

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
UNICAMP

**PROCESSO DE REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS DE SOROS
HIPERIMUNES: FILTRAÇÃO EM
MEMBRANAS DE AFINIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química, Área
de Concentração : Desenvolvimento de
Processos Biotecnológicos

UNIDADE	B. C.
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Ac 27c
V. Ex.	
TOMBO BC	40848
PROG.	278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	811,00
DATA	04/09/00
N.º CIPED	

CM-00139662-3

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

Ac27p Acconci, Cesar
Processo de remoção de endotoxinas de soros hiperimunes: filtração em membranas de afinidade. / Cesar Acconci.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

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

1. Endotoxina. 2. Soros. 3. Cobra. 4. Cromatografia de afinidade. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
UNICAMP

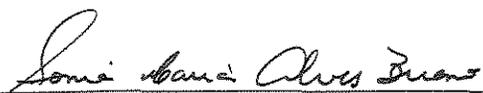
**PROCESSO DE REMOÇÃO DE ENDOTOXINAS DE SOROS
HIPERIMUNES: FILTRAÇÃO EM
MEMBRANAS DE AFINIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química, Área
de Concentração : Desenvolvimento de
Processos Biotecnológicos

Cesar Acconci

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Alves
Bueno

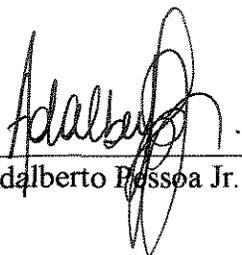
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 25 de novembro de 1998 pela banca constituída pelos professores doutores:



Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno
Orientadora

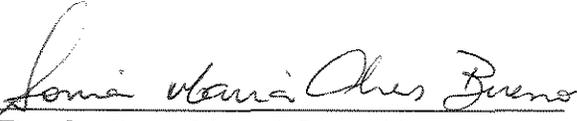


Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana



Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Cesar Acconci e aprovada pela Comissão Julgadora em 25 de novembro de 1998.


Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Dedico esta tese aos meus pais pela força constante,
à minha família pelo apoio,
à Fernanda pelo amor
e ao meu avô Affonso, que mesmo longe nunca esteve
tão perto.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo;

À meus pais pelo amor e incentivo constante;

Aos meus avós e minha família pelo apoio;

À Prof. Sônia pela orientação e ajuda;

À Fernanda pelo amor e companheirismo;

Ao meu amigo Azzoni pela amizade;

Aos “três mosqueteiros” Eduardo, Fábio e José Antônio pelos ensinamentos;

À todos os colegas do laboratório e dos laboratórios vizinhos;

Ao Prof.Dr. Cesar Santana pela utilização do seu laboratório;

Ao Prof.Dr. Everson Alves Miranda pelo contato com a FUNED e pelas sugestões;

Ao Dr. Velarde da FUNED pela doação dos soros antiofidicos;

Ao Dr. Paulo Rosa pelas sugestões;

À Profª.Dra. Maria Isabel pela utilização de seu laboratório e ajuda com a parte do planejamento experimental;

À todas as pessoas que de uma forma ou de outra colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido;

À FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA de TABELAS	v
LISTA de FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Introdução	1
1.2. Endotoxinas, características e métodos de remoção	2
1.3. Aminoácido histidina como ligante pseudobioespecífico	3
1.4. Objetivos.....	5
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBILOGRÁFICA	7
2.1. Soros Antiofídicos (anticorpos anti-veneno).....	7
2.2. As imunoglobulinas	8
2.3. Pirogênios	12
2.4. Métodos utilizados para despirogenação	16
2.5. Métodos utilizados para detecção de endotoxinas.....	33
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Materiais	39
3.2. Métodos	41
3.2.1. Quantificação de proteínas	41

3.2.2. Construção do módulo de membranas de fibras ocas de PEVA	41
3.2.3. Ativação das membranas de fibras ocas	43
3.2.4. Imobilização de histidina.....	45
3.2.5. Verificação da imobilização de histidina por sulfato de cobre	45
3.2.6. Adsorção do soro hiperimune em membranas His-PEVA	46
3.2.7. Cromatografia em coluna com membranas His-PEVA finamente cortadas.....	48
3.2.8. Eletroforese SDS-PAGE dos soros antibotrópico e antibotrópico laquétrico	51
3.2.9. Imunoeletroforese do soro antibotrópico laquétrico e dos picos de lavagem e eluição.....	52
3.2.10. Despirogenação dos materiais utilizados.....	54
3.2.11. Verificação da perda de capacidade das membranas	56
3.2.12. Experimentos de remoção de endotoxinas em soluções tampão.....	57
3.2.13. Experimentos de filtração em modo tangencial em circuito fechado	58
3.2.14. Montagem do planejamento experimental	60
3.2.15. Método de quantificação de endotoxinas	64
3.2.16. Determinação da quantidade de endotoxinas de amostras protéicas.....	68

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1. Introdução	69
4.2. Ativação da membrana de PEVA e imobilização de histidina.....	71
4.3. Adsorção de anticorpos do soro hiperimune em membranas His-PEVA.....	72
4.4. Eletroforese SDS-PAGE e imunoeletroforese dos picos referentes a filtração dos soros hiperimunes.....	77
4.5. Influência da solução tamponante e do pH na adsorção de anticorpos do soro em His-PEVA	80
4.6 Experimentos de remoção de endotoxinas em solução tampão	85
4.7. Remoção de endotoxinas de soluções contendo soro antibotrópico	88
4.8. Remoção de endotoxinas de soluções com baixa concentração de endotoxinas	96
4.9 . Influência do aumento da concentração de anticorpos no processo de remoção de endotoxinas	99
CAPÍTULO 5 -CONCLUSÃO e SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS.....	103
5.1. Conclusão.....	103
5.2. Sugestões para os próximos trabalhos	105
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA de TABELAS

Tabela 3.1: Parâmetros utilizados para a realização do planejamento experimental.....	62
Tabela 3.2: Planejamento experimental 2^2 para estudar os efeitos da relação Q_F/Q_I e da concentração de endotoxinas.....	63
Tabela 3.3: Passos para a realização de teste LAL cromogênico.....	66
Tabela 4.1: Influência do tampão na adsorção de endotoxinas em membranas His-PEVA.....	87
Tabela 4.2: Concentração de endotoxinas remanescentes na solução do reservatório (EU/mL) em função das variáveis estudadas.....	89
Tabela 4.3: Quantidade de IgG remanescentes na solução do reservatório em função das variáveis estudadas.....	92
Tabela 4.4: Quantidade de IgG obtida na solução de lavagem em função das variáveis estudadas.....	93
Tabela 4.5: Endotoxinas obtidas na solução de lavagem em função das variáveis estudadas.....	94
Tabela 4.6: Quantidade de endotoxinas remanescentes no reservatório.....	97
Tabela 4.7: Quantidade de endotoxinas obtidas com a lavagem.....	98
Tabela 4.8: Endotoxinas remanescentes na solução do reservatório.....	100
Tabela 4.9: Quantidade de anticorpos remanescentes na solução do reservatório.....	100

Tabela 4.10: Quantidade de IgG obtida na solução da lavagem em função da variável estudada	101
Tabela 4.11: Endotoxinas obtidas na solução de lavagem em função das variáveis estudadas.....	101

LISTA de FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura do anticorpo (imunoglobulina).....	10
Figura 2.2: Ação das enzimas papaína e pepsina nas imunoglobulinas	11
Figura 2.3: Localização das moléculas de endotoxinas na estrutura da parede das bactérias Gram-negativas e sua estrutura química básica.....	15
Figura 2.4: Esquema dos processos de despirogenção	17
Figura 2.5: Esquema dos ligantes utilizados em cromatografia de afinidade	26
Figura 2.6: Esquema do princípio do método de filtração em membranas de afinidade	30
Figura 2.7: Esquema da ativação da enzima que quebra o coagulogênio em sub-unidades poli-peptídicas, formando uma matriz protéica do gel com ligações dissulfeto.....	35
Figura 3.1: Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA.....	42
Figura 3.2: Esquema de fluxo de lavagem das membranas de fibras ocas de PEVA.....	44
Figura 3.3: Esquema da montagem experimental para a ativação da membrana com 1,4 butanodiol diglicidil éter	44
Figura 3.4: Esquema experimental utilizado para verificar a adsorção de IgG de cavalo (porção F(ab') ₂).....	47
Figura 3.5: Esquema da montagem experimental utilizada para a aquisição de dados	50

Figura 3.6: Esquema das etapas utilizadas nas cromatografias.....	50
Figura 3.7: Esquema do molde de um gel para imunoelektroforese.....	53
Figura 3.8: Esquema da montagem experimental para remoção de endotoxinas em membranas His-PEVA em circuito fechado.....	58
Figura 3.9: Esquema da montagem experimental para remoção de endotoxinas do soro em membranas His-PEVA contidas no módulo.....	59
Figura 4.1 : Estrutura proposta da membrana de afinidade His-PEVA.....	72
Figura 4.2 :Elektroforese SDS-PAGE dos soros antitoxinogênico laquéetico e antitoxinogênico utilizados.....	74
Figura 4.3 : Cromatograma do soro antitoxinogênico laquéetico.....	75
Figura 4.4 : Cromatograma do soro antitoxinogênico.....	76
Figura 4.5: Gel de elektroforese dos soros e picos de lavagem e eluição.....	77
Figura 4.6: Disposição das amostras nos poços e do anti-soro total de cavalo e anti-IgG de cavalo nas canaletas no gel de imunoelektroforese.....	78
Figura 4.7: Gel de imunoelektroforese.....	79
Figura 4.8 : Adsorção de anticorpos (fragmento F('ab) ₂ , soro antitoxinogênico laquéetico) em mg por grama de membrana seca His-PEVA nas várias soluções tampão e seus diferentes pHs.....	81
Figura 4.9: Estrutura dos tampões utilizados para adsorver anticorpos em His-PEVA.....	82
Figura 4.10 : Adsorção dos anticorpos (mg/g de suporte) em His-PEVA em função da condutividade dos diversos tampões.....	84

Figura 4.11: Influência da relação Q_F/Q_I e da concentração inicial de endotoxinas (EU/mL) na concentração final do reservatório 91

ÍNDICE

Apesar das medidas preventivas serem tomadas durante as etapas de produção ou purificação de soros hiperimunes, esses podem vir a ser contaminados com endotoxinas (ET), um tipo de pirogênio liberado pela parede de bactérias Gram-negativas. Endotoxinas produzem uma reação febril quando injetado em humanos ou outros mamíferos., podendo ocasionar a morte em alguns casos. Desta forma, a sua concentração em soluções a serem administradas parenteralmente deve ser reduzida a níveis toleráveis pelo organismo. Neste trabalho, para a remoção de ET de soros antiofídicos, utilizou-se o método de filtração em membranas de afinidade com o aminoácido histidina imobilizado em fibras ocas de álcool poli etileno vinílico (PEVA). Histidina imobilizada neste tipo de suporte apresentou pseudo-bioafinidade por anticorpos (IgG) do soro e ET. Para evitar competições entre estas duas moléculas pelo ligante imobilizado, foi avaliada a adsorção de anticorpos do soro nestas membranas de afinidade a fim de determinar as melhores condições nas quais ET pudessem ser removidas sem implicar em adsorção significativa de anticorpos do soro antiofídico. As condições menos favoráveis para a adsorção de anticorpos ocorreram nas soluções tamponantes acetato a pH 6,0 e fosfato pH 6,5. Testes foram realizados para determinar qual destas soluções promoveria uma maior remoção de ET, porém em presença de tampão acetato, obteve-se uma redução mais significativa.

Encontrada a solução que favoreceu a remoção deste pirogênio, estudou-se a influência das variáveis Q_F/Q_I (vazão do filtrado/vazão da alimentação) e da concentração inicial de ET na etapa de retenção através de um planejamento estatístico experimental. A

razão Q_F/Q_I não apresentou efeito significativo na retenção de ET e a quantidade deste pirogênio retida nas membranas aumentou de acordo com a sua concentração inicial na solução (quanto maior a concentração de ET (1000 EU/mL), maior a quantidade retida por unidade de área de membrana (190 EU/cm²)). A remoção média de ET alcançada no processo foi de 92%, seguida de uma recuperação total de anticorpos em torno de 90%.

Constatou-se também que a quantidade máxima de adsorção das membranas de afinidade não foi atingida e que para baixas concentrações de pirogênios, a remoção foi quase total (99%), enquanto que o aumento na concentração de anticorpos na solução não provocou alterações na quantidade de ET removida.

ABSTRACT

Contamination by pyrogens may occur during the production and purification of hiperimum serum. Endotoxins (ET) or lipopolysaccharides (LPS) are a kind of pyrogens present at the cell wall of gram-negative bacteria. LPS are able to induce fever reaction when injected in to mammals. In some cases, even death may occur. Thus, endotoxins should be removed to be reduced to tolerable levels for the host organism. There are several methods for ET removal as ultrafiltration, adsorption on activated charcoal and on ion-exchange resins, and chromatography. In the present study, adsorption on histidine-linked hollow fiber membrane (His-PEVA) was used to remove ET from anti snake serum. Immobilized histidine presents pseudobioaffinity to horse antibodies (IgG) and to ET. The adsorption of serum IgG in the His-PEVA membranes was analysed to determine the best conditions for ET removal without a significant adsorption of antibodies. The lowest adsorption of IgG was obtained with acetate (pH 6,0) and phosphate (pH 6,5) buffers. Both conditions removed LPS, but the highest efficient was found to acetate buffer. This buffer was used to determine the optimal combination of ET concentration and ratio (Q_F/Q_I) to reach high LPS removal without significant loss of IgG. Removal of 92% of ET and recuperation of 90% of IgG was obtained with this process. In low pirogen concentrations, the remotion was 99% and higher antibodies concentrations didn't induce changes in the quantity of removed ET.

CAPÍTULO 1

1.1. Introdução

No Brasil são registrados por ano, cerca de 20.000 casos de acidentes causados por picadas de serpentes (jararacas, cascavéis e surucucus), apresentando, desta forma, um problema para a saúde pública. O único tratamento eficaz conhecido é a soroterapia, que consiste em administrar os soros antiveneno em quantidades que variam com as condições do paciente. Os soros antiveneno consistem de anticorpos obtidos através da hiperimunização de cavalos com o veneno das serpentes. O soro anti-veneno é obtido através do plasma do cavalo, que após ser retirado do animal é submetido à um tratamento com pepsina, uma purificação e finalmente a formulação do soro.

Porém algumas precauções devem ser tomadas durante as etapas de produção e purificação destes soros, apesar destas precauções essas soluções podem vir a ser contaminadas com endotoxinas. Endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede das bactérias Gram-negativas que causam febre em mamíferos, vasodilatação, diarreia e em alguns casos pode ocasionar a morte do indivíduo (WALSH & HEADON,1974). Por estes motivos, é importante a remoção de endotoxinas (despirogenação) de drogas e soluções destinadas à aplicação terapêutica. (PEARSON, 1985). Assim, apesar das medidas preventivas tomadas durante as etapas de produção e purificação, soluções destinadas a uma injeção intravenosa forem contaminadas, endotoxinas

devem ser removidas de forma a reduzir a sua concentração na solução a níveis toleráveis ao organismo, (máxima exposição a endotoxina permitida de 5 EU¹/Kg/h para drogas intravenosas e 0,2 EU/Kg/h para drogas que entram em contato com o sistema nervoso central do indivíduo) segundo a FDA (“Food and Drug Administration”) dos Estados Unidos.

1.2. Endotoxinas, características e métodos de remoção

Endotoxinas, também chamadas de pirogênios, são complexos de alta massa molecular associados com a parede externa de bactérias Gram-negativas. As endotoxinas são compostos estáveis à esterilização por vapor, porém são inativadas com ciclos de calor seco, condições ácidas e alcalinas. Por estarem associadas com bactérias Gram-negativas (que estão presentes em todos os lugares, podendo ser encontrada no ar, em alimentos e na água), por serem relativamente estáveis ao calor e provocarem profundas variações fisiológicas quando administrado parenteralmente, sua eliminação é importante durante a manufatura de produtos farmacêuticos (PEARSON,1985).

Vários processos como ultrafiltração, adsorção em carvão ativo, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade tem sido propostos e muitas vezes utilizados industrialmente para eliminação de endotoxinas de soluções aquosas ou protéicas. Porém, alguns fatores como reprodutibilidade do processo, efetividade na remoção de pirogênios e perda da substância de interesse devem ser observados.

¹ EU - Unidades de Endotoxinas.

A ultrafiltração é baseada na diferença entre o tamanho das moléculas de LPS e da molécula de interesse, tornando-se bastante eficaz quando o produto possui uma molécula de baixa massa molecular, como açúcares, vitaminas, antibióticos entre outros uma vez que em soluções aquosas, as regiões hidrofóbicas das moléculas de ET tendem a associar-se formando grandes agregados, podendo-se encontrar subunidades de endotoxinas de massa molecular entre 10 a 20 Kda até agregados de 0,1µm de diâmetro (SCHINDLER & DINARELLO, 1989).

Cromatografia de troca iônica e adsorção de carvão ativo têm baixa seletividade ocasionando perda do produto. Processos cromatográficos de afinidade, para a remoção de endotoxinas, empregam adsorventes que apresentam afinidade por LPS sem que haja desnaturação ou perda significativa dos produtos e do ligante (HELANDER & VAARA, 1987; MINOBE et al.,1988; TALMADGE & SIEBERT,1989). Polimixina B, histamina, histidina e protamina tem sido utilizados como ligantes para remoção de endotoxinas. O ligante histidina imobilizado em matrizes sólidas tem-se apresentado atrativo para a despirogenação de soluções protéicas devido a sua seletividade, baixo custo e segurança (no caso de despreendimento do ligante, este não apresenta toxicidade) como descrito em MATSUMAE et al., (1990); EZZEDINE et al.,(1993); ANSPACH & HILBERT(1995).

1.3. Aminoácido histidina em processos de pseudobioseparação.

Neste trabalho utilizou-se técnica de adsorção em membranas de afinidade com o ligante histidina imobilizado (LEGALLAIS et al., 1997). Membranas de álcool polietileno

vinílico (PEVA) foram utilizadas como matrizes para imobilização do ligante com o objetivo de se tratar grandes volumes por unidade de tempo. Histidina tem sido utilizada como ligante pseudobioespecífico em cromatografia para a purificação de várias proteínas (VIJAYALAKSHIMI, 1989) e para a remoção de endotoxinas de soluções destinadas a uma aplicação terapêutica (MATSUMAE et al., 1990; EZZEDINE et al., 1993; ANSPACH & HILBERT, 1995 e LEGALLAIS et al., 1997). Tendo em vista que, histidina imobilizada adsorve várias proteínas, condições para a remoção de pirogênicos de soluções protéicas foram investigadas.

De acordo com a literatura, histidina imobilizada em géis ou membranas adsorve endotoxinas e algumas espécies e subclasses de imunoglobulina G, dependendo das condições de operação (VIJAYALAKSHIMI, 1989; BUENO et al., 1995a; HAUPT et al., 1995; BUENO et al., 1996; LEGALLAIS, et al., 1997). No entanto, dados sobre a adsorção de anticorpos de cavalo e sobre a despirogenação de soluções de soro antiofídico contaminadas com endotoxinas utilizando histidina como ligante imobilizada em suportes sólidos não são disponíveis em literatura. Uma vez que tanto os anticorpos do soro antiofídico quanto as endotoxinas poderiam ser adsorvidas em Histidina-PEVA(ou His-PEVA), as melhores condições de operação tiveram que ser determinadas para que as endotoxinas pudessem ser removidas do soro sem implicar em perdas significativa de anticorpos por adsorção nas membranas de afinidade His-PEVA.

1.4. Objetivos

Assim, nesse trabalho foi proposto um processo de remoção de endotoxinas de soros antiofídicos sem que as características do soro fossem afetadas. Foi planejada, então, uma estratégia para a despirogenação do soro antiofídico (antibotrópico laquéico e antibotrópico) baseado na diferença de condições de adsorção de ambas as moléculas, anticorpos e endotoxinas. Esta estratégia foi proposta pois, em experimentos iniciais, ao investigar a adsorção dos anticorpos do soro nas membranas His-PEVA, verificou-se que dois casos poderiam ocorrer dependendo das condições de operação: não existir afinidade destes anticorpos com a membrana de afinidade ou haver afinidade destes anticorpos por histidina imobilizada. Tendo sido verificado a existência de adsorção dos anticorpos do soro antibotrópico laquéico e antibotrópico nas membranas de afinidade His-PEVA quando em presença de tampão Mops pH 6,5. Realizou-se as seguintes etapas, tendo em vista o objetivo inicial, dentro da estratégia traçada:

1) Determinar condições nas quais a adsorção de anticorpos não fosse significativa nas membranas His-PEVA. Experimentos de adsorção de anticorpos foram realizados em coluna cromatográfica contendo membranas His-PEVA utilizando várias soluções tampão e pHs. A solução tamponante fosfato de sódio à pH 6,5 foi a que permitiu uma menor adsorção dos anticorpos, seguido do tampão acetato de sódio à pH 6,0.

2) Avaliar, se na presença das duas soluções tampão que implicaram em uma menor adsorção de anticorpos, qual delas promoveria uma maior remoção de endotoxinas. Soluções contaminadas artificialmente com endotoxinas foram preparadas em tampão acetato, pH 6,0 e

fosfato pH 6,5 e experimentos cromatográficos para a remoção de endotoxinas foram realizados em coluna contendo membranas His-PEVA em circuito fechado.

3) Determinar através de um planejamento estatístico experimental, as melhores condições para remoção de endotoxinas sem uma perda significativa de anticorpos do soro antiofídico.

4) Investigar, por fim, qual seria a influência do aumento da concentração de anticorpos no soro na quantidade de endotoxinas removidas da solução pelas membranas His-PEVA.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão ressaltados alguns aspectos importantes sobre os assuntos que envolvem este trabalho, que se refere à remoção de pirogênios de soros antiofídicos.

2.1. Soros Antiofídicos (anticorpos anti-veneno)

Existem cerca de 3.500 espécies de serpentes em todo o planeta, sendo a metade venenosas. O veneno das serpentes é usado tanto para defesa como para ataque, contendo substâncias que imobilizam a presa e facilitam a digestão. No Brasil, são quatro os gêneros de serpentes que podem causar envenenamento com sintomas clínicos importantes: *Micrurus*, *Lachesis*, *Bothrops* e *Crotalus*. O gênero *Micrurus* inclui as cobras corais cujo veneno é extremamente tóxico, porém com baixa incidência de vítimas. O gênero *Lachesis* inclui a surucucu e a surucutinga que são as m

aiões serpentes venenosas do Brasil e ocorrem nas regiões norte, centroeste e na mata atlântica. Os acidentes causados por estes animais são semelhantes aos causados pelo gênero *Bothrops*. Cobras do gênero *Bothrops* (jararaca, urutu, caissaca, etc.) são responsáveis por 88% de todos os acidentes ofídicos no Brasil, resultando em cerca de 20.000 casos por ano, geralmente em regiões rurais e na periferia das cidades (ROGERO &

NASCIMENTO,1997). O gênero *Crotalus* (cascavéis) é encontrado nas regiões nordeste, centroeste e sul. Seu veneno pode causar na vítima insuficiência renal, prolongamento no tempo de coagulação sanguínea e ação neurotóxica sendo esta a principal causa de morte precoce.

Para neutralizar os efeitos causados pelo veneno, é realizada a soroterapia. Este é o único tratamento eficaz, realizado através da administração de antivenenos em determinado tempo após o acidente em quantidades que dependem do estado clínico do paciente. Os antivenenos consistem de anticorpos policlonais específicos obtidos através da hiperimunização de cavalos com o veneno das serpentes. O antiveneno é obtido através do plasma do cavalo onde estão as imunoglobulinas (Ig). Este plasma é tratado com pepsina resultando na porção $F(ab')_2$ das Igs, as quais são responsáveis pela neutralização do veneno quando inoculado em seres humanos e animais. Posteriormente, é realizada uma purificação com sulfato de amônio e em seguida as etapas de formulação do soro (ROGERO & NASCIMENTO,1997).

