dados apresentados no Apêndice B). Em seguida, realizaram-se experimento com a melhor condição obtida com alimentação de 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes.

Os ensaios cromatográficos foram conduzidos em coluna de 3,0 mL de gel e as condições cromatográficas nos valores intermediários de pH dos sistemas tamponantes MES, MOPS e HEPES, dentro das suas respectivas faixas tamponantes. As frações de cada etapa cromatográfica foram analisadas por

nefelometria para quantificação de IgG, IgA, IgM, Alb e Trf e as porcentagens de proteínas retidas e não retidas no gel ω -aminohexil-agarose para os sistemas tamponantes MOPS e HEPES são mostradas nas Figuras 4-3 e 4-4. Os cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas destes experimentos encontram-se no Apêndice B (as duplicatas de todos os experimentos são apresentadas no apêndice D). O tampão MES não propiciou purificação de IgG nas frações não retidas, assim os resultados são somente apresentados no Apêndice B.

O efeito do pH das soluções tamponantes na capacidade de adsorção de impurezas está fortemente ligada à interação de cargas entre as proteínas, o gel e o tampão e a efeitos hidrofóbicos. A IgG humana foi parcialmente adsorvida em ω -aminohexil-agarose em todos os sistemas tamponantes (HEPES, MOPS e MES), aumentando a porcentagem de IgG não retida com o aumento do valor de pH do tampão. A alta pureza de IgG observada em pH em torno de 6,5 não está associada ao valor de pH e sim a ionização do tampão. Quando o tampão MES a pH 6,5 é empregado para a diluição do soro, IgG não é obtida livre de impurezas nas frações não retidas (apêndice B). A IgG é obtida livre de impurezas nas frações não retidas quando o pH do tampão encontra-se abaixo de seu valor de pKa (7,2 e 7,55 para MOPS e HEPES, respectivamente), ou seja, quando o tampão está com carga líquida zero. Para ambos os tampões nesta condição, obteve-se de 32 a 35% da IgG injetada recuperada com alta pureza nas frações não retidas. Observa-se que, quando o valor de pH do tampão é idêntico ao valor do seu pKa, a proteína transferrina é parcialmente adsorvida no gel ω -aminohexil-agarose, quando o soro é alimentado na coluna diluído em tampão MOPS.

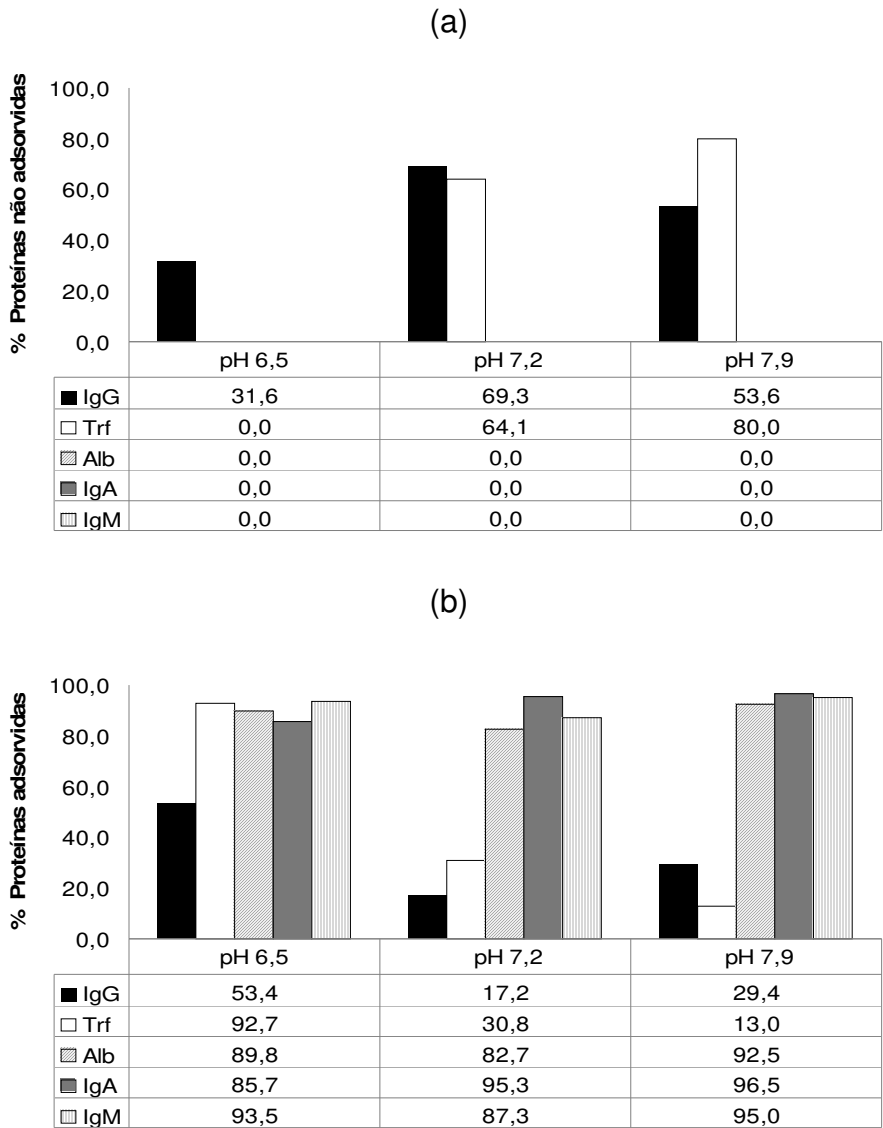


Figura 4-3. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvida em ω -aminohexil-agarose em presença do tampão MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9 e eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção. Alimentação: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (3,98 mg de proteínas totais/mL). Volume de leite de 3,0 mL.

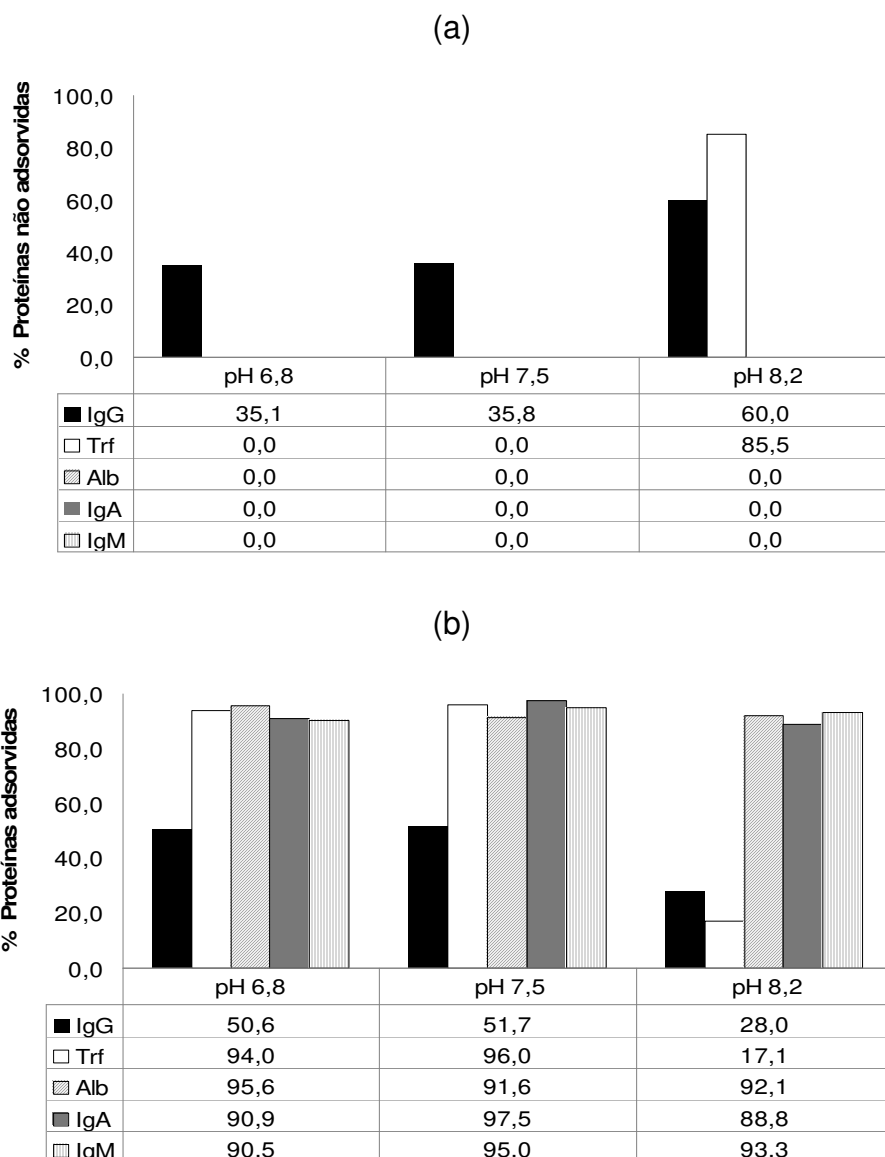


Figura 4-4. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvida das cromatografias em ω -aminohexil-agarose em HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2. Alimentação: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (3,98 mg de proteínas totais/mL). Volume de leito de 3,0 mL.

A diferença na capacidade de adsorção de impurezas nos diferentes valores pH pode ser explicada pela análise dos pontos isoelétricos (pI) das proteínas: IgG (entre os pH 4,35 e 9,95), Alb (pH 4,7), Trf (entre os pH 5,2 e 5,9), IgM (entre os pH 5,5 a 6,7) e IgA (entre os pH 4,7 e 5,9) (Prin *et.al.*, 1995). Observa-se que a porcentagem de IgA, IgM e Alb adsorvidas em ω -aminohexil-agarose varia muito pouco, independente do tampão e do pH utilizado. A IgM, mesmo podendo ter carga nula ou positiva dependendo do pH, foi adsorvida na coluna, provavelmente devido a efeitos hidrofóbicos com a cadeia alifática do ligante. No entanto, a porcentagem de transferrina adsorvida diminui com o aumento do pH do tampão, apesar desta estar sempre com carga negativa em todos os pHs estudados.

Tendo-se como melhor resultado a purificação de IgG em tampão HEPES a pH 6,8, realizou-se experimento com maior volume de alimentação (1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes) com a finalidade de comparar o perfil cromatográfico com o obtido com o gel ω -aminopropil-agarose. O perfil cromatográfico e eletroforético estão apresentados na Figura 4-5 e o balanço de massa na Tabela 4-2.

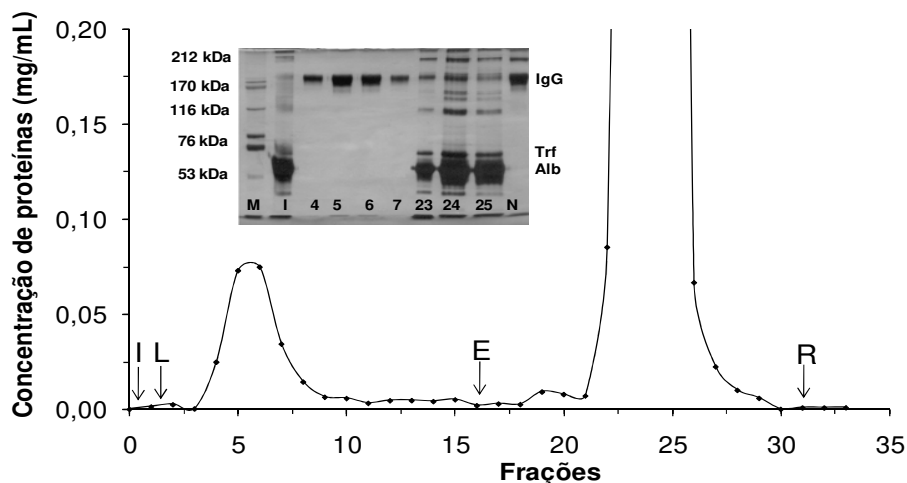


Figura 4-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (4,15 mg de proteínas totais /mL). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (23-25) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela 4-2. Balanço de massa da cromatografia referente ao gel ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	4,15	100,0
Lavagem	0,26	6,4
Eluição	3,73	89,8
Regeneração	0,02	0,5
Recuperação	4,01	96,7
Proteínas totais adsorvidas	3,75	90,4

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo multiplicado 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

A análise dos resultados obtidos por eletroforese (Figura 4-5), demonstra IgG recuperada com alta pureza na etapa de lavagem e o balanço de massa da Tabela 4-2, apresenta uma massa de 0,09 mg de proteínas totais/mL de adsorvente na lavagem. Deste modo, realizou-se análise nefelométrica para constatar a recuperação de IgG livre de impurezas na etapa de lavagem. Os resultados obtidos por nefelometria estão ilustrados na Figura 4-6 e Tabela 4-3.

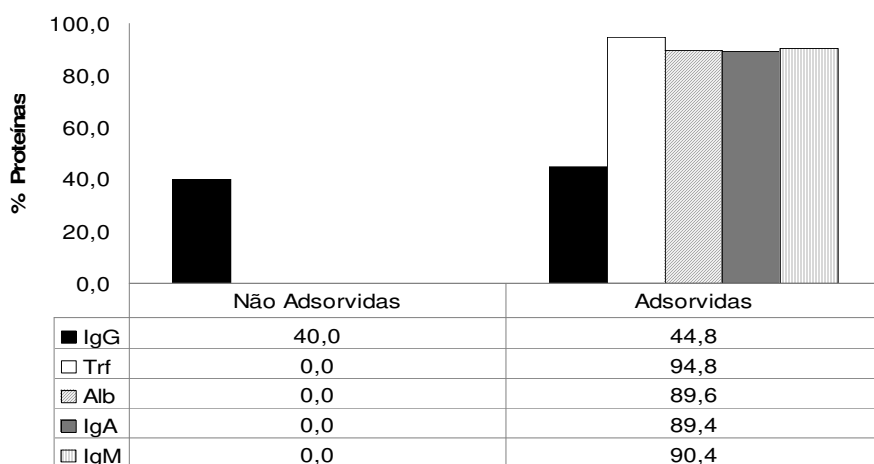


Figura 4-6. Porcentagens de proteínas não adsorvidas e adsorvidas da cromatografia em ω -aminohexil-agarose em HEPES 6,8.

Com relação aos experimentos cromatográficos realizados com o gel ω -aminopropil-agarose, observa-se que, o número de carbonos da cadeia ligada ao terminal amino teve grande efeito na capacidade de adsorção de impurezas.

Tabela 4-3. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em ω -aminohexil-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	0,61	2,21	0,12	0,10	0,05	4,15	14,6	1,00
Lavagem	0,24	n.d	n.d	n.d	n.d	0,26	93,5	6,39
Eluição	0,27	1,98	0,11	0,09	0,04	3,73	7,3	0,50
Regeneração	-	-	-	-	-	0,02	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (1976).

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

Determinação do ponto de ruptura de IgG

Com o intuito de determinar o ponto de ruptura, ou seja, ponto em que ocorre o início da não retenção de impurezas (proteínas do soro diferentes de IgG) no gel ω -aminohexil-agarose, alimentou-se a coluna com 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,37 mg de proteínas totais/mL). A Figura 4-7 apresenta o início da curva de ruptura e eletroforeses realizadas.

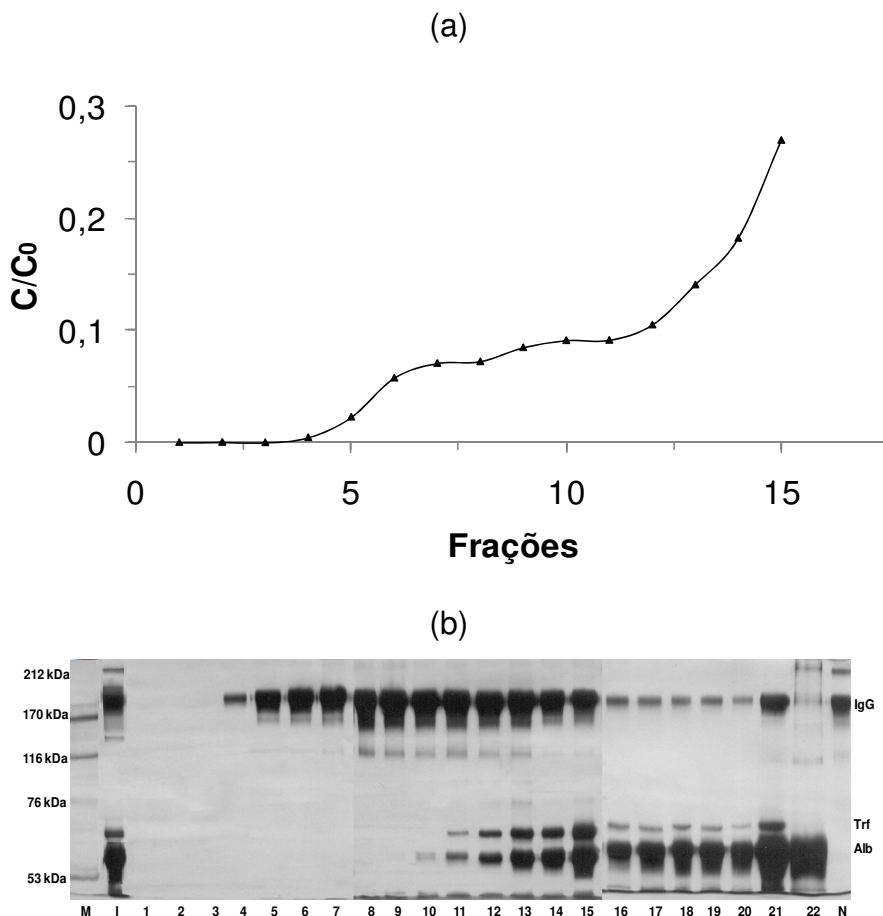


Figura 4-7. (a) Início da curva de ruptura de IgG em gel ω -aminohexil-agarose para proteínas totais. Volume de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,37 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-20: frações da lavagem; 21-22: frações da eluição; N: marcador de IgG.

Segundo a eletroforese da Figura 4-7 (b), IgG é recuperada livre de impurezas das frações 4 a 9, ou seja, até a passagem de 9,0 mL de solução de alimentação. Albumina e transferrina começaram a ser detectadas a partir das frações 10 e 11, respectivamente, sendo IgG recuperada com impurezas das frações 10 a 20. Observa-se da curva da Figura 4-7 (a) que não houve saturação da coluna (C/C_0 (máximo) igual a 0,27, em que C é a concentração em cada fração

e C_0 é a concentração inicial), mas esta saturação não precisou ocorrer para que IgG fosse recuperada com impurezas na saída da coluna. A partir dos resultados obtidos, determinou-se o ponto de ruptura de 9,0 mL, ou seja, o volume máximo de solução de soro humano que pode ser injetado na coluna para obter-se IgG de alta pureza.

Como houve purificação de IgG, determinou-se sua pureza e o fator de purificação por análise nefelométrica. As análises foram realizadas agrupando-se as frações cromatográficas de 4 a 9, referentes à etapa de alimentação, as frações de 10 a 20, das etapas de alimentação e lavagem e, finalmente, as frações da etapa de eluição. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4-4 e Figura 4-8.

Os valores de pureza obtidos superiores a 100% para IgG na etapa de alimentação podem ser explicados pelas diferenças nos métodos de quantificação de proteínas, pois para quantificar proteínas totais utilizou-se o método de Bradford (1976), que subestima a concentração de IgG nestas frações, uma vez que elas estão com grau de pureza elevado. O método de Bradford apresenta grande variação de resposta, dependendo da proteína dosada, sendo que apresenta uma maior sensibilidade para Alb (Hammond e Kruger, 1988). O método nefelométrico para quantificação de IgG, Alb, Trf, IgA e IgM é altamente específico, pois as interações ocorridas para a quantificação de proteínas são do tipo antígeno-anticorpo, assim, tem-se a quantidade de IgG real na amostra.

Tabela 4-4. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações das etapas da cromatografia em ω -aminohexil-agarose. Tampão de adsorção: HEPES pH 6,8.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	7,89	39,15	2,00	1,95	0,66	50,50	15,6	1,00
Alimentação (frações de 4 a 9)	1,58	n.d	n.d	n.d	n.d	1,06	149,4	9,56
Alimentação + Lavagem (frações de 10 a 20)	3,89	10,90	1,76	n.d	n.d	17,40	22,3	1,43
Eluição (frações de 21 a 22)	1,13	26,30	0,20	1,74	0,62	29,50	3,8	0,25
Regeneração	-	-	-	-	-	0,1	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (1976).

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

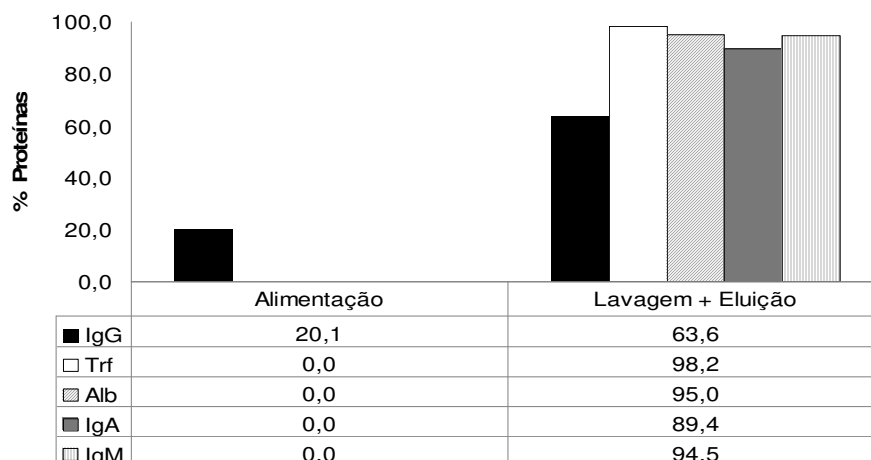


Figura 4-8. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e proteínas recuperadas nas etapas de lavagem e eluição da cromatografia em ω -aminohexil-agarose em HEPES pH 6,8.

Os resultados obtidos por nefelometria confirmam o perfil eletroforético, IgG é recuperada com alta pureza nas frações de 4 a 10 da alimentação. Apesar da recuperação de IgG ter sido de 20,1% da proteína injetada, a massa de IgG obtida por mililitro de gel (0,53 mg) recuperada com elevada pureza é significativa em relação aos demais experimentos já realizados.

Comparando-se a massa de IgG obtida por mililitro de gel (0,53 mg) com os dados da literatura, tem-se que Pitiot *et al.*, (2001) obtiveram 3,23 mg de IgG por mililitro de gel, valor aproximadamente seis vezes maior do que o obtido neste trabalho, nas frações não retidas, quando 1,0 mL de plasma humano diluído vinte vezes em tampão de adsorção MOPS pH 7,2 foi injetado na coluna contendo o gel histidina-aminohexil-Sepharose 4B usado como um adsorvente em cromatografia negativa.

Como os resultados obtidos não foram comparáveis aos de Pitiot *et al.*, (2001) em termos de massa de IgG obtida com alta pureza por mililitro de gel, realizaram-se experimentos com o gel ω -aminoocetil-agarose visando a obtenção de maior capacidade de adsorção de proteínas e maior massa de IgG purificada

(maior porcentagem de IgG nas frações não retidas). Este adsorvente possui cadeia alifática de oito carbonos ligados ao terminal amino, dois carbonos a mais do que o gel ω -aminohexil-agarose.

4.1.3. Cadeia alifática de oito carbonos: ω -aminooctil-agarose

Os ensaios com ω -aminooctil-agarose foram realizados com os tampões MES, MOPS e HEPES nos seus limites inferiores e superiores de valores de pH de tamponamento, alimentando-se a coluna com 1,0 mL de solução de soro diluída vinte vezes. Os resultados obtidos por nefelometria encontram-se apresentados na Figura 4-9 e os balanços de massas e os perfis cromatográficos e eletroforéticos destes experimentos encontram-se no Apêndice C.

A retenção de IgG no gel ω -aminooctil-agarose diferiu muito daquela observada em ω -aminohexil-agarose em tampão MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2, observando-se a alta retenção de IgG nestes pHs. A porcentagem de recuperação de IgG adsorvida para estes pHs não se aproxima do valor total de IgG injetada, que seria 100%. Este comportamento pode ter se dado devido ao fato das análises nefelométricas terem sido realizadas somente com o “pool” das frações mais concentradas das etapas de lavagem e eluição. Como em cada fração de lavagem a massa de proteínas totais não foi superior a 0,07 mg, as concentrações das proteínas dos “pools” ficaram abaixo do limite de detecção do nefelômetro.

Para os tampões MES pH 6,7 e HEPES pH 6,8, observa-se um aumento da não retenção de IgG (49,7% e 42,7% de IgG não adsorvida, respectivamente) quando comparado ao gel ω -aminohexil-agarose. Além disso, para o tampão MES pH 6,7, não houve necessidade do mesmo estar na sua forma zwitteriônica para que a IgG fosse obtida livre de impurezas nas frações não retidas, ou seja, o pH do tampão encontrava-se acima de seu valor de pKa (pKa de 6,15 para o tampão MES). Conclui-se que, para o gel ω -aminooctil-agarose, o pH do tampão é determinante para não retenção de IgG, mais que o estado de ionização do tampão.

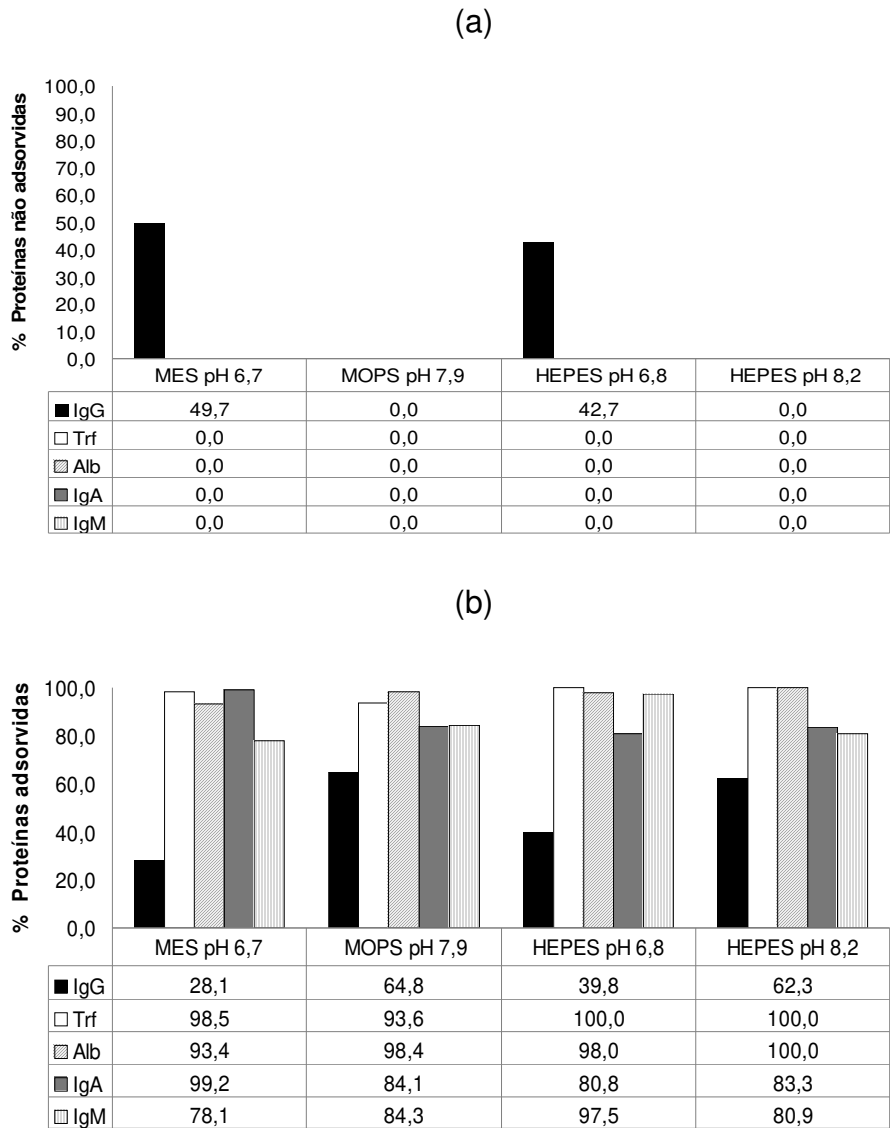


Figura 4-9. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvidas em ω -aminooctil-agarose em MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2.

