



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

FRANCISCO DE ASSIS FERREIRA DE OLIVEIRA

**MICROESFERAS DE QUITOSANA SULFATADAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO
EM PURIFICAÇÃO DE IgG: ESTUDO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

FORTALEZA

2017

FRANCISCO DE ASSIS FERREIRA DE OLIVEIRA

MICROESFERAS DE QUITOSANA SULFATADAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM
PURIFICAÇÃO DE IgG: ESTUDO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.

Coorientadora: Msc. Larissa da Silva Laurentino.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O47m Oliveira, Francisco de Assis Ferreira de.
Microesferas de quitosana sulfatadas com potencial aplicação em purificação de IgG : estudo das condições operacionais / Francisco de Assis Ferreira de Oliveira. – 2017.
53 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior.

Coorientação: Profa. Ma. Larissa da Silva Laurentino.

1. Imunoglobulinas. 2. Cromatografia por troca iônica. 3. Quitosana. 4. Adsorção. I. Título.

CDD 660

FRANCISCO DE ASSIS FERREIRA DE OLIVEIRA

MICROESFERAS DE QUITOSANA SULFATADAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM
PURIFICAÇÃO DE IgG: ESTUDO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Junior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Larissa da Silva Laurentino (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Paula Luciana Rodrigues de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e força para chegar cada vez mais longe.

A minha família, por todo o suporte que me foi dado e por toda a confiança depositada em mim. Aos meus pais, Eneide e Ribamar, por todo o apoio e auxílio sempre que precisei. A minha irmã, Mariana, pelo seu companheirismo.

A esta universidade, pela infraestrutura e oportunidade de obter essa formação.

Ao professor Ivanildo Silva Jr., pela oportunidade de ingressar em seu laboratório de pesquisa e pelo seu acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

A Larissa Laurentino, pela sua paciência e orientação no desenvolver do projeto e por ter me ensinado tanto sobre a pesquisa.

A Paula Luciana, por toda ajuda e disposição em participar da banca avaliadora.

A professora Rílvia Saraiva, pelo acompanhamento e atenção no desenvolver deste trabalho final de curso.

Aos meus amigos, Santangela Oliveira, Matheus Lopes, Victor Farias, Paula Pereira e Ítalo Ximenes, por todo o apoio moral e suporte dado no desenvolver desse trabalho.

A todos os amigos que fiz no LP1, pela ótima convivência e por todas as contribuições que me deram.

A todos os amigos que já fiz, nessa trajetória acadêmica, que me auxiliaram a trilhar esse caminho rumo à formatura e que impactaram positivamente minha vida.

A todos que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro durante o período junto ao programa de iniciação científica.

“Mesmo que não tenhamos o poder de escolher quem vamos ser, ainda podemos escolher aonde iremos a partir daqui.”

Stephen Chbosky

RESUMO

As imunoglobulinas do isotipo G (IgG) são proteínas sanguíneas de grande interesse para aplicações terapêuticas e diagnósticos de algumas doenças. Para viabilizar essas aplicações é necessário que a IgG seja obtida em elevado grau de pureza, o que tem motivado o emprego de diversas técnicas de purificação desta. Este trabalho teve por finalidade encontrar melhores condições de adsorção para purificação de IgG humana, utilizando microesferas de quitosana sulfatadas (MQS). Os ensaios adsorptivos foram realizados em batelada com IgG humana de alta pureza para analisar a influência do tipo de tampão, da faixa de pH, da massa de adsorvente, da concentração inicial da solução de IgG e do tempo de contato no processo. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se uma maior capacidade adsorptiva para os ensaios utilizando 5 mg do adsorvente mantidos em contato com solução de IgG 0,75 mg/mL em tampão HEPES a pH 6,8, onde, nessas condições, a quantidade adsorvida foi de aproximadamente 260 mg/g. As cinéticas e isotermas foram obtidas na melhor condição de adsorção. O perfil cinético mostrou que o tempo de equilíbrio foi de 10 horas e os ajustes da isoterma foram satisfatoriamente representados pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, fornecendo valores de capacidade máxima de adsorção de 306 e 284 mg/g, respectivamente. Comparativamente, foram obtidos os perfis cinéticos e as isotermas para ensaios utilizando como adsorvente microesferas de quitosana não sulfatadas (MQ). Para estas, a adsorção de IgG alcançou o equilíbrio em 6 horas, com quantidade adsorvida de 160 mg/g e os ajustes das isotermas realizados pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich resultaram em capacidades adsorptivas de 405 e 466 mg/g, respectivamente. Comparando-se as curvas isotermas obtidas para os dois adsorventes, verificou-se que, em relação às quantidades adsorvidas de imunoglobulina G, as MQS apenas superam as MQ em casos onde a concentração de IgG em solução, no equilíbrio, é de até 0,8 mg/mL. A partir de ensaios com misturas binárias IgG/BSA, em diferentes proporções mássicas, foi possível verificar que a presença de BSA em solução interfere na adsorção de IgG e, por meio de eletroforeses SDS-PAGE, pode-se observar que as MQS são mais seletivas à imunoglobulina G do que à albumina. Desse modo, é possível concluir que as MQS têm potencial para aplicação em processos de purificação de IgG, sendo mais apropriadas para processos de concentração da imunoglobulina.

Palavras-chave: Imunoglobulinas. Cromatografia por troca iônica. Quitosana. Adsorção.