2.2. As imunoglobulinas

O antígeno é uma substância estranha ao organismo normal e induz a formação de anticorpos (imunoglobulinas) que combina-se de maneira específica com esse antígeno. Os anticorpos representam uma das principais defesas contra os agentes infecciosos e podem neutralizar os agentes tóxicos, tais como toxinas elaboradas por certos organismos (Berne e Levy,1988).

A formação dos anticorpos pode ser induzida pela administração do antígeno para prevenção de doenças, utilizando-se vacinas. Porém quando a neutralização dos antígenos deve ocorrer muito rapidamente, como em acidentes por picadas de animais peçonhentos, é necessária a administração de anticorpos, na forma de soro (Berne e Levy, 1988).

As etapas que resultam na produção dos anticorpos, começam com o transporte do antígeno para os glânglios linfáticos e baço, pelos canais linfáticos e vasos sanguíneos, nesta ordem. Os antígenos aderem então a linfócitos que possuem em suas superfícies anticorpos para o antígeno presente na corrente sanguínea. A partir destas interações, os linfócitos B proliferam transformando-se em plasmócitos que secretam imunoglobulinas específicas para o antígeno presente (Guyton e Hall, 1994)

As imunoglobulinas são proteínas compostas de quatro cadeias polipeptídicas interligadas, como esquematizado na figura 2.1. As duas cadeias mais longas são chamadas de pesadas e as duas menores, leves, que são unidas por ligações dissulfeto. As cadeias pesadas têm uma massa molecular aproximada de 50.000 Da e as cadeias leves, em torno de 20.000. Conseqüentemente a molécula de Ig básica tem massa molecular estimada de 150.000 Da. As sequências de aminoácidos ao longo das cadeias são constantes entre os anticorpos, exceto pelas sequências curtas das porções em oposição das cadeias pesadas e leves (representado na figura 2.1 pelas porções vermelhas). Estas sequências são únicas para cada um dos anticorpos produzidos pelo indivíduo e constituem o sítio de ligação para o seu antígeno específico. As sequências nas cadeias pesadas também contêm sítios de ligação não-específica para moléculas e células. O grau elevado de especificidade de um sítio do anticorpo por um antígeno depende de dois fatores: sua forma é complementar ao do

antígeno e as cadeias no interior dos sítios estão posicionadas para maximizar as forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio entre os anticorpos e os antígenos (VANDER et al., e , 1981).

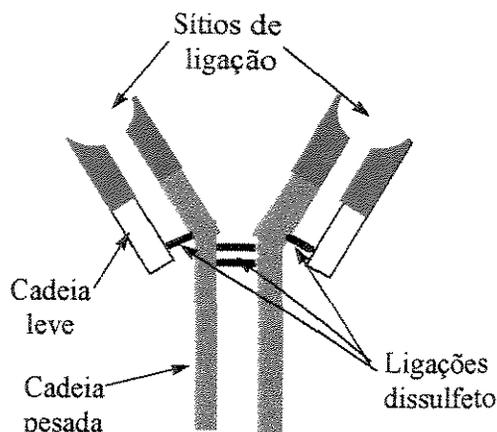


Figura 2.1. Estrutura do anticorpo (imunoglobulina)

As imunoglobulinas podem ser divididas em cinco classes de acordo com os tipos de cadeias leves e pesadas que contêm e cada classe inclui milhares de anticorpos singulares. Estas classes são designadas pelas letras G, A, M, D, e E. A imunoglobulina G (IgG) é a mais abundante dos anticorpos plasmáticos, os anticorpos IgM suprem a parte da imunidade específica contra bactérias e vírus, a IgE atua como intermediária de respostas alérgicas, os anticorpos IgA são produzidos pelo tecido que reveste o trato gastrointestinal, respiratório e genitourinários e a função da classe IgD ainda é desconhecida (Guyton e Hall, 1994).

A molécula de imunoglobulina possui duas partes denominadas Fc e Fab. A parte Fab possui a função de ligar-se ao antígeno e a Fc depende da classe de Ig. A região que une estas partes é capaz de dobrar-se sendo por isso susceptível ao ataque das enzimas papaína e

pepsina. A papaína (enzima isolada do látex da árvore do mamão) hidrolisa a molécula em 3 polipeptídeos de massa molecular de aproximadamente 45.000 Da. Um polipeptídeo é denominado fragmentos Fc ou fragmento cristalino e os outros são idênticos e capazes de realizar ligações antigênicas, formando fragmentos Fab (“Fragment antigen binding”). A pepsina hidrolisa a parte Fc das moléculas de IgG em pedaços peptídeos e a molécula resultante desta hidrólise apresenta dois fragmentos Fab unidos por uma ligação dissulfeto sendo denominada fragmento $F(ab')_2$. As duas enzimas agem aproximadamente na mesma região da molécula de IgG, mas a papaína hidrolisa a molécula em um dos lados da ligação dissulfeto entre os dois fragmentos Fab juntos e a pepsina no outro lado, como ilustrado na figura 2.2.

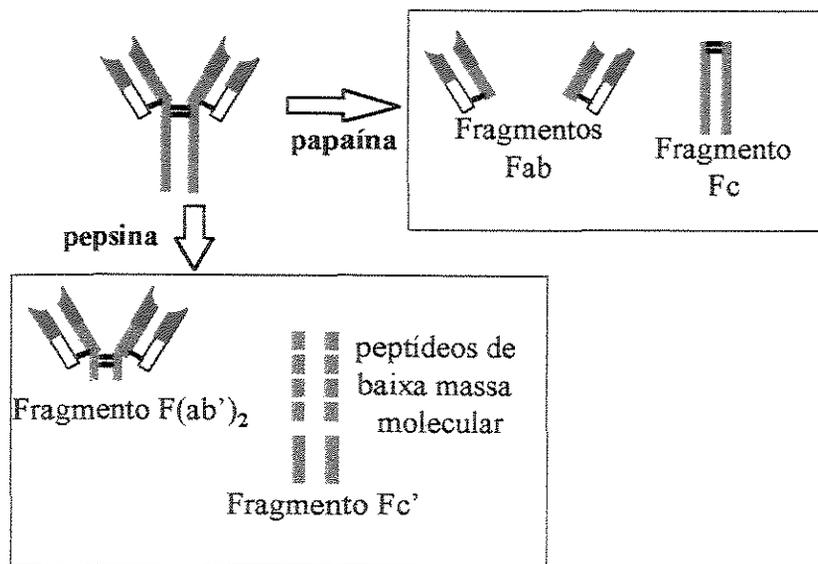


Figura 2.2: Esquema da ação hidrolítica das enzimas papaína e pepsina nas imunoglobulinas.

Como o homem não é capaz de neutralizar a peçonha das serpentes antes que seus

graves efeitos no organismo ocorram, são utilizados os anticorpos de cavalo para que a neutralização do veneno seja realizada quando este é inoculado em mamíferos. Após inoculações repetidas de baixa concentração de veneno, o cavalo produz anticorpos antiveneno que são retirados do sangue através do plasma e tratados com pepsina. Posteriormente são realizadas etapas para a produção do soro, durante as quais, pode vir a ocorrer uma contaminação por pirogênios, que causam reações indesejáveis no homem e em outros mamíferos. Por esse motivo, pirogênios devem ser removidos das soluções destinadas as aplicações terapêuticas.

2.3. Pirogênios

Pirogênios são todas as substâncias que induzem elevações de temperatura (febre) quando injetados em mamíferos. Embora os pirogênios mais importantes sejam os componentes de bactérias Gram-negativas, há outros, tais como micróbios, componentes de bactérias Gram-positivas, fungos, vírus e alguns pirogênios não biológicos como algumas drogas, esteróides e frações de plasma (PEARSON, 1985).

Muitos microorganismos produzem toxinas que são classificadas em duas categorias, as exotoxinas e as endotoxinas. As exotoxinas são proteínas secretadas extracelularmente e devido a sua natureza protéica são sensíveis ao calor. Estas proteínas causam efeitos indesejados como inativação do fator de tradução de mRNA, disfunção das células neurais e afetam as células do intestino causando diarreia. As endotoxinas, que são os lipopolissacarídeos (LPS) originários da parede externa das bactérias Gram-negativas, são

compostas principalmente de fosfolipídeos, polissacarídeos e proteínas. Quando as bactérias sofrem autólise, as endotoxinas são liberadas das células (WALSH & HEADON, 1974).

Uma vez que as endotoxinas produzem alterações fisiológicas quando administradas parenteralmente, a sua eliminação e detecção são as principais preocupações na manufatura de produtos de administração parenteral para que se possa assegurar a apirogenicidade dos produtos e dos equipamentos (WALSH & HEADON, 1974).

Sabe-se que as endotoxinas causam febre e, em alguns casos, podem levar à morte do paciente. Endotoxinas são pirogênios exógenos que, injetadas em um corpo hospedeiro, são fagocitadas por glóbulos brancos (macrófagos) induzem a produção de interleucina-1 por estes. Entre outras ações, a interleucina-1 promove a conversão de fosfolipídeos da membrana plasmática em prostaglandinas, que são chamadas de pirogênios endógenos. Estes pirogênios agem sobre neurônios termorreguladores do hipotálamo causando a reação febril (Guyton e Hall, 1994).

A ruptura de bactérias Gram-negativas resulta na liberação de moléculas de endotoxinas, que durante um processo de separação e purificação podem causar a contaminação do produto. Dessa forma, produtos destinados à aplicação parenteral, assim como fluidos para injeção, devem ser livres de contaminação por endotoxinas (PEARSON, 1985).

Foram avaliados os níveis de pirogênios suportáveis ao organismo, os quais têm sido um ponto crucial para produção farmacêutica. O valor desses níveis nas soluções a ser administradas são, para injeção intravenosa, de 5 Unidades de Endotoxinas EU/Kg/h para drogas intravenosas e 0,2 EU/Kg/h para drogas que entram em contato com o sistema

nervoso central.(Pharmacopéia NF-18)

Endotoxinas: estrutura e propriedades

Endotoxinas são os maiores componentes estruturais da parede externa das bactérias Gram-negativas. A molécula de LPS apresenta uma estrutura anfifílica que consiste em uma parte hidrofílica e uma hidrofóbica, que é o lipídio A, do qual provém toda a atividade biológica das endotoxinas (TANAMOTO, 1994).

Os lipopolissacarídeos são compostos por um polissacarídeo principal agregado ao lipídio A, que serve para ancorar a estrutura interna da membrana, e o polissacarídeo O (antígeno O), que se projeta para fora da superfície da membrana. O polissacarídeo central geralmente contém uma variedade de açúcares, as heptoses, além de hexoses como galactoses, glucoses e N-acetilglucosamina. A estrutura lipídica não contém glicerol e os ácidos graxos são unidos por ligações ésteres do N-acetilglucosamina. Os componentes da estrutura do lipídio A são os principais responsáveis pelas propriedades tóxicas das moléculas de lipopolissacarídeos enquanto que os polissacarídeos fazem as moléculas serem solúveis na água. Deve ser ressaltado que nem todas as moléculas de lipopolissacarídeos encontradas em associação com as bactérias Gram-negativas exibem efeitos tóxicos. A figura 2.3 ilustra a estrutura e a localização dos lipopolissacarídeos na parede de uma bactéria Gram-negativa.

endotoxinas de massa molecular entre 10 a 20 kDa e até agregados de 0,1 µm de diâmetro (Hannecart-Pokorni et al., 1973).

Assim, o fraco caráter iônico, heterogeneidade, estabilidade térmica, relativa insensibilidade à modificações no pH e a heterogeneidade massa molecular das endotoxinas (devido sua propriedade de agregação), fazem da sua remoção de soluções protéicas um problema em processos biotecnológicos bem como na produção comercial de fármacos.

2.4. Métodos utilizados para despirogenação

Para que os produtos destinados à aplicação parenteral estejam livres de endotoxinas, algumas precauções devem ser tomadas durante a produção destes produtos. Quando as soluções são contaminadas, a concentração de endotoxinas deve ser reduzida à níveis que não causem sintomas indesejáveis aos organismos administrados.

A despirogenação pode ser realizada de duas formas, por inativação ou por remoção de endotoxinas, como indicado na figura 2.4.

Para a despirogenação por inativação de endotoxinas são utilizados alguns processos como a hidrólise ácido-base, a oxidação, tratamento por calor seco ou úmido, radiação ionizante e através da formação de um complexo com polimixina B. Esses processos são geralmente utilizados para depirogenizar equipamentos ou soluções que podem ser submetidas a condições extremas (PEARSON, 1985, WAKITA et al., 1996; ANSPACH & HILBERT 1995; NAKATA, 1994, BAMBA et al., 1996).

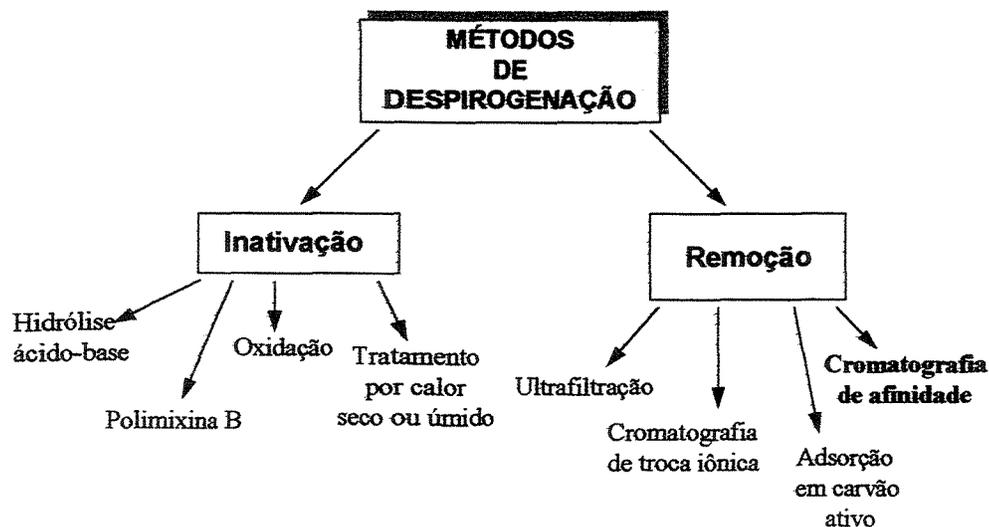


Figura 2.4 : Esquema dos métodos de despirogenação.

Vários métodos podem ser utilizados para a remoção de endotoxinas, sempre baseados nas características físicas e químicas da molécula, tais como tamanho, massa molecular, hidrofobicidade e carga eletrostática, ou ainda na propriedade das endotoxinas em ligar-se a alguns tipos de moléculas quando estas são imobilizadas em suportes sólidos. Na remoção de endotoxinas de soluções protéicas, um fator importante é manter as características da molécula de interesse (SHARMA, 1986). Existem alguns processos utilizados para remoção de endotoxinas de soluções protéicas, tendo-se como fator importante o nível de remoção de endotoxinas, o custo do processo e a recuperação dos produtos de interesse. Tais processos são: ultrafiltração (SCHINDLER & DINARELLO, 1989; EVANS-STRICKFADEN et al.,1995), adsorção em carvão ativo (SHARMA,1986), cromatografia de troca iônica (NEIDHARDT et al.,1992; HIRAYAMA et al., 1995; ANSPACH & HILBERT, 1995; WAKITA et al.,1996), cromatografia de afinidade

(HELANDER e VAARA, 1987; TALMADGE & SIEBERT, 1989; MINOBE *et al.* 1988; MATSUMAE *et al.*, 1990; EZZEDINE *et al.*, 1993; ANSPACH & HILBERT, 1995) e filtração em membranas de afinidade (LEGALLAIS *et al.*, 1997, WEI GUO *et al.*, 1997).

Despirogenação por inativação de endotoxinas

A inativação de endotoxinas pode ocorrer pela perda da toxicidade da molécula de lipopolissacarídeo pelo uso de tratamentos químicos ou físicos que rompem algumas regiões das moléculas afetando a capacidade de interagir com outras moléculas ou bloqueiam os sítios requeridos para a atividade pirogênica. Dentre os processos descritos, os mais utilizados são a hidrólise básica e o tratamento com calor seco, pois apresentam facilidade de manipulação sem apresentar riscos de não ocorrer uma descontaminação eficiente, devido as condições drásticas em que são submetidos, das soluções e dos equipamentos.

A hidrólise ácido/básica reduz ou elimina a atividade biológica das moléculas de lipopolissacarídeos por desativação do lipídio A. A hidrólise ácida age na fração do lipídio A, alterando a conformação da molécula e mascarando os sítios funcionais, ou clivando ácidos graxos, afetando a solubilidade e pirogenicidade da molécula. A hidrólise básica não atua na fração do lipídio A, mas nos ácidos graxos resultando em sua saponificação (PEARSON,1985).

A hidrólise básica é o método mais empregado, sendo que um dos procedimentos utilizados para despirogenação de colunas cromatográficas consiste em manter o material em contato com uma solução de NaOH a 0,5 M, por um período inicial de três horas com

recirculação da solução. Após este período, o material é mantido nesta solução por uma noite com o intuito de decompor os lipopolissacarídeos (WAKITA et al., 1996). Este processo é bastante eficiente, porém o material a ser despirogenado necessita de um tempo de contato elevado com a solução. Outro processo consiste, inicialmente, na lavagem do material com uma solução 0,2 M de NaOH e 20% de etanol e, em seguida, com uma solução 1,5 M de NaOH, sendo o volume utilizado de cada solução igual a 25 vezes o volume da coluna (ANSPACH & HILBERT, 1995). Estes procedimentos são geralmente empregados para despirogenação de colunas cromatográficas ou outros equipamentos onde é possível a passagem de um fluxo contendo as soluções básicas.

A inativação de endotoxinas por oxidação data do início do século, no entanto. Supõe-se que durante a oxidação ocorra uma peroxidação dos ácidos graxos presentes no lipídio A. A despirogenação oxidativa usando peróxido de hidrogênio oferece muitas vantagens sobre os outros métodos. O peróxido não apresenta riscos em sua manipulação, pode ser facilmente eliminado da solução e parece inativar as endotoxinas em condições não muito extremas (baixas concentrações e temperaturas). Sua principal desvantagem é que sua presença pode alterar o produto de interesse ou a solução (PEARSON, 1995).

A aplicação do calor seco tem sido o método preferido para despirogenação de materiais que resistem ao calor, como: vidrarias, equipamentos, instrumentos metálicos e materiais estáveis ao calor. O método consiste na exposição do material a, no mínimo, 250°C por 30 minutos ou 200°C por 1 hora ou 180°C por 2 horas (NAKATA, 1994).

Para a inativação através de calor úmido, BAMBA et al. (1995) investigaram os efeitos de um tratamento por inativação de LPS de várias espécies de bactérias, com ou sem

a presença de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}). A inativação das moléculas de endotoxinas por este tratamento foi dependente do estado de agregação de LPS em soluções contendo cátions inorgânicos. Estes cátions podem formar ligações iônicas entre as moléculas de endotoxinas, estabilizando a parede externa das membranas das bactérias, estabilização esta que parece depender também do tipo e quantidade do cátion utilizado. Em concentrações abaixo de 10 ng/mL, LPS foram inativados abaixo dos níveis detectáveis pelos métodos de dosagem comumente utilizados. A inativação através do tratamento com calor úmido em condições normais não é efetiva, entretanto, quando LPS se encontra em concentrações de até 10 ng/mL, adicionando cátions e operando-se em temperaturas específicas, ela pode ser eficiente.

Outro método descrito para a despirogenação por inativação consiste na utilização de uma radiação ionizante com ^{60}Co que é utilizado para reduzir a toxicidade de endotoxinas. Neste tipo de inativação foram detectadas variações físicas e biológicas dos LPS, uma perda gradual dos componentes de ligação dos lipopolissacarídeos e uma destruição do lipídio A. Entretanto, efeitos indesejáveis ocorreram quando a radiação ionizante foi utilizada para depirogenizar soluções protéicas, tendo sido observado um aumento na quantidade de compostos químicos desconhecidos nas drogas e soluções parenterais (PEARSON, 1985).

Muitos estudos têm mostrado que o antibiótico catiônico polimixina B (PMB) pode anular a atividade biológica dos lipopolissacarídeos. A inativação ocorre através da ligação entre o PMB e a região do lipídio A do LPS. PMB pode reduzir grandes quantidades de endotoxinas (10µg/mL) de várias soluções (PEARSON, 1985). No entanto, a molécula de

PMB é tóxica tornando inapropriada sua utilização em soluções destinadas a aplicações intravenosas.

Despirogenação por remoção de endotoxinas

Vários processos podem ser empregados para a despirogenação de soluções aquosas ou protéicas e sua utilização depende da molécula de interesse presente na solução a ser depirogenada e de fatores particulares de cada solução. Tais processos são: ultrafiltração, adsorção em carvão ativo, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade e filtração em membranas de afinidade.

A adsorção de pirogênios em carvão ativo é um procedimento de remoção de endotoxinas que precede os sistemas de ultrafiltração. É um processo baseado na adsorção física de endotoxinas e sua eficiência depende da concentração de pirogênios na solução. O carvão ativado possui uma grande afinidade por moléculas de alta massa molecular e substâncias não ionizadas, mas em determinadas situações, a sua utilização pode ser limitada devido a ocorrência de uma grande perda da molécula de interesse devido a adsorção não específica. Esta técnica é efetiva na eliminação de pirogênios, mas tem suas limitações não somente devido ao alto risco do produto desejado ser adsorvido no suporte, mas também devido a dificuldade de remover o carvão ativado da solução (SHARMA, 1986).

A ultrafiltração é um método que requer grandes diferenças de tamanho físico entre o produto e o contaminante, sendo um procedimento bastante eficaz na remoção de pirogênios de soluções contaminadas onde o produto de interesse possua um baixa massa

molecular (SCHINDLER & DINARELLO, 1989). Assim, a molécula de interesse é recuperada no filtrado livre de endotoxinas. Todavia, este procedimento torna-se ineficiente no caso das endotoxinas se ligarem fortemente a proteína de interesse ou se o produto for uma molécula de alta massa molecular, como por exemplo, hormônios, anticorpos ou enzimas. Para selecionar o tamanho de poro desejável é importante saber a composição da solução a ser purificada e a agregação das moléculas de endotoxinas com as moléculas de interesse.

Para processos de produção de água com alto grau de pureza, são desejados sistemas de ultrafiltração que possam remover simultaneamente pequenas partículas virais e endotoxinas da água. Membranas de ultrafiltração de poliacrilonitrila e polisulfona com tamanho nominal de corte de 6.000 Da foram utilizadas por EVANS-STRICKFADEN et al. (1995) para remoção de endotoxinas de águas para injeção e soluções parenterais. Nessas membranas foi passada uma solução com uma alta concentração de endotoxinas (concentração entre $4,39 \times 10^3$ a $4,97 \times 10^3$ EU/mL), tendo sido observado uma eficiente remoção, uma vez que o nível de endotoxina na solução, após realizada a filtração, foi abaixo dos níveis capazes de serem detectados pelo método utilizado pelos autores (abaixo de 0,0031 EU/mL).

Técnicas tradicionais de adsorção tais como cromatografia de troca iônica e cromatografia hidrofóbica exibem baixa seletividade, levando muitas vezes a altas perdas de produtos devido a adsorção não específica. NEIDHARDT et al. (1992) utilizou um sistema que envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas para despirogenação de anticorpos monoclonais do tipo IgG₁ (mAbs) para aplicações intravenosas. A etapa inicial do processo

consistiu na purificação dos anticorpos monoclonais a partir de sobrenadante de cultura celular empregando, para tanto, uma resina cromatográfica (BakerBond ABx) com alta capacidade, seletividade e especificidade por mAbs. A etapa final do processo consistiu na despirogenação, concentração e formulação de mAbs em tampão fisiológico. Para a despirogenação, foi utilizado a resina de troca iônica QAE-Sepharose, que apresenta alta capacidade de ligação com anticorpos e endotoxinas. Apesar da despirogenação ter se mostrado efetiva utilizando esse método, os autores tiveram uma perda de 20% de anticorpos da solução inicial.