A Figura 4-10 ilustra o perfil cromatográfico e eletroforético do experimento de purificação de IgG realizado com o tampão HEPES pH 6,8 e o as análises nefelométricas e fator de purificação podem ser observados na Tabela 4-5.

Recuperou-se IgG com elevada pureza na etapa de lavagem (0,07 mg/mL do adsorvente, Tabela 4-5) com um fator de purificação de 7,9 vezes.

Comparando-se este resultado com o obtido com o gel ω -aminohexil-agarose na condição HEPES pH 6,8 e volume de injeção de 1,0 mL de solução de soro, observa-se que o aumento de 2 carbonos da cadeia alifática não influenciou significativamente na não retenção de IgG.

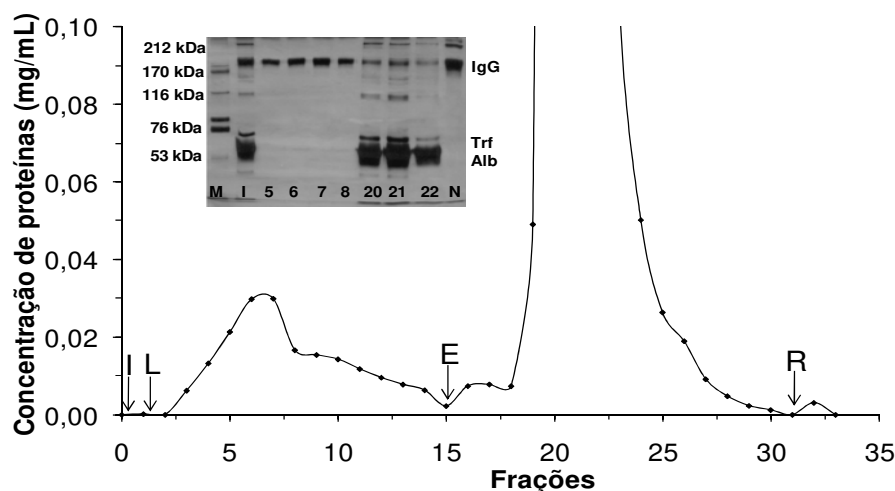


Figura 4-10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -amino-octil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,31 mg de proteínas totais /mL). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (20-22) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela 4-5. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em ω -aminooctil-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	0,50	2,86	0,15	0,13	0,05	3,31	15,2	1,0
Lavagem	0,22	n.d	n.d	n.d	n.d	0,18	119,4	7,9
Eluição	0,20	2,80	0,15	0,11	0,05	3,08	6,5	0,4
Regeneração	-	-	-	-	-	0,02	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (1976).

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

Com a finalidade de determinar o ponto de ruptura de IgG em gel ω -aminooctil-agarose, alimentou-se a coluna com volume de 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (2,91 mg de proteínas totais/mL). A Figura 4-11 apresenta a curva de ruptura e eletroforeses realizadas com o intuito de determinar o ponto em que ocorre o início da não retenção de impurezas.

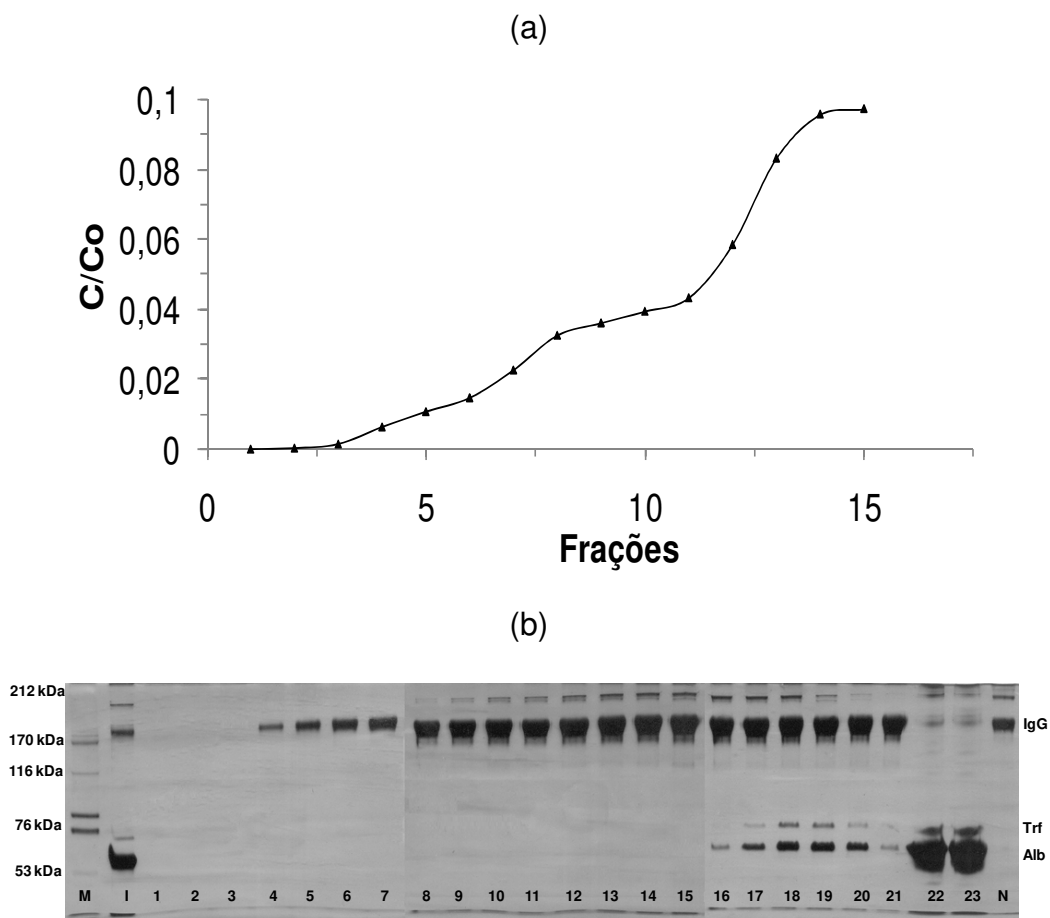


Figura 4-11. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminoocetil-agarose, volume final de alimentação: 15 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (2,91 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-21: frações da lavagem; 22-23: frações da eluição; N: marcador de IgG.

Segundo a eletroforese da Figura 4-11 (b), IgG é recuperada com alta pureza nas frações 4 a 15, ou seja, durante toda a etapa de alimentação da coluna (15,0 mL de solução de soro diluída vinte vezes). As impurezas albumina e transferrina começaram a ser detectadas a partir da fração 16, sendo IgG recuperada com impurezas das frações 16 a 23. Conclui-se que o máximo de volume de solução de alimentação que pode ser injetado na coluna com gel ω -

aminoetil-agarose para que IgG seja recuperada com elevada pureza é de 15,0 mL de solução de soro diluída vinte vezes, nas condições analisadas.

Como houve purificação de IgG determinou-se sua pureza e o fator de purificação por análise nefelométrica. As análises foram realizadas agrupando-se em “pool” as frações cromatográficas referentes às etapas de alimentação (frações de 4 a 15), de lavagem (“pool” das frações de lavagem de 16 a 21) e de eluição (“pool” das frações 22 e 23). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4-12 e Tabela 4-6.

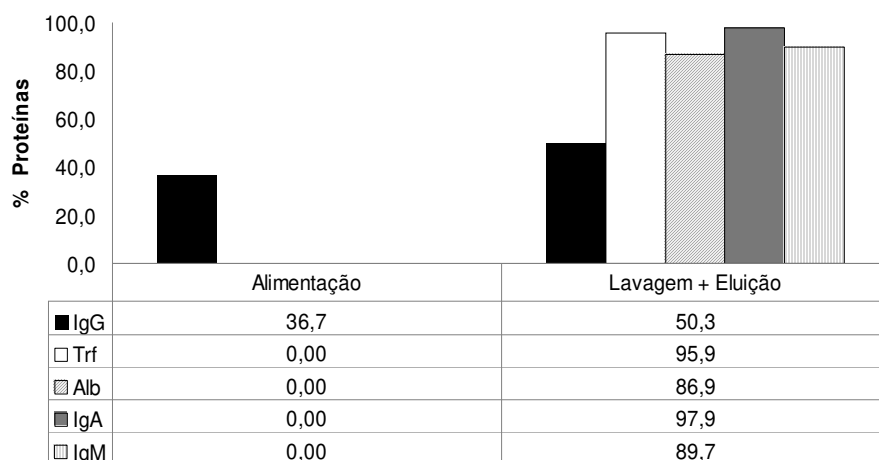


Figura 4-12. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e proteínas recuperadas na lavagem e eluição em ω -aminoetil-agarose em presença do tampão de adsorção HEPES pH 6,8 e eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção.

Tabela 4-6. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminooctil-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	7,13	37,35	2,22	1,10	0,84	43,78	16,3	1,0
Alimentação	2,62	n.d	n.d	n.d	n.d	1,59	164,9	10,1
Lavagem	1,81	0,08	0,05	n.d	n.d	2,44	73,9	4,5
Eluição	1,78	32,40	2,08	1,08	0,76	37,43	4,8	0,3
Regeneração	-	-	-	-	-	0,10	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford (1976).

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

Obteve-se 36,7% (Figura 4-12) de IgG recuperada com alta pureza na etapa de alimentação. A massa de IgG obtida por mililitro do adsorvente (0,87 mg, Tabela 4-6) recuperada com alta pureza é maior em relação a massa de IgG obtida com alta pureza no experimento com o gel ω -aminohexil-agarose (0,53 mg de IgG, Tabela 4-4) nas mesmas condições estudadas. Possivelmente a maior cadeia carbônica do octil, dois carbonos a mais em relação ao aminohexil, tenha possibilitado maior disponibilidade de elétrons da amina do ligante, permitindo, assim, maior interação entre o adsorvente e as impurezas contidas na solução de alimentação.

Apesar dos resultados com o gel ω -aminooctil-agarose terem sido melhores em termos da massa de IgG com alta pureza recuperada por mililitro de

gel (0,87 mg/mL) do que com o gel ω -aminohexil-agarose (0,53 mg/mL), este valor ainda é menor quando comparado com os da literatura (3,23 mg/mL) (Pitiot *et al.*, 2001).

Tendo-se observado um efeito significativo do número de carbonos da diamina na capacidade de adsorção de impurezas e na massa de IgG não retida bem como no grau de pureza da IgG purificada, investigou-se se braços espaçadores teriam um efeito positivo na não retenção de IgG.

4.2. Efeito do tamanho da cadeia carbônica da diamina na purificação de IgG: por cromatografia negativa: géis ativados com bisoxirano

O efeito do tamanho da cadeia carbônica da diamina imobilizada em géis ativados com bisoxirano na purificação de IgG por cromatografia negativa foi estudada com diaminas de cadeias alifáticas lineares de seis, dez e doze carbonos. A ativação da agarose com bisoxirano introduz no gel, segundo o fornecedor Sigma-Aldrich, um braço espaçador de 12 átomos, tendo-se, assim, um longo braço com características hidrofóbicas. Os efeitos hidrofóbicos e de cargas foram considerados na análise da adsorção de IgG e das outras proteínas do soro e do plasma humano nestes adsorventes. Os resultados obtidos foram comparados com os dos experimentos com os géis ativados com CNBr.

4.2.1. Cadeia alifática de seis carbonos: ω -aminohexil-bisoxirano-agarose

Com a finalidade de analisar o efeito da ativação do gel na purificação de IgG e do braço espaçador de 12 átomos, realizou-se experimentos com o adsorvente ω -aminohexil-agarose ativado com bisoxirano, que doravante neste trabalho será denominado ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Com o objetivo de comparar o desempenho deste gel com o ω -aminohexil-agarose ativado com CNBr, realizou-se ensaios cromatográficos em condições idênticas às dos experimentos para obtenção dos pontos de ruptura para IgG descritas no item

4.1.2, alimentando-se a coluna com 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8. Os resultados cromatográficos e eletroforéticos obtidos encontram-se na Figura 4-13 e as análises nefelométricas na Figura 4-14 e Tabela 4-7.

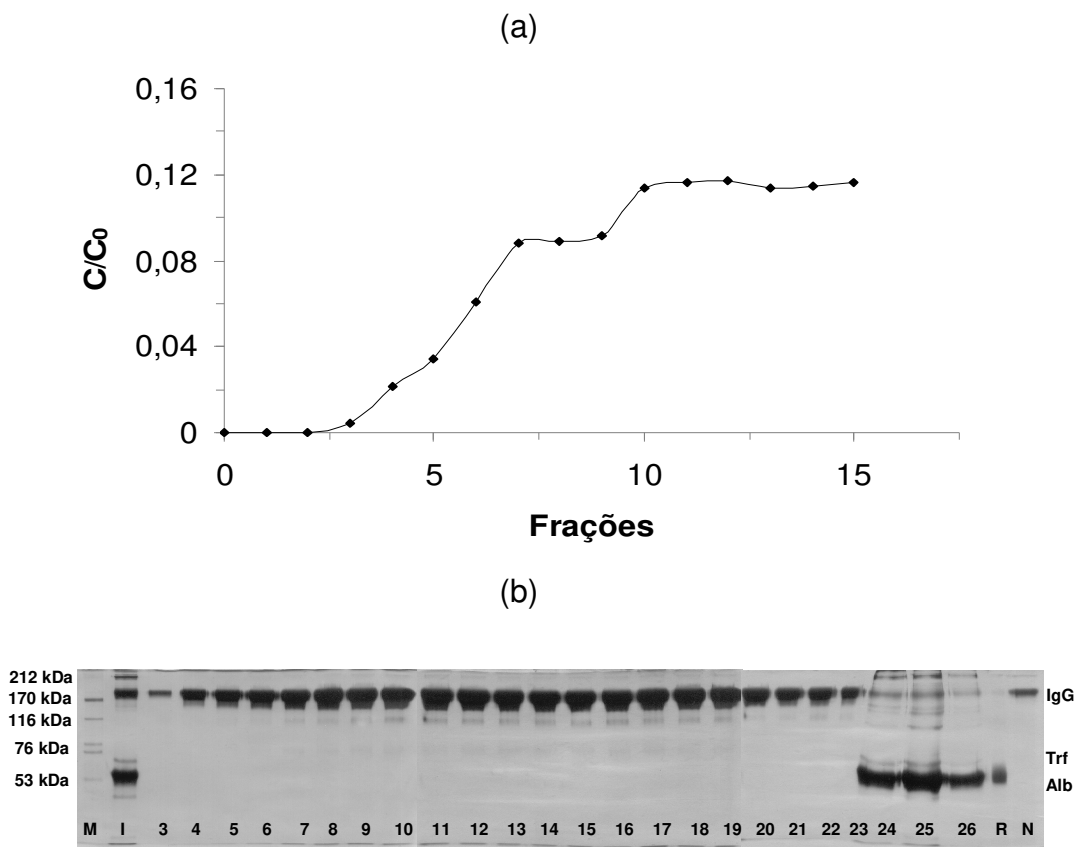


Figura 4-13 (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,29 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 3-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-23: frações da lavagem; 24-26: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG.

Tabela 4-7. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	8,50	32,25	1,69	1,03	1,09	49,40	17,2	1,0
Alimentação	4,00	n.d	n.d	n.d	n.d	3,36	119,0	6,9
Lavagem	2,46	n.d	n.d	n.d	n.d	2,38	103,3	6,0
Eluição	1,78	31,39	1,67	0,98	1,04	40,83	4,4	0,3
Regeneração	-	-	-	-	-	0,27	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

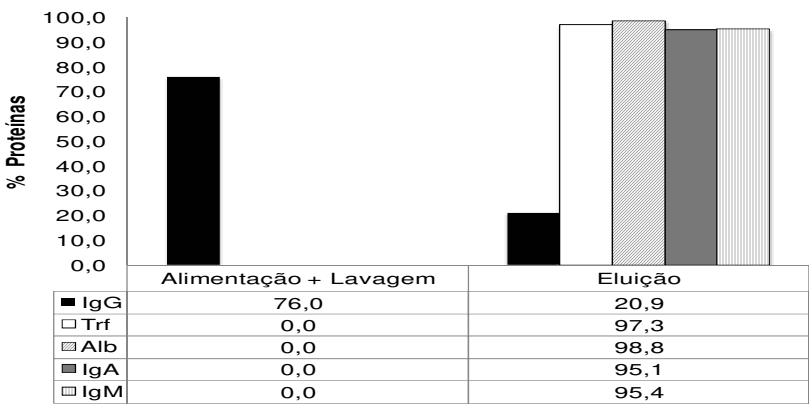


Figura 4-14. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e lavagem e proteínas recuperadas na eluição em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose em presença do tampão HEPES pH 6,8. Volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes.

Segundo a eletroforese da Figura 4-13 (b), a IgG é recuperada livre de impurezas nas etapas de alimentação e lavagem, diferindo bastante do resultado obtido com o gel ω -aminohexil-agarose ativado com CNBr, em termos de capacidade de adsorção de impurezas. Nota-se forte efeito da ativação por bisoxirano na purificação de IgG, pois o ponto de ruptura para o gel ω -aminohexil-agarose foi de 9,0 mL (Figura 4-7), enquanto que para o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, foi possível injetar todo o volume de alimentação sem ser observado o ponto de ruptura, recuperando-se 76% da IgG injetada livre de impurezas (Figura 4-14) contra 20,1% obtido com o gel ω -aminohexil-agarose.

Comparando-se os resultados obtidos com este gel com o os dados obtidos por Pitiot *et al.* (2001), em que utilizaram 2,0 ml adsorvente histidina-aminohexil-agarose (gel ativado com epicloridrina) e alimentação de 1,0 mL de plasma diluído vinte vezes, observa-se que o gel sem histidina (ω -aminohexil-bisoxirano-agarose; coluna com 3,0 mL de gel), purificou a mesma quantidade de IgG (6,46 mg) que o gel com histidina imobilizada, mas em relação a massa de IgG não retida por mililitro de adsorvente, o gel com histidina imobilizada obteve 3,23 mg, enquanto que a proporção para o gel estudado foi de 2,15 mg. Porém, não se tem ao certo noção sobre a pureza das frações não retidas obtidas por Pitiot *et al.* (2001), pois apenas IgG e Alb foram quantificadas.

Comportamento similar a Pitiot *et al.*, (2001) foi apresentado por Bresolin *et al.* (2009), em que obtiveram aproximadamente 7,0 mg (35,5% da IgG injetada na coluna) de IgG com alta pureza nas frações cromatográficas não retidas, quando 19,72 mg de IgG foram alimentadas na coluna contendo 1,0 mL do adsorvente TREN-agarose. Porém, Bresolin *et al.* (2009) quantificaram apenas proteínas totais e detectou IgG somente por eletroforese, assim, não se pode verificar a pureza das frações cromatográficas obtidas.

Com o intuito de determinar o ponto de ruptura para este adsorvente, alimentou-se na coluna o dobro do volume de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8, ou seja, 30,0 mL. Os resultados

cromatográficos e eletroforéticos obtidos encontram-se na Figura 4-15 e as análises nefelométricas na Tabela 4-8 e Figura 4-16.

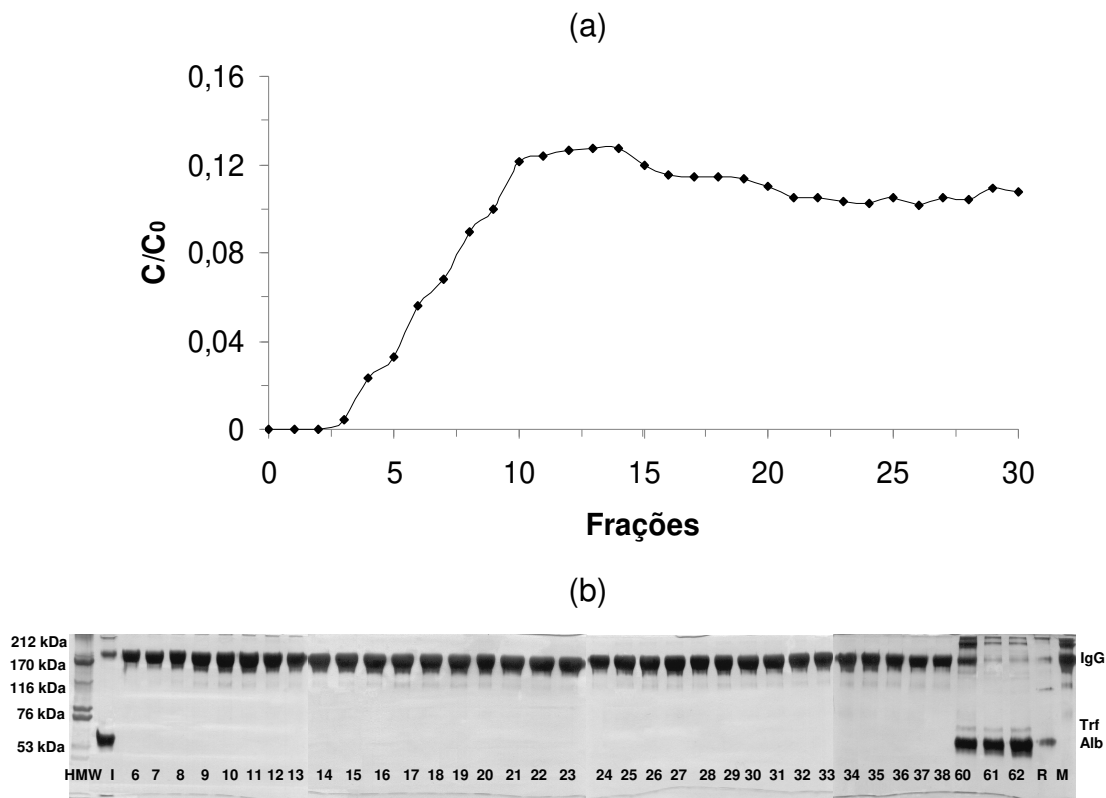


Figura 4-15. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,24 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: HMW: marcador de alta massa molecular; I: amostra de injeção; 6-30: pontos da curva de ruptura (alimentação); 31-38: frações da lavagem; 60-62: frações da eluição; R: fração de regeneração; M: marcador de IgG.

Tabela 4-8. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	16,53	56,10	3,36	2,14	2,12	97,28	17,0	1,0
Alimentação	10,12	n.d	n.d	n.d	n.d	8,43	120,0	7,1
Lavagem	2,57	n.d	n.d	n.d	n.d	2,08	123,4	7,3
Eluição	3,10	54,90	3,29	2,11	2,10	83,40	3,7	0,2
Regeneração	-	-	-	-	-	0,17	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

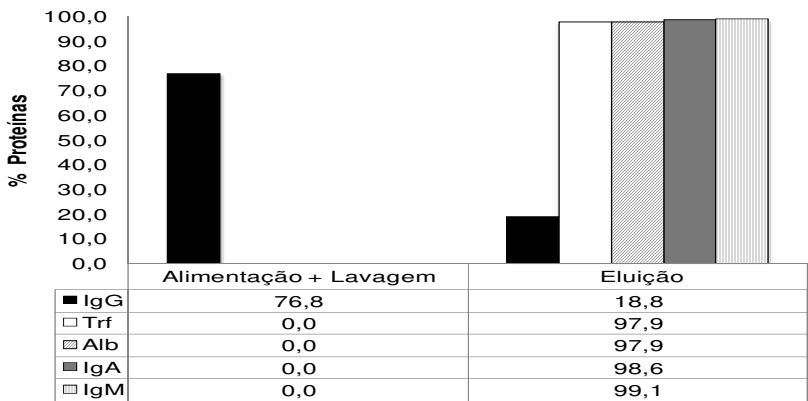


Figura 4-16. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e lavagem e proteínas recuperadas na eluição em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose em presença do tampão HEPES pH 6,8. Volume final de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes.

Observa-se que o ponto de ruptura não foi atingido para alimentação de volume de 30,0 mL. A obtenção de maior massa de IgG com alta pureza nas frações não retidas nos ensaios com o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose (4,23 mg de IgG/mL de adsorvente) pode ser, provavelmente, devido a hidrofobicidade e a diminuição dos efeitos estéricos, pois a ativação com bisoxirano insere à matriz um braço espaçador com 12 átomos, enquanto que a ativação por CNBr insere apenas 1, levando a maior capacidade de adsorção de proteínas.

Como não foi obtido o ponto de ruptura para IgG, analisou-se a influência da diluição da solução de soro alimentado na coluna cromatográfica. Realizaram-se experimentos cromatográficos com volume de alimentação de 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes, assim pode-se avaliar se a mesma massa alimentada (96,9 mg de proteínas totais), porém com um volume menor de alimentação e solução menos diluída, apresentavam efeito na purificação de IgG por cromatografia negativa. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figuras 4-17 e Tabela 4-9.

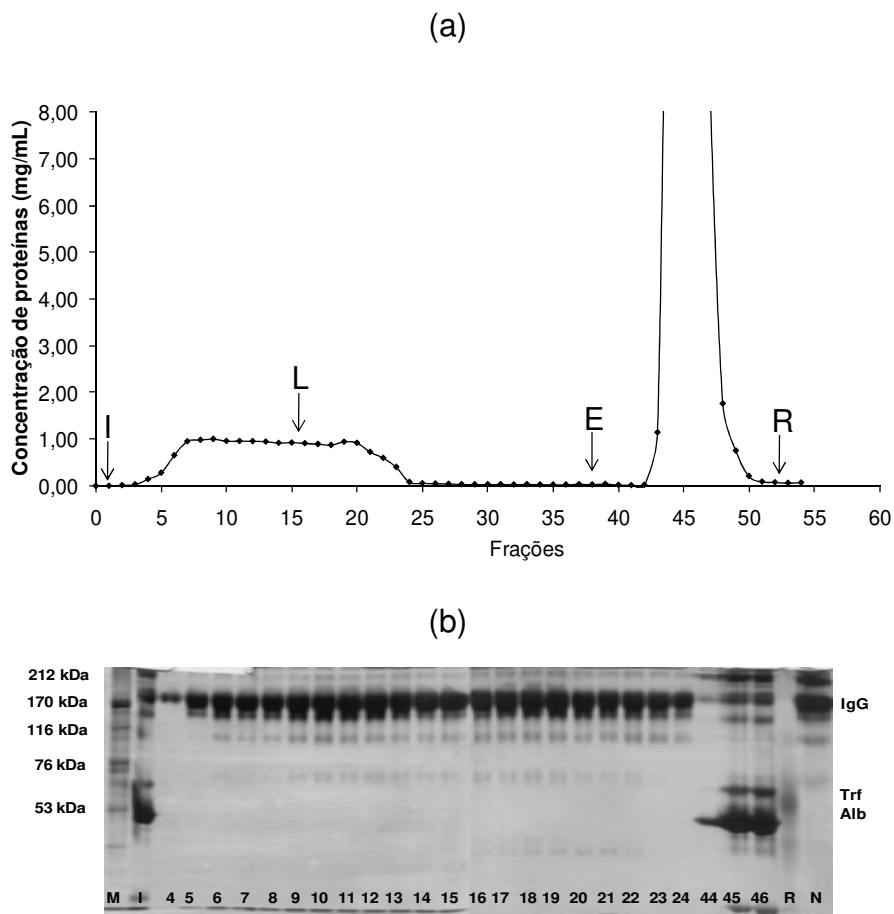


Figura 4-17. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído dez vezes (6,46 mg de proteínas totais/mL). I: Injeção da amostra; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: amostra de injeção; 4-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-24: frações da lavagem; 44-46: frações da eluição; R: fração de regeneração; N: marcador de IgG.