ABSTRACT

Immunoglobulins of G isotype (IgG) are blood proteins of great interest for therapeutic applications and diagnosis of some diseases. To make these applications viable, it is necessary that the IgG obtained has a high degree of purity, which has motivated the use of several purification techniques. This work aimed to find better adsorption conditions for human IgG purification, using sulfated chitosan microspheres (SCM). The adsorbent assays were performed in batch with high purity human IgG to analyze the influence of the buffer's type, the pH range, the adsorbent mass, the initial concentration of IgG solution and the contact time in the process. According to the obtained results, it was observed a greater adsorptive capacity in the assays using 5 mg of the adsorbent kept in contact with 0.75 mg/mL IgG solution in HEPES buffer at pH 6.8, in which, under these conditions, the adsorbed amount was about 260 mg/g. The kinetics and isotherms were obtained in the best adsorption condition. The kinetic adsorption profile shows that the equilibrium time was 10 hours and the isotherm adjustments were satisfactorily represented by the Langmuir and Langmuir-Freundlich models, providing maximum adsorption capacity values of 306 and 284 mg/g, respectively. Comparatively, the kinetic profiles and the isotherms were obtained for assays using as adsorbent non-sulfated chitosan microspheres (CM). To these, the adsorption of IgG reached the equilibrium in 6 hours, with adsorbed amount of 160 mg/g and the isothermal adjustments made with the Langmuir and Langmuir-Freundlich models resulted in adsorptive capacities of 405 and 466 mg/g respectively. Comparing the isothermal curves obtained for the two adsorbents, it was found that, in relation to the adsorbed amounts of immunoglobulin G, the SCM surpasses the CM only in cases where the IgG concentration in solution, at equilibrium, is up to 0.8 mg/mL. From the assays with IgG/BSA binary mixtures, in different mass proportions, it was possible to verify that the presence of BSA in solution interferes in the adsorption of IgG and, by SDS-PAGE electrophoresis, it can be observed that the SCM are more selective to immunoglobulin G than to albumin. Thus, it is possible to conclude that SCM have potential for application in IgG purification processes, being more appropriate for immunoglobulin concentration processes.

Keywords: Immunoglobulins. Ion-exchange chromatography. Chitosan. Adsorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de uma Imunoglobulina.....	18
Figura 2 – Demanda mundial de Imunoglobulinas de aplicação endovenosa ou subcutânea..	21
Figura 3 – Uso de Imunoglobulinas no mundo	21
Figura 4 – Estrutura da Quitina	24
Figura 5 – Estrutura da Quitosana	25
Figura 6 – Procedimento de preparação das microesferas de quitosana sulfatadas a partir de modificações às metodologias propostas por Pires <i>et al.</i> (2013) e Moraes (2016)	29
Figura 7 – Representação do sistema de agitação para ensaios em batelada	30
Figura 8 – Microesferas de quitosana (a) e microesferas de quitosana sulfatadas (b)	34
Figura 9 – Espectro na região do infravermelho das amostras (a) microesferas de quitosana natural, (b) microesferas de quitosana sulfatadas não reticuladas, (c) microesferas de quitosana sulfatadas e reticuladas.....	36
Figura 10 – Efeito do pH e do tipo de tampão na adsorção de IgG utilizando MQS ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 2 h).....	38
Figura 11 – Quantidade adsorvida em estudo da massa de MQS na adsorção de IgG ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Duração = 2 h, HEPES pH 6,8)	39
Figura 12 – Massa adsorvida em estudo da massa de MQS na adsorção de IgG ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Duração = 2 h, HEPES pH 6,8)	39
Figura 13 – Variação da quantidade adsorvida em ensaios cinéticos com MQS e MQ na adsorção de IgG ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Massa de adsorvente = 5 mg, HEPES pH 6,8).....	40
Figura 14 – Variação da concentração da fase líquida em ensaios cinéticos com MQS e MQ na adsorção de IgG ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Massa de adsorvente = 5 mg, HEPES pH 6,8).....	41
Figura 15 – Isoterma de adsorção de IgG utilizando MQS (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8).....	42
Figura 16 – Isoterma de adsorção de IgG utilizando MQ (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8).....	42
Figura 17 – Comparativo entre isotermas de adsorção de IgG utilizando MQ e MQS com ajuste de Langmuir (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8).....	44

Figura 18 – Efeito da presença da proteína BSA na adsorção de IgG utilizando MQS (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8, 1,0 mg/mL de IgG/BSA)..... 45

Figura 19 – Eletroforese das amostras dos ensaios com misturas IgG/BSA, utilizando MQS (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8, 1,0 mg/mL de IgG/BSA) 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das classes de Imunoglobulinas no soro	19
Tabela 2 – Propriedades das subclasses de Imunoglobulinas G.....	19
Tabela 3 – Frações mássicas utilizadas nos ensaios de adsorção com mistura IgG/BSA	33
Tabela 4 – Parâmetros de ajuste obtidos a partir dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) ajustado aos dados experimentais na adsorção de IgG com MQS e MQ	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina do soro bovino
DMF	N-N-Dimetilformamida
EV	Endovenosa
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazino-N'-2-etanosulfônico
HSA	Albumina do soro humano
IgA	Imunoglobulina do isotipo A
IgD	Imunoglobulina do isotipo D
IgE	Imunoglobulina do isotipo E
IgG	Imunoglobulina do isotipo G
IgM	Imunoglobulina do isotipo M
L	Modelo de Langmuir
LF	Modelo de Langmuir-Freundlich
MES	Ácido morfolinoetanosulfônico
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
MQ	Microesferas de quitosana
MQS	Microesferas de quitosana sulfatadas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
SB	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Trizima