Esferas de poli γ -metil L-glutamato aminadas foram utilizadas por HIRAYAMA et al. (1995) para remoção de endotoxinas de soluções protéicas. A adsorção das endotoxinas, neste tipo de grupamento, dependeu fortemente da presença do grupamento amino (interações eletrostáticas) e, em menor grau, das interações hidrofóbicas, do pH e da força iônica utilizada. Este processo apresentou uma efetiva remoção de endotoxinas. No entanto, para soluções contendo substâncias ácidas de alta massa molecular, tais como albumina do soro bovino (BSA), pepsina, DNA e RNA, que são aniônicas acima de pH 7,0, foi observado uma alta adsorção destas moléculas neste suporte. Para reduzir a adsorção das moléculas de interesse foi necessário a redução do pH, reduzindo também a capacidade do suporte em adsorver as moléculas de endotoxinas.

A efetividade de resinas de troca iônica Sepharose-poli-L-lisina e DEAE-Sepharose na remoção de endotoxinas foi investigada por ANSPACH & HILBERT (1995). Foram testadas soluções de BSA e lisozima contaminadas com endotoxinas. Para proteínas carregadas positivamente, DEAE-Sepharose pareceu ser efetiva, porém para proteínas com

cargas negativas resultou em baixas recuperações. A resina de Sepharose-poli-L-lisina apresentou uma descontaminação de soluções de BSA, mas quando essas soluções apresentavam inicialmente baixos níveis de endotoxinas. Para soluções com altas concentrações de endotoxinas, estas resinas de troca iônica não foram eficientes para uma completa despirogenação, necessitando de uma etapa preliminar para reduzir a concentração de LPS das soluções, aumentando o custo do processo.

Membranas lipídicas catiônicas com grupamentos amino foram utilizadas para a adsorver lipopolissacarídeos de soluções de albumina de soro bovino (BSA) (WAKITA et al., 1996). As membranas lipídicas catiônicas adsorveram seletivamente LPS de soluções de BSA. A quantidade de LPS removido de soluções de BSA contendo 100-148 ng/mL de endotoxinas foi significativa, sendo detectado, após a filtração da solução, uma concentração de LPS abaixo de 0,1 ng/mL. As interações entre as membranas e BSA foram fracas permitindo uma adsorção seletiva de LPS.

Se condições experimentais para cromatografia de troca iônica, tais como o pH e a força iônica não puderem ser ajustadas para remover pirogênios sem implicar em grandes perdas do produto desejado, a cromatografia de afinidade pode ser empregada para esse fim.

Adsorventes cromatográficos de afinidade utilizando protamina (HELANDER e VAARA, 1987), polimixina B (TALMADGE & SIEBERT, 1989; ANSPACH & HILBERT, 1995) e histidina (MINOBE et al. 1988; MATSUMAE et al., 1990; EZZEDINE et al., 1993; ANSPACH & HILBERT, 1995; LEGALLAIS et al., 1997, WEI GUO et al., 1997) como ligantes apresentaram alta afinidade por pirogênios de várias bactérias Gram-negativas. Estes adsorventes removem endotoxinas de soluções protéicas sem provocar a desnaturação ou

perda significativa de produtos. Entretanto, devido ao fato da protamina ser uma proteína, alguns inconvenientes são apresentados, tais como a possibilidade de perda da atividade biológica com o tempo e contaminação bacteriana. Polimixina B também não é um ligante apropriado para o caso da depirogenização de soluções destinadas a uma injeção intravenosa devido a neuro- e nefro-toxicidade desta molécula se liberada para a solução.

Assim, suportes cromatográficos tradicionais contendo histidina imobilizada apresentam-se como os mais atrativos para a depirogenização de soluções protéicas devido a sua seletividade, baixo custo e segurança. A histidina como ligante de afinidade apresenta todas essas vantagens, sendo as características deste aminoácido apresentadas a seguir.

Aminoácido histidina como ligante pseudobioespecífico

As técnicas de afinidade são baseadas na interação específica de um ligante imobilizado em um suporte sólido com a molécula a ser purificada. VIJAYALAKSHMI (1989) classifica os ligantes de afinidade como bio- ou pseudobioespecíficos, e essa classificação é mostrada na figura 2.5.

Os ligantes pseudobioespecíficos utilizados em cromatografia de afinidade para a separação e purificação de proteínas constituem provavelmente os sistemas de afinidade pseudo-biológicos mais utilizados atualmente. Esses ligantes são moléculas pequenas, tais como: corantes, quelatos metálicos, ligantes hidrofóbicos, aminoácidos, os quais possuem uma especificidade de grupo pelas biomacromoléculas.

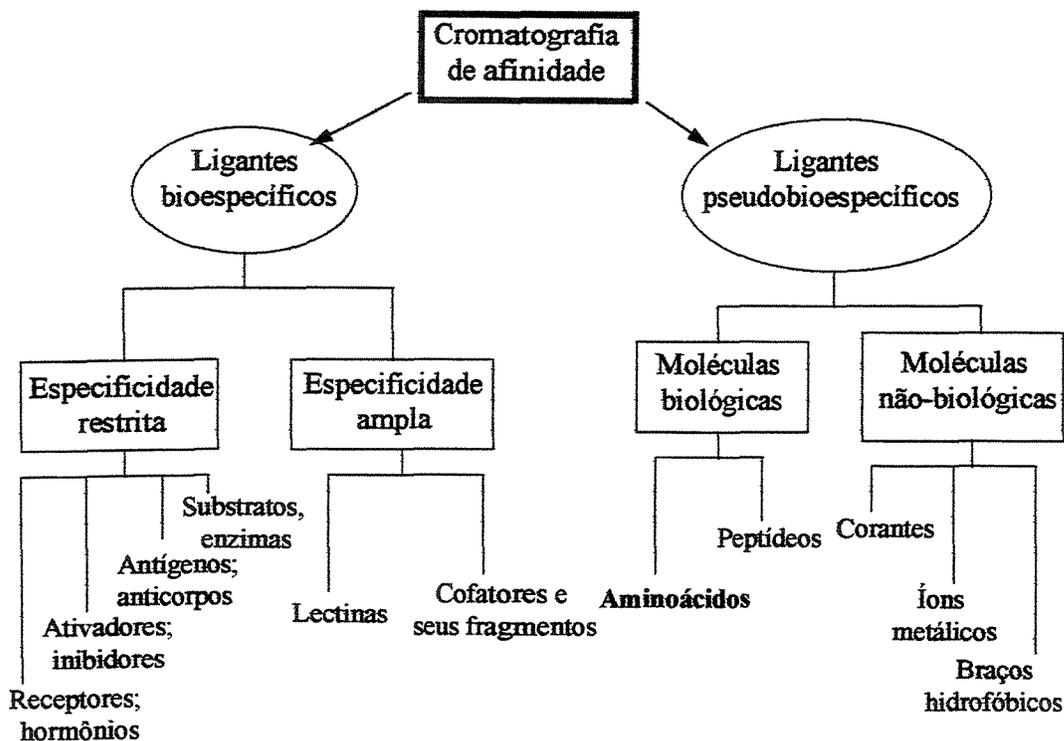


Figura 2.5: Esquema dos ligantes utilizados em cromatografia de afinidade (adaptado de VIJAYALAKSHMI, 1989).

Os ligantes pseudobioespecíficos apresentam certas vantagens em relação aos ligantes bioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989). Os ligantes de afinidade bioespecífica (antígeno-anticorpo, enzima-cofator, enzima-inibidor, hormônio-receptor, lectina-glicoproteína, etc.) são, geralmente, macromoléculas que apresentam uma estrutura tridimensional e são frágeis. Sua imobilização em suportes sólidos para aplicação em cromatografia de afinidade ou outras técnicas de separação pode resultar em uma perda da atividade. E ainda, a afinidade nos sistemas bioespecíficos é, muitas vezes, muito elevada e a recuperação da molécula a ser purificada é possível somente em condições drásticas. Isto pode causar uma perda da atividade biológica ou a desnaturação da biomolécula de

interesse. Os ligantes pseudobiospecíficos, por outro lado, são moléculas simples e de baixo custo que podem ser imobilizadas de modo estável através de grupos e reações químicas bem definidas. Sua desvantagem, as vezes, é a sua baixa especificidade. No entanto, conhece-se muitos exemplos onde moléculas são purificadas utilizando esses ligantes com notável especificidade. Contrariamente a afinidade biospecífica, que é normalmente de natureza funcional, a afinidade pseudobiospecífica pode ser considerada como uma afinidade estrutural (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Desde o início dos anos 80, o aminoácido histidina tem sido utilizado como ligante em cromatografia para a purificação de proteínas (VIJAYALAKSHMI, 1989) e remoção de endotoxinas de soluções destinadas a uma aplicação médica (MINOBE et al, 1982, MINOBE et al., 1988; MATSUMAE et al., 1990; EZZEDINE et al., 1993; ANSPACH & HILBERT, 1995, LEGALLAIS et al., 1997, WEI GUO et al, 1997).

Proteínas e endotoxinas são adsorvidas em histidina imobilizada em suportes sólidos a baixos valores de força iônica. A afinidade destas moléculas por este ligante não se deve a uma função biológica. A adsorção pode ser devido a propriedades da biomolécula como cavidades hidrofóbicas ou a presença de uma distribuição particular de cargas. Os grupamentos $-COOH$, $-NH_2$ e o grupamento lateral, o anel imidazol de histidina, contribuem nas interações hidrofóbicas ou de cargas induzidas com a biomolécula. A dessorção provocada por sais sugere que as interações eletrostáticas predominam. Porém, interações hidrofóbicas são sustentadas pelo fato que endotoxinas e algumas proteínas são também adsorvidos a uma alta força iônica (Ω maiores que 3Ω) e que a adsorção aumenta com o aumento da temperatura (MATSUMAE et al., 1990; BUENO, 1995).

Histidina como ligante em membranas de afinidade

Com todas essas vantagens apresentadas pelo ligante histidina, o método mais atrativo para a remoção de endotoxinas de soluções destinadas a uma aplicação médica seria a cromatografia de afinidade utilizando esse ligante. Entretanto, existem alguns inconvenientes quando técnicas de afinidade utilizando suportes cromatográficos tradicionais (géis) são utilizadas para processos a grande escala. A compressibilidade dos géis e a difusão nos poros limitam a operação a vazões elevadas. Suportes de sílicio ou polímeros sintéticos apresentando uma grande rigidez mecânica, constituem uma alternativa interessante em relação aos géis, mas vazões elevadas são obtidas unicamente com altas pressões operatórias, necessitando, para isso, de equipamentos onerosos.

Alternativamente, o uso de membranas como matrizes para a imobilização do ligante têm sido proposto devido a possibilidade de se tratar grandes volumes por unidade de tempo (BRANDT et al., 1988). Estes suportes são rígidos, a difusão nos poros é negligenciável (transferência de massa é governada principalmente por convecção) e altas vazões podem ser obtidas com pressões moderadas (BRANDT et al., 1988, Thommes e Kula, 1995).

Assim, alguns autores, tais como LEGALLAIS et al., 1997, WEI GUO et al., 1997 propuseram o uso de membranas como matriz para a imobilização de histidina para a remoção de endotoxinas de soluções protéicas quando os volumes a serem tratados são significativamente grandes.

Vantagens das membranas de afinidade sobre os géis de afinidade

Antes de expor as vantagens de um método sobre o outro acima citados é interessante conhecer o princípio da filtração em membranas de afinidade. O método de filtração em membranas de afinidade combina duas operações: a filtração com a adsorção. O princípio da separação consiste na adsorção da biomolécula de interesse no ligante, sendo este último imobilizado diretamente na superfície e no interior dos poros da membrana. Assim, a solução contendo a biomolécula a separar é forçada a passar através da membrana. As moléculas grandes, que não atravessam os poros, são eliminadas na linha de retentado, enquanto que as moléculas pequenas, inclusive a de interesse, atravessam os poros onde o ligante está imobilizado. A adsorção da biomolécula representa a primeira etapa da separação, na qual todas as moléculas não adsorvidas são eliminadas na linha do filtrado. A eluição representa a segunda etapa, onde a biomolécula é desorvida do suporte sólido, podendo ser recuperada, se ela for o produto de interesse, ou descartada, se ela for um contaminante. O esquema do princípio do método de filtração em membranas é apresentado na figura 2.6.

Quando o fluido passa através dos poros da membrana, o transporte das moléculas da superfície ao interior dos poros é regido pela convecção e não pela difusão, ao contrário dos géis. Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante UNARSKA et al. (1990) mostraram que quando uma solução de γ -globulina passa através de uma membrana porosa contendo proteína A imobilizada, a velocidade de adsorção é de 200 a 300 vezes maior que aquela obtida com o gel contendo o mesmo ligante, devido ao transporte convectivo.

FILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE AFINIDADE

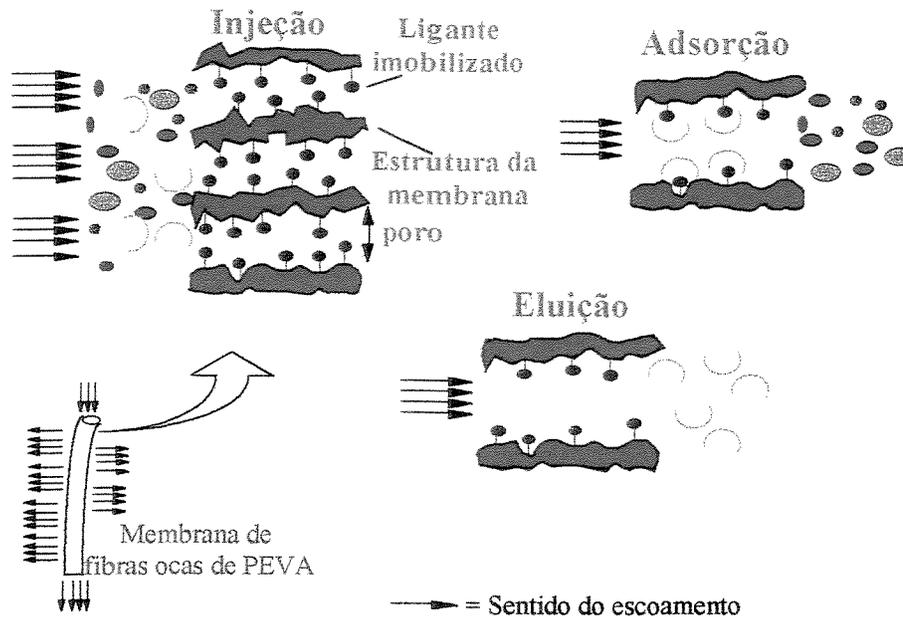


Figura 2.6. : Esquema do princípio do método de filtração em membranas de afinidade.

Assim, a vantagem no caso das membranas é que a vazão máxima aplicada pode ser muito maior que para um gel de afinidade, apesar de existirem atualmente géis que permitem uma velocidade de convecção similar a dos géis. Uma descrição matemática para esta observação experimental foi dada por BRANDT et al. (1988). Estes autores compararam o tempo que a molécula leva para difundir até o sítio de fixação do ligante (t_D), com o tempo de residência da biomolécula na membrana, (t_R), em termos do número de Peclet:

$$Pe = t_D/t_R \quad (1)$$

O número de Peclet foi adaptado em termos de parâmetros de fluxo e em termos estruturais do suporte (BRANDT et al., 1988), como:

$$Pe = (L^2/D)/(V_o/Q_F) \quad (2)$$

onde L é a distância do caminho difusional no material, D é o coeficiente de difusão da biomolécula de interesse, V_o é o volume intersticial e Q_F é a vazão da solução (na linha do filtrado para a filtração em modo tangencial).

Para que a transferência de massa do sistema seja eficiente, t_D deve ser muito menor que t_R, isto é Pe menor que 1. Além disso, Pe não pode exceder um valor crítico porque o t_R deve ser maior que o tempo de reação entre o ligante e a biomolécula a separar (limitações cinéticas de cada sistema) (KLEIN, 1991).

Em um leito de géis ou partículas, cerca de 60% do volume é ocupado pelas partículas e 40% constitui o espaço intersticial. No caso das membranas, geralmente 70% do volume total é acessível ao fluido e 30% é ocupado pelo polímero da membrana. Para os processos baseados na adsorção por afinidade, a concentração de ligante e a capacidade do suporte são, em geral, dados em termos de massa ou mol por volume do leito. Se o volume total de suporte, a densidade de ligante por volume de suporte e o número de Peclet crítico são idênticos para as membranas e para o géis, a capacidade de adsorver a biomolécula deve ser a mesma para os dois sistemas. A vantagem das membranas neste caso é que, para uma mesma capacidade desejada, a vazão máxima aplicada pode ser 1000 vezes maior que para um gel de afinidade, ou seja:

$$Q_{Fmax} = Pe_{critico} D V_o / L^2 \quad (3)$$

Tal vazão é possível graças a conformação e ao caminho difusional da membrana. Para membranas, o caminho difusional (L) é baseado na metade diâmetro do poro sendo da ordem de 0,05 a 1,5 μm, enquanto que para os géis, L é baseado na metade do raio da

partícula porosa, sendo da ordem de 25 a 300 μm (KLEIN, 1991).

Aplicações de membrana de afinidade na remoção de endotoxinas de soluções protéicas

Utilizando membranas macroporosas de celulose com histidina imobilizada, WEI GUO et al. (1997) observaram uma redução da quantidade de endotoxinas da solução de 1000 EU/mL para níveis abaixo de 0,12 EU/mL. O método proposto pelos autores consiste na passagem da solução contaminada com endotoxinas através de membranas colocadas em um cartucho, sendo este método eficiente para remoção de endotoxinas de soluções aquosas e protéicas com baixas concentrações de solutos.

LEGALLAIS et al. (1997) propuseram estratégias para despirogenação de soluções de IgG humana e do anticorpo monoclonal anti-CD4 (MabCD4) em membranas de fibras ocas de poli etileno álcool vinílico com histidina imobilizada (His-PEVA) com base nas diferenças de adsorção entre anticorpos e endotoxinas. Para o caso do MabCD4 não foi adsorvido em histidina imobilizada, não sendo detectado nenhuma perda de anticorpos, podendo desta forma, remover endotoxinas desta solução com alta eficiência. Uma vez que IgG humana é adsorvida em histidina imobilizada (BUENO et al., 1995a; BUENO et al., 1995b; HAUPT et al., 1995; BUENO et al., 1996), condições de operação foram investigadas para evitar a adsorção desta molécula e favorecer a adsorção de endotoxinas. Com um módulo de 1 m^2 de superfície contendo as membranas His-PEVA nas condições ideais de operação, foi estimado que possa ser realizado uma despirogenação de 3 L de IgG

humana com uma concentração de 1mg/mL em uma solução contendo 80 EU/mL.

Muitos processos de remoção de endotoxinas em soluções protéicas tem sido realizados, porém, dados de literatura específicos para o processo de despirogenação de soros antiofídicos são inexistentes.

2.5. Métodos utilizados para remoção de endotoxinas

Os métodos de remoção de pirogênicos, tanto de soluções aquosas como de protéicas, necessitam de uma quantificação de endotoxinas para provar sua efetividade. O primeiro método aprovado pela FDA (U.S. Food and Drugs Administration) foi um método *in vivo* de medida da temperatura corpórea de coelhos em resposta a soluções injetadas contendo endotoxinas. Atualmente, outro método aprovado pela FDA é o teste *in vitro* que vem sendo muito utilizado devido a sua facilidade de manipulação. Este método é chamado de LAL (lisado de amebócito de *Limulus*). Assim, os métodos para a detecção de endotoxinas existentes são: o teste em coelhos e o LAL (cromogênico e de geleificação).

Teste de Detecção de endotoxinas em coelhos

Endotoxinas em concentrações menores que 1 ng/ml produzem febre em seres humanos e animais mamíferos logo após a injeção intravenosa. Para induzir uma resposta pirogênica em seres humanos e coelhos, é requerida aproximadamente a mesma quantidade de endotoxinas por peso. Entretanto quando a dose é aumentada, seres humanos respondem

mais intensamente que os coelhos. A quantidade de endotoxinas admissível por peso , não causadora de resposta pirogênica, em seres humanos, é correlacionada com a razão quantidade/peso admissível para os coelhos e acrescido de um fator, para aumentar a margem de segurança, através destes cálculos pode-se obter correlações confiável.

De uma forma simples, o teste de pirogênios em coelhos envolve a medida da sua temperatura retal após injeção intravenosa de uma solução a ser testada (PEARSON,1985). O resultado do teste é considerado positivo se um dos três coelhos inoculados apresentarem uma aumento de temperatura de, no mínimo, 0,6 °C ou se a soma do aumento máximo de temperatura dos três coelhos exceder 1,4 °C. No caso dos coelhos apresentarem febre, outros testes serão realizados para confirmar se a solução é realmente pirogênica.

Este método é qualitativo e necessita de uma manutenção especial dos coelhos para que estejam sempre saudáveis para a realização dos testes. Algumas soluções (contendo antibióticos ou vacinas) que são testadas podem afetar a resposta, aumentando ou diminuindo a febre nos coelhos.

*Teste do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL): método do ponto de coagulação*

Bactérias Gram-negativa causam coagulação do sangue do caranguejo *Limulus polyphemus*. Esta reação de coagulação é enzimática e as enzimas estão localizadas em grânulos dentro dos amebócitos. Os autores TANAKA & IWANAGA (1993) mostraram que a coagulação é iniciada pela presença de endotoxinas.

O teste do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus*, quando usado de acordo

com FDA (U.S. Food and Drug Administration), pode substituir o USP (U.S. Pharmacopeia), teste de endotoxinas em coelhos para testar drogas injetáveis em seres humanos e animais, incluindo produtos biológicos. O teste é recomendado para a quantificação de endotoxinas em matérias primas e monitoramento de níveis de endotoxinas em processos (ADNER et al.,1991).

O método LAL é baseado na reação de geleificação devido a uma reação enzimática que requer a presença de endotoxinas, enzima pró-coagulante e cátions divalentes que estão presentes nos amebócitos do *Limulus polyphemus*. Como mostrado na figura 2.7 , a enzima ativada catalisa a quebra de uma proteína coagulável em sub-unidades polipeptídicas, resultando na polimerização e formando um coágulo.

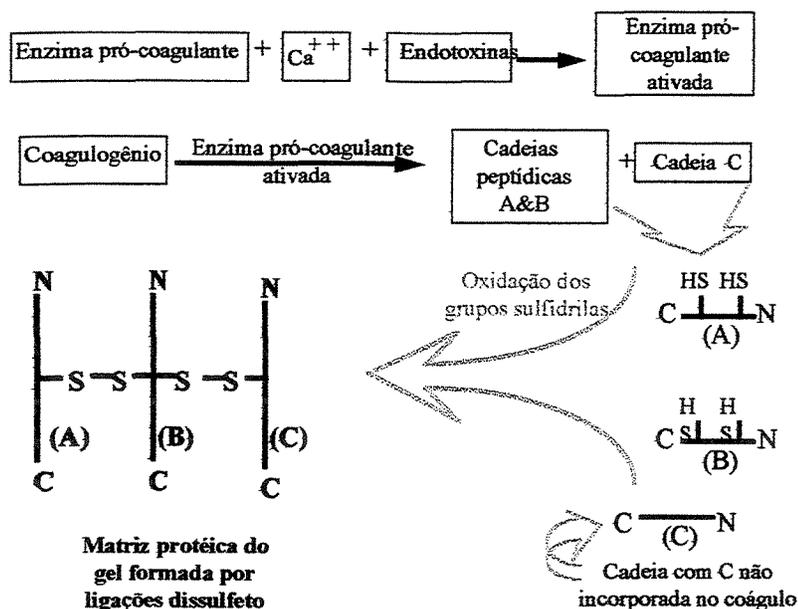


Figura 2.7: Esquema da ativação da enzima que quebra o coagulogênio em sub-unidades polipeptídicas, formando uma matriz proteica do gel com ligações dissulfeto.