Tabela 4-9. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	18,30	61,50	3,53	2,10	2,12	96,88	18,9	1,0
Alimentação+Lavagem (frações 4-24)	15,36	n.d	n.d	n.d	n.d	16,05	95,7	5,1
Eluição	2,92	61,20	3,42	1,90	2,20	70,69	4,1	0,2
Regeneração	-	-	-	-	-	0,31	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

A partir da análise da eletroforese da Figura 4-17, observa-se que para o experimento com alimentação de soro diluído dez vezes, tem-se IgG obtida com boa pureza nas frações 4 a 24, correspondentes a alimentação e lavagem, porém com pureza eletroforética menor que aquela obtida quando o soro foi diluído 20 vezes (Figura 4-15). Pelas análises nefelométricas tem-se IgG com alta pureza nas etapas de alimentação e lavagem (5,13 mg de IgG com alta pureza por mililitro de adsorvente).

Observa-se a partir destes experimentos que o ponto de ruptura também não foi atingido. Para alcançar este objetivo, alimentou-se a coluna cromatográfica até que a concentração de saída da coluna fosse igual à de entrada. O volume de alimentação necessário para a saturação da coluna foi de 106,0 mL de solução de

soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8. As frações coletadas durante a cromatografia foram de 2,0 mL. O perfil cromatográfico e eletroforético obtidos estão apresentados na Figura 4-18 e os resultados das análises nefelométricas na Tabela 4-10.

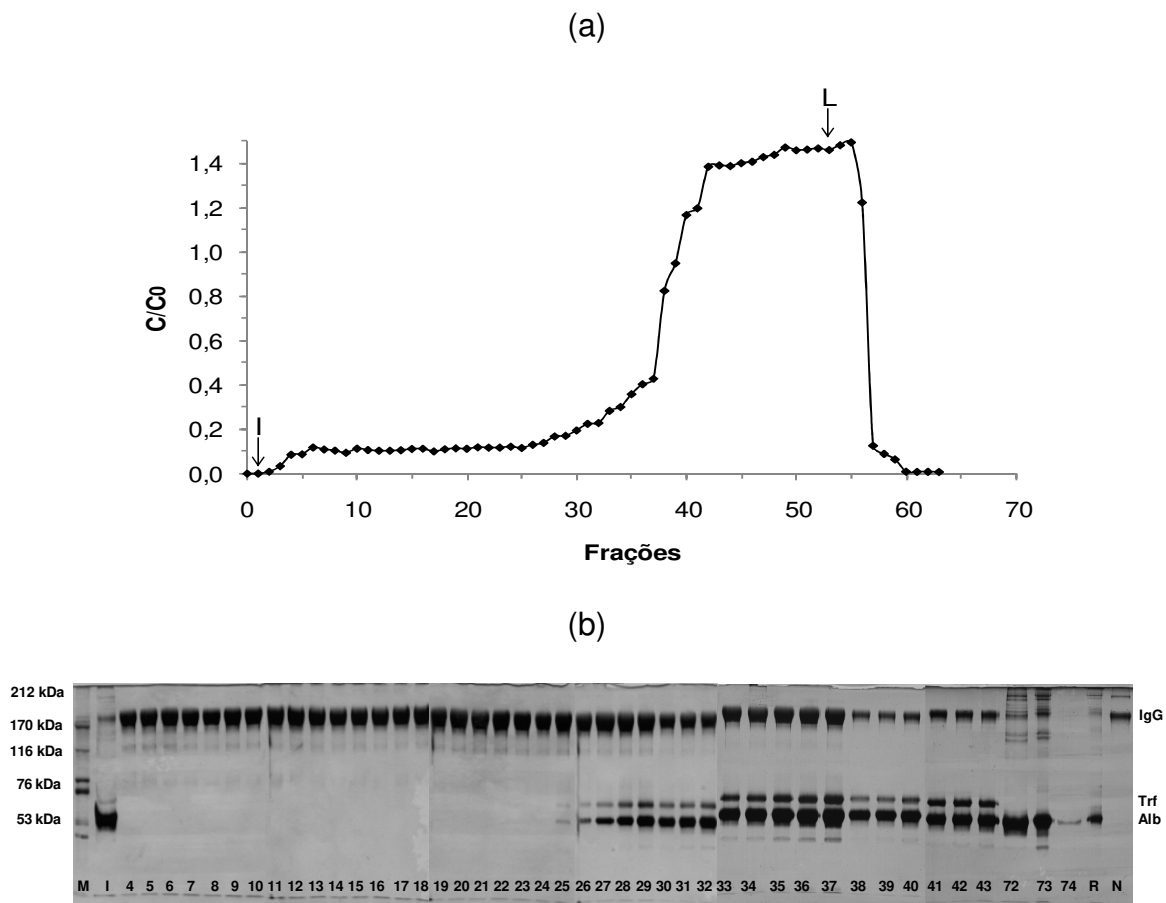


Figura 4-18. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 106,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,39 mg de proteínas totais/mL). I: Injeção da amostra; L: Lavagem. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: amostra de injeção; 4-43: pontos da curva de ruptura (alimentação); 72-74: frações da eluição; R: fração de regeneração; N: marcador de IgG.

Tabela 4-10. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	72,50	213,1	18,70	22,40	9,68	359,58	20,2	1,0
Alimentação (frações de 4 a 24)	21,13	n.d	n.d	n.d	n.d	15,38	137,4	6,8
Alimentação + Lavagem (frações de 25 a 56)	42,50	109,0	17,90	n.d	n.d	194,21	21,9	1,1
Eluição	6,68	128,0	1,53	20,51	8,96	149,30	4,5	0,2
Regeneração	-	-	-	-	-	0,52	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL de IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

A eletroforese da Figura 4-18 (b) mostra que as proteínas transferrina e albumina começam a ser detectadas a partir da fração cromatográfica 25 (volume de alimentação de 50,0 mL de solução de soro), deste modo, o ponto de ruptura para IgG é de 48,0 mL de solução de alimentação, representando uma recuperação de massa de IgG com alta pureza por mililitro do adsorvente de 7,04 mg (Tabela 4-10). A saturação da coluna C/C_0 igual a 1,0 foi obtida com aproximadamente 80,0 mL de alimentação (Figura 4-18 (a)). Os valores maiores que 1,0 para C/C_0 apresentados na Figura 4-18 (a) pode ser devido a uma parte

das proteínas que estavam adsorvidas fracamente na coluna foi dessorvida pela solução de soro alimentada.

Como os resultados obtidos foram satisfatórios para purificação de IgG a partir de solução de soro humano, realizaram-se, em seguida, experimentos com alimentação de solução de plasma humano que contém uma maior massa de proteínas do que o soro. Para os experimentos com plasma empregou-se os tampões MOPS a pH 7,9 e HEPES a pH 8,2. Estas condições de pH foram utilizadas devido ao fato das proteínas do plasma humano terem precipitado em tampões com valores de pH abaixo de 7,9.

Realizaram-se experimentos com plasma diluído dez e vinte vezes nos tampões MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2 com o adsorvente ω -aminohexil-bisoxirano-agarose em condições similares às dos experimentos para obtenção dos pontos de ruptura para IgG descritas no item 4.1.2, alimentando-se a coluna com 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 8,2 e MOPS pH 7,9 e plasma humano diluído dez vezes em tampão MOPS pH 7,9. Os resultados cromatográficos e eletroforéticos obtidos para a diluição de vinte vezes encontram-se nas Figuras 4-19 e 4-20 e as análises nefelométricas na Tabela 4-11.

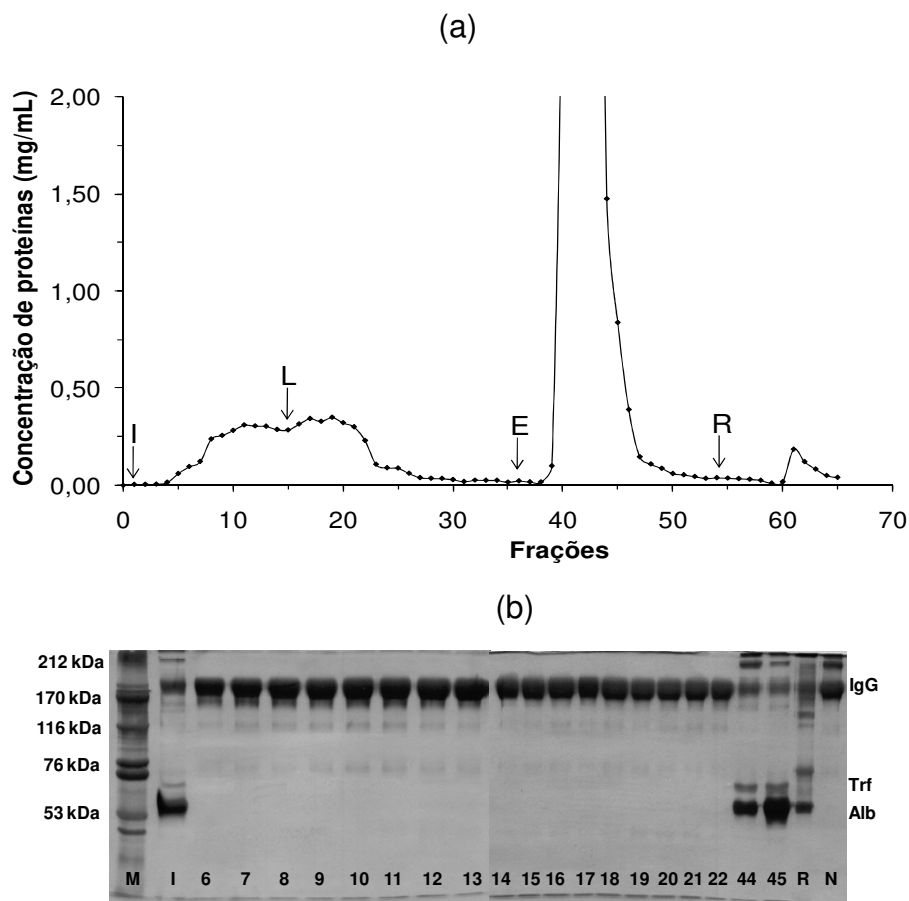


Figura 4-19. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (3,40 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 6-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 44-45: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG.

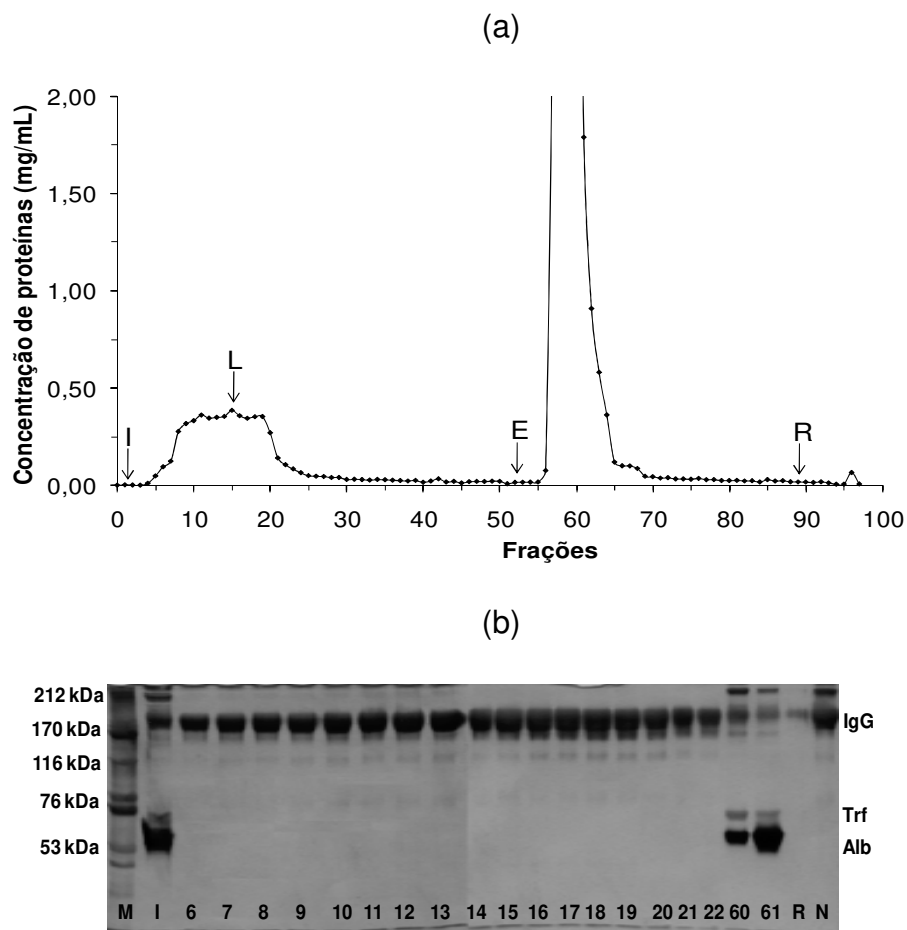


Figura 4-20. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 8,2 (3,29 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 6-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 60-61: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG.

Tabela 4-11. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG a partir do plasma humano em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Sistema	Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
		IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
MOPS pH 7,9	Solução inicial	8,07	27,9	1,74	1,00	1,09	51,03	15,8	1,0
	Alimentação	3,08	n.d	n.d	n.d	n.d	2,49	123,7	7,8
	Lavagem	2,51	n.d	n.d	n.d	n.d	2,30	109,0	6,9
	Eluição	1,89	25,7	1,64	1,02	1,1	43,95	4,3	0,3
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,68	-	-
HEPES pH 8,2	Solução inicial	8,48	29,7	1,82	0,90	1,74	49,37	17,2	1,0
	Alimentação	3,07	n.d	n.d	n.d	n.d	2,90	105,9	6,2
	Lavagem	2,39	n.d	n.d	n.d	n.d	1,91	125,1	7,3
	Eluição	2,57	27,5	1,75	0,86	1,63	37,90	6,8	0,4
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,16	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

As eletroforeses das Figuras 4-19 e 4-20 e os resultados de nefelometria mostraram que IgG é detectada na etapa de alimentação e lavagem, juntamente com uma banda de proteína de massa molecular de aproximadamente 100 kDa, que não foi detectada nos experimentos com soro humano. As análises nefelométricas não acusaram presença de IgA, IgM, albumina ou transferrina nas frações protéicas não retidas.

A banda de proteína de massa molecular de aproximadamente 100 kDa localiza-se na mesma altura da banda detectada na faixa do marcador de IgG comercial, sendo possível que esta proteína seja um fragmento de IgG.

Nota-se pequeno efeito do tipo de solução alimentada na coluna contendo gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, pois foi possível injetar todo o volume de alimentação de 15 mL, tanto de solução de plasma quanto de solução de soro, sem ser observado o ponto de ruptura, recuperando-se 76,0% de IgG injetada livre de impurezas para alimentação de solução de soro e 69 e 64% de IgG injetada livre de impurezas para alimentação de solução de plasma.

Comparando-se estes resultados com os obtidos por Pitiot *et al.* (2001), observa-se que foi obtido 15,6% menos massa de IgG purificada. Este resultado pode ter sido influenciado pelas condições tamponantes, pois as proteínas do plasma humano precipitaram em tampões com valores de pH abaixo de 7,9, fenômeno que não foi relatado por Pitiot *et al.* (2001), pois a melhor condição analisada foi MOPS pH 7,9.

Para análise do efeito da diluição do plasma na purificação de IgG, realizaram-se experimentos com alimentação de 8,0 mL de solução de plasma diluído dez vezes no tampão MOPS pH 7,9 (melhor condição para a diluição de vinte vezes). Os resultados obtidos para este experimento encontram-se apresentados na Figura 4-21 e Tabela 4-12.

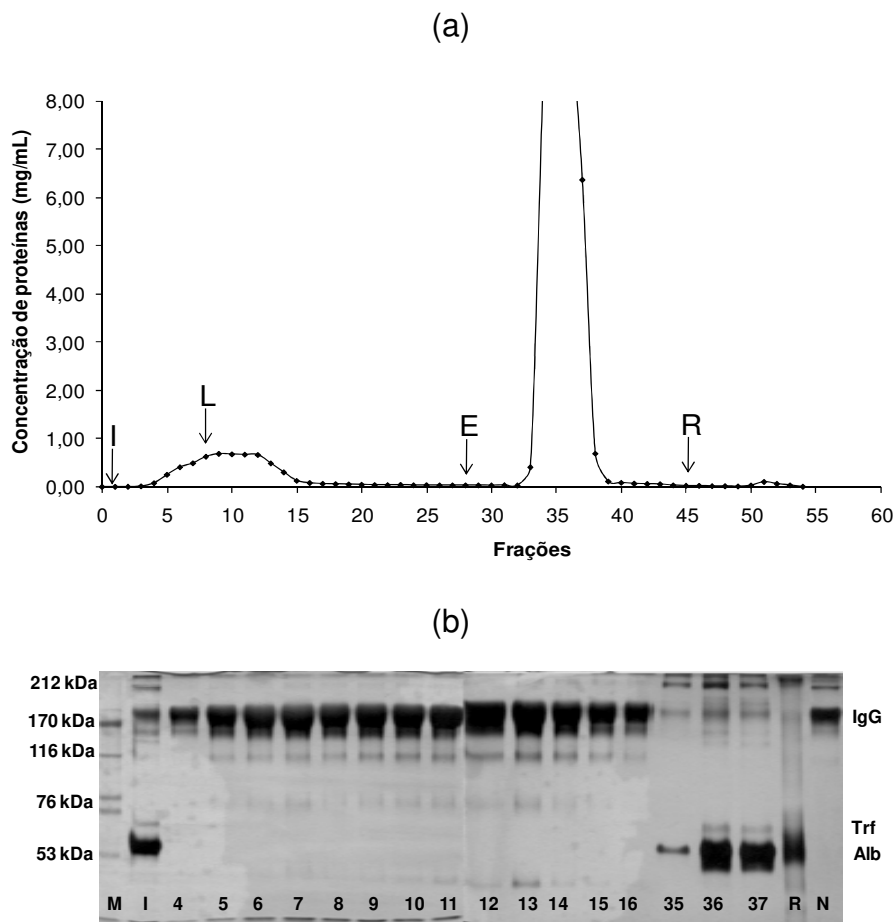


Figura 4-21. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 8,0 mL de solução de plasma humano diluído dez vezes em tampão MOPS pH 7,9 (6,46 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 4-8: frações da alimentação; 9-16: frações da lavagem; 35-37: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG.

A partir das análises da eletroforese da Figura 4-21 e Tabela 4-12, observa-se que IgG é obtida com alta pureza nas frações 4-16 correspondentes as etapas de alimentação e lavagem. A massa de IgG obtida com alta pureza por mililitro de adsorvente para a diluição de dez vezes (1,81 mg) foi similar a obtida com a diluição de vinte vezes (1,87 mg). Este resultado indica que ambas as diluições são favoráveis a purificação de IgG a partir do plasma humano.

Tabela 4-12. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG a partir do plasma humano em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: MOPS pH 7,9. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	9,92	31,2	1,77	1,08	1,10	51,7	19,2	1,0
Alimentação+Lavagem (Frações 4-16)	5,43	n.d	n.d	n.d	n.d	5,38	100,9	5,3
Eluição	4,04	30,1	1,74	1,02	1,00	40,4	10,0	0,5
Regeneração	-	-	-	-	-	0,25	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leite: 3,0 mL.

Observa-se que nos experimentos realizados com plasma não foi atingida o ponto de ruptura para IgG. Deste modo, realizou-se experimento com alimentação de 50,0 mL de solução de plasma diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (melhor condição) para a obtenção do ponto de ruptura para IgG. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4-22 e Tabela 4-13.

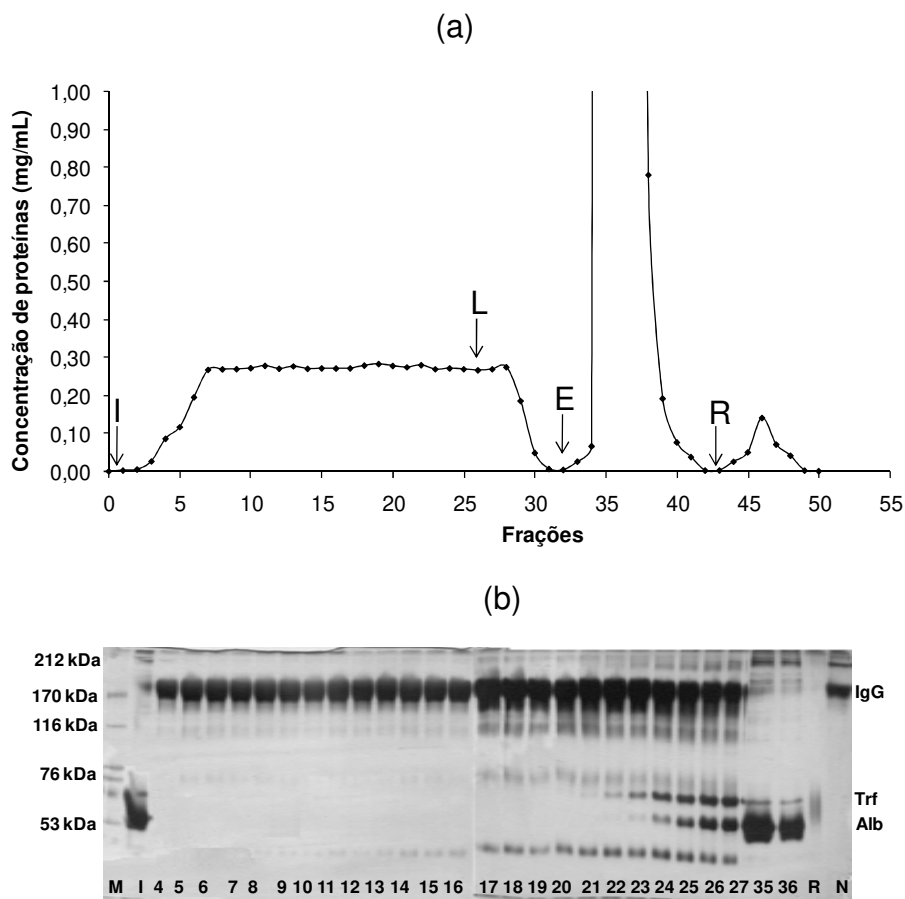


Figura 4-22. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 50,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (2,60 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 4-25: frações da alimentação; 26-27: frações da lavagem; 35-36: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG.

Tabela 4-13. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG a partir do plasma humano em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Adsorção: MOPS pH 7,9. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG		
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	20,55	96,0	6,05	2,76	2,07	129,8	15,8	1,0
Alimentação (Frações 4-20)	10,62	n.d	n.d	n.d	n.d	8,03	132,3	8,4
Lavagem	6,14	n.d	0,32	n.d	n.d	4,71	130,4	8,2
Eluição	3,04	94,1	6,06	2,71	2,00	107,0	2,8	0,2
Regeneração	-	-	-	-	-	0,74	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford

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

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

* n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

Observa-se pela eletroforese da Figura 4-22 que o ponto de ruptura para IgG foi obtido na fração 21, correspondendo a 42,0 mL de volume alimentado de plasma diluído vinte vezes (para este experimento foi coletado 2,0 mL de amostra). Assim, pode-se alimentar 40,0 mL de solução de plasma diluído vinte vezes para obtenção de IgG com alta pureza. A massa de IgG obtida com alta pureza foi de 3,54 mg por mililitro de adsorvente, valor semelhante ao relatado na literatura (3,23 de IgG mg por mililitro de adsorvente) (Pitiot *et al.*, 2001).

Como o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose apresentou comportamento distinto do observado com o gel ω -aminohexil-agarose e dos apresentados na literatura, realizaram-se experimentos com o gel ω -aminodecil-agarose ativado com bisoxirano para analisar se o aumento da cadeia carbônica do ligante, repercutia efeito na purificação de IgG.

4.2.2. Cadeia alifática de dez carbonos: ω -aminodecil-bisoxirano-agarose

Os ensaios cromatográficos com o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose foram conduzidos nos valores intermediários de pH dos sistemas tamponantes MES, MOPS e HEPES demonstraram que, dentro das suas respectivas faixas tamponantes, todos os sistemas tamponantes testados favoreceram a purificação de IgG nas frações não retidas (Apêndice E). O tampão que apresentou melhores resultados foi, similarmente aos outros géis estudados, o HEPES, pH 6,8.

Com a finalidade de comparar o desempenho do gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose com o ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, realizou-se ensaios cromatográficos em condições idênticas ao experimento descrito no item 4.2.1, alimentando-se a coluna com 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,38 mg/mL de proteínas totais) em tampão HEPES pH 6,8. A Figura 4-23 apresenta os resultados cromatográficos e eletroforeses realizadas e na Tabela 4-14 e Figura 4-24, os resultados das análises nefelométricas.

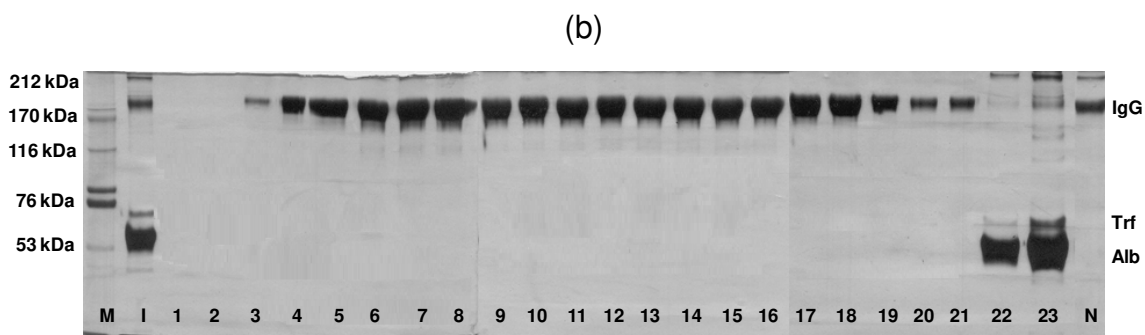
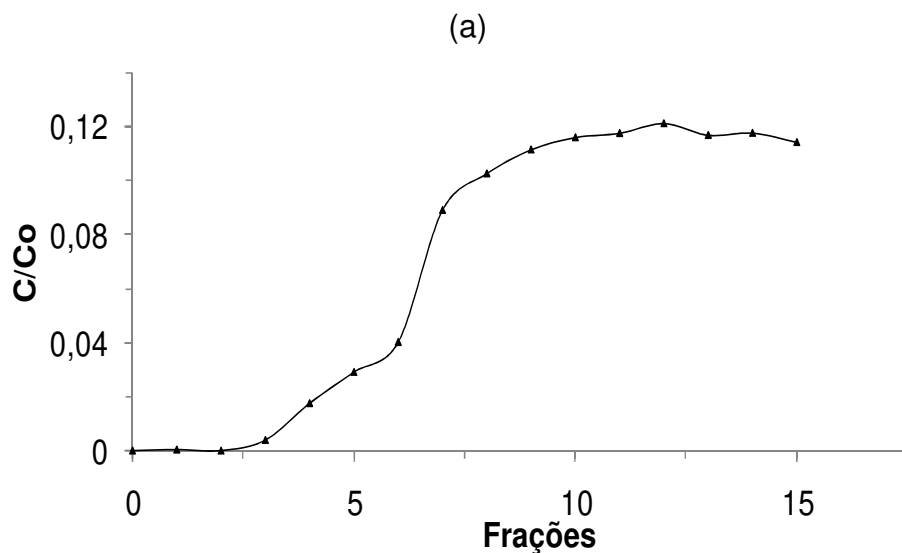


Figura 4-23. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,38 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-21: frações da lavagem; 22-23: frações da eluição; N: marcador de IgG.