LISTA DE SÍMBOLOS

C_0	Concentração inicial da fase líquida
C_{eq}	Concentração da fase líquida no equilíbrio
C_f	Concentração final da fase líquida
k_L	Constante de Langmuir
k_{LF}	Constante de Langmuir-Freundlich
m_{ads}	Massa de adsorvente
N	Parâmetro de cooperatividade do sistema
n	Fração mássica de IgG na mistura IgG/BSA
q	Quantidade adsorvida por grama de adsorvente
q_{max}	Capacidade máxima de adsorção
R^2	Coefficiente de determinação
V_{sol}	Volume de solução de adsorbato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Imunoglobulinas	17
2.2	Purificação de IgG	20
2.3	Cromatografia de Troca Iônica	22
2.4	Matriz Polimérica do Adsorvente	24
3	METODOLOGIA	27
3.1	Materiais	27
3.2	Síntese das microesferas de quitosana sulfatadas	27
3.3	Caracterização dos adsorventes	29
3.3.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho – FTIR</i>	29
3.3.2	<i>Avaliação da estabilidade química</i>	29
3.4	Ensaio de adsorção com IgG de alta pureza	30
3.5	Ensaio de adsorção com mistura IgG/BSA	32
3.6	Eletroforeses	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Síntese das microesferas de quitosana sulfatadas	34
4.1.1	<i>Espectroscopia de FTIR</i>	35
4.1.2	<i>Estabilidade química</i>	36
4.2	Ensaio de adsorção com IgG de alta pureza	37
4.2.1	<i>Estudo do pH</i>	37
4.2.2	<i>Estudo da massa</i>	38
4.2.3	<i>Cinéticas de adsorção</i>	40
4.2.4	<i>Isotermas de adsorção</i>	41
4.3	Ensaio de adsorção com mistura IgG/BSA	44

5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas são componentes importantes do sistema imunológico, atuando como receptores para antígenos específicos, ou dispersos no sangue, promovendo a imunidade humoral. Estas apresentam alta afinidade e especificidade e, por isso, vem sendo empregadas em diversas aplicações em biotecnologia, diagnósticos de algumas doenças e propósitos médicos, dentre outros (ROQUE, SILVA e TAIPA, 2007).

Atualmente, a imunoglobulina G (IgG) e a albumina do soro humano (do inglês, *Human Serum Albumin* – HSA), componentes majoritários do plasma humano, são comumente isoladas industrialmente por meio da metodologia de Cohn (COHN *et al*, 1946), processo de fracionamento com etanol a frio que se baseia na diferença de solubilidade entre as proteínas plasmáticas proporcionadas por variações de pH, concentração de etanol, temperatura, força iônica e concentração proteica. Todavia, esse método não é altamente seletivo, de modo que métodos cromatográficos passaram a ser empregados como uma etapa complementar ou em substituição da metodologia clássica (BRESOLIN, SOUZA e BUENO, 2010; HOFBAUER *et al*, 2012).

A cromatografia representa uma ferramenta primordial para a extração de compostos biológicos, podendo conferir um elevado grau de pureza, requisito fundamental para aplicações *in vivo*, e condições que preservem suas características biológicas (ROQUE, SILVA e TAIPA, 2007; BURNOUF, 1995). Uma vez que muitas proteínas apresentam capacidade de se ligar a moléculas específicas de forma não covalente, essa especificidade proporcionada pelo ligante é empregada para adsorção seletiva da molécula alvo em misturas de proteínas, por meio da cromatografia de afinidade (SANTOS, 2017). No entanto, o custo para emprego desta técnica de separação bioquímica é relativamente alto, em comparação com outras técnicas, e demanda um processo de eluição um pouco mais complexo, uma vez que as proteínas adsorvidas neste processo têm grande afinidade pelas matrizes utilizadas. Assim, novos estudos são realizados a fim de desenvolver processos que gerem menores custos e que proporcionem elevada seletividade ao componente desejado.

Dentre os diversos métodos cromatográficos, os processos de troca iônica mostram-se atrativos e economicamente viáveis, por se tratar de uma técnica vastamente estudada e de fácil operação, o que a torna a técnica mais empregada para a purificação de proteínas (FERREIRA, 2017; PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Devido às suas propriedades como a biocompatibilidade e biodegradabilidade, bem como pela sua ampla biodisponibilidade, a quitosana é um biomaterial aplicado em diversas áreas tecnológicas, sendo inclusive utilizada como resina de troca iônica em processos cromatográficos, como apresentado em Wan Ngah e Fatinathan (2010). Aliado a isso, sua estrutura permite modificações químicas seletivas devido às diferenças de reatividade dos grupos amino e das hidroxilas que a constituem. Há vários estudos que reportam aplicações para reações de sulfatação de polissacarídeos, as quais resultam em alterações de suas atividades biológicas, bem como de sua solubilidade em água (MOURA NETO, 2013; VIEIRA, 2012). Ainda, de acordo com Ferreira (2017), resinas contendo grupos funcionais sulfônicos ($-\text{SO}_3\text{H}$) tendem a ser fortemente catiônicas.

Assim, este trabalho abordará a síntese de adsorvente a base de quitosana, com posterior modificação por sulfatação, a fim de aumentar a sua capacidade adsortiva como resina catiônica para aplicação em processo de purificação de imunoglobulina G por cromatografia de troca iônica.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral encontrar melhores condições operacionais de adsorção de Imunoglobulina G utilizando microesferas de quitosana sulfatadas. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a influência do pH de diferentes tampões biológicos;
- Acompanhar o comportamento cinético e das isotermas de adsorção com IgG;
- Comparar os resultados obtidos utilizando microesferas de quitosana sulfatadas com os de microesferas de quitosana não-sulfatadas;
- Realizar ensaios de adsorção com misturas de IgG e BSA, em diferentes proporções.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica do presente trabalho está dividida em quatro partes: imunoglobulinas, purificação de IgG, cromatografia de troca iônica e matriz polimérica do adsorvente.

2.1 Imunoglobulinas

Constantemente os seres humanos são expostos a inúmeros patógenos existentes no ambiente, por meio de contato, de inalação e de ingestão (ALBERTS *et al*, 2010). Ademais, estima-se que o microbioma humano seja composto por cem trilhões de microrganismos, número que é aproximadamente dez vezes superior ao total de células presentes no corpo humano, crescendo em sítios localizados na boca, na cavidade nasal, nos intestinos, no trato urogenital, na pele, dentre outros. (MADIGAN *et al*, 2016). Sabe-se que alguns microrganismos exercem funções vitais no organismo por meio de interações simbióticas, no entanto, por vezes, o corpo é invadido por organismos interpretados como potenciais ameaças às atividades de órgãos e tecidos (HARLOW e LANE, 1988).