O teste de lisado de amebócito de geleificação é um método semi-quantitativo sendo que várias etapas constituem a análise por gel. Uma amostra contendo apenas endotoxinas em concentração conhecida é reconstituída com água estéril e apirogênica. O lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* é também reconstituído com água apirogênica. A partir da solução contendo endotoxina reconstituída com concentração conhecida são feitas diluições em tubos de ensaio estéreis e apirogênicos. Estas diluições são feitas entre concentrações de endotoxinas capazes de confirmar a sensibilidade do teste e verificar a sua validade. Em cada tubo é adicionado 0,1 ml de LAL reconstituído e 0,1 ml das soluções de endotoxinas, e é mantido por 1 h a uma temperatura de $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os tubos são analisados individualmente no método de formação de gel como positivo ou negativo. O teste positivo tem a formação de um gel firme capaz de não se desprender do fundo do tubo quando este for invertido em 180° . O teste negativo é caracterizado pela ausência de gel ou pela formação de uma massa viscosa que não se adere ao fundo do tubo quando este é invertido. O tubo só pode ser observado uma vez, sendo descartado logo após (manual de instruções para realização do teste LAL de geleificação, fornecido pela FUNED).

Para determinar a concentração de endotoxinas em uma amostra, são feitas duplicatas de diluições até que o ponto final de geleificação seja encontrado. O ponto final ocorre quando na concentração determinada o gel se adere ao fundo do tubo apresentando um resultado positivo e o tubo seguinte um resultado negativo. O nível de endotoxinas é calculado através da sensibilidade calculada do lisado dividido pelo valor antilogarítmico da média dos pontos obtidos pelas diluições.

As amostras a serem testadas devem ser coletadas e preparadas usando água e materiais apirogênicos. O pH influencia na reação e deve estar entre 6,0 e 7,5. Em algumas substâncias interferentes devem haver diluições para que a mesma seja eliminada. Esse método é semi-quantitativo, não apresentando desta forma uma determinação precisa da quantidade de endotoxinas. A formação do gel é muito sensível, podendo haver um colapso do gel com a trepidação do equipamento utilizado para manter a temperatura ou a própria manipulação, inutilizando a análise.

Teste cromogênico quantitativo do lisado de amebócito de *Limulus*

Este método também utiliza um lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* (LAL) e um substrato cromogênico para determinação da quantidade de endotoxinas de bactérias Gram-negativas em solução, portanto é um teste quantitativo. As endotoxinas das bactérias Gram-negativas promovem a ativação de uma pró-enzima contida no lisado de amebócito de *L. polyphemus*. A velocidade inicial de ativação depende da quantidade de endotoxinas presentes. A enzima ativada cataliza o rompimento das ligações da p-nitroalanina (pNA) de um substrato incolor Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA. O pNA liberado, que produz a cor amarelada, é medido em um comprimento de onda de 405-410 nm após a reação ser finalizada com um reagente de parada. A correlação entre a concentração de endotoxinas na solução e a absorbância é linear, quando a concentração de endotoxinas está entre 0,1 e 1,0 EU/mL. A concentração de endotoxinas em uma amostra é determinada pela relação entre as absorbâncias das endotoxinas padrão utilizadas na confecção da curva de calibração

(Manual de instruções do teste LAL cromogênico, fornecido pela BioWhittaker, 1997)

A realização do método consiste em adicionar o LAL em uma solução de endotoxinas incubando-se a mistura a 37°C por 10 minutos. Em seguida, o substrato cromogênico é acrescentado e mantido na mesma temperatura por mais 6 minutos. Após os 6 min, a reação é bloqueada e a medida da absorbância a 405 nm é realizada(DUNÉR, 1995; Manual de instruções do teste LAL cromogênico, fornecido pela BioWhittaker, 1997).

O kit LAL cromogênico contém uma solução com concentração conhecida de endotoxinas. Esta solução é reconstituída e a curva de calibração é construída diluindo-se apropriadamente a solução inicial. A correlação entre absorbância e concentração de endotoxinas é linear na faixa entre 0,1 e 1,0 EU/ml. A concentração de endotoxinas de uma amostra desconhecida é calculada pela obtenção dos valores de absorbância de soluções padrão de amostras conhecidas. (Manual de instruções do teste LAL cromogênico, fornecido pela BioWhittaker, 1997)

Este método é quantitativo e apresenta uma alta sensibilidade, sendo válido para testar produtos finais como: drogas de aplicação parenteral, produtos biológicos, que poderão ser utilizados em seres humanos e animais.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados materiais, equipamentos e procedimentos utilizados para realização deste trabalho.

3.1. Materiais

Albumina de soro bovino (BSA), γ - globulina humana (IgG humana), anti-soro total e anti-IgG de cavalo, L-histidina, 1,4 butanodiol diglicidil éter, borohidrato de sódio, glicerol, ácido morfolinoetanosulfônico (Mes), ácido morfolinopropanosulfônico (Mops), ácido hidroetilpiperazinaetanosulfônico (Hepes) foram obtidos da Sigma, EUA. Triidroximetil amino metano (Tris) foi fornecido pela Nuclear , Brasil. Coomassie brilliant blue-G250, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e agarose adquiridos da Bio-Rad, EUA. Soros antibotrópico (11,93 mg/mL) e antibotrópico laquéico (30 mg/mL) apirogênicos foram doados pela Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte, M. G. e soro antibotrópico (11,37 mg/mL) foi adquirido do Instituto Butantan, São Paulo, S.P. Fosfato de sódio bibásico e monobásico, acetato de sódio, ácido acético glacial, carbonato

de sódio anidro foram adquiridos da Ecibra, Brasil. Ácido clorídrico, cloreto de sódio, etanol absoluto, sulfato de cobre pentahidratado, ácido fosfórico obtidos da Merck, EUA, foram utilizados.

Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% (w/v), 2 beta-mercaptoetanol, tira de tampão de SDS (“buffer strip”), gel de eletroforese (gradiente de concentração 4-15%), marcadores de baixa massa molecular, filme plástico de preparação do gel (“gel-bond”) foram distribuídos pela Pharmacia, EUA, e nitrato de prata pela Fisher Scientific Company, EUA.

Na quantificação de endotoxinas foi utilizado o teste LAL, QCL-1000, cromogênico e para contaminação das soluções utilizou-se lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* 05:B55, adquiridos da Biowhitaker, EUA.

Utilizou-se água ultrapura produzida por equipamento Millipore, EUA, para a preparação de todas as soluções. Nos experimentos com endotoxinas, as soluções tampão foram preparadas com água para injeção intravenosa da marca Mesquita e Ariston, Brasil. As diluições das amostras a serem analisadas através do teste LAL cromogênico foram feitas com água apirogênica distribuído pela Biowhitaker, EUA.

Para a realização dos experimentos de remoção de endotoxinas foi utilizado um módulo de filtração construído por nós no Laboratório de Biosseparações, a partir de membranas retiradas de um cartucho comercial da marca Kuraray, JAPÃO. As membranas de PEVA apresentavam diâmetro interno de 200 µm e externo de 240 µm, e tamanho nominal de corte de 600.000 Da.

3.2. Métodos

3.2.1. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas dos soros antitoxigênico e antitoxigênico laquélico foram determinadas pelo método descrito por BRADFORD (1976), que utiliza albumina de soro bovino como proteína de referência. Foi construído uma curva para a determinação do coeficiente de extinção da proteína do soro a 280 nm, tendo como base a concentração total determinada pelo método Bradford.

3.2.2. Construção do módulo de membranas de fibras ocas de PEVA

As fibras ocas de PEVA foram removidas de um cartucho comercial da marca Kuraray, JAPÃO. Foram retiradas 200 fibras ocas de PEVA e suas extremidades fixadas através de uma resina epóxi em um tubo de vidro com duas saídas laterais, como mostrado na figura 3.1. Este módulo foi utilizado para ensaios de remoção de endotoxinas em presença de soros hiperimunes.

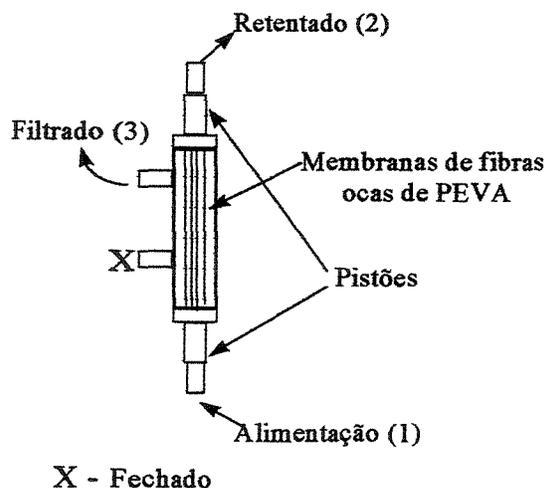


Figura 3.1: Esquema do módulo de fibras ocas de PEVA.

O módulo construído apresenta uma área de membranas de $50,3 \text{ cm}^2$, calculado através da equação (1):

$$\text{Área da membrana} = 2\pi rLn \dots \dots \dots (1)$$

onde:

r = raio interno da membrana

L = comprimento das fibras

n = número de fibras

Cada membrana de fibra oca apresenta diâmetro interno de $200 \mu\text{m}$ e externo de $240 \mu\text{m}$, tamanho nominal de corte de 600.000 Da .

Através de outra relação (equação 2), calculou-se o volume das membranas ($0,11 \text{ cm}^3$):

$$\text{Volume das membranas}=(r_0 - r_i)^2L \dots\dots\dots(2)$$

onde:

r_0 = raio externo;

r_i = raio interno.

Calculou-se somente a área interna das membranas pois o escoamento forçava as soluções a passarem pelos poros da região interna para a região externa. Portanto a área de contato inicial dos anticorpos e das endotoxinas foi a da região interna.

3.2.3. Ativação das membranas de fibras ocas

Para ativação da membrana com 1,4 butanodiol diglicidil éter utilizou-se o procedimento descrito por BUENO et al. (1995). As membranas contidas no módulo foram inicialmente lavadas com água ultrapura e depois com um volume de 50 mL de uma solução 0,6 M de hidróxido de sódio. A lavagem foi realizada em 4 etapas: modo frontal, “intraluminal”, espaço da concha e “backflushing”, como mostrado na figura 3.2.

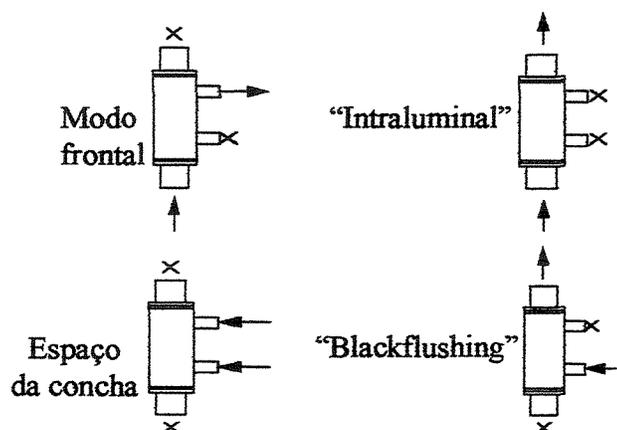


Figura 3.2: Esquema de fluxo de lavagem através das membranas de fibras ocas de PEVA.

Finalizada as etapas de ativação, uma solução contendo 20 mL de 1,4 butanodiol diglicidil éter, 20 mL de NaOH 0,6 M com uma concentração de 2 mg/mL de borohidrato de sódio foi bombeada através do módulo como mostra a figura 3.3. O experimento foi realizado em capela e com o tempo de duração de 8 horas. A solução foi mantida em agitação durante todo o experimento.

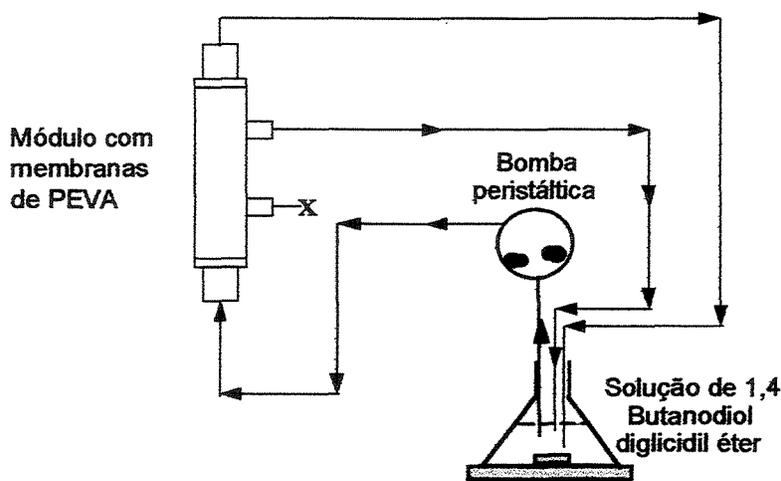


Figura 3.3: Esquema da montagem experimental para a ativação da membrana com 1,4 butanodiol diglicidil éter.

Ao término do tempo de reação, as membranas foram lavadas com água ultrapura para eliminar todo 1,4 butanodiol diglicidil éter não reagido. A lavagem foi realizada como mostrado na figura 3.2.

3.2.4. Imobilização de histidina

Realizou-se a imobilização do aminoácido histidina como descrito em BUENO et al. (1995a). Duas soluções contendo Na_2CO_3 a uma concentração de 1M foram preparadas em um volume de 30 mL cada. Em uma das soluções foi acrescentada L-histidina a 20% (p/v) e NaOH até atingir o pH 11,0. A lavagem foi feita, em todos os sentidos do módulo, com a solução de Na_2CO_3 através do módulo para retirar toda a água. Após esta lavagem, a solução contendo L-histidina foi passada no módulo em modo frontal. A montagem experimental foi realizada como mostrado na figura 3.3. A solução contendo L-histidina foi mantida em agitação durante todo o experimento de imobilização e teve a duração de 40 horas a temperatura ambiente. As membranas assim obtidas foram denominadas His-PEVA.

3.2.5. Verificação da imobilização de histidina por sulfato de cobre

O objetivo deste experimento foi verificar qualitativamente se a histidina foi imobilizada na membrana através da formação de ligações de coordenação com o cobre. Em modo frontal, a solução de sulfato de cobre 0,05 M foi passada pelo módulo, que se tornou

levemente azul (semelhante a coloração da solução de sulfato de cobre). Em seguida, passou-se água pelas membranas para eliminar o cobre que não formou ligações de coordenação com a histidina imobilizada. Verificou-se que a coloração persistiu nas membranas mesmo após a lavagem das mesmas mostrando, assim, que a histidina estava imobilizada nas fibras. Injetou-se em seguida, uma solução com EDTA no módulo para retirar o cobre que formou ligações de coordenação com a histidina, regenerando, assim, as membranas. As membranas foram lavadas com água ultrapura para eliminar todo EDTA e cobre restantes. A montagem experimental foi feita como mostrado na figura 3.3.

3.2.6. Adsorção do soro hiperimune em membranas His-PEVA

Para verificar se os soros antibotrópico laquétrico e antibotrópico adsorveriam nas membranas His-PEVA foram realizadas cromatografias utilizando o módulo ativado anteriormente.

O procedimento foi realizado como descrito por BUENO et al. (1996). Inicialmente foram preparadas soluções tampão Mops a 25 mM e pH 6,5. Em uma das soluções acrescentou-se NaCl até que sua concentração salina fosse de 0,2 M. Em outra solução a concentração do mesmo sal foi 1 M. Em todas as soluções, os valores de pH foram mantidos em 6,5. O tampão Mops foi utilizado nas condições acima determinadas, pois foi determinado que para a imunoglobulina G humana esta solução tampão propiciava uma adsorção maior nas membranas His-PEVA que os tampões acetato, fosfato, Mes, Hepes, Tris/HCl (BUENO et al., 1996).

A uma solução tampão Mops 25 mM pH 6,5 foi adicionado soro antibotrópico laquéutico a uma concentração de 6,16 mg/mL. Com o auxílio de uma bomba peristáltica (Digi-staltic Masterflex), a solução contendo o soro em tampão (volume de 4,8 mL), foi passada através do módulo, em modo frontal, como mostra esquema da figura 3.4.

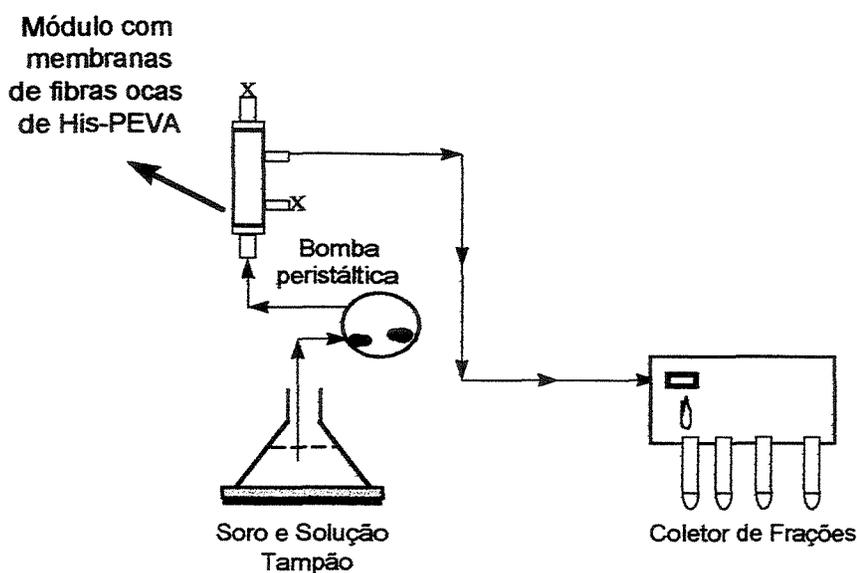


Figura 3.4: Esquema experimental utilizado para verificar a adsorção de IgG de cavalo (porção $F(ab')_2$).

A vazão utilizada foi de 0,5 mL/min e coletou-se frações de 5 mL. Após injetada a solução, lavou-se as membranas conforme descrito anteriormente com o mesmo tampão para eliminar as proteínas não adsorvidas, obtendo desta forma um primeiro pico. A absorbância de todas as frações coletadas foi medida a 280 nm. A absorbância das frações foi monitorada até que estivesse em torno de 0,07 de densidade óptica, ou menor, que foi

considerada como linha de base. Após a lavagem, foi feita uma eluição com Mops 25 mM, pH 6,5 e 0,2 M de NaCl, obtendo num segundo pico as proteínas que adsorveram nas membranas His-PEVA. Com uma solução tampão nas mesmas condições da lavagem, mas com uma concentração de NaCl de 1 M, recuperou-se as proteínas que ficaram mais fortemente adsorvidas num terceiro pico. O experimento foi realizado a temperatura ambiente.

As frações referentes a cada pico foram reunidas, concentradas e analisadas quanto ao teor de proteínas e sua pureza através de uma eletroforese SDS-PAGE. O procedimento foi repetido nas mesmas condições para o soro antibotrópico.

3.2.7. Cromatografia em coluna com membranas His-PEVA finamente cortadas

Uma vez determinado que a porção $F(ab')_2$ de IgG de cavalo adsorve em membranas de His-PEVA, testes com diversas soluções tampão em suas regiões de tamponamento foram realizados.

As fibras ocas de PEVA foram removidas do módulo comercial da marca Kuraray (JAPÃO) após imobilização de histidina como mostrado nas figuras 3.2.3 e 3.2.4 (BUENO,1995). Estas fibras foram finamente cortadas (comprimento de cerca de 1 mm), em seguida, suspensas em água e desgaseificadas. Após a desgaseificação, as fibras foram introduzidas em uma coluna cromatográfica (Bio-Rad MT2, de 7 mm de diâmetro interno e 52 mm de comprimento) de forma a fornecer um volume de leito de 2 mL e uma massa seca de 0,28 g.

Através de uma bomba peristáltica (Digi-staltic Masterflex), a fase móvel foi alimentada na coluna cromatográfica a uma vazão de 0,4 mL/min. A coluna foi equilibrada com a solução tamponante (vários tampões e valores de pH foram testados) e em seguida, soro antibotrópico laquéico diluído 5 vezes no mesmo tampão foi alimentado na coluna cromatográfica. Finalizada a injeção, a coluna foi lavada com o mesmo tampão utilizado para equilibrar as fibras com o intuito de eliminar as proteínas que não foram adsorvidas. As proteínas adsorvidas em histidina imobilizada foram eluídas em todos os experimentos com tampão acetato de sódio a 25 mM, contendo 1 M de NaCl a pH 4,0. A corrente de saída da coluna, durante todo o experimento, esteve conectada a um monitor de medida de absorvância a 280 nm (Econo UV Monitor - Bio-Rad), cujos sinais eram emitidos continuamente ao aquisitor de dados (HP 3852A). Ao receber os dados do aquisitor, um microcomputador (HP 9153C) traçava um cromatograma referente aos dados obtidos. A corrente de saída foi coletada em frações de volume de 2,4 mL por um coletor de frações Advantec SF- 2120. A absorvância de cada fração foi medida a 280 nm em um espectrofotômetro Hitachi U2000. Um esquema da montagem experimental está esquematizado na figura 3.5.

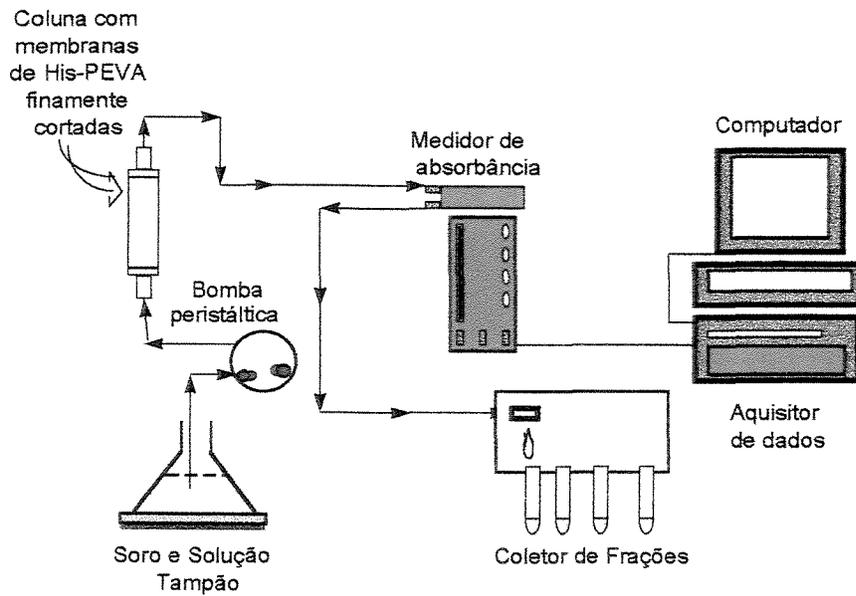


Figura 3.5: Esquema da montagem experimental utilizada para a aquisição de dados.

Finalizada a cromatografia, a coluna foi regenerada com uma solução de NaOH 25 mM, seguida por uma lavagem com água ultrapura e finalmente pelo tampão de adsorção. Os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata. O esquema das etapas utilizadas para realização das cromatografias é mostrado na figura 3.6.