Tabela 4-14. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: por acréscimo de 1,0 M NaCl em tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	9,12	30,2	1,48	1,06	1,15	45,24	20,2	1,00
Alimentação	4,67	n.d	n.d	n.d	n.d	4,29	108,9	5,40
Lavagem	2,72	n.d	n.d	n.d	n.d	2,45	111,0	5,51
Eluição	1,36	29,3	1,44	0,97	1,12	35,91	3,8	0,19
Regeneração	-	-	-	-	-	0,37	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford , 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

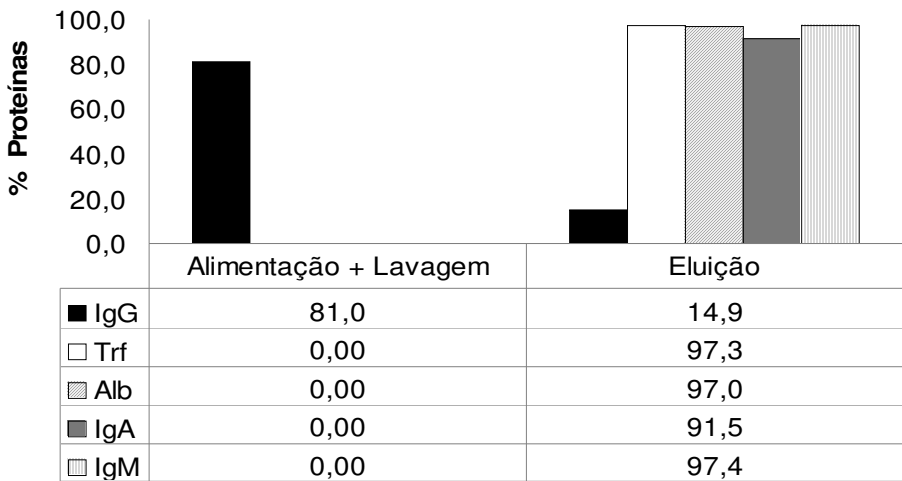


Figura 4-24. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvidas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em presença dos tampões MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2, eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção.

Segundo a eletroforese da Figura 4-23 (b), tem-se que IgG foi recuperada livre de impurezas das frações 3 a 21, que correspondem as frações coletadas durante a etapa de alimentação e de lavagem da coluna. A capacidade deste gel em adsorver proteínas do soro é alta, como observado igualmente para o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, pois foi possível injetar o volume de alimentação de 15,0 mL sem ser observado o ponto de ruptura, recuperando-se 81% da IgG injetada com alta pureza (massa de 2,46 mg de IgG/mL do adsorvente) (Tabela 4-14 e Figura 4-24).

Realizaram-se duplicata para alimentação de 15,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes e obteve-se também IgG com alta pureza nas frações de alimentação e lavagem da coluna (Apêndice E).

Com o intuito de determinar o ponto de ruptura para este adsorvente, alimentou-se na coluna o dobro do volume, ou seja, 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8. O perfil cromatográfico e eletroforético obtidos estão apresentados na Figura 4-25 e os resultados das análises nefelométricas na Tabela 4-15 e Figura 4-26.

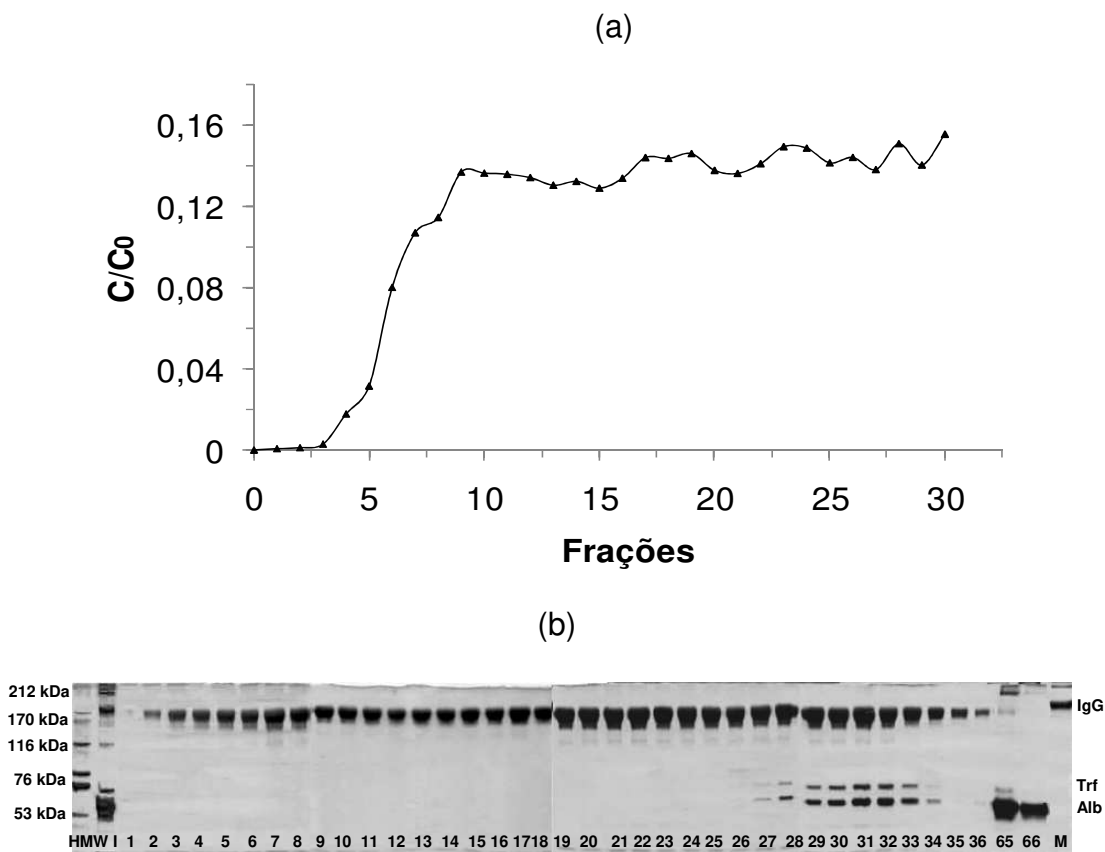


Figura 4-25. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,09 mg de proteínas totais/mL). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-30: pontos da curva de ruptura (alimentação); 31-36: frações da lavagem; 65-66: frações da eluição; M: marcador de IgG.

Tabela 4-15. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	18,09	54,6	2,95	2,07	2,06	92,82	19,5	1,0
Alimentação (frações de 1 a 26)	13,52	n.d	n.d	n.d	n.d	10,65	126,9	6,5
Alimentação+								
Lavagem (frações de 27 a 36)	3,26	0,18	0,15	n.d	n.d	3,43	95,1	4,9
Eluição	1,22	52,6	2,71	2,02	1,93	75,59	1,6	0,1
Regeneração	-	-	-	-	-	0,41	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leite: 3,0 mL.

A eletroforese da Figura 4-25 (b), mostra que IgG foi recuperada com alta pureza das frações 1 a 26 (etapa de alimentação), correspondendo a 74,7% da massa de IgG injetada e 4,51 mg de IgG não retida por mililitro de adsorvente (Figura 4-26 e Tabela 4-15). As impurezas albumina e transferrina começaram a ser detectadas a partir da fração 27, o qual foi denominado ponto de ruptura. Estas impurezas continuaram a ser detectadas nas etapas de lavagem e eluição da coluna cromatográfica. O volume máximo a ser alimentado na coluna com gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose para a obtenção de IgG com alta pureza é de 27,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes.

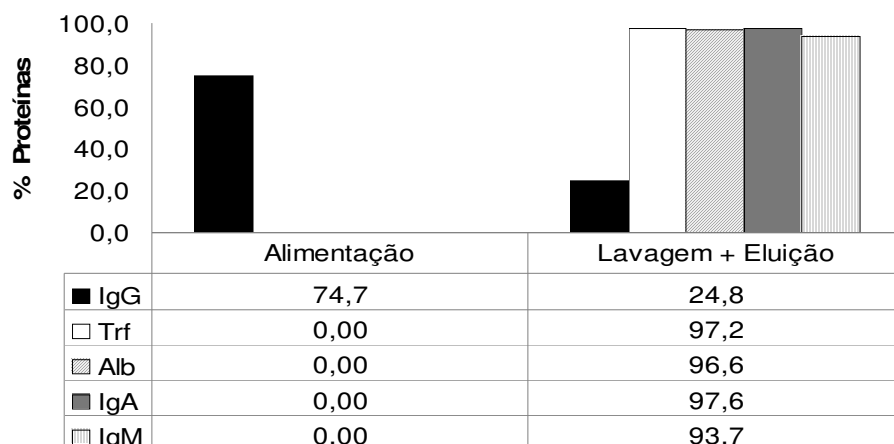


Figura 4-26. Porcentagens de recuperação de IgG de alta pureza na alimentação e proteínas recuperadas na lavagem e eluição em ω -aminodecil-agarose em presença do tampão HEPES pH 6,8 e eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção.

Em relação à massa de IgG purificada com alta pureza, o adsorvente ω -aminodecil-bisoxirano-agarose teve uma menor massa de IgG recuperada com alta pureza por mililitro de adsorvente (4,51 mg), enquanto que a massa obtida para o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose foi de 7,04 mg de IgG com alta pureza por mililitro de adsorvente, mostrando, assim, que a maior cadeia carbônica do gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose acarretou na maior adsorção de IgG. A recuperação de IgG obtida pelos dois géis apresentam resultados satisfatórios quando comparados aos dados obtidos por Pitiot *et al.* (2001) (3,23 mg de IgG por mililitro de gel).

Para analisar a influência do volume e diluição da solução de soro alimentada na coluna cromatográfica, realizaram-se experimentos cromatográficos com volume de alimentação de 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes, assim pode-se avaliar se um volume menor de alimentação com mesma massa de proteínas totais alimentada (aproximadamente 80,0 mg de proteínas totais) influenciam na purificação de IgG por cromatografia negativa. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 4-27.

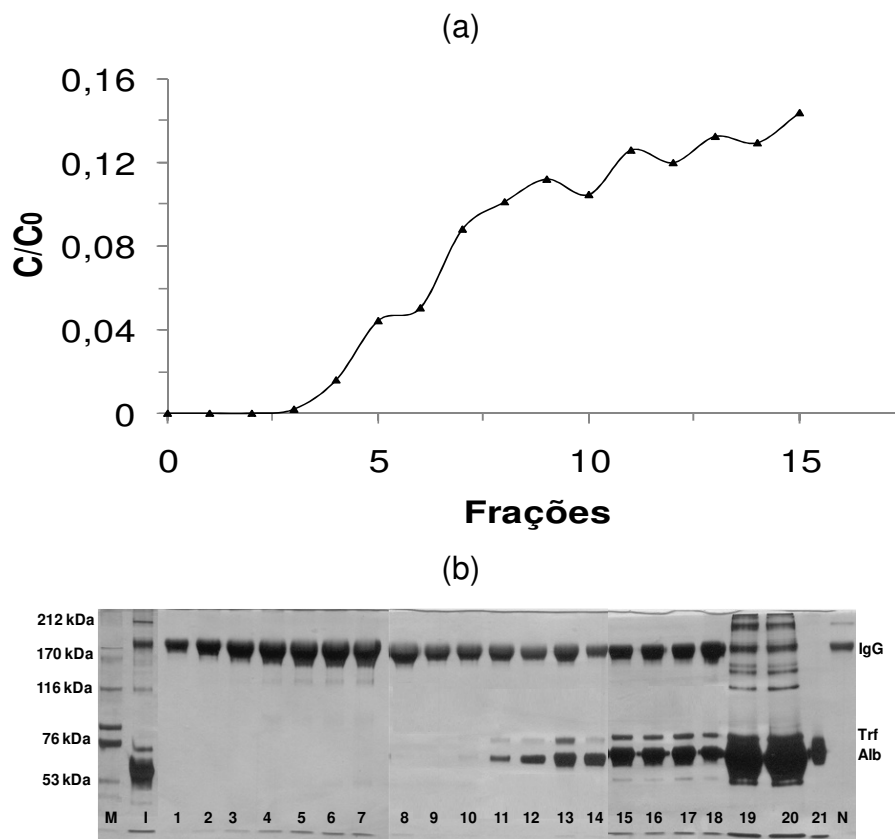


Figura 4-27. Curva de ruptura do experimento em gel ω -aminodecil-agarose, volume de alimentação 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes. Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-8: pontos da curva de ruptura (alimentação); 9-15: pontos da lavagem; 16-17: pontos da eluição; N: marcador de IgG.

Tabela 4-16. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel ω -aminodecil-agarose. Volume de alimentação 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	16,35	53,55	2,98	2,64	1,26	84,80	19,3	1,0
Alimentação	5,68	n.d	n.d	n.d	n.d	3,36	169,0	8,7
Lavagem	8,28	0,94	0,71	n.d	n.d	9,97	83,0	4,3
Eluição	1,22	48,7	2,21	2,45	1,16	66,67	1,8	0,1
Regeneração	-	-	-	-	-	0,58	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

O experimento realizado com volume de alimentação de 15,0 mL de solução de soro diluído dez vezes (Figura 4-27) mostra que IgG é apenas recuperada com alta pureza das frações 1-10 da etapa de alimentação (1,89 mg de IgG/mL do adsorvente, Tabela 4-16), sendo que na diluição de vinte vezes obteve-se maior massa de IgG com elevada pureza nas frações 1 a 26 da etapa de alimentação (4,51 mg de IgG/mL do adsorvente, Tabela 4-15). Estes resultados mostram que a capacidade de adsorção de proteínas do gel foi mais significativa na maior diluição da alimentação (vinte vezes).

Este comportamento pode ser explicado com base na condutividade das soluções de soro. Bresolin e colaboradores (2009) mediram a condutividade do soro humano (9,21 mS/cm, pH 7,4) e de soluções de soro com diluições de cinco (3,02 mS/cm, pH 6,9), dez (2,10 mS/cm, pH 6,7) e vinte (1,595 mS/cm, pH 6,5)

vezes e observaram que a capacidade de adsorção de proteínas no gel TREN-agarose foi mais eficiente a baixos valores de condutividade e pH próximos a 6,5, sendo estas características coerentes com o as interações eletrostáticas em trocadores de íons clássicos, em que a diluição do soro ou plasma é necessária para maior adsorção devido a alta condutividade destes fluidos (Bresolin *et al.*, 2009).

Diante desses resultados, analisaram-se também o efeito do tipo de alimentação na purificação de IgG por cromatografia negativa. Alimentaram-se soluções de plasma humano diluído vinte e dez vezes na coluna contendo o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, com condições similares às dos experimentos para obtenção dos pontos de ruptura para IgG descritas no item 4.1.2. Para a diluição de vinte vezes, foram alimentados 15,0 mL de solução de plasma humano diluído em tampão HEPES pH 8,2 e MOPS pH 7,9. Estas condições de pH foram utilizadas devido ao fato das proteínas do plasma humano terem precipitado em tampões com valores de pH abaixo de 7,9. Os resultados cromatográficos e eletroforéticos obtidos para as duas condições encontram-se nas Figuras 4-25 e 4-26 e as análises nefelométricas na Tabela 4-14.

Para a diluição de dez vezes, foram injetados 8,0 mL de solução de plasma diluído dez vezes em tampão HEPES pH 8,2 (melhor resultado obtido da diluição de vinte vezes). Os resultados obtidos para esta condição encontram-se apresentados na Figura 4-30.

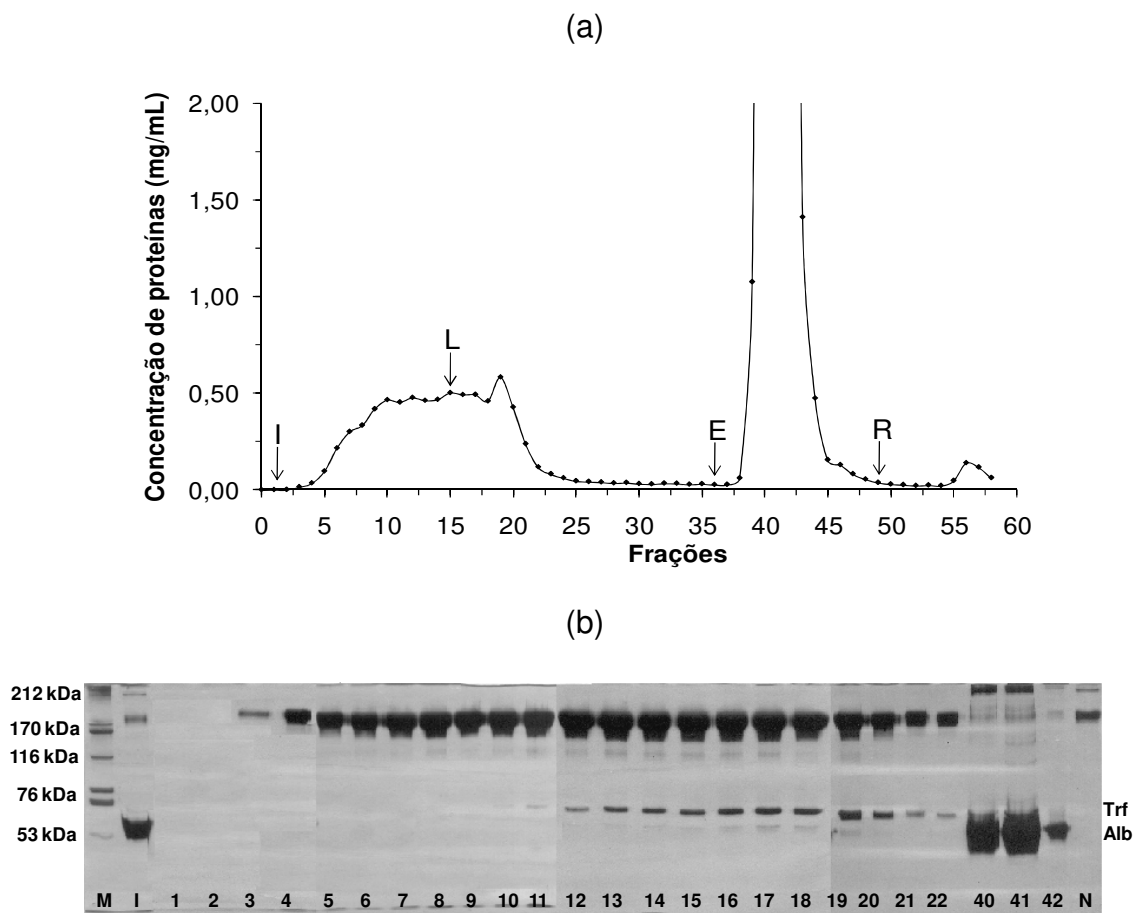


Figura 4-28. (a) Início da curva de ruptura de IgG do experimento em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão MOPS pH 7,9 (3,40 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 1-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 40-42: frações da eluição; N: marcador de IgG.

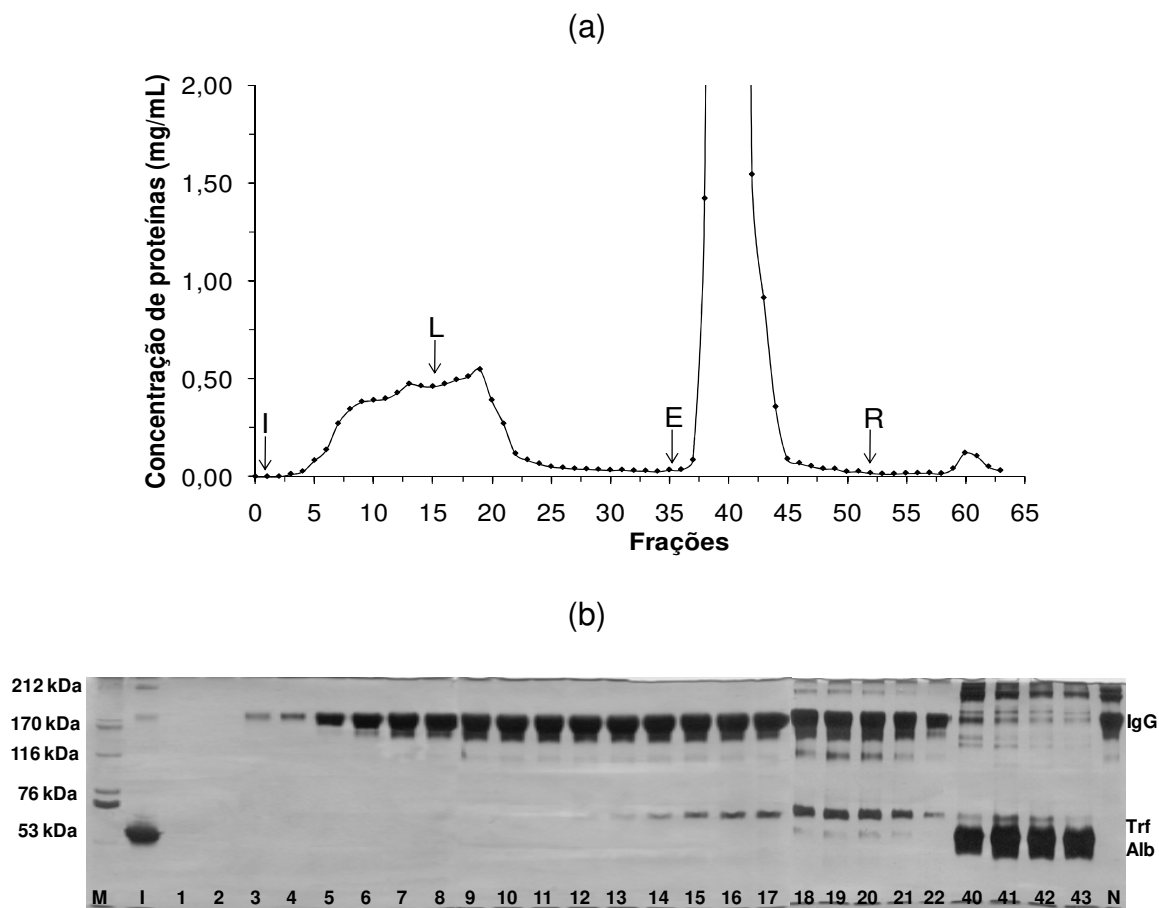


Figura 4-29. (a) Início da curva de ruptura do experimento em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 15,0 mL de solução de plasma humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 8,2 (3,34 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 1-15: frações da alimentação; 16-22: frações da lavagem; 40-43: frações da eluição; N: marcador de IgG.

Tabela 4-17. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica de purificação de IgG em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose a partir do plasma diluído vinte vezes. Adsorção: MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Sistema	Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
		IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
MOPS pH 7,9	Solução inicial	10,4	29,3	1,65	1,05	1,19	51,0	20,4	1,0
	Alimentação (Frações 1-10)	1,94	n.d	n.d	n.d	n.d	1,89	102,6	5,0
	Alimentação + Lavagem (Frações 11-22)	6,07	n.d	0,32	n.d	n.d	6,57	92,4	4,5
	Eluição	1,85	28,2	1,31	1,02	1,16	40,4	4,6	0,2
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,49	-	-
HEPES pH 8,2	Solução inicial	10,5	29,7	1,65	1,08	1,36	50,1	21,0	1,0
	Alimentação (Frações 1-11)	2,82	n.d	n.d	n.d	n.d	2,7	104,4	5,0
	Alimentação + Lavagem (Frações 12-22)	4,86	n.d	0,26	n.d	n.d	4,9	99,2	4,7
	Eluição	1,98	28,9	1,28	1,02	1,23	38,6	5,1	0,2
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,43	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

As eletroforeses das Figuras 4-28 e 4-29 dos experimentos realizados com o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose mostraram que IgG é recuperada sem impurezas das frações cromatográficas da alimentação de 1 a 10 e de 1 a 11 para os tampões MOPS pH 7,9 e HEPES pH 8,2, respectivamente. As proteínas transferrina e albumina começaram a ser detectadas eletroforicamente e nefelometricamente (somente a transferrina) nas frações finais da etapa de alimentação e lavagem. Comparando-se estes resultados com os obtidos com injeção de solução de soro humano, observa-se um grande efeito do tipo de solução alimentada em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, pois com a alimentação de soro humano, a IgG foi recuperada com alta pureza nas etapas de alimentação e lavagem, enquanto que para a alimentação de plasma, detectou-se a presença de transferrina e albumina nas frações não retidas. Conclui-se que a capacidade de adsorção de proteínas do plasma do gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose é menor que a do gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Ressalta-se que os experimentos com plasma foram realizados com valores mais altos de pH, sendo que a ionização do tampão pode ter influenciado na não retenção de transferrina e albumina.

A eletroforese da Figura 4-30 do experimento realizado com o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose e alimentação de plasma diluído dez vezes mostraram que IgG é recuperada com impurezas a partir da fração 8 (final da alimentação). Das frações com alta pureza (4-7) obteve-se apenas 0,81 mg de proteínas totais, sendo este resultado inferior ao obtido com a diluição de vinte vezes, em que se obteve 2,82 mg de IgG com alta pureza.

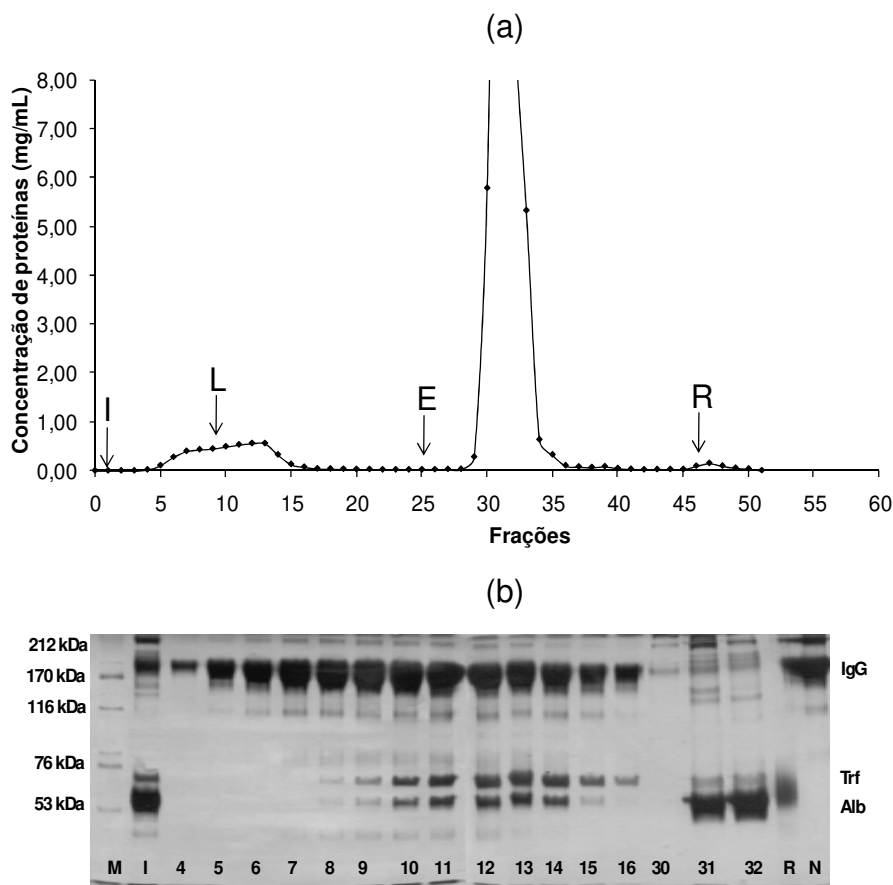


Figura 4-30. (a) Experimento com ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume de alimentação: 8,0 mL de solução de plasma humano diluído dez vezes em tampão HEPES pH 8,2 (6,35 mg de proteínas totais/mL). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem, eluição e regeneração: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 4-8: frações da alimentação; 9-16: frações da lavagem; 30-33: frações da eluição; N: marcador de IgG.