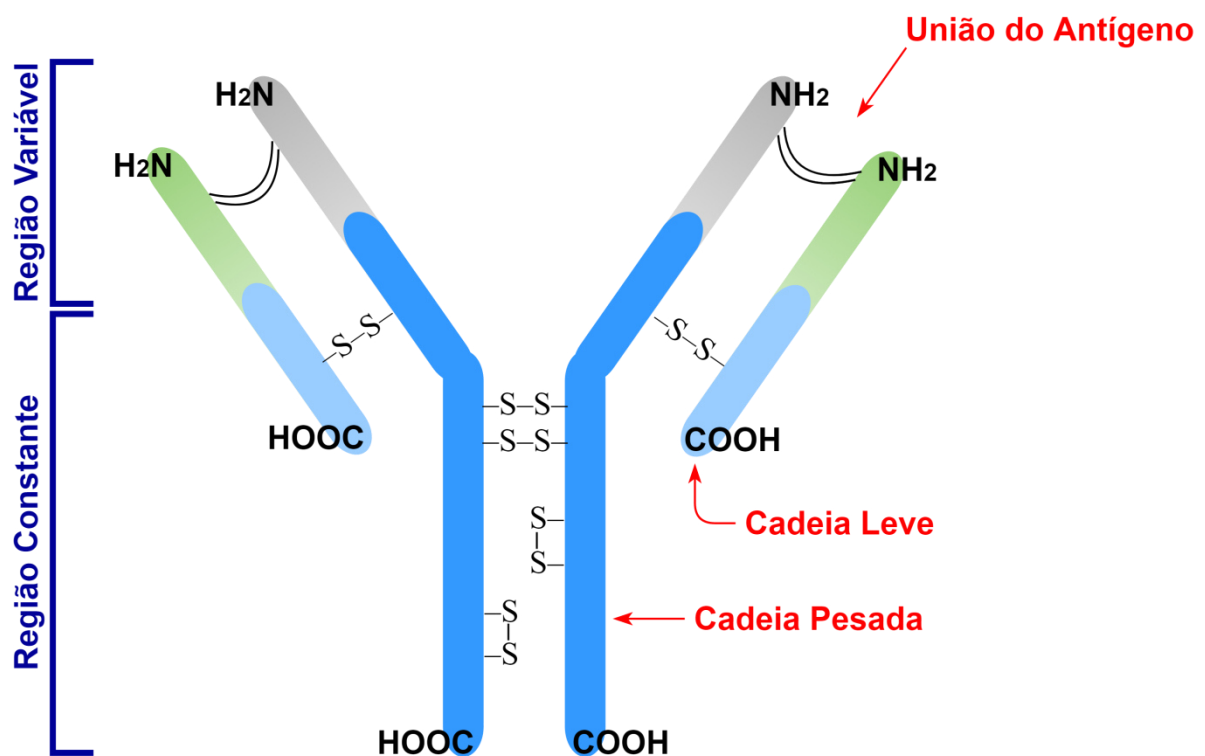
Denomina-se antígeno, qualquer substância capaz de ser reconhecida e ativar uma resposta imune a esta, não se restringindo a componentes de substâncias estranhas (MALE *et al*, 2006; MURPHY, 2014). Os antígenos apresentam duas propriedades principais: a antigenicidade, que diz respeito a capacidade de estimular a formação de anticorpos, e a imunogenicidade, a qual está relacionada com a capacidade de induzir uma resposta imune específica (TEVA, FERNANDEZ e SILVA, 2010).

O sistema imunológico é composto por um conjunto de células, originadas de células hematopoéticas pluripotentes, e moléculas distribuídas por todo o organismo, destinando-se a eliminar ou inativar ameaças causadas pela penetração de microrganismos ou contra a transformação maligna de células, prevenindo infecções e tumores (LEANDRO *et al*, 2007; MARTÍNEZ e ALVAREZ-MON, 1999). Esse sistema apresenta duas subdivisões: o sistema inato e o sistema adaptativo. O sistema inato, responsável pelas defesas gerais, é constituído por todos os mecanismos de resposta imune que atuam de forma não específica contra um invasor utilizando-se de barreiras físicas, como pele e mucosa, e de fagócitos. Uma vez que o sistema inato não é capaz de deter a ameaça, o sistema adaptativo é acionado e, com um desenvolvimento mais lento, elimina os patógenos invasores e os produtos tóxicos destes, por meio de mecanismos específicos aos antígenos. Dentre os principais constituintes do

sistema adaptativo, podem-se destacar os linfócitos e as imunoglobulinas (ALBERTS *et al*, 2010; RIBEIRO, 2006).

As imunoglobulinas, também chamados de anticorpos, são glicoproteínas globulares cuja função é reconhecer os antígenos por meio de um modelo de ajuste do tipo "chave e fechadura" e são sintetizadas por células plasmáticas originadas da diferenciação de linfócitos B (RIBEIRO, 2006; ROQUE, LOWE e TAIPA, 2004). As imunoglobulinas são constituídas por proteínas (82% a 96%) e carboidratos (4 a 18%) e apresentam como estrutura básica quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves idênticas com massa entre 23 e 25 kDa e duas cadeias pesadas idênticas com massa entre 50 e 70 kDa. Unindo as cadeias pesada e leve, assim como as duas cadeias pesadas, há pontes dissulfeto (-S-S-) intercadeia em número variável entre as diferentes moléculas de imunoglobulinas. Há também pontes dissulfeto intracadeia internamente a cada uma das cadeias polipeptídicas. A representação esquemática da estrutura de uma imunoglobulina é mostrada na Figura 1 (HAMILTON, 2001; MAYER, [20--]).

Figura 1 – Estrutura de uma Imunoglobulina.



Fonte: adaptado de Faria, Batista e Heneine (2013).