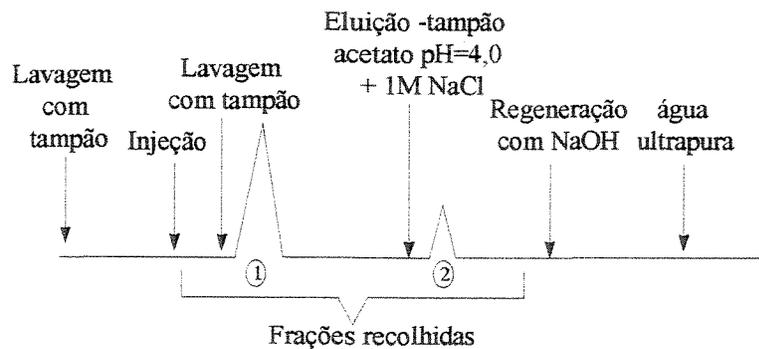


Figura 3.6: Esquema das etapas utilizadas nas cromatografias.

Com este procedimento obtivemos as amostras referentes a lavagem e a eluição (pico 1 e 2, respectivamente), quantificando-as para cada tampão e valor de pH. Foi realizada, então, uma eletroforese SDS-PAGE e uma imunoeletroforese utilizando as frações referentes a lavagem e eluição e a amostra de injeção (soro antibotrópico laquétrico).

3.2.8. Eletroforese SDS-PAGE dos soros antibotrópico e antibotrópico laquétrico

Com os soros antibotrópico laquétrico e antibotrópico doados pela Fundação Ezequiel Dias de Belo Horizonte e com as frações coletadas após a cromatografia dos soros em His-PEVA, foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE. As amostras dos soros hiperimunes, devidamente diluídos, foram desnaturadas com SDS e com SDS e 2- β -mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfeto presentes nas proteínas. Estes experimentos foram feitos com o intuito de verificar a pureza dos soros e das frações de lavagem e eluição após a cromatografia. A eletroforese foi realizada conforme procedimento descrito no manual de instruções que acompanha o aparelho Phast-System-Pharmacia LKB (EUA), utilizando-se gel com gradiente de concentração 4-15%. Terminada a eletroforese, realizou-se a coloração do gel com Coomassie brilliant blue, como descrito no manual do equipamento.

3.2.9. Imunoeletroforese do soro antibotrópico laquétrico e dos picos de lavagem e eluição.

A técnica de imunoeletroforese é baseada na migração eletroforética de um antígeno e sua imunoprecipitação específica com um anticorpo. A imunoeletroforese pode ser utilizada em vários casos, como para determinação de único antígeno em uma mistura complexa e sua análise quantitativa ou semi-quantitativa, identificação de componentes em uma mistura complexa, exame de uma sequência de frações obtidas através de um sistema de separação (como uma coluna cromatográfica) e verificar se a interação entre o antígeno e o anticorpo não foi afetada com realização deste processo. Neste trabalho soro antes de ser injetado na coluna cromatográfica e as frações obtidas após cromatografia, referentes a lavagem e a eluição.

Em uma solução tampão Tris-HCl 0,5 M e pH 8,6, 1 % de agarose foi dissolvida para a confecção do gel. Esta solução de agarose foi aquecida e mantida em constante agitação até que toda a agarose fosse dissolvida obtendo uma solução transparente. De acordo com o manual de instruções para utilização da agarose, seu aquecimento não deve ultrapassar 88 °C. O volume da solução de agarose a ser utilizado para a confecção do gel foi calculada com base nas dimensões da cuba eletroforética e da espessura desejada.

Em um filme de preparação do gel (“gel-bond”), com as dimensões da cuba, 5 ml da solução de Tris-HCl-agarose foi aplicada. O gel-bond possui um lado hidrofóbico e um hidrofílico. No lado hidrofílico a solução Tris-HCl-agarose foi aplicada de forma a se obter

uma espessura de gel uniforme ($\cong 3$ mm). Após a geleificação da solução, canaletas e poços foram feitos a partir de um molde. O desenho básico do molde é mostrado na figura 3.7.

O gel com as canaletas e os poços foi colocado na cuba de eletroforese modelo Sub-cell agarose gel, Bio-Rad (EUA), sendo que os poços ficaram próximos da região catódica. As soluções a serem analisadas foram acrescidas de azul de bromofenol, que permitiu o acompanhamento de suas migrações através do gel. Nos furos foram colocados um volume de 5 μ l de cada solução e iniciada a eletroforese. A voltagem utilizada foi de 100 V durante todo o experimento.

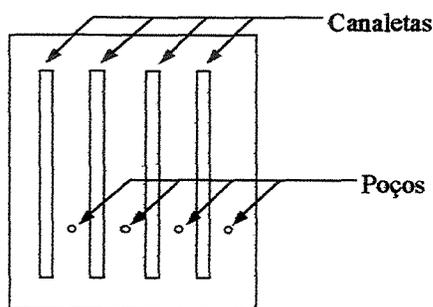


Figura 3.7: Esquema do molde de um gel para imunoeletroforese.

Terminada a imunoeletroforese, o gel foi retirado da cuba, e nas canaletas foi colocado o anti-soro total de cavalo e o anti-IgG de cavalo para que o mesmo se difundisse no gel e houvesse a formação de um arco de precipitação caso encontrasse o anticorpo ou proteína correspondente. Após o acréscimo dos anti-soros o gel foi colocado em uma câmara úmida fechada para evitar que o gel ficasse seco. O tempo de duração desta etapa foi de 24 horas.

Após este tempo, o gel foi retirado da câmara úmida e deixado em uma solução 0,15 M de NaCl durante 24 horas, para que o excesso dos anti-soros fosse removido. Finalizada a lavagem com NaCl, o gel foi colocado em água ultrapura por duas horas e posteriormente seco para que fosse realizada a sua coloração por Coomassie brilliant blue. Terminado o procedimento de coloração o gel foi novamente seco com um jato de ar quente e seco, até apresentar o aspecto semelhante a filme plástico rígido.

3.2.10. Despirogenação dos materiais utilizados

Ao realizar os experimentos de adsorção de lipopolissacarídeos são necessárias etapas preliminares que possam garantir as condições apirogênicas dos equipamentos e materiais utilizados para remoção e determinação de lipopolissacarídeos. Alguns métodos foram utilizados para despirogenação das vidrarias, da coluna cromatográfica empacotada com fibras ocas finamente cortadas e do módulo com membranas de His-PEVA.

Despirogenação das linhas e da coluna

Antes de cada experimento de adsorção de endotoxinas, a despirogenação da coluna contendo as membranas His-PEVA finamente cortadas (volume de leito de 3 ml) foi realizada conforme o procedimento descrito por ANSPACK & HILBERT (1995). Os autores sugerem alimentar a coluna com duas soluções, a primeira contendo NaOH 0,2 M e 20% de etanol e a segunda com NaOH 1,5 M, ambas em um volume de 25 vezes o da

coluna. Com este procedimento há a dessorção dos lipopolissacarídeos, tornando a coluna livre de endotoxinas. Após este procedimento, a coluna foi equilibrada com uma solução tampão apirogênica.

Vidraria e soluções

Como sugerido por NAKATA (1994) é necessário que toda vidraria utilizada seja depirogenizada em estufa a 250°C durante 30 minutos ou 200°C por 1 hora e 30 minutos ou 180°C por 3 horas.

Toda vidraria foi inicialmente deixada em uma solução de NaOH 1,5 M durante toda a noite. Após este período, a vidraria foi lavada com água ultrapura em abundância e colocada em um banho sonicador, marca Branson (EUA) durante 10 min. Finalizada a lavagem, o material era seco e colocado em estufa de secagem da marca Fanem, modelo 315 SE (Brasil) durante no mínimo 4 horas a uma temperatura de 180°C. Este procedimento foi realizado para garantir a total despirogenação do material.

A água utilizada nos experimentos de adsorção foi apirogênica para que não haja influência de contaminação de endotoxinas. Os tampões utilizados foram feitos em água para injeção intravenosa da marca Mesquita e Ariston (Brasil). As diluições das amostras a serem analisadas através do teste LAL cromogênico foram feitas com água apirogênica distribuída pela Biowhitaker (EUA).

3.2.11. Verificação da perda de capacidade das membranas.

Ao se realizar o tratamento descrito por ANSPACK & HILBERT(1995) houve a preocupação com a perda de ligante devido as condições básicas as quais as membranas de His-PEVA foram submetidas. A fim de verificar se a quantidade de proteínas adsorvidas não seria afetada, experimentos de adsorção de IgG humana foram feitos antes da despirogenação da coluna (em triplicata) e quantidade adsorvida foi determinada. Após a despirogenação da coluna, experimentos para verificar a adsorção de IgG foram realizados.

Na cromatografia utilizou-se uma solução contendo 2 mg de IgG humana que foi alimentada, a uma vazão de 0,4 mL/min, em uma coluna (volume de 3 mL), após as membranas terem sido equilibradas com tampão Mops a pH 6,5. Para retirar IgG não adsorvida, a lavagem da coluna foi feita com mesmo tampão de injeção. A eluição de IgG adsorvida em histidina imobilizada foi realizada com tampão acetato a 25 mM, pH 4,0 contendo 1 M de NaCl. O pico contendo as proteínas adsorvidas foi quantificado a 280 nm.

Realizada a cromatografia, a coluna foi despirogenizada e verificou-se a quantidade adsorvida de IgG humana permaneceu constante. Os experimentos foram realizados várias vezes a fim de certificar que o tratamento proposto não provocaria uma diminuição significativa da quantidade adsorvida antes e após a realização deste tratamento.

3.2.12. Experimentos de remoção de endotoxinas em soluções tampão

Uma vez que, tanto os anticorpos do soro antiofídico quanto de endotoxinas poderiam ser adsorvidas em His-PEVA, as melhores condições de operação tiveram que ser determinadas para que as endotoxinas pudessem ser removidas do soro sem implicar em perdas significativa de anticorpos por adsorção no suporte estudado. Em presença destas das soluções, tampão acetato e fosfato, foi verificada qual delas possibilitaria uma maior remoção de endotoxinas.

Os experimentos de remoção de endotoxinas foram realizados em circuito fechado como mostra a figura 3.8 e a uma vazão de 0,4 mL/min. A coluna foi equilibrada com o tampão de injeção. A solução tampão contendo endotoxinas com concentração previamente conhecida foi alimentada na coluna cromatográfica empacotada com as membranas His-PEVA finamente cortadas (volume de 3 mL). A solução que deixava a coluna retornava ao reservatório, que durante todo o experimento, foi mantida em agitação. A duração de cada experimento foi de uma hora.

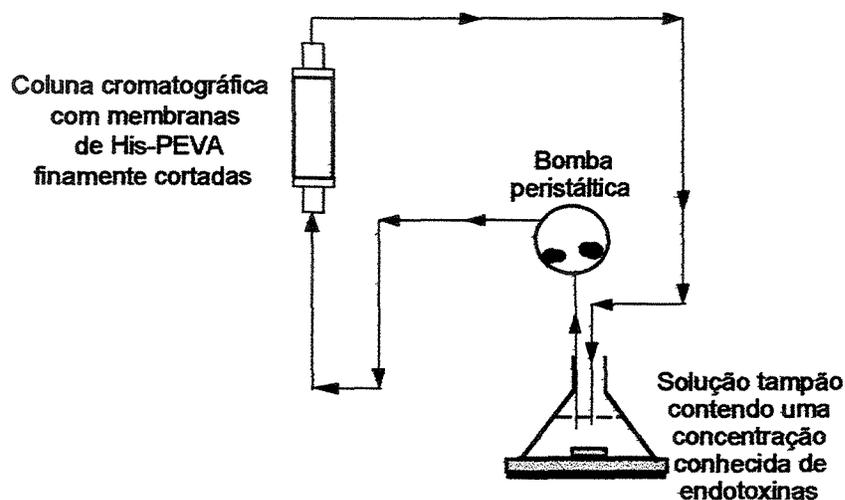


Figura 3.8: Esquema da montagem experimental para remoção de endotoxinas em membranas His-PEVA em circuito fechado.

A concentração de endotoxinas no reservatório foi medida no início e no final da etapa de adsorção e a quantidade de endotoxinas adsorvida foi calculada através da diferença entre a concentração inicial e final.

3.2.13. Experimentos de filtração em modo tangencial em circuito fechado

Todos os experimentos de adsorção de endotoxinas em presença de soro antiofídico foram realizados em circuito fechado a temperatura ambiente, como mostra a figura 3.9.

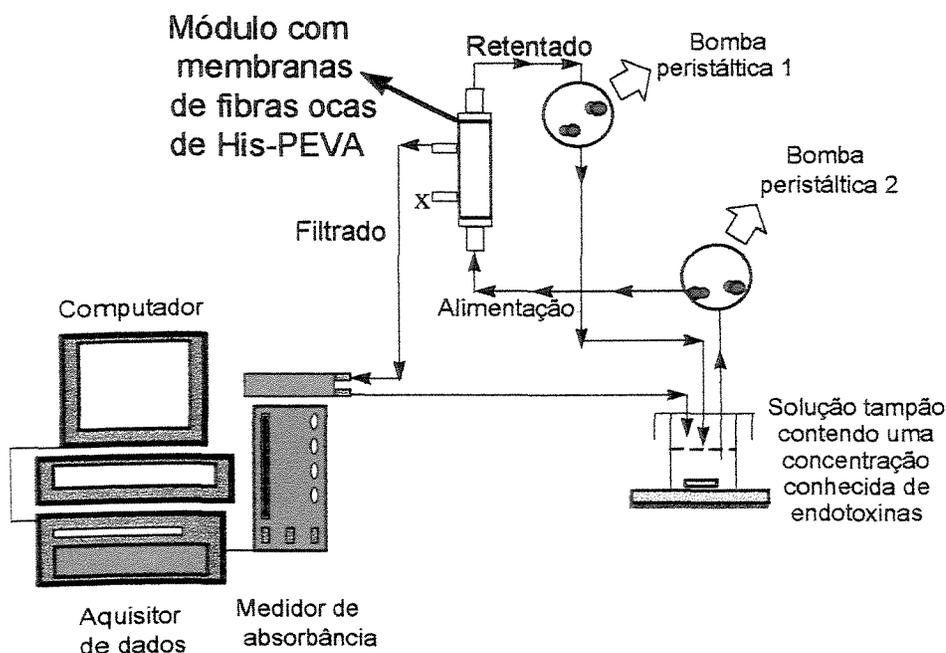


Figura 3.9: Esquema da montagem experimental para remoção de endotoxinas do soro antiofídico por filtração em modo tangencial.

A solução tampão acetato a 25 mM e pH 6,0 contendo soro antibotrópico (diluição 1:1) e contaminada artificialmente com uma concentração conhecida de endotoxinas foi alimentada através da bomba peristáltica 1 (Digi-staltic Masterflex) no módulo, a uma vazão de alimentação Q_I , em modo tangencial, com recirculação do retentado e do filtrado ao reservatório. Os experimentos foram realizados em modo tangencial para evitar a colmatagem das membranas.

A vazão de alimentação (Q_I) e a vazão do filtrado (Q_F) foram mantidas constantes usando 2 bombas peristálticas para fixar a razão Q_F / Q_I entre 0,5 e 0,86, conforme o experimento.

Todos os experimentos foram realizados a uma vazão de filtrado (Q_F) de 0,6

mL/min, resultando em um tempo de residência (t_R) de 11 s. O t_R foi calculado através da razão entre o volume das membranas ($0,11 \text{ cm}^3$) e a vazão de filtrado ($t_R = V_0 / Q_F$). Utilizou-se o valor de t_R de 11 s, pois conforme descrito por Bueno et al. (1996), valores de t_R maiores que 10 segundos, evitam a ocorrência de colmatagem ou formação de uma camada de polarização de concentração na superfície das membranas His-PEVA.

A recirculação da solução teve a duração de uma hora. A concentração de IgG do soro foi monitorada por um detector UV (Econo UV Bio-Rad) localizado na linha do filtrado durante os experimentos de adsorção. A lavagem do módulo foi realizada nos modos esquematizados na figura 3.2.

O detector esteve localizado na linha do retentado, quando realizada lavagem das membranas em modo "backflushing". A eluição foi realizada com NaOH 1,5 M, com o intuito de desorver as endotoxinas e os anticorpos que ficaram adsorvidos e regenerar as membranas. Após a desorção, o processo de despirogenção da coluna foi repetido deixando assim o módulo pronto para ser reutilizado.

Endotoxinas e anticorpos foram quantificadas nas soluções mantidas em circuito fechado antes e após a adsorção e na fração de lavagem.

3.2.14. Montagem do planejamento experimental

Visando-se um número mínimo de experimentos devido o custo das análises, foi feito um planejamento experimental como descrito por NETO et al. (1995). Foram determinados

os fatores que seriam mantidos constantes, aqueles que poderiam variar e as respostas a serem analisadas.

Os fatores mantidos constantes foram: a concentração de anticorpos do soro antiofídico e o tempo de residência (consequentemente a vazão do filtrado). As variáveis estudadas foram: as razões entre vazão de filtrado e a vazão de alimentação (Q_F / Q_I), que estiveram entre 0,5 e 0,86 e a concentração inicial de endotoxinas no reservatório (350 e 1000 EU/mL). As respostas analisadas foram: a redução na quantidade de endotoxinas na solução do reservatório e a recuperação de anticorpos de cavalo.

O soro utilizado nesses experimentos foi o antibotrópico, que apresentava uma concentração total de anticorpos de 11,37 mg/mL. A concentração utilizada nos experimentos foi de 5,68 mg/mL pois para que a remoção de endotoxinas seja eficiente em His-PEVA, uma diluição do soro é necessária em tampão acetato 25mM e pH 6,0.

Foi estudada a influência das variáveis Q_F/Q_I (vazão do filtrado/vazão da alimentação) e da concentração inicial de endotoxinas na resposta da adsorção. Foram, então, determinados os valores para as variáveis. Com a vazão do filtrado mantida constante em 0,6 mL/min (tempo de residência de 11s) e os valores para a razão Q_F/Q_I foram de 0,5 e 0,86, calculou-se as vazões de alimentação e do retentado.

A faixa de concentração inicial de endotoxinas, outra variável do planejamento experimental, foi fixada tomando como base valores obtidos em literatura: 25 a 856 EU/mL (LEGALLAIS et al.,1997) e 1000 EU/mL (WEI GUO et al.,1997). Neste trabalho, foram utilizadas soluções com concentração inicial de endotoxinas na solução do reservatório de 350 a 1000 EU/mL de endotoxinas

As condições determinadas para cada variável e para os fatores mantidos constantes são mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros utilizados para a realização do planejamento experimental.

Fatores	Condição	Valores
Tempo de residência	constante	11 s
Vazão filtrado	constante	0,6mL/min
Concentração inicial de IgG	constante	5,83mg/mL
Razão Q_F/Q_I	variável	0,5 a 0,86
Tempo de recirculação	constante	1 h
Concentração inicial de ET	variável	350 a 1000 EU/mL
Volume do reservatório	constante	10 mL

Um planejamento experimentais de dois níveis foi utilizado para determinar a condição onde houvesse uma maior remoção de endotoxinas da solução protéica contida no reservatório. A concentração de endotoxinas na solução de lavagem, as quantidades de anticorpos no reservatório e na solução de lavagem também foram determinadas.

Nos planejamentos experimentais de dois níveis foi utilizado os sinais (+) e (-) para

designar os níveis superior e inferior, respectivamente. Então, para os valores da relação Q_F/Q_I temos 0,86 para o sinal positivo (+) e 0,5 para o sinal negativo (-). Nota-se que na tabela 3.2., os ensaios 1 e 3 correspondem ao nível negativo (-) de Q_F/Q_I , enquanto para 2 e 4 os valores desta razão são positivos (+). Para a concentração de endotoxinas, os experimentos 1 e 2 representam o nível negativo (-), concentração de 350 EU/mL e os experimentos 3 e 4 para os valores positivos (+), concentração de 1000 EU/mL. São mostrados também as condições para o ponto central que recebem a conotação de zero (0). Desta forma obtemos um planejamento fatorial 2^2 , como mostrado na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Planejamento experimental 2^2 para estudar os efeitos da relação Q_F/Q_I e da concentração de endotoxinas.

ENSAIO	Relação Q_F/Q_I	Concentração de endotoxinas (EU/mL)
1	0,5 (-)	350 (-)
2	0,86 (+)	350 (-)
3	0,5 (-)	1000 (+)
4	0,86 (+)	1000 (+)
5	0,68 (0)	675 (0)
6	0,68 (0)	675 (0)

3.2.15. Método de quantificação de endotoxinas

O teste cromogênico foi escolhido para a quantificação de endotoxinas por ser um método quantitativo e aprovado pela FDA (Food and Drugs Administration), possui uma sensibilidade de 0,1 a 1,0 EU/mL. O kit (fornecido pela BioWhittaker) contém um frasco de endotoxinas de baixa concentração (de 20 a 30 EU/mL), dois frascos de substrato cromogênico e cinco frascos de lisado de amebócito de *Limulus*. Os compostos do substrato cromogênico, das endotoxinas e do lisado contidos nos frascos estão liofilizados.

Reconstituição dos reagentes utilizados

O frasco contendo endotoxinas possuía uma concentração pré-determinada através de um certificado de análise que acompanha o kit que era de 27 EU/ml quando reconstituído em 1 mL de água apirogênica. Após a reconstituição, a solução era agitada por 45 min em vortex. Esta solução é estável por um mês quando estocada em temperatura de 2 a 8°C. Antes de reutilizar a solução, esta deve ser acondicionada a temperatura ambiente e agitada vigorosamente por 45 min. O substrato cromogênico foi dissolvido em 6,5 mL de água e após reconstituído foi guardado em refrigerador (2 a 8°C) sendo estável por um mês se não contaminado com microorganismos ou pirogênios. Esta solução deve ser protegida contra exposição a luz. O reagente Lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* foi reconstituído imediatamente antes do uso em um volume de 1,4 mL de água apirogênica. Para evitar a formação de espumas, a sua dissolução foi feita através de uma agitação lenta. O lisado

reconstituído foi estocado a -10°C e pode ser reutilizado em até um período de uma semana.

Ao descongelar deve ser utilizado apenas uma vez.

Determinação da curva de calibração de endotoxinas.

Para a quantificação de endotoxinas das amostras desconhecidas, uma curva de calibração foi construída. O procedimento para construção da curva foi realizado conforme descrito no manual de instruções que acompanha o kit LAL cromogênico. Para a construção da curva de calibração, sucessivas diluições foram realizadas utilizando a solução de endotoxinas de concentração pré-determinada. Através da relação $(x-1)/10$, calculou-se o volume de água para a primeira diluição. A variável “x” representa a quantidade de endotoxinas contida no frasco. Em nosso caso, a concentração foi de 27 EU, resultando em um volume de água de 2,6 mL. Então, 0,1 mL da solução de endotoxina padrão foi dissolvido em 2,6 mL de água. Esta solução foi vigorosamente agitada em vortex por um minuto antes de sua utilização. Com esta diluição a solução resultante contém 1,0 EU/mL (primeiro ponto da curva). Um volume de 0,5 mL da solução com concentração de 1,0 EU/mL foi transferido para um frasco contendo 0,5 mL de água, obtendo-se 0,5 EU/mL. Em outro frasco, contendo 1,5 mL de água, foi acrescentado 0,5 mL da solução de 1,0 EU/mL, resultando em 0,25 EU/mL. A última diluição foi feita preparando uma solução contendo 0,9 mL de água e 0,1 mL da solução de 1,0 EU/mL, ficando com uma concentração de 0,1 EU/mL. Água apirogênica foi utilizada para diluir as soluções padrão da curva de calibração. Todas as soluções foram agitadas, por no mínimo 1 minuto antes do

uso. Finalizada as diluições, foi realizado o teste como descrito no manual de instruções.

Para a determinação da curva de calibração foram utilizadas as soluções pré-agitadas, com concentrações de 0 (água apirogênica) a 1,0 EU/ml, preparadas a partir da solução padrão de endotoxinas. As etapas para a construção da curva de calibração são mostradas na tabela 3.3.