Realizaram-se com o gel ω -aminododecil-agarose ativado com bisoxirano para analisar se o aumento da cadeia carbônica do ligante, repercutia efeito na purificação de IgG.

4.2.3. Cadeia alifática de doze carbonos: ω -aminododecil-bisoxirano-agarose

Realizou-se experimento com volume de alimentação de 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,37 mg/mL de proteínas totais) em tampão de adsorção HEPES pH 6,8 no gel ω -aminododecil-bisoxirano-agarose. Observou-se que a IgG foi recuperada nas etapas de alimentação e lavagem com poucas impurezas, mas as proteínas do soro humano ficaram fortemente adsorvidas em ω -aminododecil-bisoxirano-agarose, podendo estas serem eluidas parcialmente adicionando-se sal (NaCl) no tampão de adsorção e regenerando-se a coluna com hidróxido de sódio. A recuperação total de proteínas neste experimento foi de 63,0%. Para remover o restante das proteínas adsorvidas, fez-se uso de solução de SDS a 0,2%.

Outro experimento foi realizado com volume de alimentação de 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,15 mg de proteínas totais/mL) em tampão de adsorção HEPES pH 6,8, sendo a eluição realizada em etapas para a dessorção das proteínas adsorvidas. Os eluentes HEPES acrescido de 1,0 M de NaCl pH 6,8, citrato pH 3,0 e etilenoglicol a 80% foram testados, mas apenas 36,05% das proteínas foram recuperadas. A regeneração da coluna foi feita com guanidina 6,0 M, sendo recuperadas 2,1% das proteínas injetadas. A recuperação total de proteínas foi de 73,0%, sendo necessária novamente a lavagem da coluna com solução de SDS. O experimento foi realizado em 12,0 horas, devido a todas as etapas de eluição e após a lavagem com SDS, a coluna foi lavada por várias horas para retirada do surfactante.

Para fins de purificação de IgG, o gel ω -aminododecil-agarose não se mostrou eficiente, pois as proteínas adsorvem fortemente na coluna, sendo necessário condições drásticas para a dessorção das mesmas, e, conseqüentemente, havendo perda da capacidade de adsorção de proteínas a cada ciclo cromatográfico.

4.3. Gel de troca iônica usado como controle: DEAE-agarose

Como descrito no capítulo Revisão Bibliográfica, o grupo funcional DEAE tem sido estudado por diversos autores para purificação de IgG por cromatografia negativa (Fahey e Horbett, 1959; Persson, 1987; Bird *et al.*, 1984; Lowe *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1998).

Devido ao fato do grupo funcional DEAE ter sido estudado por vários autores, utilizou-se o adsorvente DEAE-agarose como controle para purificação de IgG a partir do soro humano. Solução de plasma humano não foi alimentada na coluna com DEAE-agarose, pois os resultados obtidos em géis com diaminas imobilizadas alimentados com plasma não foram satisfatórios em relação a massa de IgG obtida por mililitro de adsorvente (3,54 mg) quando comparado com a massa obtida com alimentação de soro (7,04 mg de IgG com elevada pureza por mililitro de adsorvente). A condição testada para este adsorvente foi a de 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8, esta condição foi testada por ter sido uma boa condição de purificação de IgG em gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4-31 e as análises nefelométricas na Tabela 4-18.

A eletroforese da Figura 4-31 (b), mostra que IgG foi obtida livre de impurezas das frações cromatográficas de 1 a 9, durante a etapa de alimentação. A partir da fração 10 detecta-se uma banda de proteína de massa molecular elevada, superior a 212 kDa. As proteínas Alb e Trf começam a sair da coluna a partir da fração 24. Os resultados das análises nefelométricas de IgG, Alb, Trf, IgA e IgM (Tabela 4-18) indicaram apenas a presença de IgG na etapa de alimentação (Frações de 1-22; 3,19 mg de IgG não retidas por mililitro de adsorvente). A proteína de massa molecular elevada (acima de 212 kDa) que aparece na eletroforese não foi quantificada. Provavelmente sejam apolipoproteínas, que possuem massa molecular entre 132-545 KDa (Atmeh, 1990).

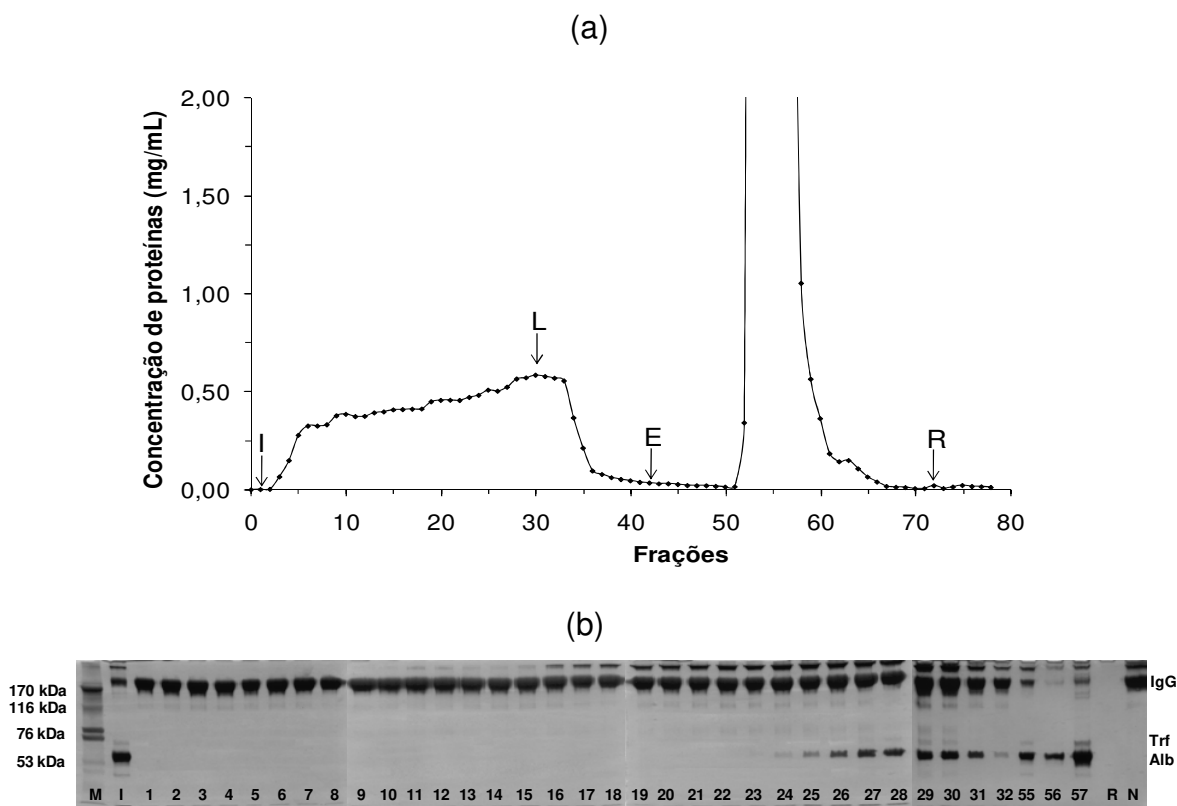


Figura 4-31. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas em DEAE-agarose, Início da curva de ruptura, volume de alimentação: 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8 (3,26 mg/mL de proteínas totais). (I) Injeção da amostra; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; I: injeção 1-27: frações da alimentação; 28-32: frações da lavagem; 55-57: frações da eluição; R: regeneração; N: marcador de IgG.

Segundo a literatura, as interações envolvidas na adsorção de proteínas no gel DEAE-agarose podem ser de natureza eletrostática, pontes de hidrogênio, bem como interações do tipo dipolo-dipolo entre moléculas de proteínas e o grupo DEAE carregado. Estas interações são muito sensíveis à mudanças na concentração, composição e pH do tampão de eluição (Tishchenko *et al.*, 1998). Todas estas interações podem estar ocorrendo em conjunto, entre o DEAE e as proteínas do soro, observando-se que uma parte das moléculas de IgG não foram adsorvidas devido a ampla faixa de pI.

Tabela 4-18. Massa obtida por nefelometria referente ao “pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa da cromatografia em gel DEAE-agarose. Adsorção: HEPES pH 6,8. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
	IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Solução inicial	18,45	64,50	3,69	2,11	2,15	97,90	18,8	1,0
Alimentação (Frações de 1-22)	9,57	n.d	n.d	n.d	n.d	9,20	104,0	5,5
Lavagem (Frações de 23-34)	4,02	0,23	0,04	n.d	0,08	5,10	78,8	4,2
Eluição	4,31	61,28	3,55	1,92	2,01	76,94	5,6	0,3
Regeneração	-	-	-	-	-	0,16	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo método de Bradford, 1976.

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

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,93 mg/dL para IgG, 0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL.

Comparando-se os resultados eletroforéticos e de nefelometria obtidos com adsorvente DEAE-agarose com os obtidos com os géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose nas mesmas condições, para as diaminas tem-se maior porcentagem de IgG com alta pureza nas frações não retidas (76,8 e 74,7%, respectivamente), enquanto recupera-se 51,9% de IgG com elevada pureza para o gel DEAE. Em termos de massa de IgG não retida com alta pureza por mililitro de adsorvente, tem-se 4,23, 4,51 e 3,19 mg por mililitro, para ω -aminohexil-bisoxirano-agarose, ω -aminodecil-bisoxirano-agarose e DEAE-agarose, respectivamente. Este resultado mostra o potencial dos géis diamina-agarose para purificação de IgG humana como alternativa aos géis clássicos de troca iônica.

4.4. Pontos isoelétricos das moléculas de IgG retidas e não retidas nos géis ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose

Como a IgG obtida a partir do soro ou plasma humano é policlonal, apresentando moléculas de 4 subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) com variados pontos isoelétricos (pI) e afinidades, um dado essencial para a elucidação do tipo predominante de interação entre adsorvente-adsorbato é a determinação dos pI das moléculas presentes nas frações retidas e não retidas das cromatografias. Para esta determinação, foram realizados experimentos cromatográficos em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose com IgG humana diluída em Hepes pH 6,8, para posterior análise dos pontos isoelétricos das moléculas de IgG contidas nas frações cromatográficas retidas e não retidas. Este sistema tamponante e adsorventes foram utilizados por terem propiciado os melhores resultados de purificação de IgG humana por cromatografia negativa.

Na Figura 4-32 apresentam-se os cromatogramas e eletroforeses de focalização isoelétrica (IEF) dos experimentos realizados com os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, segundo procedimento descrito no item 3.2.2 do capítulo Materiais e métodos.

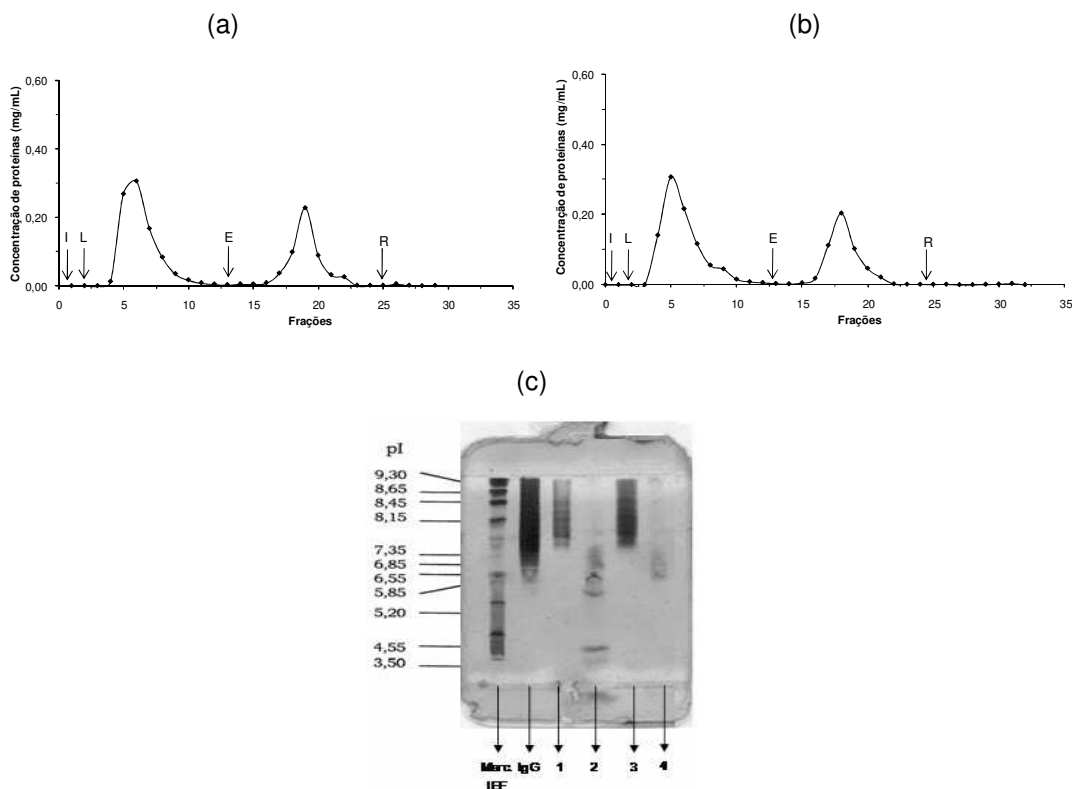


Figura 4-32. (a) e (b) Cromatogramas dos experimentos realizados com IgG de alta pureza diluída em Hepes pH 6,8, em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, respectivamente. (I) injeção; (L) lavagem; (E) eluição; (R) regeneração. (c) Eletroforese de focalização isoeétrica (IEF): marc. IEF: marcador de ponto isoeétrico; IgG: IgG de alta pureza, 1: “pool” das frações de lavagem da cromatografia em ω -aminohexil-agarose; 2: “pool” das frações de eluição da cromatografia em ω -aminohexil-agarose; 3: “pool” das frações de lavagem da cromatografia em ω -aminodecil-agarose; 4: “pool” das frações de eluição da cromatografia em ω -aminodecil-agarose.

As moléculas de IgG não retidas (obtidas na etapa de lavagem) nos géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose apresentam valores de pI na faixa de aproximadamente 7,5 e 9,3, sendo, portanto, moléculas carregadas positivamente em pH 6,8. O resultado indica que estas moléculas sofreram repulsão eletrostática devido à carga positiva dos adsorventes.

As moléculas de IgG com cargas negativas, neutras e levemente positivas em pH 6,8, com valores de pI na faixa de aproximadamente 5,5 a 7,5, foram adsorvidas nos dois géis analisados, indicando que, possivelmente, as interações dessas moléculas de IgG com os adsorventes sejam predominantemente de natureza eletrostática. Interações do tipo hidrofóbicas e van der Waals não podem ser descartadas, no entanto, provavelmente ocorram em menor grau. Qi e colaboradores estudaram as interações das proteínas contidas no soro de rato e o adsorvente de troca iônica com o grupo funcional DEAE e observaram que as proteínas adsorvidas possuíam valores de pI ácidos, mostrando, assim, um comportamento semelhante ao observado nos experimentos realizados neste trabalho (Qi *et.al.*, 2001).

4.5. Isotermas de adsorção de IgG e Alb em ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose

As isotermas de adsorção foram determinadas visando o cálculo de parâmetros essenciais para o escalonamento do processo, como a capacidade máxima (Q_m) dos géis ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em adsorver IgG e Alb e as constantes de dissociação (K_d) dos complexos IgG- e Alb-diamina. Os experimentos de adsorção foram realizados com IgG e Alb por serem as principais proteínas do soro e do plasma humano adsorvidas nos géis citados. Os resultados experimentais de adsorção e as curvas ajustadas com base nos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich para as proteínas IgG e Alb são apresentados nas Figuras 4-33 e 4-34 e os parâmetros ajustados dos respectivos modelos estão apresentados nas Tabelas 4-19 e 4-20.

O modelo inicialmente empregado para representação dos dados experimentais foi o de Langmuir, em que é considerada a adsorção em monocamada, superfície interna do sólido homogênea e presença de número finito de sítios, não interação entre moléculas adsorvidas e não há adsorção competitiva (Langmuir, 1913). Como o modelo de Langmuir não representou bem os sistemas para a maioria dos casos, empregou-se o modelo de Langmuir-Freundlich.

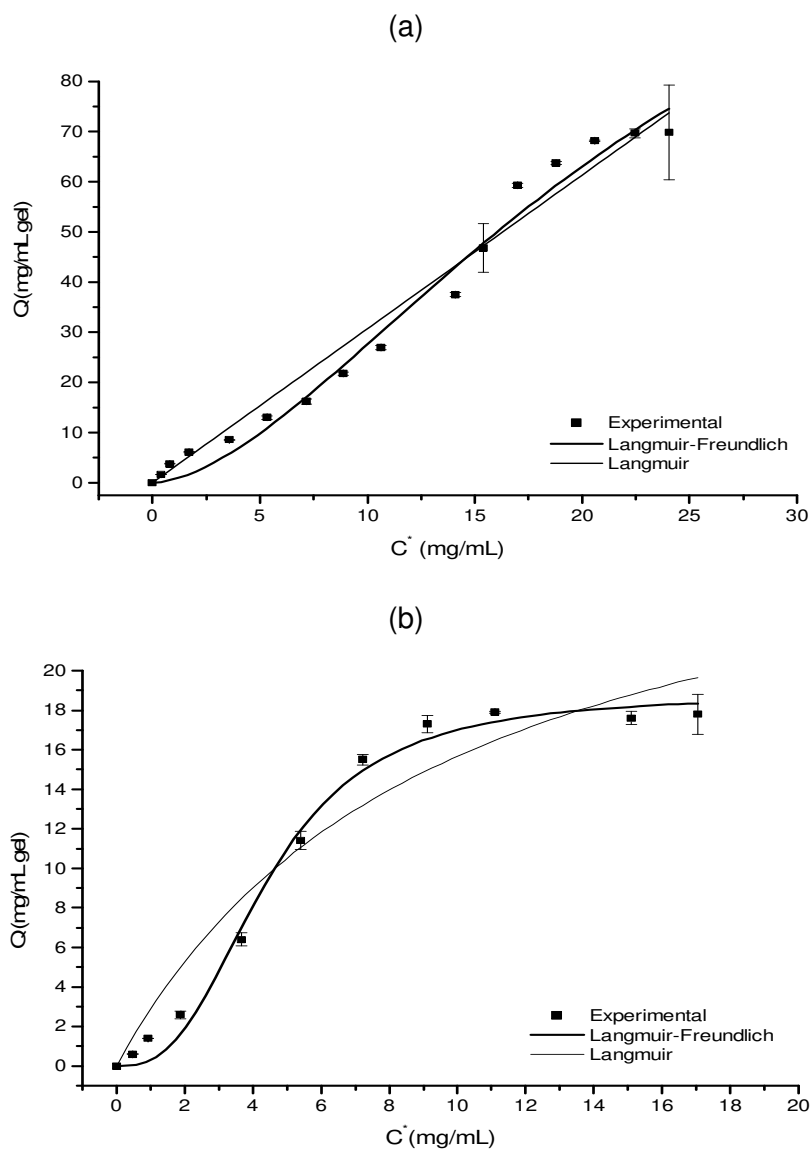


Figura 4-33. Isothermas de adsorção de IgG humana em (a) ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e (b) ω -aminodecil-bisoxirano-agarose: pontos experimentais e curvas ajustadas segundo os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich.

Tabela 4-19. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de IgG humana em ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose.

Parâmetros	Modelos			
	Langmuir		Langmuir-Freundlich	
	ω -aminohexil	ω -aminodecil	ω -aminohexil	ω -aminodecil
Q_m (mg/mL)	psf*	$30,8 \pm 5,8$	$150,4 \pm 64,1$	$18,8 \pm 0,72$
K_d (mol/L)	psf*	$(6,4 \pm 2,5) \times 10^{-5}$	-	-
K_{dLF} (mol/L)	-	-	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$(3,9 \pm 2,3) \times 10^{-4}$
n	-	-	$1,69 \pm 0,33$	$2,70 \pm 0,40$
Coeficiente de correlação	-	0,95	0,94	0,99
Variança	-	0,37	13,8	0,64

* psf: após convergência, os parâmetros não apresentaram significado físico.

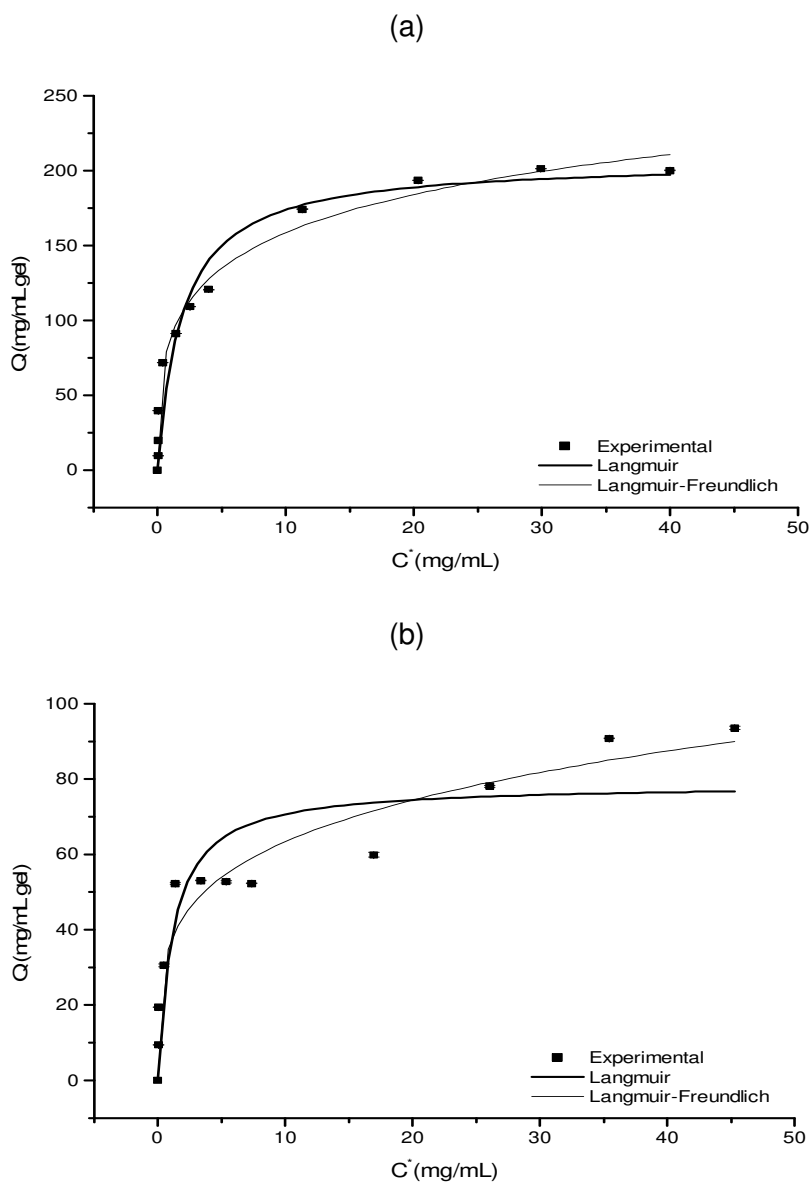


Figura 4-34. Isothermas de adsorção de Alb humana em (a) ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e (b) ω -aminodecil-bisoxirano-agarose: pontos experimentais e curvas ajustadas segundo os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich.

Tabela 4-20. Parâmetros obtidos a partir do ajuste não-linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de Alb humana em ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose.

Parâmetros	Modelos			
	Langmuir		Langmuir-Freundlich	
	ω -aminohexil	ω -aminodecil	ω -aminohexil	ω -aminodecil
Q_m (mg/mL)	$206,6 \pm 13,2$	$78,6 \pm 7,0$	$448,8 \pm 212,4$	$202,9 \pm 222,0$
K_d (mol/L)	$(2,9 \pm 0,8) \times 10^{-5}$	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	-	-
K_{dLF} (mol/L)	-	-	$(6,2 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(6,6 \pm 9,1) \times 10^{-5}$
n	-	-	$0,35 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,13$
Coeficiente de correlação	0,94	0,84	0,99	0,95
Variança	375,9	163,8	102,3	58,1

A adsorção de IgG humana em ω -aminohexil-bisoxirano-agarose não foi bem representada por ambos os modelos, sendo que para o modelo de Langmuir, os parâmetros ajustados não apresentaram significado físico. O modelo de Langmuir-Freundlich, que considera a natureza heterogênea do sistema e a cooperatividade de adsorção (Sharma e Agarwal, 2001), apresenta uma boa correlação com os pontos experimentais para adsorção de IgG humana em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose ($r^2 = 0,99$, Tabela 4-19). Os parâmetros obtidos a partir deste modelo mostram conformidade com os dados experimentais, em que se observa capacidade experimental máxima de adsorção de aproximadamente 18,0 mg/mL gel (Figura 4-33). A constante aparente de dissociação K_{dLF} tem ordem de grandeza de 10^{-4} mol/L, indicando fraca afinidade de IgG pelo aminodecil imobilizado. O parâmetro n, cujo valor é 2,7, caracteriza um sistema

com cooperatividade positiva, em que a adsorção de uma molécula favorece a adsorção de outras. Comparando-se os valores de n obtidos para os dois adsorventes estudados, nota-se que o valor de n aumentou com o aumento da cadeia carbônica.

Quando se compara a adsorção de IgG nos dois géis analisados, observa-se maior adsorção de IgG no gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose (aproximadamente 70 mg de IgG/mL gel), enquanto que a capacidade máxima para o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose é de aproximadamente 18 mg de IgG/mL gel. Este resultado não condiz com os experimentos cromatográficos realizados com os dois adsorventes alimentados com soro humano, visto que para o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose obteve-se maior massa de IgG não adsorvida. O comportamento apresentado pode ter sido influenciado fortemente pela adsorção das demais proteínas contidas no soro quando realizado os ensaios cromatográficos, pois as isotermas foram realizadas apenas com IgG humana de alta pureza.

O modelo de Langmuir-Freundlich foi o que melhor representou os dados experimentais de adsorção de Alb em ambos adsorventes ($r^2 = 0,99$ e $0,95$ para ω -aminohexil- e ω -aminodecil-bisoxirano agarose, respectivamente), no entanto, o valores de Q_m ajustados (448,8 e 202,9 mg de Alb/mL de gel para ω -aminohexil e ω -aminodecil, respectivamente) não condizem com a máxima capacidade de adsorção experimental (aproximadamente 200 e 90 mg de Alb/mL de gel para ω -aminohexil e ω -aminodecil, respectivamente). Os valores da constante de dissociação, para ambos os adsorventes e modelos empregados, são da ordem de 10^{-5} mol/L, indicando afinidade média de Alb pelas diaminas imobilizadas. Para ambos adsorventes estudados, o parâmetro n , com valores de 0,31 e 0,35, caracterizam sistemas de cooperatividade negativa, típico de adsorventes de troca iônica, em que a adsorção de uma molécula desfavorece a adsorção de outras (provavelmente por repulsão eletrostática).

A análise do parâmetro de cooperatividade para as proteínas estudadas mostra que a adsorção de IgG nos dois adsorventes é favorecida pela interação

proteína-proteína. Estas interações podem ser devido a solução de alimentação de IgG possuir moléculas com cargas positivas, negativas e nulas (comportamento observado por análise de IEF em que alimentou-se solução de IgG com alta pureza) que possibilitam interações entre as moléculas.