As imunoglobulinas podem ser classificadas, de acordo com o tipo das cadeias pesadas e com a quantidade de unidades funcionais, em cinco classes: IgG, IgA, IgM, IgD e

IgE, tendo suas cadeias pesadas representadas, respectivamente, pelas letras gregas gama (γ), alfa (α), mi (μ), delta (δ) e épsilon (ϵ) (HUSE, BOHME e SCHOLZ, 2002). As distribuições percentuais das classes de imunoglobulinas, bem como suas principais propriedades e a forma básica de suas estruturas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das classes de Imunoglobulinas no soro.

Imunoglobulina	Soro (% Ig)	Peso Molecular (kDa)	Concentração no Soro (mg / mL)	Estrutura
IgG	75	150	8 – 17	Monômero
IgA	15	150	1 – 4	Monômero, Dímero
IgM	10	900	0,05 – 2	Pentâmero
IgD	< 0,5	180	< 1	Monômero
IgE	< 0,01	190	< 1	Monômero

Fonte: adaptado de Schroeder Jr. e Cavacini (2010) e Ribeiro (2006).

A classe das IgG's se subdivide, ainda, em quatro subclasses: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Estas são diferenciadas, principalmente, pelo número de pontes dissulfeto intercadeias pesadas e por características estruturais na região flexível (RIBEIRO, 2006). Suas respectivas concentrações relativas, assim como suas principais propriedades estão organizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades das subclasses de Imunoglobulinas G.

Propriedades	IgG₁	IgG₂	IgG₃	IgG₄
Tipo de Cadeia Pesada	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4
Peso Molecular (kDa)	146	146	170	146
Faixa de pI (média \pm desvio padrão)	8,6 \pm 0,4	7,4 \pm 0,6	8,3 \pm 0,7	7,2 \pm 0,8
Total de IgG no soro de um adulto normal (%)	60,3 – 71,5	19,4 – 31,0	5,0 – 8,4	0,7 – 4,2
Concentração em soro normal (mg/mL)	5 – 12	2 – 6	0,5 – 1	0,2 – 1
Nº de pontes dissulfeto intercadeia	2	4	11	2

Fonte: adaptado de Hamilton (2001).

2.2 Purificação de IgG

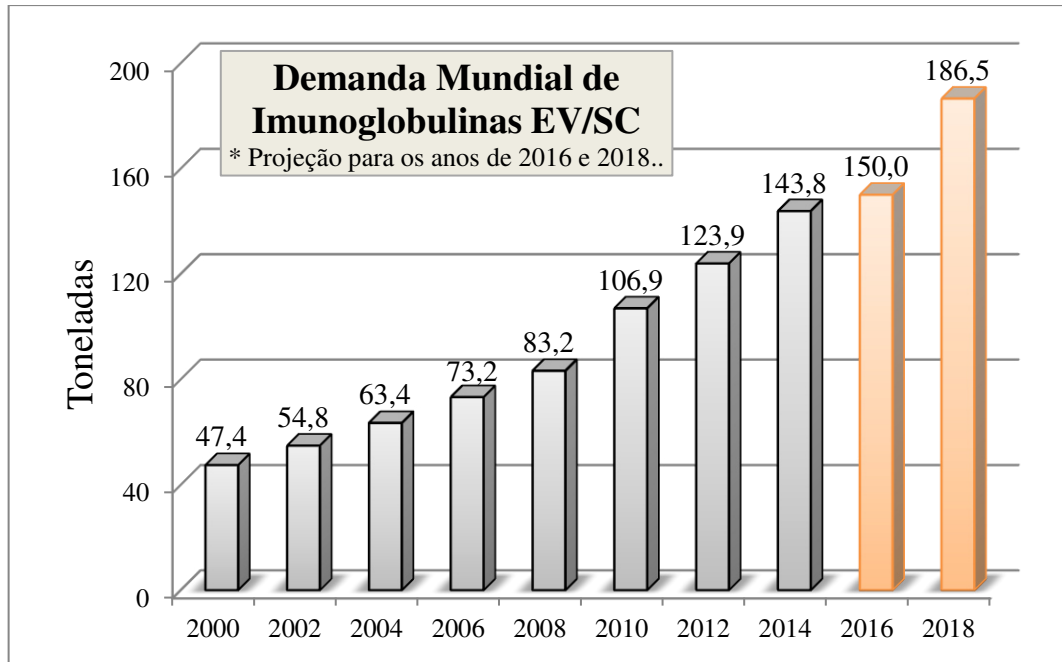
O sangue humano é um material biológico bastante singular, do qual podem ser extraídos vários produtos terapêuticos (BURNOUNF e RADOSEVICH, 2001). Estima-se que mundialmente, em 2012, 36,8 milhões de litros de plasma humano tenham sido coletados para fracionamento (INSTITUTO BUTANTAN, 2017).

A produção de hemoderivados vem se intensificando desde a década de 40 quando, nos Estados Unidos, o químico Edwin Joseph Cohn desenvolveu, junto a outros colaboradores, um sistema de precipitação de plasma por etanol, resultando em uma fração proteica purificada rica em HSA, a qual é o componente majoritário no plasma, com uma concentração de aproximadamente 40 mg/mL e massa molecular de 66 kDa (ANDRADE e HLADY, 1987; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2017; GONDIM, 2012).

Com o passar do tempo, o cerne desse ramo industrial foi passando por algumas variações: a albumina foi a base principal até que, entre as décadas de 1980 e 1990, a produção de Fator VIII tornou-se o eixo central do ramo. Já no século atual, a indústria de hemoderivados passou a ter as imunoglobulinas assumindo o papel preponderante, fazendo com que a HSA e o Fator VIII fossem considerados quase subprodutos de sua obtenção purificada. Segundo a projeção do Instituto Butantan (2017), a demanda mundial de imunoglobulinas para aplicação endovenosa ou subcutânea tende a crescer consideravelmente de modo que, em 2018 serão requeridas 186,5 toneladas de imunoglobulinas, como mostrado na Figura 2.