Tabela 3.3: Passos para realização do teste LAL cromogênico

	Amostra	Branco
Soluções contendo 0,1 a 1,0 EU/mL	50 µL	-
Água apirogênica	-	50 µL
LAL(lisado de amebócito de <i>Limulus</i>)	50 µL	50 µL
Misturar e incubar a 37°C ± 1°C	10 min	10 min
Solução do substrato a 37°C ± 1°C	100 µL	100 µL
Misturar e incubar a 37°C ± 1°C	6 min	6 min
Reagente de parada	100 µL	100 µL
misturar imediatamente		

Inicialmente, 50 µL de cada solução de endotoxinas padrão de 0 a 1,0 EU/mL foi colocada em uma microplaca apirogênica pré-aquecida a 37°C ± 1°C. Todas as determinações incluíram um branco mais os quatro pontos (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 EU/mL) em duplicata. O branco foi feito com água apirogênica.

Foi adicionado, então, 50 μL do lisado de amebócito de *Limulus* em todas as amostras. O tempo foi marcado a partir do acréscimo do reagente no primeiro poço de reação. Todos os reagentes foram adicionados na mesma velocidade e tiveram igual tempo de incubação. O tempo de incubação desta etapa foi de 10 min.

Imediatamente após o tempo de incubação da etapa anterior, 100 μL da solução de substrato foi acrescentada, obedecendo a ordem e velocidade de pipetagem da etapa anterior. Este reagente foi aquecido a 37°C antes que fosse adicionado.

Finalizado o passo anterior, que foi de 6 min, 100 μL do reagente de parada (ácido acético 25%) que foi dispensado na microplaca na mesma ordem das etapas anteriores. Em todas as etapas, após adicionar os reagentes, houve uma suave agitação, que é essencial. A leitura foi feita a 405 nm em um equipamento Bio-kinetics reader EL-312e (EUA). Através dos dados obtidos, determinou-se uma curva de calibração

Para medidas de soluções de endotoxinas com concentrações desconhecidas foram feitas diluições em água apirogênica até que sua absorvância se encaixasse nos valores lineares obtidos na calibração.

O teste cromogênico pode ser feito em tubos ou em microplacas e foi tratado exatamente da mesma maneira para determinação das concentrações de endotoxinas, ou seja, a ordem e velocidade de pipetagem dos reagentes em cada etapa foi sempre a mesma.

Cálculo da curva de calibração e das amostras

Dentro das condições realizadas, a absorvância a 405 nm para as concentrações de

0,1 a 1,0 EU/mL é linear. As absorvâncias médias dos resultados dos padrões, foram subtraídas do branco para o calculo do delta médio de absorvância.

O método para a construção da curva consiste em encontrar os valores do coeficiente angular e do linear utilizando os pontos do delta médio de absorvância dos padrões. Com estes valores calculou-se a concentração de endotoxinas através da seguinte fórmula: concentração de endotoxinas (EU/mL) = (absorvância média das amostras - coeficiente linear)/ coeficiente angular. O erro inerente do método é de 10%.

3.2.16. Determinação da quantidade de endotoxinas de amostras protéicas

As soluções de soro antiofídico contaminadas artificialmente com endotoxinas foram inicialmente aquecidas a 70°C por 10 minutos para que não houvesse interferência por parte das imunoglobulinas de cavalo na quantificação das soluções. Com este aquecimento há uma desnaturação das imunoglobulinas (e não das endotoxinas que são estáveis a ciclos curtos de calor). Impedindo que estas venham a interferir de alguma forma nas reações enzimáticas que ocorrem no teste. Posteriormente, foram feitas as medidas conforme procedimento descrito na tabela 3.3. Para que as análises pudessem ser realizadas diluições foram feitas permitindo que as medidas estivessem dentro da faixa de linearidade, que é de 0,1 a 1,0 EU/mL.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Introdução

De acordo com a literatura, histidina imobilizada em géis ou membranas adsorve endotoxinas e algumas espécies e subclasses de imunoglobulina G, dependendo das condições de operação (VIJAYALAKSHIMI, 1989; BUENO et al.1995; HAUPT et al.,1995; BUENO et al., 1996; LEGALLAIS, et al., 1997). No entanto, dados sobre a adsorção de anticorpos de cavalo e sobre a despirogenação de soluções de soro antiofídico contaminadas com endotoxinas utilizando histidina como ligante imobilizada em suportes sólidos não são disponíveis em literatura. Uma vez que potencialmente tanto os anticorpos do soro antiofídico quanto as endotoxinas poderiam ser adsorvidas em His-PEVA, neste trabalho as melhores condições de operação tiveram que ser determinadas para que as endotoxinas pudessem ser removidas do soro sem implicar em perdas significativa de anticorpos por adsorção nas membranas de afinidade His-PEVA.

Dessa forma, a primeira etapa desse trabalho consistiu em investigar a adsorção dos anticorpos do soro nas membranas His-PEVA. Dois casos poderiam ocorrer, no primeiro caso onde não existiria afinidade destes anticorpos com o ligante de pseudoafinidade e o segundo caso onde haveria afinidade destes anticorpos por histidina imobilizada. Verificou-

se, então, a existência de adsorção dos anticorpos do soro antibotrópico laquélico e antibotrópico nas membranas de afinidade His-PEVA quando em presença de tampão Mops pH 6,5.

No segundo passo, determinou-se as condições nas quais a adsorção de anticorpos não fosse significativa nas membranas His-PEVA. Experimentos de adsorção de anticorpos foram realizados em coluna cromatográfica empacotada com membranas His-PEVA utilizando várias soluções tampão e pHs. O tampão fosfato de sódio à pH 6,5 foi o que permitiu uma menor adsorção dos anticorpos, seguido do tampão acetato de sódio à pH 6,0.

Com base nestes resultados, testes em coluna cromatográfica foram realizados experimentos utilizando os referidos tampões para verificar qual das duas soluções poderia promover uma maior remoção de endotoxinas. Soluções contendo endotoxinas adicionadas artificialmente nas soluções tamponantes foram preparadas em acetato pH 6,0 e fosfato pH 6,5. Os experimentos cromatográficos para remoção de endotoxinas foram realizados em coluna empacotada com membranas His-PEVA e em circuito fechado. A solução tampão acetato promoveu uma maior remoção de endotoxinas que o fosfato.

Encontrada a solução tampão que implicou em uma menor adsorção de anticorpos e uma maior remoção de endotoxinas, experimentos com as membranas His-PEVA no módulo, de filtração foram realizados com soro antibotrópico laquélico contaminado artificialmente com endotoxinas. Os experimentos foram realizados em modo tangencial com recirculação do retentado e do filtrado para avaliar a remoção de endotoxinas no soro antiofidico.

4.2. Ativação da membrana de PEVA e imobilização de histidina

Neste trabalho, foram utilizadas membranas na forma de fibras ocas por estas apresentarem uma maior área superficial da membrana por unidade de volume do módulo quando comparada às demais geometrias. Fibras ocas de PEVA foram escolhidas como suporte para a imobilização de histidina devido aos resultados promissores apresentados por LEGALLAIS et al., 1997 utilizando essa membrana para a remoção de endotoxinas de soluções protéicas (IgG humana e anticorpos monoclonais).

Uma vez escolhida a membrana, o passo seguinte foi a ativação e a imobilização do ligante histidina neste suporte. Um cartucho comercial contendo as membranas de fibras ocas de PEVA (1 m² de área) foi desmontado e uma parte das membranas retiradas do cartucho foram utilizadas para a construção de um módulo de escala reduzida (50 cm² de área de permeação) e outra parte foi finamente cortada (comprimento de cerca de 1 mm). Em seguida, tanto o pequeno módulo contendo as fibras ocas quanto as fibras finamente cortadas foram submetidas a ativação e imobilização do ligante.

A ativação das membranas foi realizada com 1,4 butanodiol diglicidil éter (como descrito em materiais e métodos), devido ao fato da membrana de PEVA apresentar grupamentos hidroxilas que permitem ser ativados por reagentes que apresentem grupamentos epóxido. Uma vez que 1,4 butanodiol diglicidil éter é um agente bifuncional, histidina pode ser imobilizada no suporte, sendo que a reação de acoplamento ocorreu entre o grupamento epóxido e o grupo α -amino do aminoácido. A membrana de afinidade assim

obtida foi denominada His-PEVA e a estrutura proposta para a mesma é mostrada na figura 4.1.

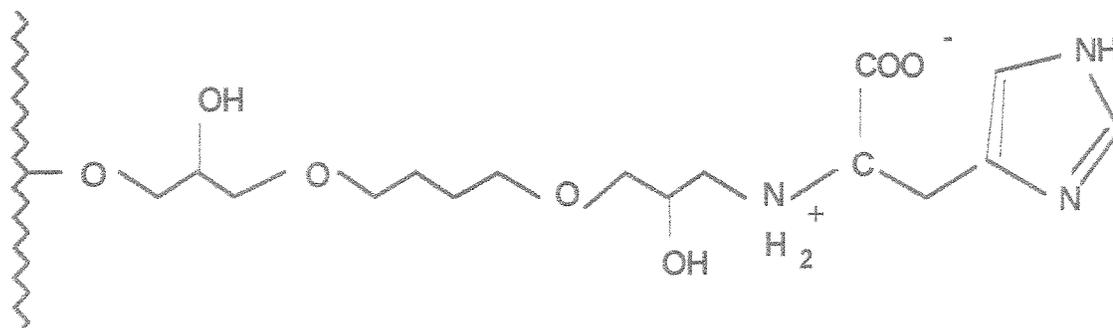


Figura 4.1 : Estrutura proposta da membrana de afinidade His-PEVA

4.3. Adsorção de anticorpos do soro hiperimune em membranas His-PEVA

Finalizada a etapa de ativação e imobilização de histidina nas membranas, foram realizados testes para verificar a adsorção dos anticorpos de cavalo (presentes no soro antiofidico) nas membranas His-PEVA. Para tanto, foram utilizados os soros antibotrópico laquétrico e antibotrópico, fornecidos pela FUNED. Antes de realizar os experimentos de adsorção, foi realizada uma caracterização, desses soros através da quantificação total de proteínas e de uma eletroforese SDS-PAGE para determinar o grau de pureza de cada um dos soros.

Análise das amostras de soro antiofídico

Quantificação de proteínas

A quantidade de proteínas contidas nas amostras de soro antiofídico laquétrico e soro antiofídico foi determinada através do método BRADFORD (1976). Para o soro antiofídico laquétrico obteve-se a concentração de 30,78 mg/mL de proteína total, enquanto para o soro antiofídico a concentração de proteínas obtidas foi de 11,93 mg/mL (soros obtidas da FUNED, B. H.). Com o soro adquirido do Instituto Butantan (S.P.) a concentração de proteínas obtidas foi de 11,00 mg/mL.

Determinação da pureza dos soros hiperimunes

Para determinar a pureza do soro antiofídico foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE. As amostras dos soros hiperimune (FUNED,B.H.) foram desnaturadas com SDS e com SDS e 2- β -mercaptoetanol, que rompe as ligações dissulfeto presentes nas proteínas (imunoglobulinas). A coloração do gel foi feita com coomassie brilliant blue. O resultado da eletroforese é mostrado na figura 4.2 .

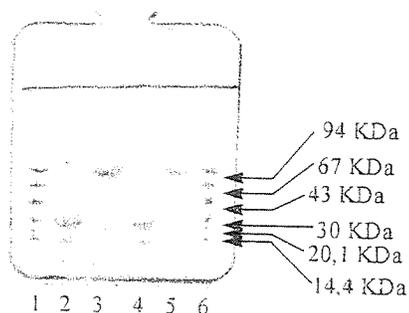


Figura 4.2: Eletroforese SDS-PAGE dos soros antibotrópico laquétrico e antibotrópico utilizados. 1- Marcador de massa molecular, Fosforilase b, 94000 Da; Albumina de soro , 67000 Da; Albumina de ovo, 43000 Da; Anidrase Carbonica, 30000 Da; Inibidor de tripsina de soja, 20100 Da; a Albumina láctea, 14400 Da; 2- Soro antibotrópico desnaturado com SDS + 2- β -mercaptoetanol; 3- Soro antibotrópico desnaturado com SDS; 4- Soro antibotrópico laquétrico desnaturado com SDS + 2- β -mercaptoetanol; 5- Soro antibotrópico laquétrico desnaturado com SDS ; 6- Marcador de massa molecular.

A massa molecular do fragmento $F(ab')_2$ da imunoglobulina G foi calculado, a partir da eletroforese, como sendo de aproximadamente de 92 kDa, para os dois soros testados neste trabalho. A proteína tratada com 2- β -mercaptoetanol apresentou massa molecular da cadeia de aproximadamente 21 kDa. Verificou-se dessa forma, que as amostras de soro hiperimmune apresentavam uma pequena contaminação com proteínas de baixa massa

molecular resultante da ação da enzima pepsina, que provavelmente são peptídeos de baixa massa molecular.

Experimentos de filtração

Como dados sobre a adsorção de imunoglobulina de cavalo neste tipo de adsorvente não existiam em literatura, foram verificados através de uma filtração se os anticorpos do soro antiofídico seriam adsorvidos nas membranas His-PEVA. Os experimentos de filtração foram realizados em modo frontal utilizando o módulo em escala reduzida (50,3 cm²). O tampão utilizado para a adsorção dos anticorpos foi Mops 25 mM, pH 6,5 e para a eluição, dois tampões foram utilizados. Estes dois tampões foram preparados adicionando-se NaCl ao tampão de adsorção para se obter concentrações finais de 0,2 e 1,0 M. Os cromatogramas típicos para o soro antiofídico laquéutico e para o soro antiofídico são mostrados nas figuras 4.3 e 4.4.

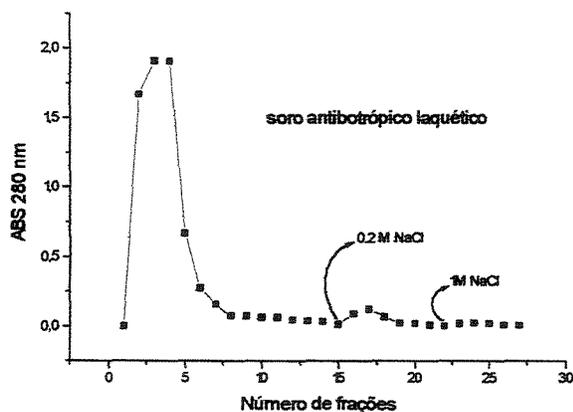


Figura 4.3 : Cromatograma do soro antiofídico laquéutico.

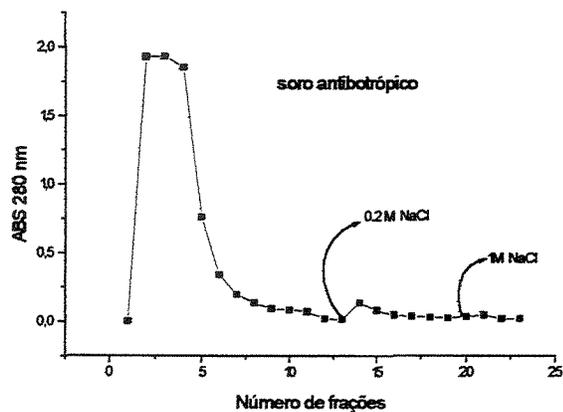


Figura 4.4 : Cromatograma do soro antibotrópico.

No cromatograma típico para o soro antibotrópico laquélico, o primeiro grande pico representa as proteínas do soro não retidas nas membranas His-PEVA e o segundo pico menor, as proteínas eluídas com o tampão Mops 25 mM contendo 0,2 M de NaCl a pH 6,5. A cromatografia foi finalizada através de uma lavagem das fibras com uma solução tampão Mops acrescida de 1 M de NaCl, porém, nesta lavagem nenhum pico foi apresentado. Como a quantidade de soro injetada no módulo foi pequena, a presença de uma grande fração de proteínas não adsorvidas, supõe-se que possa haver a presença de vários subgrupos do fragmento $F(ab')_2$ de cavalo com diferentes afinidades por histidina imobilizada. O mesmo comportamento foi observado para o soro antibotrópico.

Em seguida, combinou-se as frações de 1 à 8 referentes ao primeiro pico, e as frações 16, 17 e 18, referentes ao segundo pico que representaram, respectivamente, 89,5% e 8,7% da quantidade de proteína injetada. Para o soro antibotrópico foram reunidas as frações de 1 a 10 referentes ao primeiro pico e as frações 14, 15 e 16 referentes ao segundo

pico que representam, respectivamente 89,2% e 1,2% da quantidade total de proteína injetada. Posteriormente, as frações foram concentradas por ultrafiltração afim de realizar uma eletroforese.

4.4. Eletroforese SDS-PAGE e imunoeletroforese dos picos referentes a filtração dos soros hiperimunes

Com a finalidade de certificar se houve realmente adsorção do fragmento $F(ab')_2$ na membrana com histidina imobilizada e, qualitativamente, se após realizada a cromatografia em membranas de His-PEVA, o fragmento $F(ab')_2$ ainda estava ativo podendo interagir com anti-IgG de cavalo e anti-IgG total, foi realizada uma eletroforese e uma imunoeletroforese. Para a eletroforese, as frações dos picos de lavagem e eluição foram analisadas desnaturando-se as amostras somente com SDS. A coloração foi realizada com nitrato de prata. O resultado obtido é mostrado na figura 4.5.

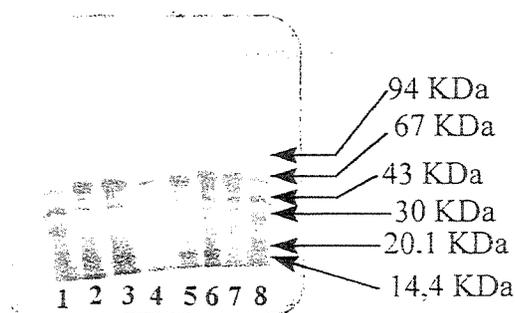


Figura 4.5 : Gel de eletroforese dos soros e picos de lavagem e eluição. 1- Marcador de massa molecular LMW, Fosforilase b, 94000 Da; Albumina de soro bovino, 67000 Da; Albumina de ovo 43000 Da; Anidrase carbônica, 30000 Da; Inibidor de tripsina de soja,

20100 Da; a Albumina láctea, 14400 Da; 2- Pico 2-Soro antibotrópico; 3- Pico 1-Soro antibotrópico; 4- Soro antibotrópico; 5- Pico 2-Soro antibotrópico laquétrico; 6- Pico 1-Soro antibotrópico laquétrico; 7- Soro antibotrópico laquétrico; 8- Marcador de massa molecular.

Analisando a figura 4.5, nota-se que houve adsorção do fragmento $F(ab')_2$ quando em presença de solução tampão Mops a 25 mM, pH 6,5. Verificou-se, nos dois casos (soro antibotrópico e antibotrópico laquétrico), que houve adsorção de imunoglobulina G de cavalo em His-PEVA.

Na imunoeletroforese, a disposição das frações dos picos de lavagem e eluição obtidos através de uma cromatografia em membranas de His-PEVA e do soro antibotrópico laquétrico é mostrada na figura 4.6.

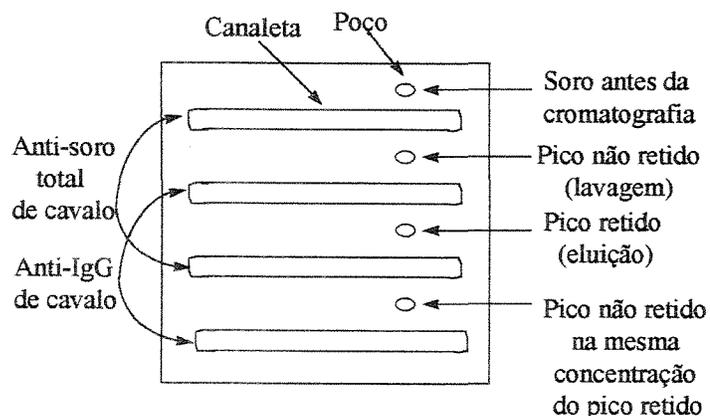


Figura 4.6: Disposição das amostras nos poços e do anti-soro total de cavalo e anti-IgG de cavalo nas canaletas no gel de imunoeletroforese.

O gel é mostrado na figura 4.7, onde pode-se notar que houve interação pois ocorreu a formação dos arcos de precipitação, mostrando de forma qualitativa que após o processo cromatográfico a IgG de cavalo porção F(ab')₂ mantém suas características.

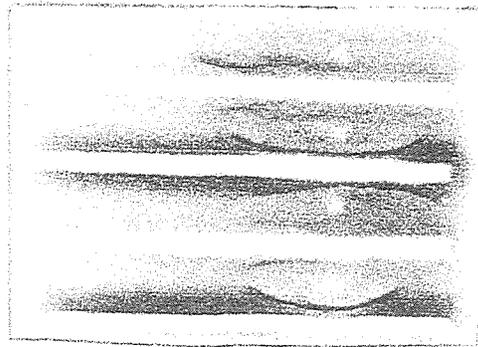


Figura 4.7: Gel de imunoeletroforese

Como houve a adsorção de IgG de cavalo em His-PEVA, esse caso é desfavorável, pois uma vez que endotoxinas e anticorpos estiverem em solução, estes competirão pelo sítio de adsorção do ligante. Assim, as condições de operação precisaram ser investigadas com a finalidade de evitar a adsorção de anticorpos e favorecer a adsorção de endotoxina, uma vez que o tipo de tampão, a força iônica e o pH influenciam na adsorção de imunoglobulinas e endotoxinas.

4.5. Influência da solução tamponante e do pH na adsorção de anticorpos do soro em His-PEVA

Com a finalidade de maximizar a adsorção de endotoxinas, foi investigada a possibilidade de diminuir ou evitar a adsorção do fragmento $F(ab)_2$ utilizando um outro tampão ou pH, diferente do utilizado no experimento anterior (Mops 25 mM, pH 6,5). Assim, diferentes soluções tampão a 25 mM na sua faixa tamponante foram utilizados: Tris-HCl (pH entre 7,0 e 8,5); Fosfato de sódio (pH entre 6,0 e 8,0); Acetato de sódio (pH entre 5,0 e 6,0); Mops (pH entre 6,5 e 8,0); Hepes (pH entre 7,0 e 8,0) e Mes (pH entre 5,5 e 6,5).

A Figura 4.8 mostra a quantidade de fragmento $F(ab)_2$ de cavalo adsorvida em His-PEVA em função dos diferentes tampões acima citados a diversos pHs. Os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata, em uma coluna cromatográfica empacotada com membranas His-PEVA finamente cortadas (volume de 2 mL), onde foi injetado 1 ml de soro antibotrópico laquéico a uma concentração de 6,2 mg/mL. O fluxo de saída da coluna foi monitorado por uma monitor de UV. Frações de 2,4 mL foram coletadas e foi determinada a quantidade adsorvida para cada solução tampão e seu pH. No gráfico 4.8 são apresentados os valores médios de cada experimento. Os valores entre os dados obtidos foram menores que 0,01mg por grama de suporte. Por não serem variações significativas e portanto não influenciarem na análise dos resultados, estes foram omitidos das figuras 4.8. e 4.10.