A adsorção de Alb nos adsorventes estudados apresenta comportamento diferente do observado para IgG em relação ao parâmetro de cooperatividade, já que a adsorção de moléculas de Alb não favorecem a adsorção de outras moléculas por interação proteína-proteína. Este comportamento pode ser devido a repulsão eletrostática entre as moléculas adsorvidas (proteína-proteína) e as que se encontram em solução.

Dois comportamentos distintos podem ser analisados com as isotermas de adsorção obtidas. O primeiro são os altos valores de capacidade de adsorção de IgG e Alb para o gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose (aproximadamente 70,0 e 200,0 mg/mL gel, respectivamente) e o segundo são os baixos valores de adsorção de IgG e Alb para o adsorvente ω -aminodecil-bisoxirano-agarose (aproximadamente 18,0 e 100,0 mg/mL gel, respectivamente). Estas isotermas de adsorção mostram que o adsorvente ω -aminodecil-bisoxirano-agarose possui menor quantidade de sítios disponíveis para adsorção das proteínas IgG e Alb quando comparado ao gel ω -aminohexil-bisoxirano-agarose.

Capítulo 5: Conclusões

Os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose apresentaram os maiores rendimentos em termos de recuperação de IgG com alta pureza por mililitro de adsorvente. Para a alimentação de 15,0 mL de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8, obteve-se rendimentos de 76 e 81 %, respectivamente, para ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, enquanto que os adsorventes ω -aminooctil-agarose e ω -aminohexil-agarose apresentaram rendimentos de 20,1 e 36,7% para o mesmo volume de soro alimentado. O adsorvente ω -aminopropil-agarose não apresentou seletividade para a IgG em todos os sistemas tamponantes testados e o ω -aminododecil-bisoxirano-agarose não pode ser regenerado adequadamente após alimentação de soro humano.

A capacidade dinâmica dos géis (determinada pelas curvas de ruptura) variou com o tipo de ativação e tamanho da cadeia carbônica da amina imobilizada. Os géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose apresentaram as maiores capacidades dinâmicas, obtendo-se 7,04 e 4,51 mg de IgG com alta pureza nas frações não retidas por mililitro de adsorvente, respectivamente.

Quando se compara o rendimento dos géis alimentados com plasma e soro humano, observa-se que os ensaios com soro apresentaram rendimentos aproximadamente quatro vezes maiores do que com plasma. Este menor rendimento obtido com plasma pode ter se dado pela maior competitividade das proteínas do plasma pelos sítios de adsorção, uma vez que o plasma possui maior quantidade de proteínas.

Os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose mostraram-se mais eficientes para purificação de IgG em termos de rendimento e capacidade dinâmica do que o gel controle DEAE-agarose. Para alimentação de 30,0 mL de soro diluído vinte vezes em tampão

Hepes pH 6,8, obteve-se 51,9% de rendimento e 3,19 mg de IgG de alta pureza por mililitro de DEAE-agarose, enquanto que para os géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, obteve-se 76,8 e 74,7% de rendimento e purificação de 4,23 e 4,51 mg de IgG/mL de adsorvente, respectivamente. Ressalta-se, portanto, o potencial de emprego dos géis ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose para purificação de IgG humana em larga escala.

Capítulo 6: Sugestões para próximos trabalhos

Diante dos resultados de purificação de IgG obtidos por cromatografia negativa em adsorventes com diaminas imobilizadas neste trabalho, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Assim, as sugestões àqueles que darão continuidade a este trabalho são:

- Realizar cromatografias negativas com alimentação de frações obtidas pela purificação de IgG pelo método de Cohn utilizando os adsorventes ω -aminohexil-bisoxirano-agarose e ω -aminodecil-bisoxirano-agarose (melhores resultados obtidos neste trabalho). Este estudo é importante devido a indústria de hemoderivados utilizar IgG pré-purificada para alimentação de colunas de troca-iônica para purificação de IgG.

Capítulo 7: Referências

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. Antibodies and Antigens. In: Cellular and Molecular Immunology, 2ª edição, 1994.

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

ANDRADE D., HLADY V. Plasma protein adsorption: the big twelve. *Annals New York Academy of Science*, v. 516, p. 158-172, 1987.

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., PETSCH, D., DECKWER, W.D. Purification of murine IgG1 on group specific affinity sorbents. *Bioseparation*, v. 6, p. 156-184, 1996.

ATMEH, R.F. Isolation and identification of HDL particles of low molecular weight. *Journal of Lipid Research*, v. 31, p. 1771-1780, 1990.

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

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

BAYRAMOGLU G., CELIK G., ARICA, M.Y. Immunoglobulin G adsorption behavior of L-histidine ligand attached and Lewis metal ions chelated affinity

membranes. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 287, p. 75-85, 2006.

BERNARD, J., LEVY, J.P., VARET, B., CLAUVEL, J.P., RAIN, J.D., SULTAN, Y. *Hématologie*, p. 193 e 267, 1990.

BIRD, P., LOWE, J., STOKES, R.P., BIRD, A.G., LING, N.R. and JEFFERIS, R. The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity. *Journal of Immunological Methods*, v. 71, p. 97-105, 1984.

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

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

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

BOYLE, M.D.P., FAULMANN, E.L., METZGER, D.W. Application of bacterial immunoglobulin-binding proteins to the purification of immunoglobulin. *Molecular Interaction in Bioseparations*, p. 91-112, 1993.

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

BRESOLIN, I.T.L. Purificação de anticorpos monoclonais utilizando IMAC em membranas de fibra oca de peva: comparação dos agentes quelantes IDA, CM-Asp e TREN / Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

BRESOLIN, I.T.L., RIBEIRO, M.B., CARO, J.R., SANTOS, F.P., CASTRO, M.P., BUENO, S.M.A. Adsorption of human serum proteins onto tren-agarose: purification of human igG by negative chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 17-23, 2009.

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

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

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

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

BURTON, D.R. Immunoglobulin G: functional sites. *Molecular Immunology*, v. 22, p. 161-206, 1985

BURTON, D.R., GREGORY, L., JEFFERIS, R. Aspect of the molecular structure of the IgG subclasses. *Monograph Allergy*, v. 19, p. 7-35, 1986

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

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

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

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

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

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

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

ERNTELL, M., MYHRE, E.B., SJOBRING U., BJORCK. Streptococcal protein G has affinity for both Fab and Fc fragments of human IgG. *Molecular Immunology*, v. 25, p. 121-126, 1988.

FAHEY, J.L., HORBETT, A.P. Human gamma globulin fractionation on anion exchange cellulose columns. *Journal Biological Chemical*, v. 234, p. 2645-51, 1959.

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

GAGNON, P. Purification tools for monoclonal antibodies. *Validated Biosystems*, p. 254, 1994.

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

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

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

HEMOBRÁS, Caderno de Especificações Técnicas, disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/CadEspecTec.pdf>, acessado em agosto de 2008.

HEMODERIVADOS, ANBIO, Associação Nacional de Biossegurança, disponível em: www.anbio.org.br/pdf/2/tr07_hemoderivados.pdf, acessado em agosto de 2007.

HOLLIGER, P., HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, v. 23, p. 1126-1136, 2005.

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

HOUEN, G. Aminoalkyl affinity matrices, *Journal of Biochemical Biophysics Methods*, v. 49, p. 189-197, 2001.

HOUEN, G., HOGDALL, E.V., BARKHOLT, V., NORSKOV, L. Lactoferrin: similarity to diamine oxidase and purification by aminohexyl affinity chromatography. *Europe Journal Biochemical*, v. 241, p. 303-308, 1996.

HOUEN, G., SVENDSEN, I. Affinity chromatography of thiol ester-containing proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 799, p. 139-148, 1998.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog> acessado em outubro de 2008.

<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/productinformationsheetc9210pis.pdf>
acessado em maio de 2008.

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

JAN, C., RYDÉN, J.L. *Protein Purification : Principles, High Resolution Methods and Applications*. VHC Publishers, p. 107-148, 1989.

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

KEMPF, C., STUCKI, M., BOSCHETTI, N. Pathogen inactivation and removal procedures used in the production of intravenous immunoglobulins. *Biologicals*, v. 35, p. 35-42, 2007.

KISTLER P., NITSCHMANN H.S. Large scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier. *Vox Sang*, v. 7, p. 414-24, 1962.

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

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

LEBING W., REMINGTON K., SCHREINER C., PAUL H.I. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by caprylate virus inactivation and column chromatography. *Vox Sang*, v. 84, p. 193-20, 2003.

LEVISON, P.R. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins Comparison of different formats. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 17-33, 2003.

LEVISON, P.R., KOSCIELNY, M.L., BUTTS, E.T. *Bioseparation*, v. 1, p. 59, 1990.

LOGHEM, V. Staphylococcal protein A and human IgG subclasses and allotypes. *Scand Journal Immunology*, v. 15, p. 275, 1982.

LOWE, J., BIRD, P., HARDIE, D., JEFFERIS, R., LING, N.R. Monoclonal antibodies (McAbs) to determinants on human gamma chains: properties of antibodies showing subclass restriction or subclass specificity. *Immunology Methods*, v. 47, p. 329, 1982.

MALE, D. The immune system. In: MALE, D. Immunology. *London, Gower Medical Publishing*, p. 1-45, 1986.

MANSIR, A.T., MONTESIONS, R.M., GUZMÁN, R. Mathematical analysis of frontal affinity chromatography in particle and membrane configurations. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 1-28, 2001.

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

MCMURRY, J. Química Orgânica 2. *Pioneira Thompson Learning*, 6ª Edição, p.879-888, 2005.

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

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

MURONETZ V.I., KORPELA T. Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. *Journal Chromatography B Analytical Technology Biomed Life Science*. v. 790, p. 53-66, 2003.

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

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

PERSSON, M.A.A. Preparation of human sera containing one single IgG subclass using affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*, v. 98, p. 91-98, 1987.

PERTA, J., UNDAS, A., TWARDOWSKI, J., JAKUBOWSKI, H. Purification of antibodies against *N*-homocysteinylated proteins by affinity chromatography on *N*-homocysteinyl-aminoethyl-Agarose. *Journal of Chromatography B*, v. 807, p. 257-261, 2004.

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

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

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

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

QI, Y., YAN, Z., HUANG, J. Chromatography on DEAE ion-exchange and Protein G affinity columns in tandem for the separation and purification of proteins. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 263–273, 2001.

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

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

SANTOS, F.P., CASTRO, M.P., BRESOLIN, I.T.L., RIBEIRO, M.B., BUENO, S.M.A. (b) Cromatografia em Gel Agarose-Tren: Purificação de Imunoglobulina G Humana, *XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)*, 2006.

SANTOS, F.P., CASTRO, M.P., RIBEIRO, M.B., BRESOLIN, I.T.L., BUENO, S.M.A. (a) Adsorção de proteínas do soro humano em agarose-TREN: cromatografia negativa para purificação de IgG. *6º Encontro Brasileiro de Adsorção (EBA)*, 2006.

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

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

SHI, W., ZHANG, F.B., ZHANG, G.L. Adsorption of bilirubin with polylysine carrying chitosan-coated nylon affinity membranes. *Journal of Chromatography B*, v. 819, p. 301-306, 2005.

SHOSHANBARMATZ, V., ZARKA, A. A simple, fast, one-step method for the purification of the skeletal-muscle ryanodine receptor. *Biochemical Journal*, v. 285, p. 61-64, 1992.

SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, C.B. Química Orgânica. *LTC –Livros Técnicos e Científicos Editora S.A*, 7ª Edição, v. 2, p. 202-203, 2002.

STEINMANN, L., PORATH, J., HASHEMI, P., OLIN, A. Prereparation and some properties of a polyethyleneimine- agarose metal adsorbent. *Talanta*, v. 41, p. 1707, 1994.

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

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

THOMAS, A.R., NAUDE, R.J., OELOFSEN, W., NAGANUMA, T., MURAMOTO, K. Purification and partial characterisation of alpha(2)-antiplasmin and plasmin(ogen) from ostrich plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 129, p. 809-820, 2001.

TISHCHENKO, G.A., BLEHA, M., SKVOR, J., BOSTÍK, T. Effect of salt concentration gradient on separation of different types of specific immunoglobulins by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose. *Journal of Chromatography B*, v. 706, p. 157-166, 1998.

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

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

VENTURA, R.C.A., ZOLLNER, R.D., LEGALLAIS, C., VIJAYALAKSHMI, M., BUENO, S.M.A. In vitro removal of human IgG autoantibodies by affinity filtration using immobilized L-histidine onto PEVA hollow fiber membranes. *Biomolecular Engineering*, v. 17, p. 71-74, 2001.

- VERDOLIVA, A., PANNONE, F., ROSSI, M., CATELLO, S., MANFREDI, V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. *Journal of Immunological Methods*, v. 271, p. 77-88, 2002.
- 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.
- WALTERS, R.R. Affinity chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 57, p. 1099-1114, 1985.
- WONG, J., ALBRIGHT R.L., WANG N.H.W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)-chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*. v. 20, p. 49-106, 1991.
- YANG H., GURGEL P.V., CARBONELL R.G. Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G. *Journal of Peptide Research*, v. 66, p. 120-137, 2005.

Apêndice A

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas dos experimentos realizados com o gel ω -aminopropil-agarose em presença dos tampões de adsorção MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 8,2 e eluição por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. Estes resultados são referentes aos experimentos descritos no item 4.1.1.

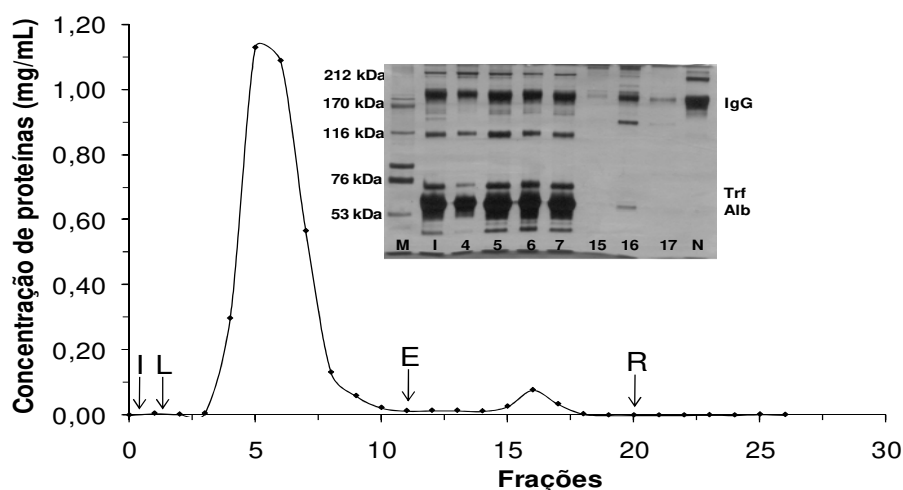


Figura A-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,7.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,56 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 6,7; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 6,7; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (15-17) eluição; (N) marcador de IgG.

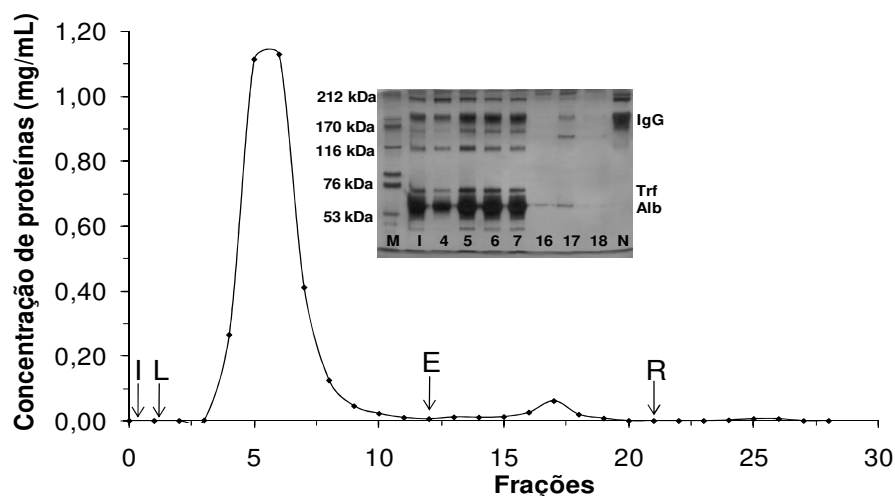


Figura A-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,32 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,9; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,9; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (16-18) eluição; (N) marcador de IgG.

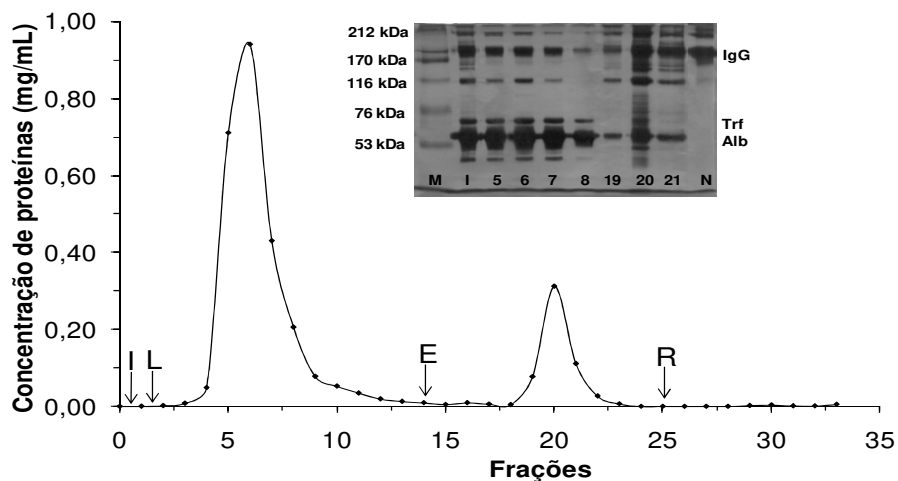


Figura A-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,14 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (19-21) eluição; (N) marcador de IgG.

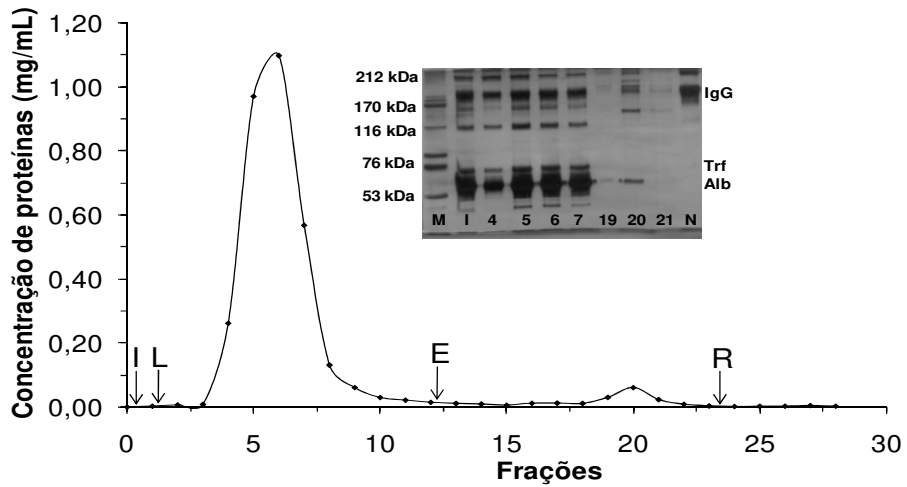


Figura A-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminopropil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,43 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 8,2; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (19-21) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela A-1. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção MES pH 6,7 e MOPS pH 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	MES pH 6,7		MOPS pH 7,9	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,56	100,0	3,32	100,0
Lavagem	3,32	93,3	3,13	94,2
Eluição	0,18	5,0	0,15	4,5
Regeneração	0,00	0,1	0,01	0,4
Recuperação	3,51	98,4	3,29	99,2
Proteínas totais adsorvidas	0,18	5,1	0,16	4,8

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.
Volume do leito: 3,0 mL.

Tabela A-2. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões HEPES pH 6,8 e pH 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	HEPES pH 6,8		HEPES pH 8,2	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,14	100,0	3,43	100,0
Lavagem	2,55	81,5	3,20	93,3
Eluição	0,55	17,6	0,16	4,7
Regeneração	0,01	0,4	0,01	0,4
Recuperação	3,12	99,5	3,38	98,5
Proteínas totais adsorvidas	0,57	18,2	0,18	5,3

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

Apêndice B

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas dos experimentos realizados com volume de 1,0 e 3,0 mL de gel ω -aminohexil-agarose em presença dos tampões de adsorção MES pH 5,5 e 6,5, MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9, HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2 e eluição por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. Estes experimentos foram descritos no item 4.1.2.

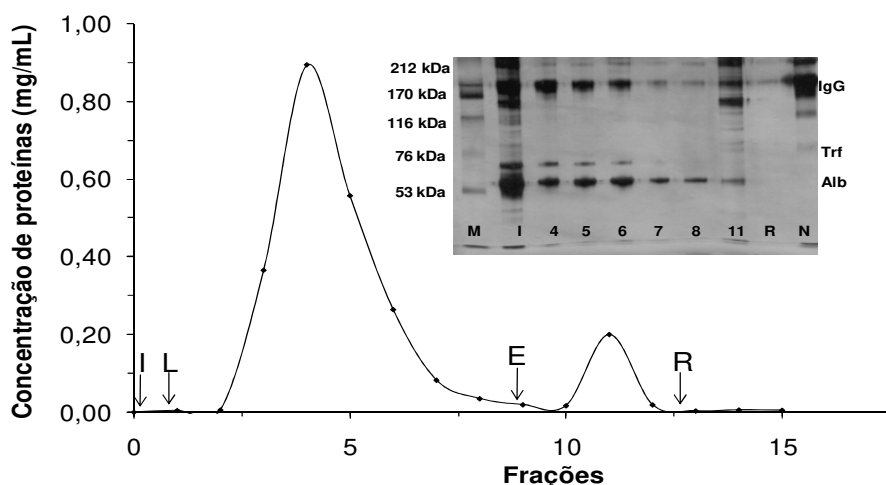


Figura B-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 5,5.

Volume do leito: 1,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (2,57 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 5,5; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 5,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (11) eluição; (R) regeneração; (N) marcador de IgG.

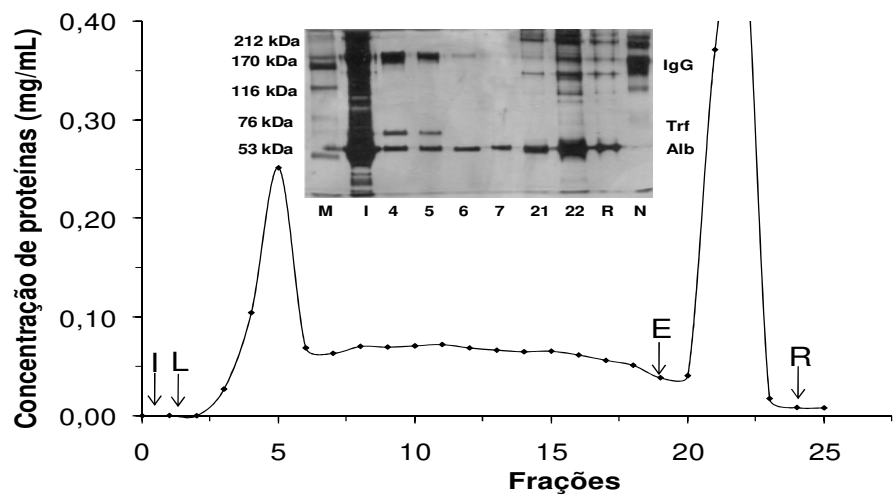


Figura B-2 Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,5. Volume do leito: 1,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,21 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 6,5; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (21-22) eluição; (R) regeneração; (N) marcador de IgG.

Tabela B-1. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MES pH 5,5 e 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 5,5		pH 6,5	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	2,57	100,0	3,21	100,0
Lavagem	2,12	82,5	1,32	40,9
Eluição	0,47	18,2	1,81	56,2
Regeneração	0,03	1,0	0,03	1,0
Recuperação	2,62	101,8	3,15	98,1
Proteínas totais adsorvidas	2,04	19,4	1,84	57,3

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.
^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.
Volume do leito: 1,0 mL.

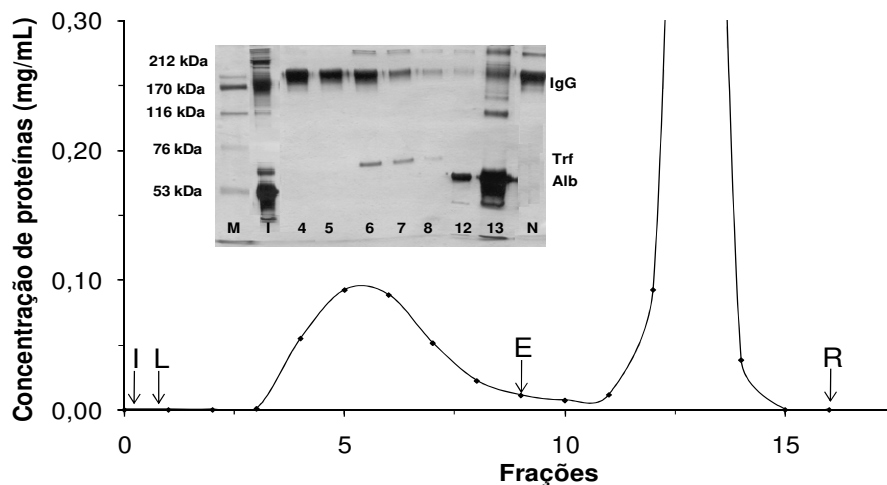


Figura B-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 5,5.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (5,08 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 5,5; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 5,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (12-13) eluição; (N) marcador de IgG.

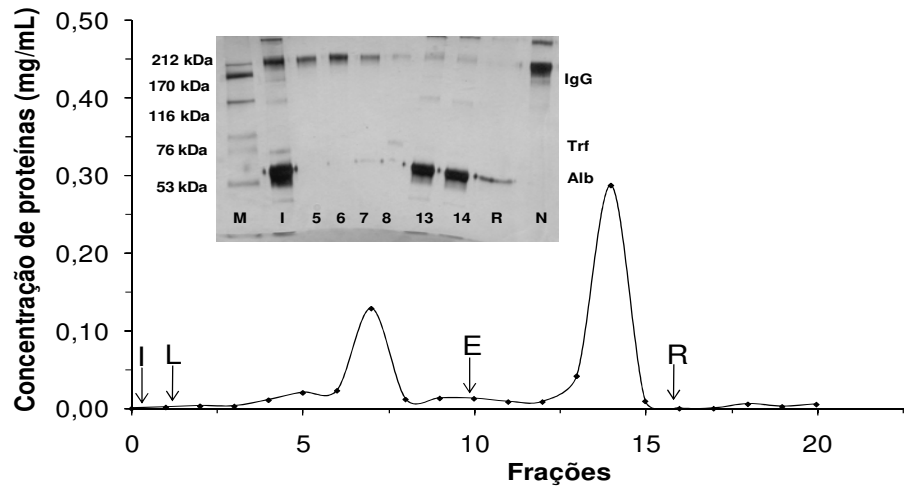


Figura B-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,5.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (2,56 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 6,5; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (13-14) eluição; (R) regeneração; (N) marcador de IgG.

Tabela B-2. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MES pH 5,5 e 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 5,5		pH 6,5	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,99	100,0	1,00	100,0
Lavagem	0,33	16,5	0,24	23,6
Eluição	2,04	102,4	0,67	67,2
Regeneração	0,00	0,00	0,05	4,5
Recuperação	2,62	118,9	0,96	95,2
Proteínas totais adsorvidas	2,04	102,4	0,72	71,7

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.
Volume do leito: 3,0 mL.