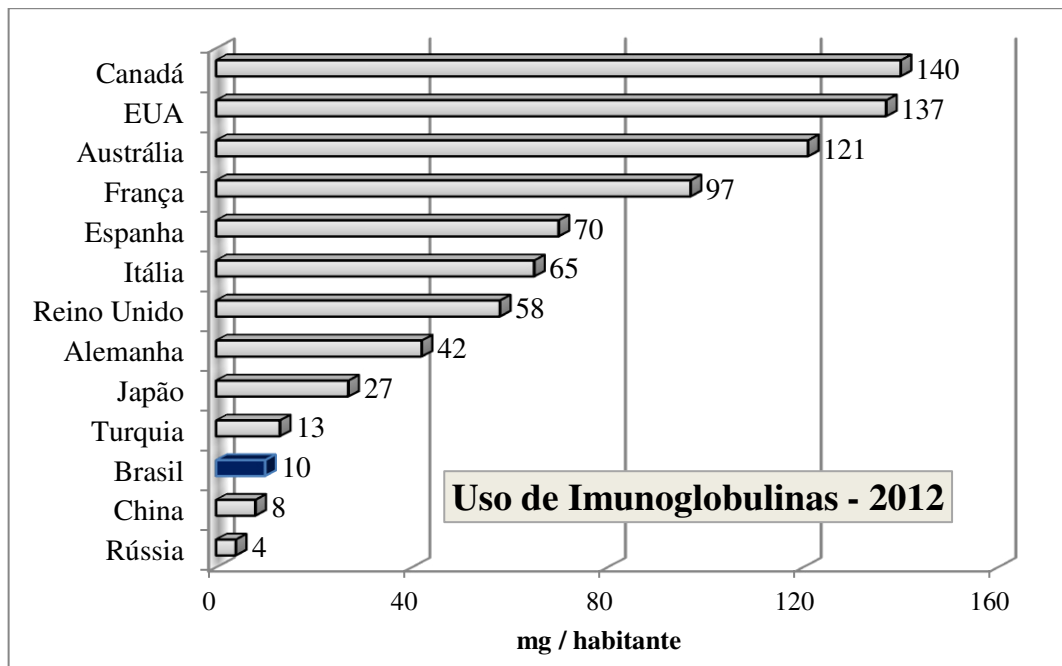
As imunoglobulinas têm sido os hemoderivados de maior utilização em todo o mundo, por volta de 140 mg *per capita* em países como Canadá e Estados Unidos. No Brasil, o consumo é de aproximadamente 10 mg por habitante, conforme ilustrado na Figura 3 (GONDIM, 2012; INSTITUTO BUTANTAN, 2017). Embora alguns novos projetos de plantas industriais estejam em fase inicial, como do Instituto Butantan e da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRAS), o Brasil ainda é dependente da importação deste hemoderivado, acarretando em desembolsos, de acordo com os crescentes preços do mercado internacional de imunoglobulinas, com valores entre 40 e 70 dólares por grama (BRASIL, 2004; GONDIM, 2012). Provavelmente esses dados já devem ter sofrido alterações, mas eles dão um vislumbre da relevância do desenvolvimento de estudos sobre os processos de purificação de imunoglobulinas no contexto atual.

Figura 2 – Demanda mundial de Imunoglobulinas de aplicação endovenosa ou subcutânea.



Fonte: adaptado de Instituto Butantan (2017).

Figura 3 – Uso de Imunoglobulinas no mundo.



Fonte: adaptado de Instituto Butantan (2017).

A IgG é considerada a imunoglobulina mais versátil, podendo realizar todas as funções das demais moléculas de imunoglobulina, além de ser uma boa opsonina, termo

utilizado para designar substâncias com a propriedade de favorecer o processo de fagocitose, atuando ativamente no combate a infecções (MAYER, [20--]).

Esta também é empregada em várias aplicações terapêuticas, tais como na prevenção de pneumonia, tratamento de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, doenças seletivas de anticorpos, dentre outras. Nesses tratamentos, usualmente, são demandadas grandes doses de IgG, podendo chegar a vários gramas por paciente ao ano (CONDINO-NETO *et al*, 2013; MIRANDA *et al*, 2010).

Há uma regulamentação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, de 19 de maio de 2000, que especifica o grau de pureza mínimo de 90% para IgG intramuscular e de 95% para IgG endovenosa (MIRANDA *et al*, 2010). Deste modo, são requeridos processos de purificação com elevado grau de seletividade ou a execução de etapas adicionais de eliminação de contaminantes.

Uma vez que o plasma tem predisposição à contaminação por uma variedade de agentes patogênicos, garantir a segurança dos produtos hemoderivados é uma prioridade para os produtores destes. Assim, costumam ser adotados procedimentos de particionamento, inativação e filtração de vírus (KEMPF, STUCKI e BOSCHETTI, 2007).

Estudos com a finalidade de desenvolver métodos mais seletivos para a purificação de IgG e capazes de proporcionar maior grau de pureza, em etapa única, têm sido realizados nas últimas décadas, dentre os quais destacam-se as técnicas de precipitação e as cromatografias de troca iônica, afinidade e permeação em gel (SOUZA, 2009).

2.3 Cromatografia de Troca Iônica

De acordo com Torres (2006), a adsorção pode ser definida como um fenômeno de superfície em que uma quantidade finita de moléculas de um fluido, denominado adsorbato, adere à superfície de um sólido, denominado adsorvente. O processo de separação do componente de interesse é consequência de uma força resultante não balanceada na superfície do adsorvente, o que atrai as moléculas de um fluido e as mantém em contato por um determinado tempo com o sólido, sem que necessariamente haja uma reação química (BEZERRA, 2013). Dado que os componentes adsorvidos concentram-se sobre a superfície externa, quanto maior a porosidade da partícula (por conseguinte, com maior área superficial), mais favorável será a adsorção (NASCIMENTO *et al*, 2014).