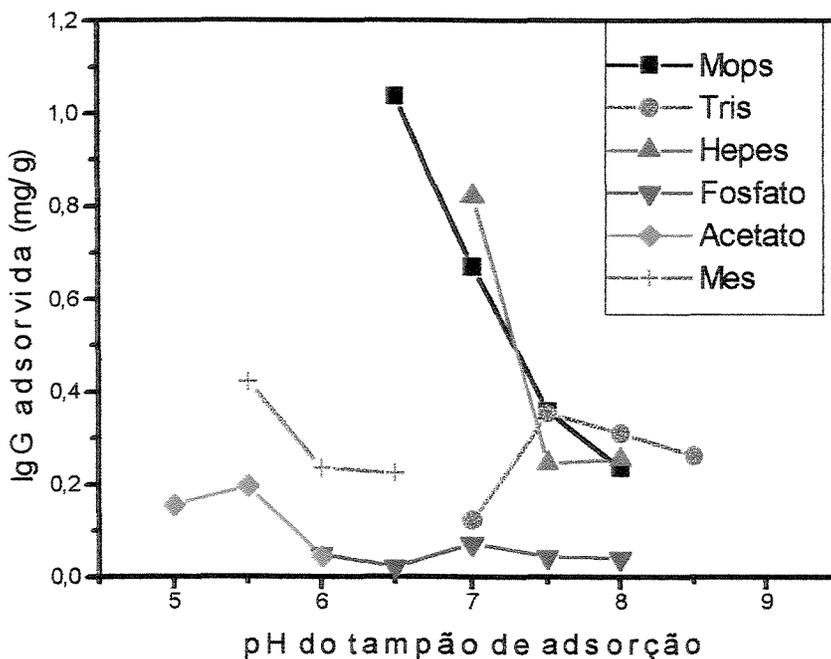


Figura 4.8 : Adsorção de anticorpos (fragmento F(ab)₂, soro antibotrópico laquético) de membrana seca His-PEVA(mg/g de suporte) nas várias soluções tampão e seus diferentes pHs.

Observa-se, a partir da análise do gráfico da Figura 4.8, que o fragmento F(ab')₂ de cavalo pode ser adsorvido nas membranas His-PEVA entre pH 5,5 a 8,5, porém o pH ótimo de adsorção difere para cada solução tamponante. Por exemplo, aproximadamente a mesma quantidade de fragmento F(ab')₂ foi adsorvida em tampão acetato a pH 5,5 quando comparada a quantidade adsorvida em tampão Tris-HCl, pH 7,0.

Pode-se distinguir, nesse gráfico, dois diferentes grupos de tampões. Os tampões Mes, Acetato, Tris-HCl e Fosfato, que permitiram a adsorção de uma pequena quantidade

de anticorpos (0,02-0,4 mg/g suporte) e os tampões Hepes e Mops, no qual a adsorção foi de 2 a 3 vezes maior (0,9-1,1 mg/g suporte) quando estes tampões foram utilizados em pHs abaixo de seu pK_a (7,55 e 7,2 respectivamente).

Para esses dois últimos tampões, a quantidade de anticorpos adsorvida diminuiu muito com o aumento de pH, chegando a adsorver, quando em pHs muito acima do seu pK_a , quantidades similares às obtidas dos outros tampões, tais como Mes, Tris-HCl e Acetato.

Observando as estruturas dos tampões utilizados nesse trabalho na Figura 4.9, nota-se que Acetato, Tris e Fosfato apresentam uma ou mais cargas de mesmo sinal (somente positiva ou negativa), enquanto que os tampões zwitteriônicos Mes, Hepes e Mops apresentam duas cargas de sinais opostos quando estão em pH abaixo de seu pK_a .

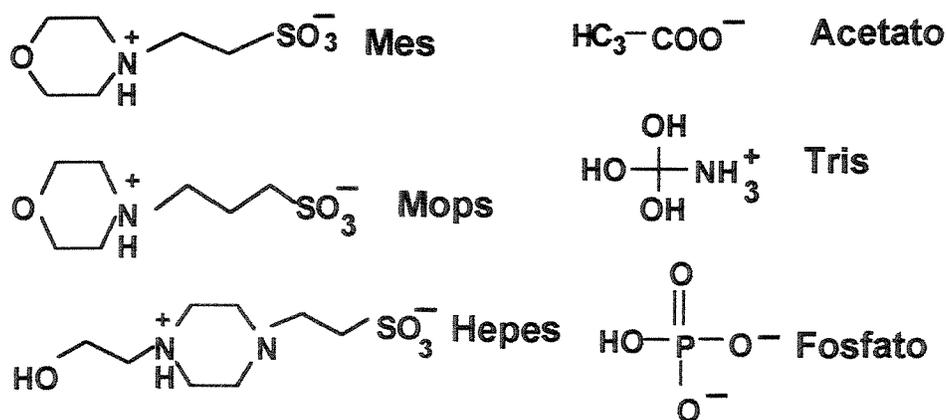


Figura 4.9: Estrutura dos tampões utilizados para adsorver anticorpos em His-PEVA.

Quando a quantidade de anticorpos adsorvidos é traçada em função da condutividade dos tampões, como mostrado na figura 4.10, observa-se que a adsorção diminui com o aumento da condutividade (exceto para o tampão Tris-HCl). Os tampões que apresentaram valores de condutividade menores que $2,25 \text{ 1/k}\Omega\text{cm}$ propiciaram uma adsorção significativa de anticorpos e os que tamponaram em faixas de pH onde a condutividade foi maior que este valor, a adsorção quase não ocorreu.

A melhor adsorção foi obtida em presença dos tampões Mops e Hepes na sua forma zwitteriônica (baixa condutividade). Em pHs acima do valor do pKa, a quantidade de anticorpos adsorvidos na presença desses tampões foi diminuída devido ao aumento de condutividade. Esse aumento de condutividade ocorre devido a desprotonação do nitrogênio do anel morfolino ou piperazina, tornando Mops e Hepes carregados negativamente.

Para explicar o fenômeno de adsorção dos anticorpos em His-PEVA levantou-se a seguinte hipótese: que todos os íons dos tampões e respectivos contra-íons interagem com as moléculas de proteína via interações carga-carga e ocultam o sítio de adsorção de histidina, porém Hepes e Mops na sua forma zwitteriônica não o fazem. No entanto, não foi observado o mesmo fenômeno quando o tampão Mes foi utilizado na sua forma zwitteriônica.

Uma possível explicação é que pH 6,0 seria um limite inferior para ocorrer uma adsorção significativa de anticorpos. O estado de protonação dos grupos carregados das moléculas de fragmento $F(ab')_2$ envolvidas na interação podem estar impedindo a adsorção em pH abaixo de 6,0.

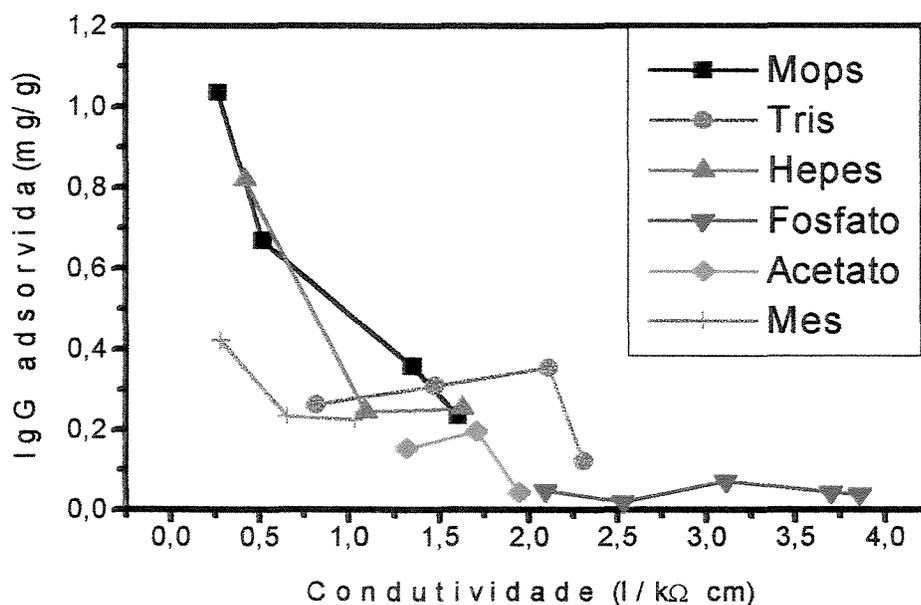


Figura 4.10 : Adsorção dos anticorpos (mg/g de suporte) em His-PEVA em função da condutividade dos diversos tampões.

Alguns experimentos de adsorção foram realizados com o soro antibotrópico e verificou-se que este apresentava o mesmo comportamento que o soro antibotrópico laquétrico.

Para se obter uma despirogenação eficiente do soro sem perdas de anticorpos, deve-se trabalhar em condições tais que não ocorra a adsorção de anticorpos em His-PEVA ou que essa adsorção seja mínima. Essa condição é necessária para que as endotoxinas não disputem com as moléculas de fragmento $F(ab)_2$ o sítio de adsorção do ligante. O tampão fosfato de sódio (pH entre 6,0 e 8,0) foi o que permitiu uma menor adsorção do fragmento $F(ab)_2$, seguido dos tampões acetato de sódio (pH entre 5,0 e 6,0) e Tris-HCl (pH entre 7,0

e 8,5). Com base nesses resultados, selecionou-se os tampões e pHs menos favoráveis para a adsorção de anticorpos: acetato de sódio, pH 6,0 e fosfato de sódio, pH 6,5.

4.6. Experimentos de remoção de endotoxinas em solução tampão

Finalizados os experimentos de adsorção IgG de cavalo nas membranas His-PEVA e encontradas as soluções tampão e o pHs que permitiriam uma menor adsorção, os testes de remoção de endotoxinas foram realizados para determinar qual das 2 soluções tampão promoveria uma maior redução da quantidade de lipopolissacarídeos. Ao realizar os experimentos de adsorção de endotoxinas, foram necessárias etapas preliminares que pudessem garantir as condições apirogênicas dos equipamentos e materiais utilizados para remoção e determinação de lipopolissacarídeos. A despirogenação das vidrarias foi realizada através do calor seco (Nakata, 1994), a coluna e o módulo foram submetido a uma hidrólise básica, como proposto por ANSPACH & HLBERT ,1995. Foi verificada, então, a possível perda de capacidade de adsorção das membranas His-PEVA quando submetida a um tratamento com NaOH.

Verificação da perda de capacidade das membranas

Experimentos de adsorção de IgG humana foram feitos com o intuito de verificar se as membranas de His-PEVA suportariam o tratamento proposto por ANSPACH & HLBERT (1995).

A adsorção de IgG humana anterior ao tratamento com NaOH foi $30\% \pm 1\%$ da massa total alimentada na coluna, após a eliminação de endotoxinas a quantidade de IgG adsorvida foi $30\% \pm 1\%$ da massa total. As quantidades adsorvidas, antes e após o tratamento, foram semelhantes não afetando desta forma a capacidade de adsorção da membrana. Com isso, foi verificado que o tratamento é efetivo e os experimentos de remoção de endotoxinas podiam ser realizados.

Remoção de endotoxinas em solução tampão

Determinadas as condições que permitiriam uma menor adsorção de IgG de cavalo, estudos foram realizados para avaliar a remoção de endotoxinas por filtração nas membranas His-PEVA. As soluções escolhidas foram acetato pH 6,0 e fosfato pH 6,5, devido ao fato da adsorção de anticorpos em His-PEVA ter se mostrado praticamente inexistente quando em presença destas duas soluções tampão. Para tais experimentos, utilizou-se uma coluna cromatográfica com membranas His-PEVA finamente cortadas com um volume de leito de 3 mL. As referidas soluções tampão foram contaminadas artificialmente com endotoxinas e passadas pela coluna, em circuito fechado.

Como mostrado na tabela 4.1, as concentrações iniciais de endotoxinas nos dois tampões não foram idênticas, devido as características das endotoxinas de associar-se formando grandes agregados. Houve a dificuldade de se preparar soluções contaminadas artificialmente e por isso a adsorção foi expressa em porcentagem da concentração inicial. Ambas as soluções tamponantes promoveram a remoção significativa de lipopolissacarídeos,

porém tampão acetato favoreceu uma maior adsorção de endotoxinas (cerca de 92% de endotoxinas removidas), uma relação de cerca de quatro vezes mais endotoxinas removidas, que o tampão fosfato (em torno de 29%) nas condições estudadas.

Estes resultados foram semelhantes àqueles obtidos por Legallais et al. (1997). Utilizando o tampão acetato em pH 5,0 aqueles autores observaram que este promove maior adsorção de endotoxinas em membranas de His-PEVA em relação ao tampão fosfato no processo de despirogenação de soluções de IgG humana.

Tabela 4.1: Influência do tampão na adsorção de endotoxinas em membranas His-PEVA.

Tampão	Acetato 25 mM pH 6,0	Fosfato 25 mM pH 6,5
Volume inicial	10 ml	10 ml
Volume do leito da coluna	3 ml	3 ml
Concentração inicial	123,6 EU/ml	84,5 EU/ml
Concentração final	9,4 EU/ml	59,9 EU/ml
Endotoxinas remanescente	7,6%	70,9%

Após encontrada a solução tampão que proporciona uma melhor adsorção de endotoxinas, o próximo passo foi a realização de experimentos de remoção de endotoxinas de soluções contendo soro antiofídico.

4.7. Remoção de endotoxinas de soluções contendo soro antiofídico

Encontrada a solução tampão que promoveu uma maior redução na quantidade de endotoxinas em relação as outras soluções tampão utilizadas, foram realizados experimentos de remoção de endotoxinas de soluções contendo o soro antiofídico. Devido ao alto custo das análises, foi proposto um planejamento experimental para estudar a influência de alguns parâmetros na redução de LPS da solução protéica contaminada, minimizando, assim, o número de experimentos.

Um planejamento experimental de dois níveis foi utilizado para determinar a condição onde houvesse uma maior remoção de endotoxinas da solução protéica contida no reservatório. As concentrações de LPS na solução de lavagem e de proteínas no reservatório e na solução de lavagem também foram determinadas.

O resultado do planejamento experimental variando a razão Q_F/Q_I e a concentração inicial de endotoxinas é apresentado na tabela 4.2.

Tabela 4.2.: Concentração de endotoxinas remanescentes na solução do reservatório em função das variáveis estudadas.

Condições	Q_F/Q_I	Concentração inicial de endotoxinas(EU/mL)	Concentração de endotoxinas remanescentes(EU/mL)	Quantidade removida(%)
1	0,5	350	26,6	92
2	0,5	1000	80,6	92
3	0,68	675	56,1	92
4	0,68	675	47,4	92
5	0,86	350	36,6	89
6	0,86	1000	41,9	96

*O volume da solução no reservatório: 10ml.

Pode-se verificar através dos resultados obtidos com o planejamento experimental que houve influência da concentração inicial de endotoxinas e da razão Q_F/Q_I na resposta de remoção de endotoxinas, observando-se que uma concentração final similar ocorreu para as condições 1,2,3 e 4. Porém para as condições 5 e 6, houve uma diferença na concentração final obtida no reservatório, de 3 e 4% respectivamente em relação as outras condições estudadas. Apesar das pequenas diferenças obtidas entre os valores de porcentagem de endotoxinas removidas para cada experimento, a condição 6 foi a que apresentou uma remoção mais significativa.

A quantidade total de endotoxinas retida no módulo foi de 3234 EU para a condição 1 e 9194 EU para a condição 2. Para experimentos realizados no ponto central (condições 3 e 4) as quantidades de endotoxinas removidas no processo foram 6189 EU e 6276 EU, respectivamente. Para a condição 5, a quantidade retida foi 3134 EU e 9581 EU para a condição 6.

O módulo utilizado nos experimentos apresenta uma área de 50,3 cm². Desta forma, obteve-se uma quantidade média de endotoxinas retida por área de membrana de 64,4 EU/cm² e 182,8 EU/cm² para as condições 1 e 2, 123,0 EU/cm² e 124,8 EU/cm² para as condições 3 e 4 (ponto central). Para a condição 5 e 6 foram obtidos 62,3 EU/cm² e 190,5 EU/cm², respectivamente.

Através da superfície de respostas foi analisada a influência da razão Q_F/Q_I e da concentração inicial de endotoxinas na quantidade de endotoxinas retidas por área de membrana, como mostrado na figura 4.11.

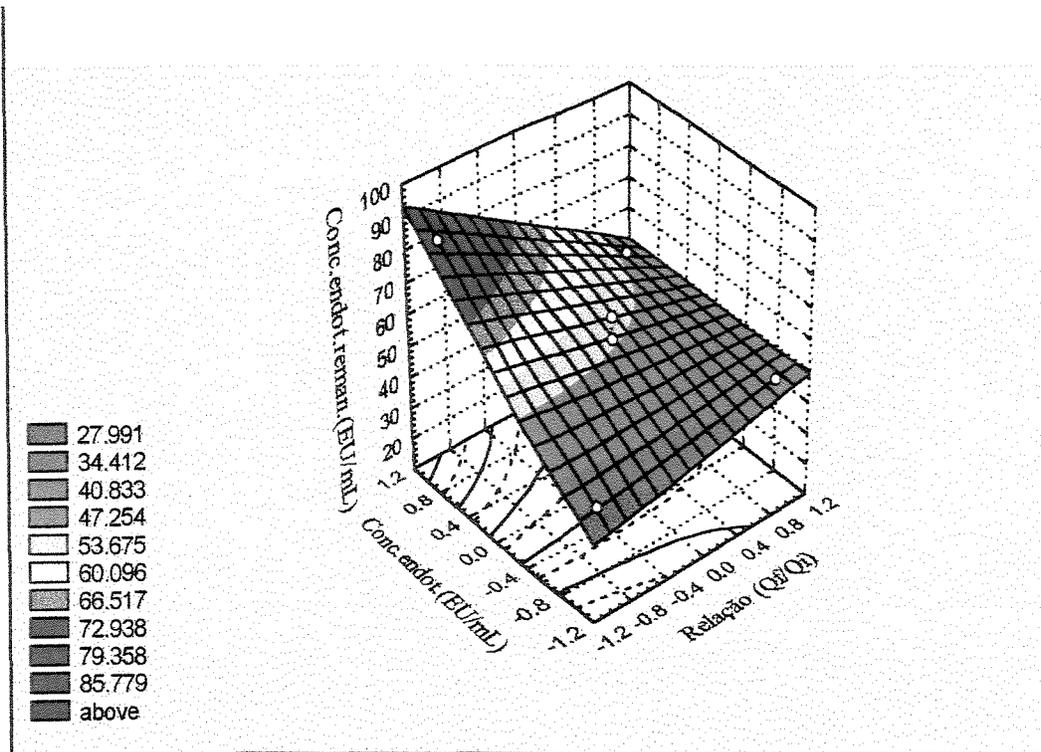


Figura 4.11: Influência da relação Q_F/Q_I e da concentração inicial de endotoxinas na quantidade de endotoxinas retidas no módulo. $R^2=0,999$

A quantidade de endotoxinas retida no módulo aumentou de acordo com a sua concentração inicial na solução do reservatório: quanto maior a concentração inicial, maior a quantidade retida por unidade de área de membrana. Com isso, dentro da faixa estudada, a supõe-se que capacidade máxima do sistema não foi atingida. Seria interessante realizar experimentos com soluções contendo concentração maiores que 1000 EU/mL para verificar em qual condição a capacidade máxima será atingida.

A remoção de endotoxinas da solução do reservatório foi significativa em todos os ensaios realizados, porém a quantidade de anticorpos (IgG) do soro recuperada após a remoção de endotoxinas também deve ser levada em consideração, pois são esses que

neutralizam o veneno da serpente quando inoculado no hospedeiro. Finalizado o experimento de remoção de endotoxinas, a IgG contida na solução do reservatório foi quantificada e está apresentada na tabela 4.3.

Tabela 4.3.: Quantidade de IgG remanescente na solução do reservatório em função das variáveis estudadas.

Condições*	Quantidade de anticorpos		
	Q_F/Q_I	remanescentes (mg)	Recuperação (%)
1	0,5	39,8	70,0
2	0,5	37,1	65,3
3	0,68	33,3	58,6
4	0,68	37,4	65,8
5	0,86	30,6	53,8
6	0,86	31,0	54,6

*O volume da solução no reservatório: 10ml.

A quantidade inicial de anticorpos no reservatório foi de 56,8 mg em 10 mL de solução. Os resultados obtidos mostraram que houve uma maior recuperação de anticorpos nos ensaios realizados nas condições de Q_F/Q_I de 0,5 e 0,68.

A condição 1 (Q_F/Q_I de 0,5 e concentração inicial de endotoxinas 350 EU/mL), foi a que apresentou uma maior recuperação de IgG, possivelmente por ter sido realizado com a maior vazão de retentado e menor concentração de endotoxinas que nas outras condições.

Através dos resultados obtidos, pode-se verificar que uma grande quantidade de anticorpos ainda ficou retida no módulo, possivelmente por fenômenos diferentes da

adsorção. Assim, houve a necessidade de realizar uma lavagem do módulo de filtração com a finalidade de recuperar os anticorpos retidos no interior do mesmo. O módulo foi lavado conforme apresentado na figura 2 com uma solução tampão apirogênica (tampão acetato a pH 6,0). Os resultados são mostrados na tabela 4.4.

Tabela 4.4.: Quantidade de IgG obtida na solução de lavagem em função das variáveis estudadas

Condições*	Quantidade de anticorpos		
	Q_r/Q_t	recuperados (mg)	Recuperação (%)
1	0,5	13,7	94,2
2	0,5	19,1	98,9
3	0,68	15,2	90,6
4	0,68	17,0	90,6
5	0,86	14,7	79,7
6	0,86	16,7	83,9

*O volume da solução no reservatório: 60ml.

Mediu-se também a quantidade de endotoxinas na lavagem. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 4.5.

A partir desses resultados pode-se determinar a quantidade de endotoxinas adsorvidas na membrana através da diferença entre a quantidade de endotoxinas remanescentes no reservatório e a quantidade de endotoxinas obtida na lavagem.

Tabela 4.5.: Endotoxinas obtidas na solução de lavagem em função das variáveis estudadas

Condições*	Q_f/Q_t	Concentração de endotoxinas (EU/mL)	Quantidade de endotoxinas(EU)
1	0,5	39,8	174
2	0,5	37,1	390
3	0,68	33,3	42
4	0,68	37,4	12
5	0,86	30,6	150
6	0,86	31,0	288

*O volume da solução no reservatório: 60ml.

Obteve-se 3060 EU ($60,8 \text{ EU/cm}^2$) de endotoxinas adsorvidas na condição 1 e na condição 2, 8804 EU (175 EU/cm^2). Nas condições do ponto central foram adsorvidas 6147 EU ($122,2 \text{ EU/cm}^2$) e 6264 ($124,5 \text{ EU/cm}^2$). Para as condições 5 e 6 foram adsorvidas 2984 EU ($59,3 \text{ EU/cm}^2$) e 9296 EU ($184,8 \text{ EU/cm}^2$), respectivamente. Verifica-se que para a condição 6 a quantidade de endotoxinas adsorvida foi a maior obtida dentro das condições estudadas.

Para que o soro hiperimune possa ser administrado parenteralmente, é necessário que o mesmo esteja com uma concentração de endotoxinas estipulada pela FDA (“Food and Drug Administration” dos Estados Unidos). No entanto, observou-se através dos resultados obtidos nos experimentos referenciados neste tópico, que não houve uma total remoção de endotoxinas da quantidade inicial introduzida no reservatório. Além disso,

a solução remanescente apresentava uma concentração de endotoxinas acima da recomendada pela FDA (5 EU/kg/h).

Levantou-se algumas hipóteses para explicar o fato de não se ter conseguido nestes experimentos a remoção total de endotoxinas. A primeira hipótese seria o tempo de recirculação de uma hora utilizado nos experimentos não ter sido suficiente para que a quantidade total de endotoxinas fosse adsorvida nas membranas.

A segunda hipótese seria a existência de um arraste das moléculas de endotoxinas que não foram adsorvidas e que se encontravam na região “intraluminal” para a solução do reservatório (válvula da linha do retentado encontrava-se aberta - modo tangencial e circuito fechado). No entanto, como os anticorpos do soro antiofídico (porção F(ab')₂) são moléculas grandes (massa molecular de aproximadamente 92 kDa), é aconselhável realizar a filtração em modo tangencial e não em frontal, para evitar o acúmulo de proteínas na região “intraluminal” provocando a colmatagem das membranas.