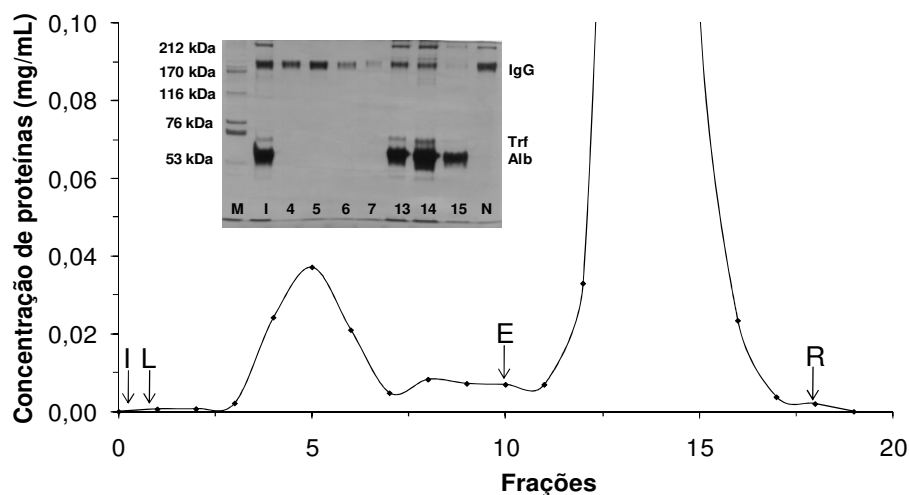


Figura B-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 6,5.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,05 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 6,5; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (13-15) eluição; (N) marcador de IgG.

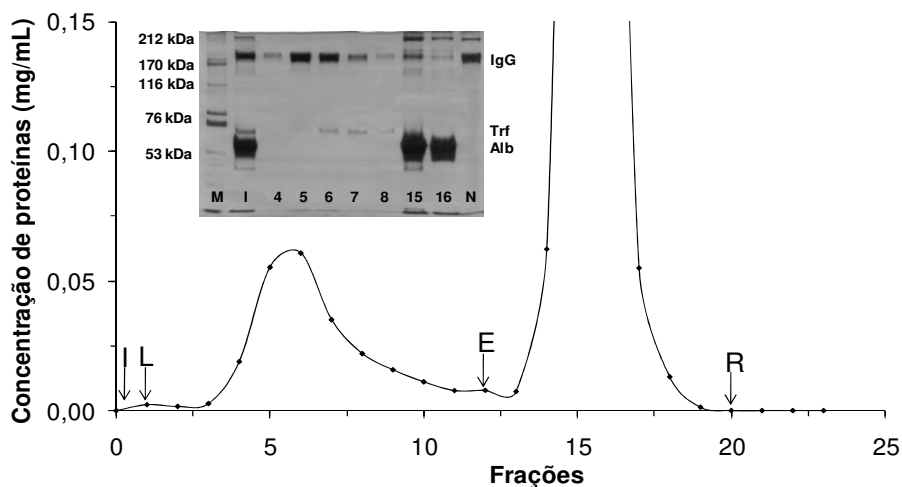


Figura B-6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,2.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,25 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,2; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (15-16) eluição; (N) marcador de IgG.

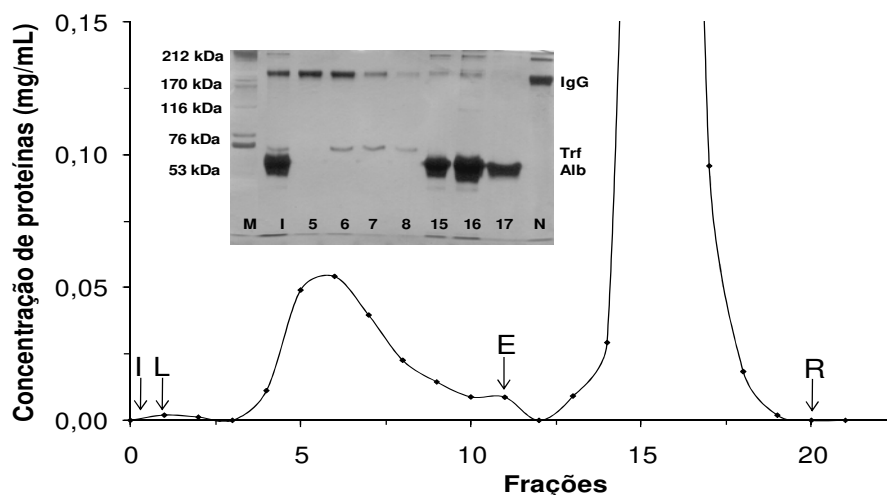


Figura B-7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,7 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,9; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,9; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (15-17) eluição; (N) marcador de IgG.

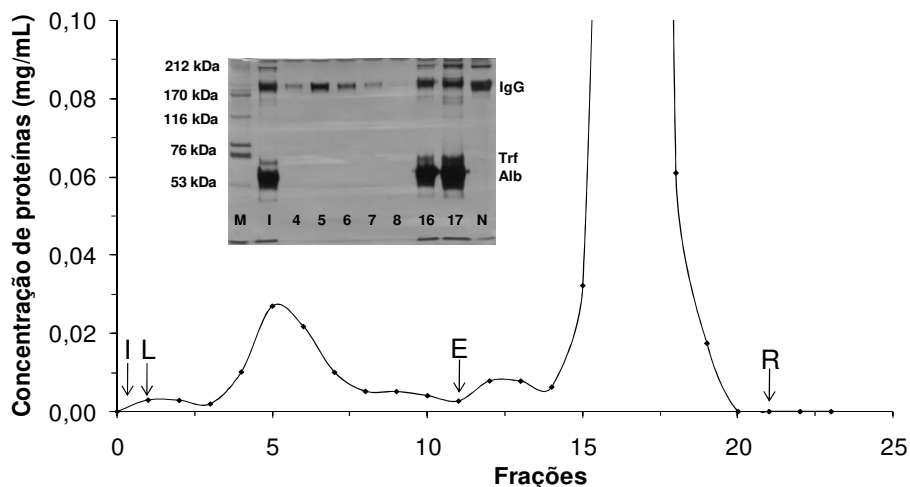


Figura B-8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,48 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (16-17) eluição; (N) marcador de IgG.

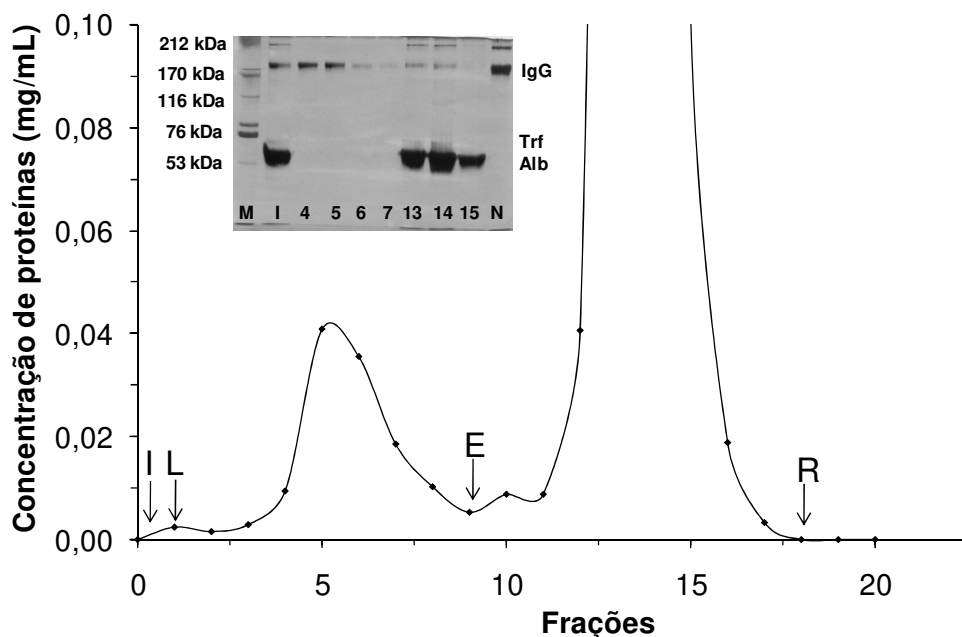


Figura B-9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminoxil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 7,5.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,55 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 7,5; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 7,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-7) lavagem; (13-15) eluição; (N) marcador de IgG.

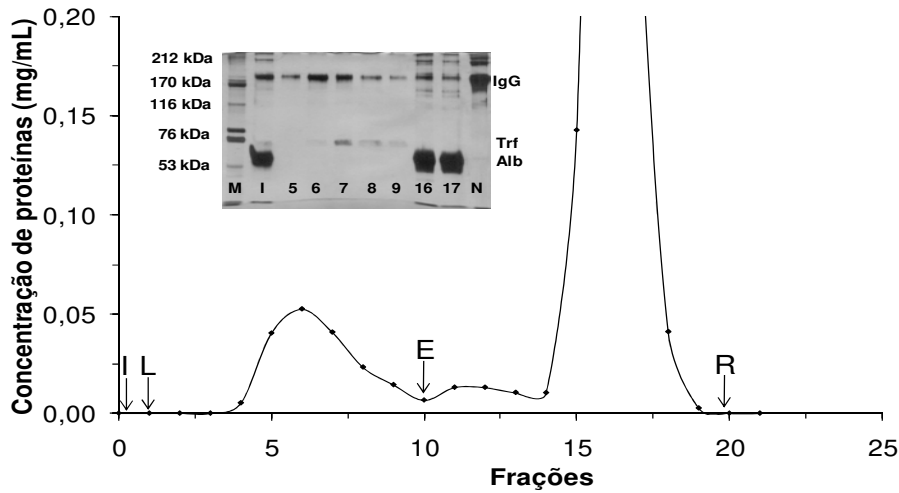


Figura B-10. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,58 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 8,2; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-9) lavagem; (16-17) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela B-3. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 6,5		pH 7,2		pH 7,9	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,22	100,0	1,30	100,0	1,47	100,0
Lavagem	0,09	7,4	0,23	17,4	0,20	13,8
Eluição	1,03	84,2	1,07	82,1	1,15	78,2
Regeneração	0,01	0,5	0,00	0,1	0,02	1,4
Recuperação	1,12	92,1	1,29	99,6	1,37	93,5
Proteínas totais adsorvidas	1,03	84,7	1,07	82,2	1,17	79,6

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

Tabela B-4. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 6,8		pH 7,5		pH 8,2	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,39	100,0	1,42	100,0	1,43	100,0
Lavagem	0,09	6,7	0,13	8,9	0,18	12,9
Eluição	1,26	90,2	1,26	88,6	1,21	84,9
Regeneração	0,02	1,2	0,00	0,2	0,00	0,2
Recuperação	1,37	98,1	1,39	97,8	1,40	97,9
Proteínas totais adsorvidas	1,27	91,4	1,26	88,9	1,21	85,0

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

Tabela B-5. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: MOPS a pH 6,5, 7,2 e 7,9. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH	Proteínas (mg)					Purificação de IgG		
		IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	6,5	0,25	0,76	0,04	0,03	0,03	1,22	20,2	1,0
	7,2	0,24	0,74	0,04	0,03	0,03	1,30	18,8	1,0
	7,9	0,28	0,93	0,05	0,04	0,02	1,47	19,0	1,0
Lavagem	6,5	0,08	n.d	n.d	n.d	n.d	0,09	86,7	4,3
	7,2	0,17	n.d	0,03	n.d	n.d	0,23	73,6	3,9
	7,9	0,15	n.d	0,04	n.d	n.d	0,20	75,0	3,9
Eluição	6,5	0,13	0,68	0,04	0,02	0,03	1,03	12,8	0,1
	7,2	0,04	0,61	0,01	0,03	0,03	1,07	3,9	0,1
	7,9	0,08	0,86	0,01	0,04	0,02	1,15	7,2	0,1
Regeneração	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-
	-	-	-	-	-	-	0,00	-	-
	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a do material injetado x 100.

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL

Tabela B-6. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: HEPES a pH 6,8, 7,5 e 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
		IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Injeção	6,8	0,25	0,87	0,05	0,04	0,02	1,39	17,6	1,0
	7,5	0,24	0,83	0,05	0,04	0,02	1,42	16,9	1,0
	8,2	0,25	0,89	0,05	0,04	0,03	1,43	17,5	1,0
Lavagem	6,8	0,09	n.d	n.d	n.d	n.d	0,09	95,6	5,4
	7,5	0,09	n.d	n.d	n.d	n.d	0,13	66,2	3,9
	8,2	0,15	n.d	0,04	n.d	n.d	0,18	83,3	4,8
Eluição	6,8	0,12	0,83	0,04	0,04	0,02	1,26	9,8	0,1
	7,5	0,12	0,76	0,05	0,04	0,02	1,26	9,8	0,1
	8,2	0,07	0,82	0,01	0,04	0,03	1,21	5,8	0,1
Regeneração	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
	-	-	-	-	-	-	0,00	-	-
	-	-	-	-	-	-	0,00	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a do material injetado x 100.

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL

Apêndice C

Cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas dos experimentos realizados com o gel ω -aminooctil-agarose em presença dos tampões de adsorção MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 8,2 e eluição por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. Estes experimentos foram descritos no item 4.1.3.

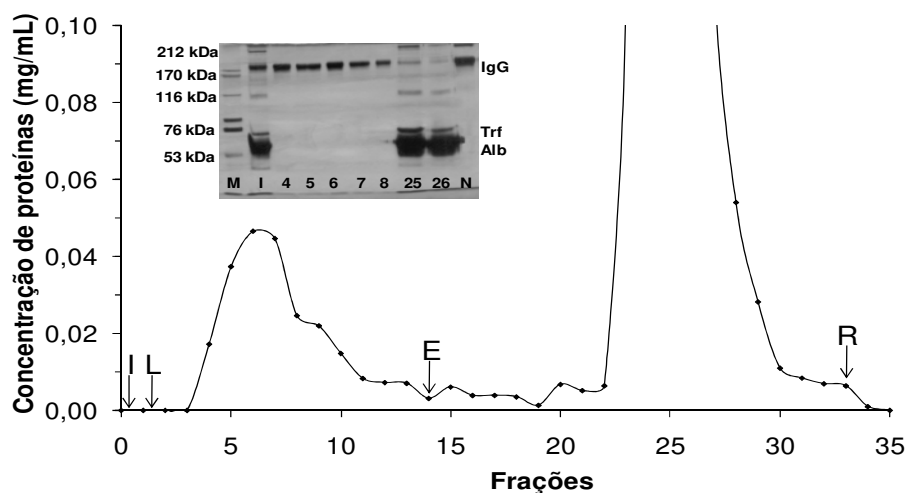


Figura C-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,7.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,63 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 6,7; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (25-26) eluição; (N) marcador de IgG.

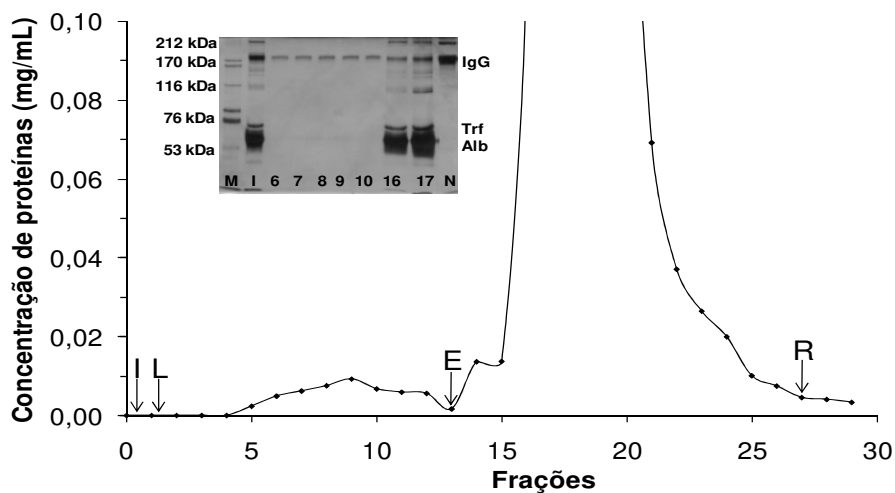


Figura C-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminoocetil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,47 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,9; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,9; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (6-10) lavagem; (16-17) eluição; (N) marcador de IgG.

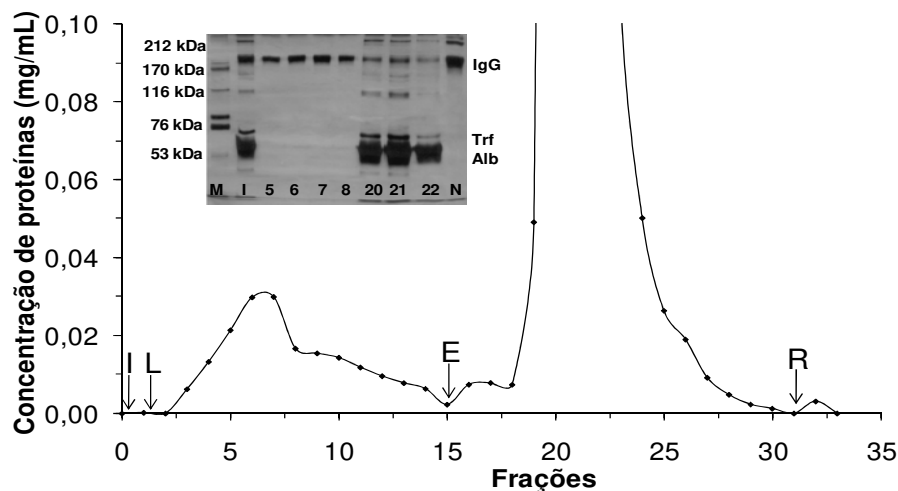


Figura C-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,31 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (5-8) lavagem; (20-22) eluição; (N) marcador de IgG.

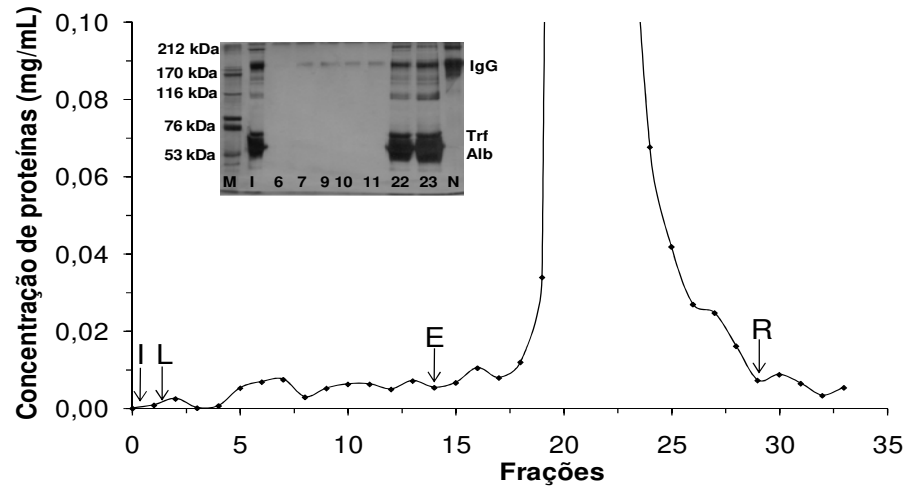


Figura C-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminooctil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,60 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 8,2; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (6-11) lavagem; (22-23) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela C-1. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção MES pH 6,7 e MOPS pH 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	MES pH 6,7		MOPS pH 7,9	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,63	100,0	3,47	100,0
Lavagem	0,25	6,9	0,05	1,4
Eluição	3,32	91,6	3,11	89,5
Regeneração	0,03	0,9	0,03	0,9
Recuperação	3,61	99,5	3,19	91,7
Proteínas totais adsorvidas	3,36	92,6	3,14	90,5

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.
Volume do leito: 3,0 mL.

Tabela C-2. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção HEPES pH 6,8 e pH 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	HEPES pH 6,8		HEPES pH 8,2	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,31	100,0	3,60	100,0
Lavagem	0,18	5,6	0,07	1,9
Eluição	3,08	93,1	3,15	87,7
Regeneração	0,02	0,6	0,03	0,7
Recuperação	3,28	99,3	3,25	90,3
Proteínas totais adsorvidas	3,10	93,7	3,18	88,3

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

Tabela C-3. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Sistema	Etapas	Proteínas (mg)						Purificação de IgG	
		IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Mes pH 6,7	Injeção	0,47	2,48	0,13	0,13	0,06	3,63	13,0	1,0
	Lavagem	0,23	n.d	n.d	n.d	n.d	0,25	93,6	7,2
	Eluição	0,13	2,32	0,13	0,13	0,04	3,32	4,0	0,3
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,03	-	-
Mops pH 7,9	Injeção	0,55	2,87	0,16	0,13	0,06	3,47	15,8	1,0
	Lavagem	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,05	0,0	0,0
	Eluição	0,36	2,82	0,15	0,11	0,05	3,11	11,4	0,7
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,03	-	-
Hepes pH 6,8	Injeção	0,50	2,86	0,15	0,13	0,05	3,31	15,2	1,0
	Lavagem	0,22	n.d	n.d	n.d	n.d	0,18	119,4	7,9
	Eluição	0,20	2,80	0,15	0,11	0,05	3,08	6,5	0,4
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,02	-	-
Hepes pH 8,2	Injeção	0,50	2,61	0,14	0,13	0,06	3,6	13,8	1,0
	Lavagem	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,07	0,0	0,0
	Eluição	0,31	2,63	0,15	0,11	0,05	3,15	9,8	0,7
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,03	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a do material injetado x 100.

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Volume do leito: 3,0 mL

Apêndice D

Duplicatas dos ensaios realizados com o gel ω -aminohexil-agarose em presença dos tampões de adsorção MOPS pH 6,5, 7,2, 7,9 e HEPES pH 6,8, 7,5, 8,2 e eluição por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. A descrição dos ensaios está apresentada no item 4.1.2. Os cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas das duplicatas realizadas encontram-se a seguir.

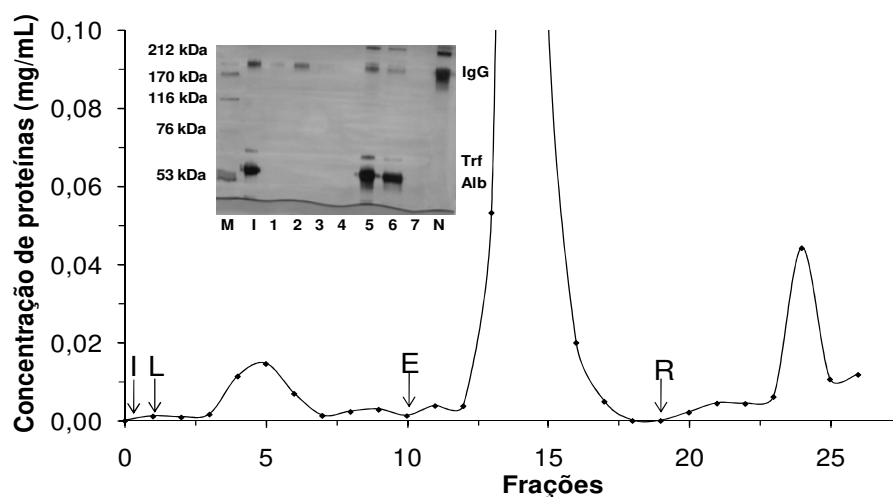


Figura D-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 6,5.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (4,02 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 6,5; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-4) lavagem; (5-7) eluição; (N) marcador de IgG.

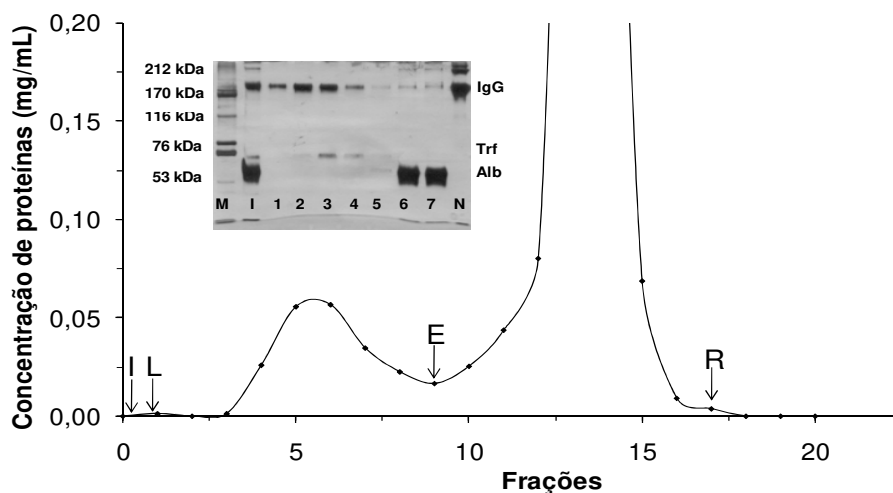


Figura D-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,2.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,48 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,2; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-5) lavagem; (6-7) eluição; (N) marcador de IgG.

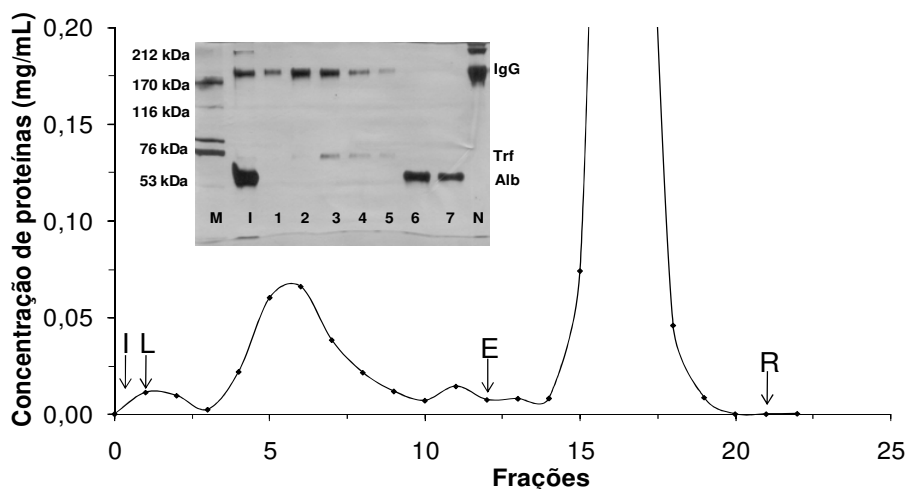


Figura D-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,62 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,9; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,9; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-5) lavagem; (6-7) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela D-1. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção MOPS pH 6,5, 7,2 e 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 6,5		pH 7,2		pH 7,9	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,61	100,0	1,39	100,0	1,45	100,0
Lavagem	0,63	39,5	0,20	14,2	0,26	18,2
Eluição	0,98	60,9	1,20	86,6	1,09	74,8
Regeneração	0,00	0,30	0,01	0,92	0,00	0,0
Recuperação	1,62	100,7	1,41	101,7	1,35	93,05%
Proteínas totais adsorvidas	0,98	60,9	1,07	87,5	1,09	74,85%

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

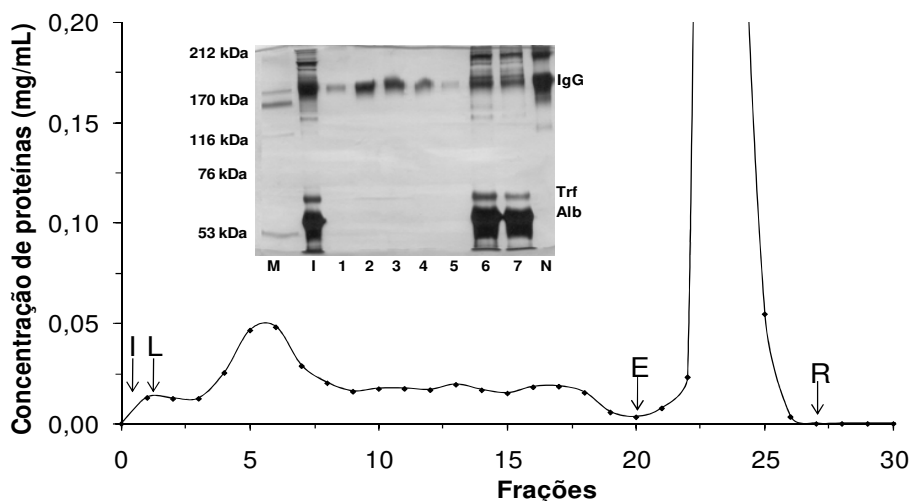


Figura D-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (4,48 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-5) lavagem; (6-7) eluição; (N) marcador de IgG.