Dependendo da natureza das forças envolvidas, os fenômenos adsortivos podem ser físicos (fisissorção) ou químicos (quimissorção). Ocorre fisissorção quando a ligação do

adsorbato à superfície do adsorvente é intermediada por forças fracas (não covalentes), como as forças de Van der Waals, resultado da sobreposição de várias interações. Na adsorção química há troca ou partilha de elétrons entre adsorbato e adsorvente, o que resulta em uma reação química e na constituição de uma nova ligação, bem mais forte (covalente) que a derivada da fisissorção. Outra particularidade da quimissorção é que esta é dita localizada, só podendo acontecer nos sítios ativos, e há formação de uma única camada adsorvida sobre o adsorvente, em contrapartida, a fisissorção é dita não localizada, ocorrendo por toda a superfície do adsorvente, e pode haver formação de multicamadas da substância adsorvida (BEZERRA, 2013; NASCIMENTO *et al*, 2014; TORRES, 2006).

De acordo com Degani, Cass e Vieira (1998), a cromatografia é uma técnica físico-química de separação que consiste na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre as fases móvel e estacionária. Quanto à fase móvel empregada, a cromatografia pode ser classificada como: líquida, gasosa ou supercrítica onde, nesta última, emprega-se vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica. Em aplicações onde o objetivo é promover a purificação de metabólitos celulares, a cromatografia líquida é a técnica de interesse. Nesta técnica, os solutos (partículas do componente desejado) são retidos em um leito poroso, por fenômenos de adsorção (física ou química), partição ou exclusão molecular (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998; PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Industrialmente, vários tipos de cromatografia são empregados para a purificação de misturas multicomponentes de proteínas, dentre elas a cromatografia de troca iônica, de afinidade, de exclusão, dentre outras (GERBERDING e BYERS, 1998). Nesse contexto, constatou-se que o método mais utilizado para purificação de proteínas é o de troca iônica. Esta é normalmente selecionada, pois, em comparação aos demais, mostrou ser simples, versátil, de fácil ampliação de escala e por apresentar altas resolução e capacidade adsortiva (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005; ZUÑIGA *et al*, 2003).

O princípio do processo de separação por cromatografia de troca iônica consiste nas interações eletrostáticas devido às cargas das biomoléculas. Visto que as proteínas têm natureza anfotérica, sua carga líquida é dependente do pH do meio em que esta se encontra. Dependendo da proporção de cargas positivas e negativas próprias, em um determinado pH, a carga líquida será nula, e sob essas condições a proteína é dita estar no seu ponto isoelétrico (pI). Deste modo, em meios onde o pH é menor que o pI da proteína, esta fica carregada positivamente. De modo análogo, em meios onde o pH é maior que o pI da proteína, esta fica carregada negativamente (KOPACIEWICZ *et al*, 1983).

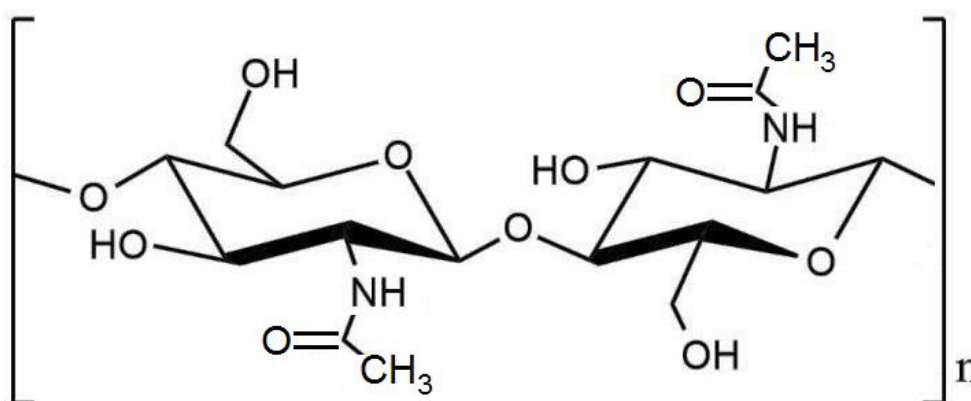
Nesse método cromatográfico há uma etapa de adsorção reversível de moléculas de solutos eletricamente carregados a grupos com cargas opostas, imobilizados em matriz sólida. Em seguida, na etapa de eluição, os solutos adsorvidos são substituídos por outros de mesma carga, porém com maior afinidade pela fase estacionária. Deste modo, os diferentes graus de interação eletrostática, entre a fase estacionária e os íons da fase móvel, conduzem esse processo (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

2.4 Matriz Polimérica do Adsorvente

Com o objetivo de melhorar os resultados, em algumas aplicações, são feitas modificações em materiais sensíveis a reações, de modo a efetuar alterações convenientes em suas propriedades. Nesse contexto, materiais poliméricos orgânicos de baixo custo e abundantes na natureza vem sendo amplamente estudados (VIEIRA, 2012).

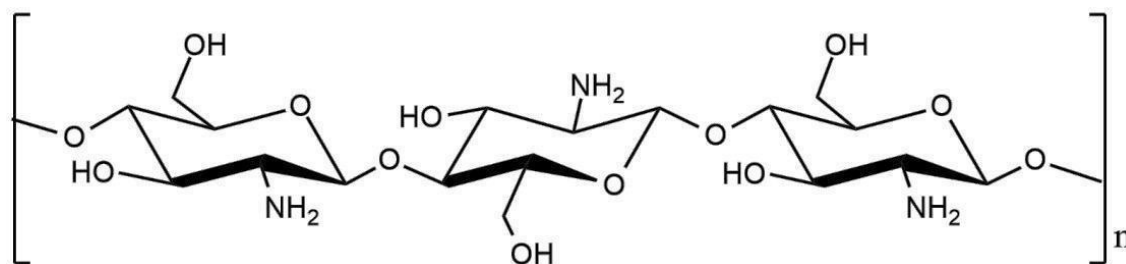
A quitosana é um polissacarídeo linear derivado da quitina, biopolímero presente nos exoesqueletos e cutículas de crustáceos e insetos, em algumas algas marinhas e nas paredes celulares de fungos. A quitina, um dos biopolímeros mais abundantes na natureza, é composta por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações β -(1-4) e, quando submetida a reação de desacetilação, seja alcalina ou enzimática, resulta na estrutura β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, a qual, se apresentar grau de desacetilação superior a 60%, é denominada quitosana (DIAS *et al*, 2008; FAN *et al*, 2012; VIEIRA, 2012). Assim, a quitosana mostra-se uma potencial matriz adsorvente para processos cromatográficos, por sua ampla disponibilidade e por ter um baixo custo de aquisição. As estruturas da quitina e da quitosana são mostradas nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 – Estrutura da Quitina.