A terceira hipótese seria o fato da concentração inicial de endotoxinas na solução ser muito alta, dificultando a total eliminação dos pirogênios (quantidade de endotoxinas removidas foi em torno de 90% em todos os experimentos, independente da concentração inicial utilizada). As endotoxinas e os anticorpos presentes na solução do interior das fibras ocas das membranas poderiam estar interagindo, e formando aglomerados. Esta interação poderia estar impedindo as endotoxinas de ficarem adsorvidas nas membranas, não permitindo a total remoção.

A fim de verificar se a terceira hipótese formula seria correta e tentar obter uma remoção total de endotoxinas, submeteu-se a solução resultante após os experimentos de remoção de pirogênios a uma filtração em modo tangencial e circuito fechado.

4.8. Remoção de endotoxinas de soluções com baixa concentração de endotoxinas.

Almejou-se, através destes experimento, a remoção total de endotoxinas de soluções protéicas contendo baixas concentrações de pirogênios. Assim, se soluções contaminadas com altas concentrações de pirogênios fossem filtradas em His-PEVA e a concentração de endotoxinas na solução resultante ainda estivesse acima da desejada, haveria a possibilidade de recircular novamente a solução através do módulo.

Para a realização do experimento, reuniu-se em um único frasco duas soluções obtidas após o processo de remoção de endotoxinas (tópico 4.7, tabela 4.2, ensaios 3 e 4), resultando em uma concentração de endotoxinas de 65,4 EU/mL e de anticorpos de 3,5 mg/mL. Utilizou-se neste experimento Q_F/Q_I de 0,5 (vazão de alimentação de 1,2 mL/min e 0,6 mL/min para o retentado), pois esta razão foi que apresentou uma remoção de endotoxinas de 92% e uma recuperação de anticorpos de aproximadamente 99% (a maior recuperação encontrada). Como a recuperação de anticorpos é um fator muito importante pois são estes que vão realizar a ação anti-veneno, optou-se pela utilização desta condição neste experimento.

Os experimentos foram realizados em modo tangencial, em circuito fechado e com tempo de recirculação de 1 hora. Os valores obtidos após a remoção de endotoxinas são apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6. : Quantidade de endotoxinas remanescentes no reservatório.

Q_f/Q_i	Volume inicial	Concentração inicial de ET	Quantidade total inicial	Concentração final de ET	Quantidade total final	ET remanescente(%)
0,5	10 mL	65,4 EU/mL	654 EU	0,8 EU/mL	8 EU	1,2

Pode-se verificar através destes resultados que a remoção foi apresentando uma redução de 99% da quantidade inicial. A porcentagem de anticorpos remanescentes na solução do reservatório foi de 56,2%. Para neutralizar os efeitos causados pelo veneno de serpente, a administração de antivenenos é realizada em determinado tempo após o acidente, em quantidades que dependem do estado clínico do paciente. Por exemplo, é aplicada uma ampola de 10 mL e posteriormente é aguardada a reação do paciente, para somente depois administrar outras ampolas.

Assim, para que a solução obtida neste experimento pudesse ser aplicada em um paciente, seria necessário concentrá-la em torno de 6 vezes, através de ultrafiltração (de forma a obter a concentração inicial de anticorpos do soro antibotrópico utilizado de 11,4 mg/mL). Se a solução obtida fosse concentrada 6 vezes, a quantidade de endotoxinas resultante seria de 4,8 EU/mL. Como a administração do soro é feita através de injeção intravenosa, a quantidade máxima de endotoxinas permitida ser aplicada em um indivíduo

segundo a FDA é calculada inicialmente pela através da razão entre o volume máximo administrado (que é de 10 mL por hora) e o peso do indivíduo (estimamos uma média de 60 Kg) e é denominada de dose máxima. Portanto, através do cálculo desta razão, foi obtido uma dose máxima de 0,17 mL/kg. Com isso determinou-se o limite de endotoxinas para este caso, como sendo a relação entre 5 EU/Kg/h e a dose máxima de 0,17 Kg/mL, que foi de 29,4 EU/mL/h. Através dos cálculos realizados foi verificado que é possível a administração de até 62 mL da solução recuperada acima (concentração de endotoxinas de 4,8 EU/mL).

Determinou-se também, nestes experimentos, a quantidade de endotoxinas obtidas com a lavagem do módulo, como mostrado na tabela 4.7.

Tabela 4.7 : Quantidade de endotoxinas obtidas com a lavagem

Q_F/Q_I	Volume obtido na lavagem	Concentração obtida na lavagem	Quantidade total obtida
0,5	60 mL	0,42 EU/mL	25,2 EU

Com estes resultados, tem-se neste processo, a quantidade de endotoxinas adsorvidas nas membranas His-PEVA, que foi de 12,34 EU/cm².

Pode-se provar com os resultados dos experimentos descritos neste tópico, que para baixas concentrações de endotoxinas (menores que 60 EU/mL) na solução protéica, a remoção de pirogênios é praticamente completa (concentração de 0,42 EU/mL após a lavagem).

Ao final destes experimentos uma questão foi levantada: qual seria a influência do aumento da concentração de anticorpos no processo de remoção de endotoxinas, uma vez que existem soros antiofídicos com maior concentração de anticorpos, como por exemplo, o soro antibotrópico laquético.

4.9. Influência do aumento da concentração de anticorpos no processo de remoção de endotoxinas

O objetivo destes experimentos foi verificar se o aumento da concentração de anticorpos teria influência na quantidade de endotoxinas removida da solução contaminada. Utilizou-se, para a realização destes experimentos uma solução de soro antibotrópico laquético, por possuir uma alta concentração de endotoxinas de 30 mg/mL (com a diluição na solução tampão a concentração de anticorpos foi de 15 mg/mL) e contaminada com 350 EU/mL de endotoxinas. Os experimentos foram realizados em modo tangencial, em circuito fechado e com tempo de recirculação de 1 hora. Foram realizados dois experimentos, nos quais ficou-se a concentração de endotoxinas e as relações Q_F/Q_I em 0,5 e 0,86. Com estes ensaios foram obtidos os resultados mostrados nas tabelas 4.8 e 4.9.

Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos com experimentos realizados com soro antibotrópico nas mesmas condições (concentração inicial de endotoxinas de 350 EU/mL Q_F/Q_I de 0,5 e 0,86, tabela 4.2., ensaios 1 e 5), observou-se que o aumento na concentração de anticorpos resultou em uma maior remoção de endotoxinas (aumento de 6 a 8%). Para uma concentração menor de anticorpos como nos experimentos do tópico

anterior, a quantidade de endotoxinas remanescentes no reservatório foi de 266 e 366 EU para Q_F/Q_I de 0,5 e 0,86, respectivamente.

Tabela 4.8 : Endotoxinas remanescentes na solução do reservatório.

Ensaio*	Q_F/Q_I	Concentração inicial	Quantidade total inicial	Concentração final	Quantidade total final	ET remanescentes
1	0,5	350,6 EU/mL	3506 EU	5,9 EU/mL	59 EU	1,7%
2	0,86	350,6 EU/mL	3506 EU	4,6 EU/mL	46 EU	1,3%

* O volume da solução no reservatório: 10ml.

Tabela 4.9 : Quantidade de anticorpos remanescentes na solução do reservatório.

Ensaio*	Q_F/Q_I	Concentração inicial	Quantidade total inicial	Concentração final obtida	Quantidade total final	IgG remanescentes
1	0,5	15 mg/ml	150 mg	8,8 mg/mL	88 mg	58,6%
2	0,86	15 mg/ml	150 mg	7,2 mg/mL	72 mg	48%

* O volume da solução no reservatório: 10ml.

Analisando a porcentagem de anticorpos remanescentes (tabela 4.9) em relação aos dados da tabela 4.3, nota-se que o aumento da concentração destes na solução inicial resultou em uma maior retenção dos mesmos na membrana. Além disso, com a razão Q_F/Q_I

de 0,5 houve uma maior quantidade de anticorpos remanescentes, confirmando que a vazão de retentado mais elevada evita a retenção de moléculas no espaço “intraluminal”.

O fato de ter havido uma maior remoção de endotoxinas, deve-se talvez à formação de aglomerados entre as moléculas de pirogênios e anticorpos, provocando, assim uma retenção dos mesmos no interior do espaço “intraluminal”.

Realizou-se também nestes experimentos a lavagem do módulo pelo motivo já descrito anteriormente e os resultados estão apresentados nas tabelas 4.10 e 4.11.

Tabela 4.10: Quantidade de IgG obtida na solução de lavagem em função da variável estudada

Ensaio	Q_F/Q_I	Concentração final de IgG	Volume total da lavagem	Quantidade total de anticorpos após a lavagem	% de IgG obtidos na lavagem
1	0,5	0,47 mg/ml	118,2 mL	55,5 mg	37%
2	0,86	0,47 mg/ml	121,8 mL	57,2 mg	38%

Tabela 4.11: Endotoxinas obtidas na solução de lavagem em função da variável estudada

Ensaio	Q_F/Q_I	Concentração final	Volume total da lavagem	Quantidade total de endotoxinas após a lavagem	Porcentagem de LPS obtida na lavagem
1	0,5	6,3 EU/ml	118,2 ml	744,6 EU	21%
2	0,86	4,1 EU/ml	121,8 ml	499,4	14,2%

A porcentagem total recuperada de anticorpos foi 95,6% para o ensaio 1 e 86,1% para o ensaio 2, não havendo diferença significativa dos experimentos realizados com o planejamento experimental nas mesmas condições (ensaio 1 e 5).

A quantidade total de endotoxinas na solução inicial foi de 3506 EU para cada ensaio. No ensaio 1, a soma da quantidade de endotoxinas remanescentes no reservatório e a obtida na lavagem foi de 803,6 EU (22,9% da quantidade total), ou seja 2702,4 EU (77,1%) ficaram adsorvidas em His-PEVA. Para o ensaio 2, a soma da quantidade de endotoxinas remanescente no reservatório e a obtida na lavagem foi de 545,4 EU (15,6% do total), ficando 2960,6 EU (84,4%) adsorvidas nas membranas.

Esperava-se que o aumento da concentração de anticorpos na solução resultasse em uma menor quantidade de endotoxinas adsorvida, pois existiria uma maior “competição” entre anticorpos e moléculas de endotoxinas pelo ligante imobilizado. No entanto, obteve-se com os ensaios do planejamento experimental uma adsorção de endotoxinas de 60,8 EU/cm² para a condição 1 (Q_F/Q_I de 0,86) e com os ensaios onde houve o aumento da concentração de anticorpos, uma adsorção de 53,7 EU/cm² para o ensaio 1 (Q_F/Q_I de 0,5) e 58,9 EU/cm² para o ensaio 2 (Q_F/Q_I de 0,86). Verificou-se com estes resultados que não existe variação significativa da quantidade de endotoxinas adsorvidas com o aumento da concentração de anticorpos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO E SUGESTÃO PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. CONCLUSÃO

O aminoácido histidina imobilizado em fibras ocas de PEVA foi avaliado neste trabalho como ligante pseudobioespecífico para a remoção de endotoxinas de soros antiofídicos. O estudo dos efeitos do tipo de tampão e do pH sobre a etapa de adsorção permitiu identificar as condições que propiciaram a adsorção menos favorável de anticorpos e, ao mesmo tempo, uma adsorção significativa de endotoxinas. Deste estudo concluiu-se que a solução tamponante acetato de sódio a pH 6,0 possivelmente evitou uma competição entre essas duas moléculas pelo sítio de adsorção do ligante imobilizado.

Através de um planejamento estatístico experimental, foi investigado a influência das variáveis Q_F/Q_I e concentração inicial de endotoxinas no reservatório na etapa de retenção de pirogênios e anticorpos nas membranas His-PEVA. Os resultados obtidos mostraram que, dentro das faixas de valores estudada, Q_F/Q_I não apresentou efeito significativo na retenção de endotoxinas. Quanto aos anticorpos, uma grande quantidade destas moléculas ficaram retidas no módulo em todos os experimentos, possivelmente por fenômenos diferentes de adsorção, tendo-se verificado um pequeno efeito de Q_F/Q_I nesta

retenção. Dessa forma, houve a necessidade de realizar uma lavagem do módulo de filtração com a finalidade de recuperar os anticorpos retidos no interior do mesmo, tendo-se conseguido após a lavagem uma recuperação total em torno de 90%. O planejamento estatístico experimental também possibilitou constatar que a quantidade de endotoxinas retida no módulo aumentou de acordo com a sua concentração inicial na solução do reservatório (quanto maior a concentração, maior a quantidade retida por unidade de área de membrana) e que a capacidade máxima de adsorção das membranas His-PEVA não foi atingida (obteve-se, com os experimentos realizados, uma adsorção de 184,8 EU/cm²).

Apesar dos dados experimentais obtidos terem demonstrado a eficácia das membranas ao remover endotoxinas de soros antiofídicos, esta remoção não atingiu 100%. Os resultados demonstraram que a concentração final de endotoxinas remanescentes no reservatório, obtida após o processo de remoção foi adequada somente para aplicações onde a administração da solução seja até 60 mL por hora. Tendo verificou-se que, para baixas concentrações de endotoxinas na solução protéica, a remoção de pirogênios em His-PEVA é praticamente completa (obteve-se 99% de redução da quantidade inicial). Apesar de ter ocorrido uma remoção significativa, sugere-se realizar uma filtração adicional com o intuito de remover todas as endotoxinas remanescentes.

O estudo do efeito do aumento da concentração de anticorpos no processo de remoção de endotoxinas demonstrou que este aumento não resulta em uma diminuição significativa da quantidade de endotoxinas adsorvida (60,8 EU/cm² e 53,8 EU/cm² para concentrações de anticorpos de 5,7 mg/mL e 15,0 mg/mL, respectivamente), podendo-se,

desta forma, possivelmente operar o sistema com concentração de anticorpos ainda mais elevada.

Pode-se concluir com o trabalho realizado que o processo de filtração em membranas His-PEVA mostrou-se eficiente para a remoção de endotoxinas de soros antiofídicos quando contaminados artificialmente e que estas membranas apresentam um grande potencial como uma alternativa aos sistemas já existentes para a remoção de endotoxinas de soluções protéicas.

5.2 Sugestões para próximos trabalhos

tendo-se constatado, nestes trabalho, que o aminoácido histidina imobilizado em membranas de fibras ocas de PEVA remove de maneira eficaz endotoxinas de soluções de soros antiofídicos contaminadas artificialmente, recomenda-se dar continuidade a esta pesquisa, sugerindo:

- Realizar um planejamento experimental estatístico quadrático para determinar as melhores condições de remoção de endotoxinas;
- Realizar a remoção de endotoxinas filtrando a solução em modo frontal, de forma a minimizar a quantidade de endotoxinas não retidas no interior do módulo;

- Determinar a capacidade máxima de adsorção de endotoxinas da membrana His-PEVA;
- Utilizar este processo para remover endotoxinas de outros soros hiperimunes e vacinas contaminadas com estes pirogênios.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNER,N.; FLINK,O.; NYSTRAND, R.; PHIL, B.; VEGIS, P. Collaborative Study of a Control Standard Endotoxin Using the Limulus Amebocyte (gel-clot) Test. Journal of Parenteral Science & Technology, **45 (2)** , 88-93, 1991.
- ANSPACH,F.B. e HILBERT O. Removal of Endotoxins by Affinity Sorbents. Journal of Chromatography A, **711**, 81-92, 1995.
- BAMBA,T.; MATSUI,R.; WATABE;K. Effect of Steam-Heat Treatment with/without Divalent Cations on the Inactivation of Lipopolisaccharides from Several Bacterial Species. PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, **50 (2)**, 129-134, 1996.
- BERNE, R.M.; LEVY, M. N.; Fisiologia. Editora Guanabara Coogan S.A.,Segunda Edição,1990.
- 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, **72**, 248-254, 1976.
- BRANDT, S.; GOFFE, R.A.; KESSLER, S.B.; O'CONNOR, J.L.; ZALE,S.E. Membrane-Basead Affinity Technology for Commercial Scale Purifications. Biotechnology, **6**, 780-782, 1988.

- BUENO, S.M.A. Tese de Doutorado. Título: Séparation d'immunoglobuline G à partir du sérum ou du plasma humain en utilisant le ligand L-histidine immobilisé sur les membranes à fibres creuses - Université de Technologie de Compiègne, Laboratoire d'Interaction Moleculaires et de Technologie des Séparations, Compiègne - França. 1995.
- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. *In vitro* Removal of Human IgG by Pseudobiospecific Affinity Membrane Filtration on a Large Scale. A Preliminary Report. The International Journal of Artificial Organs, **18**, 392-398; 1995a.
- BUENO, S.M.A.; HAUPT, K.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Separation of Immunoglobulin G from Human Serum by Psedochromatography Using Immobilized L-Histidine in Hollow Fibre Membranes. Journal of Chromatography B, **667**, 57-67, 1995b.
- 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, **117**, 45-56. 1996.
- DUNÉR, K.I. The Importance of the Quality of Water in Limulus Amebocyte Lysate Test; PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, **49(3)**, 119-121, 1995.
- EVANS-STRICKFADEN, T.T.; OSHIMA, K.H.; HIGHSMITH A.K.; ADES, E.W. Endotoxin Removal Using 6,000 Molecular Weight Cut-Off Polyacrylonitrile (PAN) e Polysulfone (PS) Hollow Fiber Ultrafilters. PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, **50(3)**, 154-157, 1995.
- EZZEDINE, M.; LAWNY, F. & VIJAYALAKSHMI, M.A. Purification and

- Depyrogenation of Antihemophilic FVIII:C from Human Plasma. Biotechnology of Blood Proteins, **227**, 115-123, 1993.
- GUYTON A.C. & HALL J.E. Textbook of Medical Physiology. 9 Edition. W.B. Saunders Company, 1996, p. 1064, EUA
- HANNECART-POKORNI, E; DEKEGEL, D. e DEPUYDT, F. Macromolecular Structure of Lipopolysaccharides from Gram-Negative Bacteria. European Journal of Biochemistry, **38**, 6-13, 1973.
- HAUPT, K; BUENO, S.M.A e VIJAYALAKSHMI, M.A. Interaction of Human Immunoglobulin G with L-Histidine Immobilized Onto Poly (ethylene vinyl alcohol) Hollow Fiber Membranes. Journal of Chromatography B, **674**, 13-21, 1995.
- HELANDER; I.M. e VAARA; M. Reversible Binding of *Salmonella typhimurium* Lipopolysaccharides by Immobilized Protamine. European Journal of Biochemistry, **163**, 51-55, 1987.
- HIRAYAMA, C.; SAKATA, M.; MORIMOTO, S.; TACHIBE, H.; IHARA, H.; OHKUMA, K.; MIYACHI, Y. The Removal of Endotoxins from Protein Solution Using Column Packing with Aminated Poly(γ -methyl L-glutamate) Spheres. Chromatographia, **40(1/2)**, 33-38, 1995.
- KLEIN, E. Affinity Membranes: Their Chemistry and Performance in Adsorptive Separation Processes, John Wiley and Sons, Inc., EUA, 1991.
- LEGALLAIS, C. ; ANSPACH, F.B.; BUENO, S.M.A.; HAUPT, K. ; VIJAYALAKSHMI, M.A. Strategies for the Depyrogenation of Contaminated Immunoglobulin G

- Solutions by Histidine-Immobilized Hollow Fiber Membrane. Journal of Chromatography B, **691**, 33-41, 1997.
- MATSUMAE, H.; MINOBE, S.; KINDAN, K.; WATANABE, T.; SATO, T.; TOSA, T. Specific Removal of Endotoxin from Protein Solutions by Immobilized Histidine. Biotechnology and Applied Biochemistry, **12**, 129-140. 1990.
- MINOBE,S.; WATANABE,T.; SATO,T.; TOSA, T. Characteristics and Applications of Adsorbents for Pyrogen Removal. Biotechnology and applied biochemistry, **10**, 143-153, 1988.
- MINOBE,S.; WATANABE,T.; SATO,T.; TOSA, T; CHIBATA, I. Characteristics of Immobilized Histamine for Pyrogen Adsorption. Journal of Chromatography, **262**, 193-198, 1983.
- MINOBE,S.; WATANABE,T.; SATO,T.; TOSA, T; CHIBATA, I. Preparation of Adsorbents for Pyrogen Adsorption. Journal of Chromatography, **248**, 401-408, 1982.
- NAKATA, T. Destruction of Challenged Endotoxin in a Dry Heat Oven. Journal of Pharmaceutical Science & Technology, **48(2)**, 59-63, 1994.
- NEIDHARDT, E.A.; LUTHER, M.A.; RECNY, M.A. Rapid, Two-Step Purification Process for the Preparation of Pyrogen-Free Murine Immunoglobulin G₁ Monoclonal Antibodies. Journal of Chromatography, **590**, 255-261, 1992.
- NETO B.B., SACARMINIO I.S., BRUNS R.E. Planejamento e Otimização de Experimentos; Editora da UNICAMP. 1995.

- PEARSON, F.C. Pyrogens. Endotoxins, LAL Testing, and Depyrogenation. Marcel Dekker, Inc. 1985.
- ROBERT M. BERNE e MATTHEW N. LEVY. Fisiologia, Ed. Guanabara Koogan S.A. 1988, p. 818, RJ.
- ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Atenuação da Toxicidade de Venenos Ofídicos por Meio da Radiação Ionizante. Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento, 2, 24-26, 1997.
- SCHINDLER, R. E DINARELLO, C.A. A Method for Removing Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor-Inducing Substances from Bacterial Cultures by Ultrafiltration with Polysulfone. Journal of Immunological Methods, 116, 159-165, 1989.
- SHARMA, S.K. Endotoxin Detection and Elimination in Biotechnology. Biotechnology and Applied Biochemistry, 8, 5-22, 1986.
- TALMADGE, K.W. e SIEBERT C.J. Efficient Endotoxin Removal with a New Sanitizable Affinity Column: Affi-Prep Polymyxin. Journal of Chromatography A, 476, 175-185, 1989.
- TANAKA, S; IWANAGA, S. Proteolytic Enzymes in Coagulation, Fibrinolysis and Complement Activation-Limulus Test for Detecting Bacterial Endotoxins-Part B. Methods in Enzymology, 223, 359-365, 1993.
- TANAMOTO, K. Interaction of Pathogenic Bacteria With Host Cells-Induction of Prostaglandin Release from Macrophages by Bacterial Endotoxin-Bacterial Pathogenesis-part B. Methods in enzymology, 236, 31-41, 1994.

- THOMMES, J. e KULA, M. R. Membrane Chromatography - an Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins. Biotechnology Progress, **11**, 357-367, 1995.
- UNARSKA, M.; DAVIES, P.A.; ESNOUF, M.P. e BELHOUSE, B.J. Comparative Study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems; Journal of Chromatography A, **519**, 53-67, 1990.
- VANDER SHERMAN- LUCIANO. Fisiologia Humana, Mc. Graw Hill do Brasil, 1981, p. 812. SP.
- VELARDE, D.T., Responsável pela produção dos soros da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Comunicação pessoal.
- VIJAYALAKSMI, M.A. Pseudobiospecific Ligand Affinity Chromatography; Trends in Biotechnology, **7(3)**, 71-76, 1989.
- WAKITA M.; ADACHI T.; IDA J.; HASHIMOTO M. Selective Adsorption of Lipopolisaccharide from Protein Solution by Porous Supports Bearing Cationic Lipid Membranes; Bull. Chem. Soc. Jpn., **69**, 1017-1021, 1996.
- WALSH e HEADON, Protein Biotechnology. Ed Wiley, primeira edição, 1974.
- WALTERS, R.R. Affinity Chromatography; Analytical Chemistry, **57**, 11, 1099A-1114A, 1985.
- WEI GUO, ZHENHUA SHANG, YINIAN YU and LIANGMO ZHOU Removal of Endotoxin from Aqueous Solutions by Affinity Membrane; Biomedical Chromatography, **11**, 164 - 166, 1997.