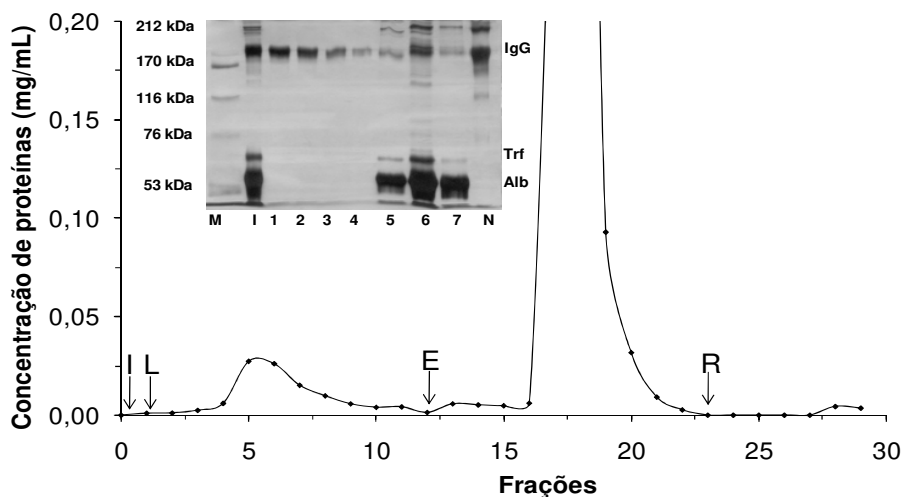


Figura D-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 7,5.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,18 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 7,5; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 7,5; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-4) lavagem; (5-7) eluição; (N) marcador de IgG.

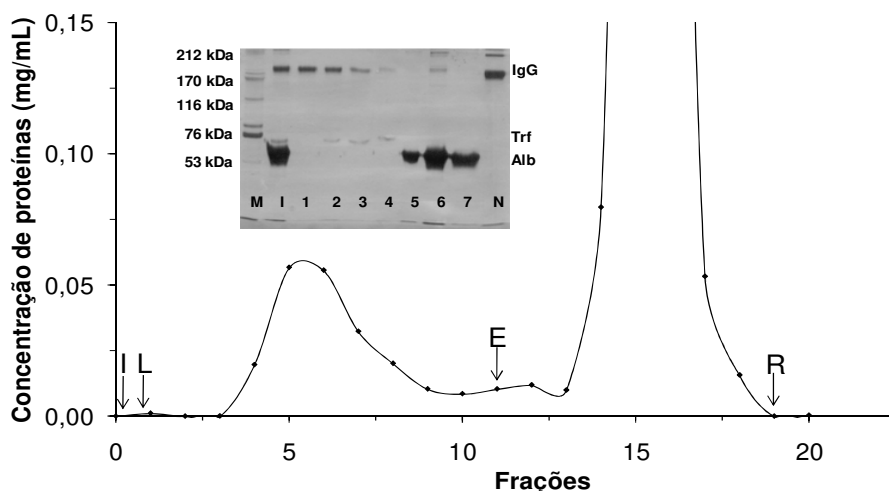


Figura D-6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,4 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 0,4 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,52 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 8,2; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-4) lavagem; (5-7) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela D-2. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção HEPES pH 6,8, 7,5 e 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 6,8		pH 7,5		pH 8,2	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,79	100,0	1,27	100,0	1,41	100,0
Lavagem	0,38	21,1	0,11	8,7	0,20	14,5
Eluição	1,43	79,9	1,13	88,9	1,21	85,9
Regeneração	0,00	0,2	0,01	0,8	0,00	0,1
Recuperação	1,82	101,3	1,25	98,4	1,41	100,6
Proteínas totais adsorvidas	1,44	80,5	1,14	89,8	1,21	86,0

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

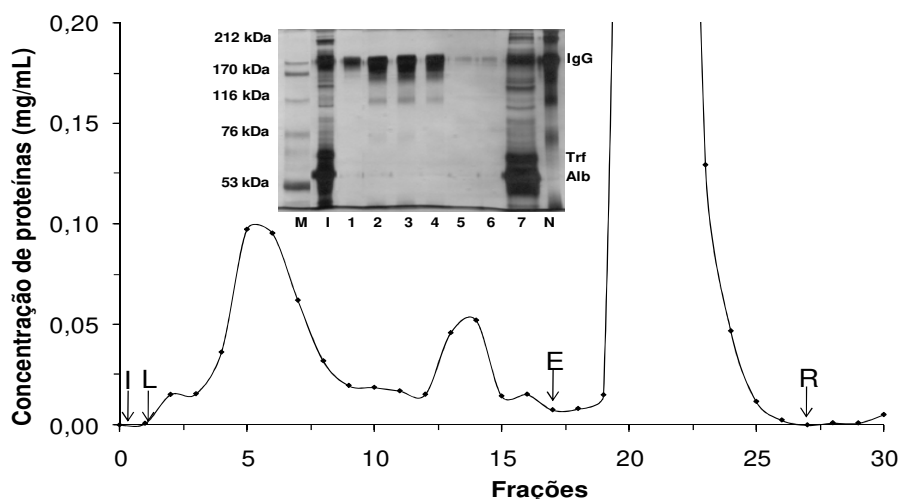


Figura D-7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminohexil-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,50 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (1-6) lavagem; (7) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela D-3. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão HEPES pH 6,8, e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,50	100,0
Lavagem	0,22	6,4
Eluição	3,13	89,3
Regeneração	0,02	0,5
Recuperação	3,37	96,2
Proteínas totais adsorvidas	3,15	89,8

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL

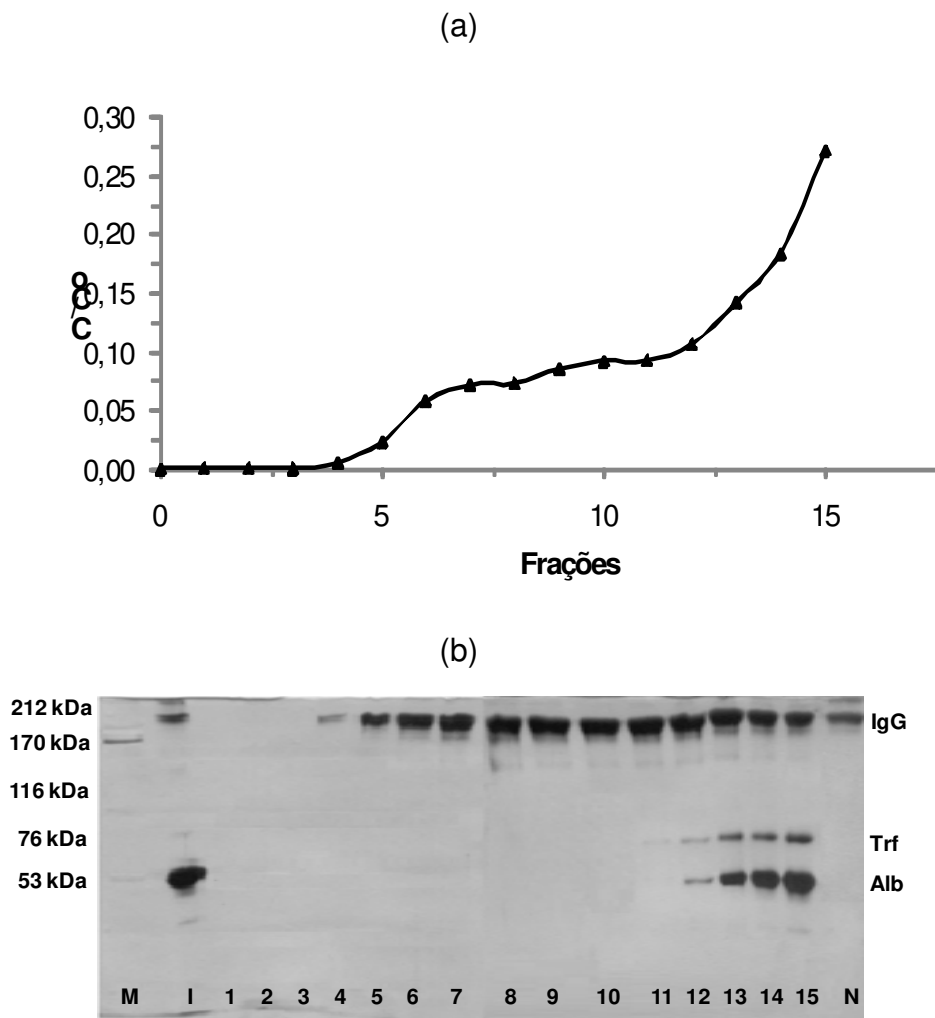


Figura D-8. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminohexil-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (5,07 mg/mL de proteínas totais). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); N: marcador de IgG.

Tabela D-4. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão HEPES pH 6,8, e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 6,8	
	PT ^a (mg)	% ^b
Solução inicial	76,03	100
Alimentação	6,06	7,9
Lavagem	21,72	28,6
Eluição	44,44	58,5
Regeneração	0,15	0,2
Recuperação	72,36	95,2
Proteínas totais adsorvidas	44,59	58,7

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

Apêndice E

Cromatogramas, eletroforeses, balanços de massas e porcentagens de proteínas adsorvidas e não adsorvidas dos experimentos realizados com o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em presença dos tampões de adsorção MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 8,2 e eluição por adição de 1,0 M de NaCl ao tampão de adsorção. Estes experimentos foram detalhados no item 4.2.2.

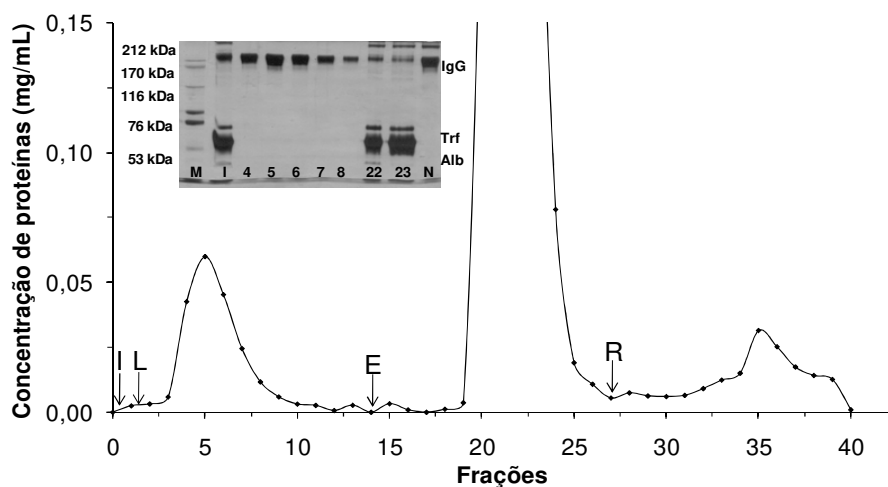


Figura E-1. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão MES pH 6,7.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (2,52 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MES pH 6,7; (E) eluição: MES, NaCl 1,0 M pH 6,7; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (22-23) eluição; (N) marcador de IgG.

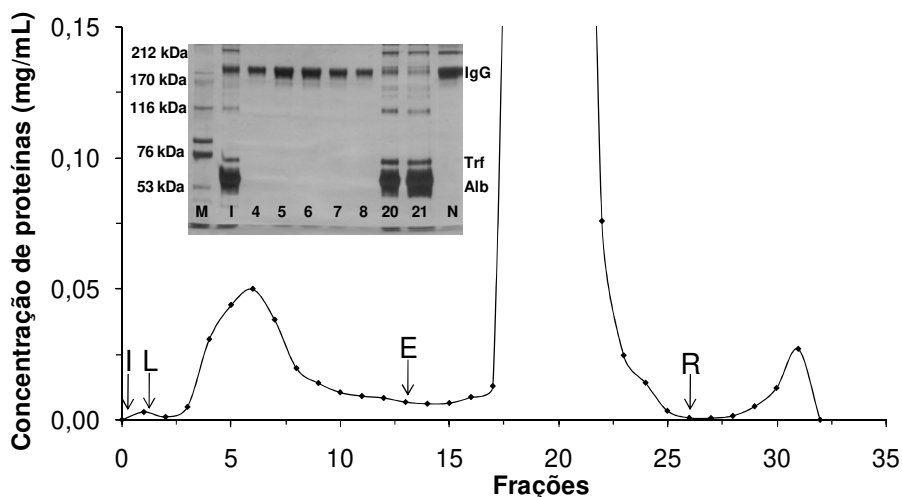


Figura E-2. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão MOPS pH 7,9.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,03 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão MOPS pH 7,9; (E) eluição: MOPS, NaCl 1,0 M pH 7,9; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (20-21) eluição; (N) marcador de IgG.

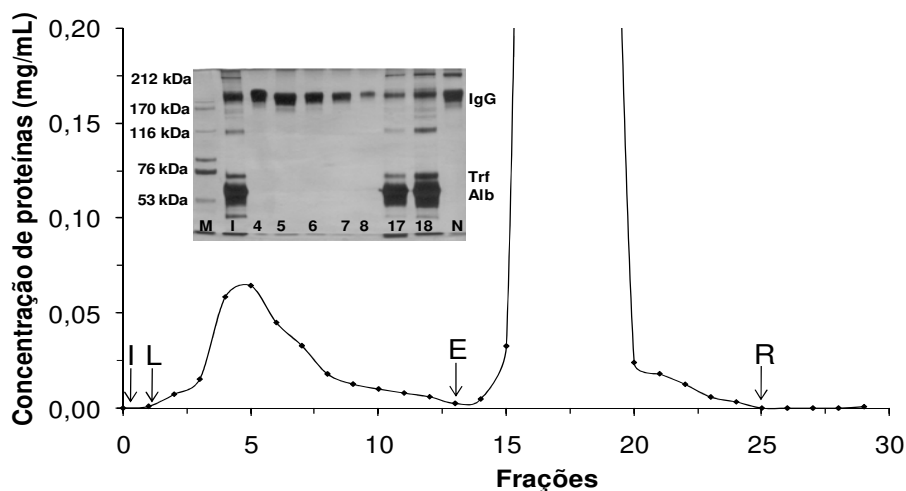


Figura E-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 6,8.

Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,64 mg/mL de proteínas totais). (L) lavagem: tampão HEPES pH 6,8; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 6,8; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (17-18) eluição; (N) marcador de IgG.

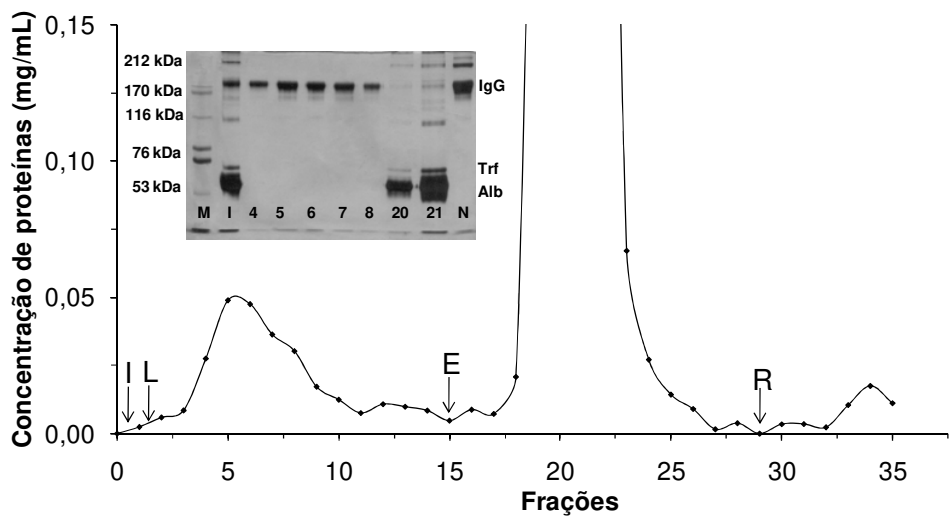


Figura E-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, a partir de solução de soro em tampão HEPES pH 8,2. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção:1,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes (3,08 mg/mL de proteínas totais) . (L) lavagem: tampão HEPES pH 8,2; (E) eluição: HEPES, NaCl 1,0 M pH 8,2; (R) regeneração: NaOH 25 mM. Eletroforese SDS-PAGE: Faixas: (M) marcador de alta massa molecular; (I) injeção; (4-8) lavagem; (20-21) eluição; (N) marcador de IgG.

Tabela E-1. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção MES pH 6,7 e MOPS pH 7,9 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	MES pH 6,7		MOPS pH 7,9	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	2,52	100,0	3,03	100,0
Lavagem	0,21	8,5	0,25	8,1
Eluição	1,97	78,1	2,47	81,7
Regeneração	0,16	6,5	0,05	1,7
Recuperação	2,35	93,1	2,77	91,5
Proteínas totais adsorvidas	2,14	84,9	2,52	83,2

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

Tabela E-2. Balanço de massa da cromatografia referente aos tampões de adsorção HEPES pH 6,8 e pH 8,2 e dessorção por acréscimo de 1,0 de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	pH 6,8		pH 8,2	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	3,64	100,0	3,08	100,0
Lavagem	0,28	7,7	0,28	9,0
Eluição	3,34	91,8	2,62	85,1
Regeneração	0,00	0,0	0,05	1,7
Recuperação	3,62	99,5	2,96	95,9
Proteínas totais adsorvidas	3,34	91,8	2,68	87,0

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.

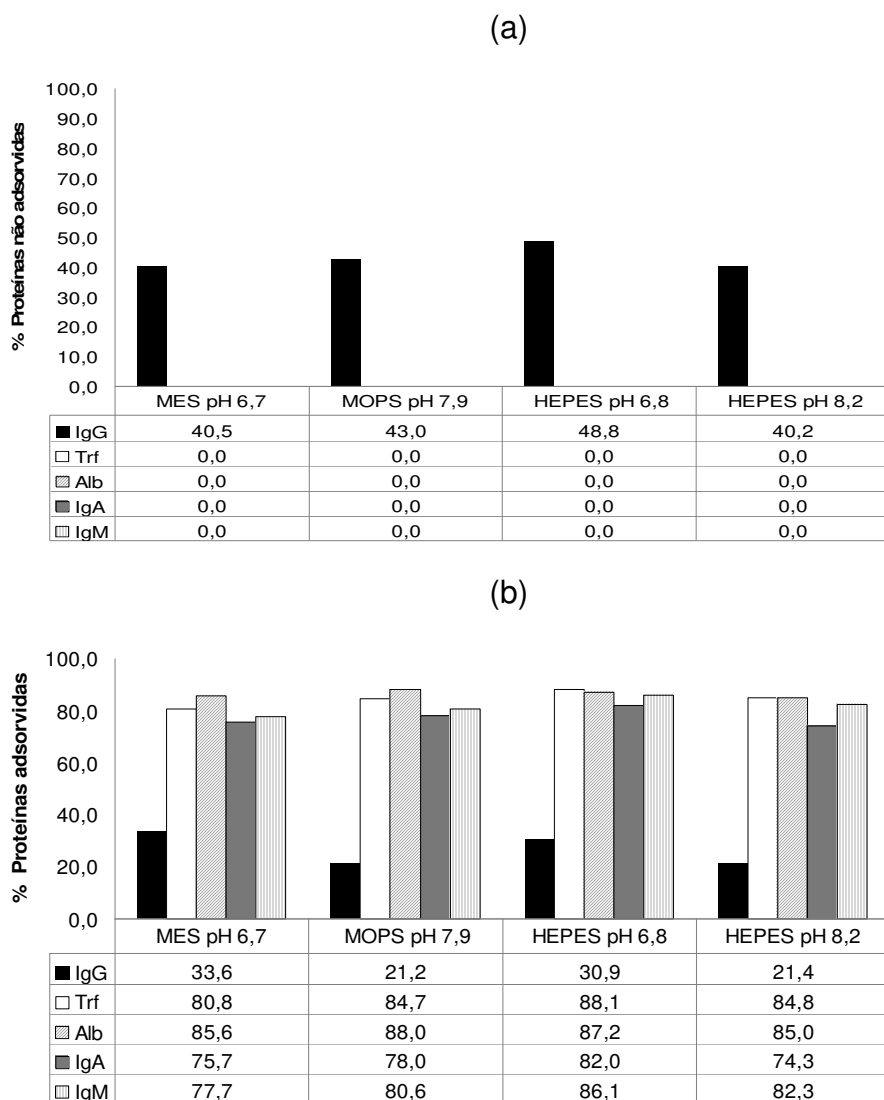


Figura E-5. Porcentagens de proteínas (a) não adsorvidas e (b) adsorvidas em ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em presença dos tampões MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2, eluição por acréscimo de 1,0 M NaCl nos tampões de adsorção.

Tabela E-3. Massa obtida por nefelometria referente ao “Pool” das frações de proteínas mais concentradas de cada etapa cromatográfica. Adsorção: MES pH 6,7, MOPS pH 7,9, HEPES pH 6,8 e pH 8,2. Dessorção: acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção.

Sistema	Etapas	Proteínas (mg)					Purificação de IgG		
		IgG	Alb	Trf	IgA	IgM	PT ^a	Pureza ^b (%)	FP ^c
Mes pH 6,7	Injeção	0,55	2,30	0,15	0,07	0,06	2,52	21,9	1,0
	Lavagem	0,22	n.d	n.d	n.d	n.d	0,21	106,6	4,9
	Eluição	0,19	1,97	0,12	0,05	0,05	1,97	9,4	0,4
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,16	-	-
Mops pH 7,9	Injeção	0,47	2,44	0,14	0,12	0,05	3,03	15,3	1,0
	Lavagem	0,20	n.d	n.d	n.d	n.d	0,25	79,9	5,2
	Eluição	0,10	2,15	0,11	0,10	0,04	2,47	4,0	0,3
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,05	-	-
Hepes pH 6,8	Injeção	0,64	3,12	0,17	0,16	0,06	3,64	17,7	1,0
	Lavagem	0,31	n.d	n.d	n.d	n.d	0,28	112,1	6,3
	Eluição	0,20	2,72	0,15	0,13	0,06	3,34	5,9	0,3
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,00	-	-
Hepes pH 8,2	Injeção	0,47	2,40	0,13	0,13	0,05	3,08	15,3	1,0
	Lavagem	0,19	n.d	n.d	n.d	n.d	0,28	67,5	4,4
	Eluição	0,10	2,04	0,11	0,09	0,04	2,62	3,8	0,3
	Regeneração	-	-	-	-	-	0,05	-	-

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976

^b Pureza: razão entre a massa de IgG da fração e a PT^a do material injetado x 100.

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

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,62 mg/dL para Alb, 1,11 mg/dL para IgA, 0,69 mg/dL para IgM e 0,35 mg/dL para Trf).

Duplicata do ensaio realizado com o gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose em que se alimentou a coluna cromatográfica com 15,0 mL de solução de soro

humano diluído vinte vezes em tampão de adsorção HEPES pH 6,8 e eluição por adição de NaCl no tampão de adsorção. A descrição do ensaio está apresentada no item 4.2.2. Os cromatogramas, eletroforeses e balanços de massas da duplicata realizadas encontram-se a seguir.

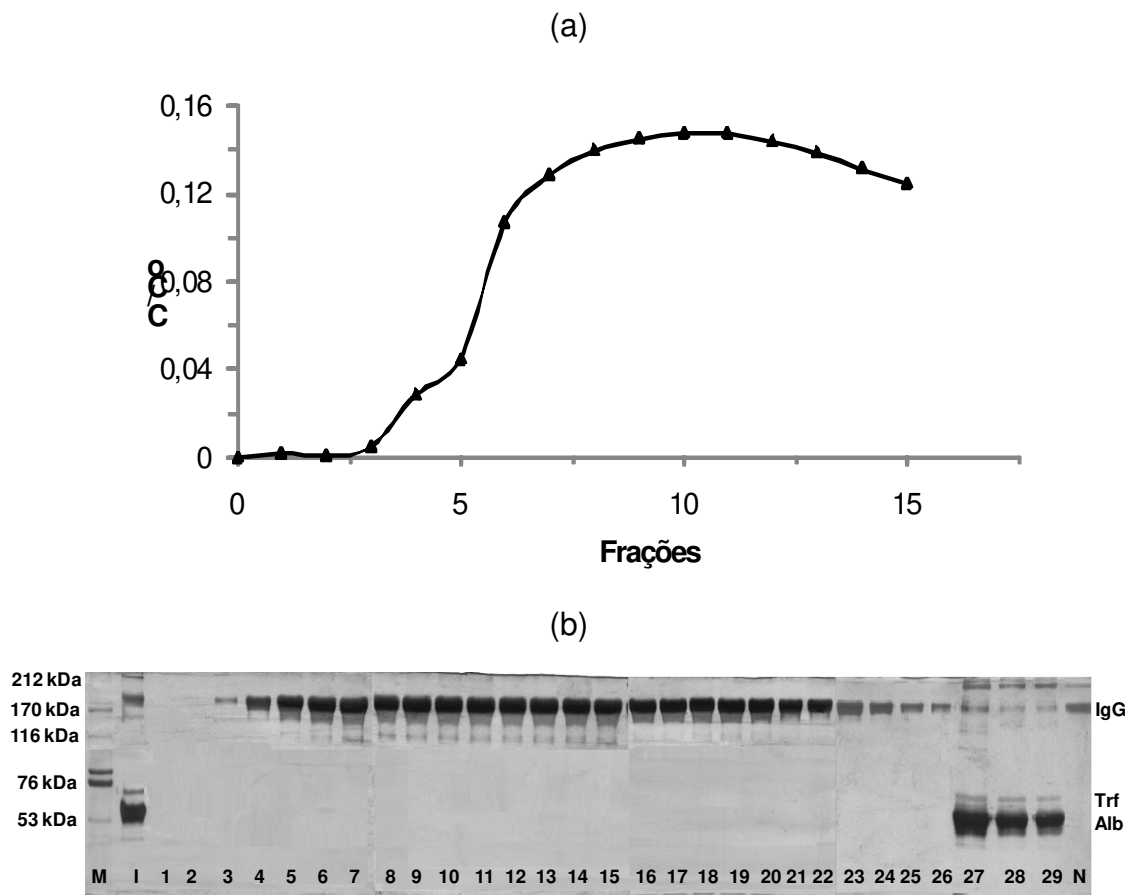


Figura E-6. (a) Curva de ruptura de IgG do experimento em gel ω -aminodecil-bisoxirano-agarose, volume final de alimentação: 15,0 mL de solução de soro diluído vinte vezes (3,01 mg/mL de proteínas totais). (b) Eletroforese SDS-PAGE das frações de alimentação, lavagem e eluição: Faixas: M: marcador de alta massa molecular; 1-15: pontos da curva de ruptura (alimentação); 16-26: frações da lavagem; 27-29: frações da eluição; N: marcador de IgG.

Tabela E-4. Balanço de massa da cromatografia referente ao tampão de adsorção HEPES 25 mM pH 6,8, e dessorção por acréscimo de 1,0 M de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT ^a (mg)	% ^b
Solução inicial	50,67	100,0
Alimentação	3,71	7,3
Lavagem	2,75	5,4
Eluição	41,00	80,9
Regeneração	0,34	0,67
Recuperação	47,8	94,3
Proteínas totais adsorvidas	41,3	81,5

^a Proteína Total: Dosagem pelo Método de Bradford, 1976.

^b Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo x 100.

Volume do leito: 3,0 mL.