Fonte: Adaptado de Freire (2016) e Moraes (2016).

Figura 5 – Estrutura da Quitosana.



Fonte: Adaptado de Freire (2016).

Uma vez que a quitosana nas formas de pó ou de flocos apresenta as desvantagens de ser solúvel em meio ácido e de possuir baixa área superficial, em algumas aplicações é feita a reticulação da cadeia polimérica e sua modificação física para a forma de esferas (DIAS *et al*, 2008). A estrutura química da quitosana é um polieletrólito linear catiônico com os grupos hidróxido e amino reativos, o que facilita a realização de modificações químicas para melhorar uma propriedade de interesse no material (MORAES, 2016).

A sulfatação de polissacarídeos possibilita alterar a sua solubilidade em água, bem como promover alterações em suas atividades biológicas por meio de alterações na conformação da cadeia (MOURA NETO, 2013). Uma estratégia utilizada para melhorar o desempenho dos adsorventes a base de quitosana, em processos que envolvem a sua utilização como resina catiônica, consiste na introdução de grupamentos sulfônicos ($-SO_3^-$) em sua cadeia, reduzindo as cargas positivas de grupos amino protonados e produzindo uma carga superficial negativa nesta (LIMA *et al.*, 2013).

O trióxido de enxofre, reagente empregado no processo de sulfatação, é um composto eletrófilo agressivo e altamente reativo a qualquer composto contendo um grupo eletrodador. Assim, a sulfatação é um processo de complexa aplicação industrial, uma vez que estas reações tendem a ser demasiadamente exotérmicas e muito rápidas. Além disso, a remoção de calor do sistema é dificultada pelo aumento da viscosidade do composto, durante o processo. Deste modo, visando diminuir a reatividade do trióxido de enxofre, com moderadas velocidade de reação e liberação de calor, esse reagente é comumente utilizado na forma conjugada a agentes complexantes (BARCZA, 2012). Neste trabalho, foi utilizado ácido clorossulfônico, forma conjugada do trióxido de enxofre a ácido clorídrico.

A fim de aumentar a resistência química da quitosana ao meio, é comum bloquear os seus grupos funcionais por meio da adição de um agente modificador. Essa inclusão pode ser feita na própria solução de quitosana ou na quitosana já moldada. O glutaraldeído é um agente reticulante utilizado para aumentar a estabilidade química da quitosana, por meio do

bloqueio dos grupos amino presentes em sua cadeia polimérica, por meio de uma reação irreversível e rápida (TORRES, 2006).

3 METODOLOGIA

A metodologia empregada neste trabalho pode ser dividida em seis tópicos principais: materiais, síntese das microesferas de quitosana sulfatadas, caracterização dos adsorventes, ensaios de adsorção com IgG de alta pureza, ensaios de adsorção com mistura IgG/BSA e eletroforeses.

3.1 Materiais

A quitosana utilizada foi obtida da Polymar (Brasil), com grau de desacetilação de 87,4%, de acordo com a fabricante. Os reagentes ácido acético, DMF (N-N-Dimetilformamida) e glutaraldeído foram obtidos da Vetec (Brasil). A albumina do soro bovino foi obtida da INLAB (Brasil). A imunoglobulina G do soro humano (99%) e os reagentes MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazino-N'-2-etanosulfônico), MES (ácido morfolinoetanosulfônico) e tris (trizima) foram adquiridos da Sigma (EUA). O marcador de alto peso molecular, contendo as proteínas miosina (212 kDa), α_2 -macroglobulina (170 kDa), β -galactosidade (116 kDa), transferina (76 kDa) e glutamato desidrogenase (53 kDa), foi obtido da GE Healthcare (EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e nas preparações de todas as soluções foi utilizada água ultrapura (Millipore, EUA).

3.2 Síntese das microesferas de quitosana sulfatadas

A síntese do adsorvente foi realizada a partir de modificações às metodologias apresentadas por Pires *et al.* (2013) e Moraes (2016). Inicialmente foi preparada uma solução de quitosana 5% (m/v) em ácido acético 10% (v/v), por meio da adição de 20g de quitosana em pó a 180 mL de água MiliQ, mantidos sob agitação por 2 horas em agitador mecânico Tecnal (Brasil), modelo TE-139, a aproximadamente 800 rpm para solubilização. Seguido pela adição de 40 mL de ácido acético e 180 mL de água MiliQ, permanecendo, a mistura, em agitação nas condições anteriores por mais 24 horas. Terminada esta etapa, a solução foi filtrada para remoção de eventuais impurezas presentes.

Em seguida, a solução de quitosana foi gotejada, à vazão constante de 1,5 mL/minuto, em solução coagulante de hidróxido de amônio 50% (v/v). O sistema foi montado utilizando uma bomba peristáltica Watson-Marlow (EUA), modelo Q400 e a seção de saída de

fluido foi padronizada utilizando uma ponteira para micropipeta de 0-200 μL do tipo Gilson, sem filtro. Após o gotejamento, as esferas foram mantidas em repouso por 24 horas. Logo depois, estas foram lavadas abundantemente com água destilada até atingirem pH neutro e foram deixadas para secar em estufa a 50 °C. Ao fim dessa etapa obtiveram-se as microesferas de quitosana (MQ), das quais foi reservada uma parcela para ensaios comparativos de adsorção e as demais foram submetidas à sulfatação, conforme descrito subsequentemente.

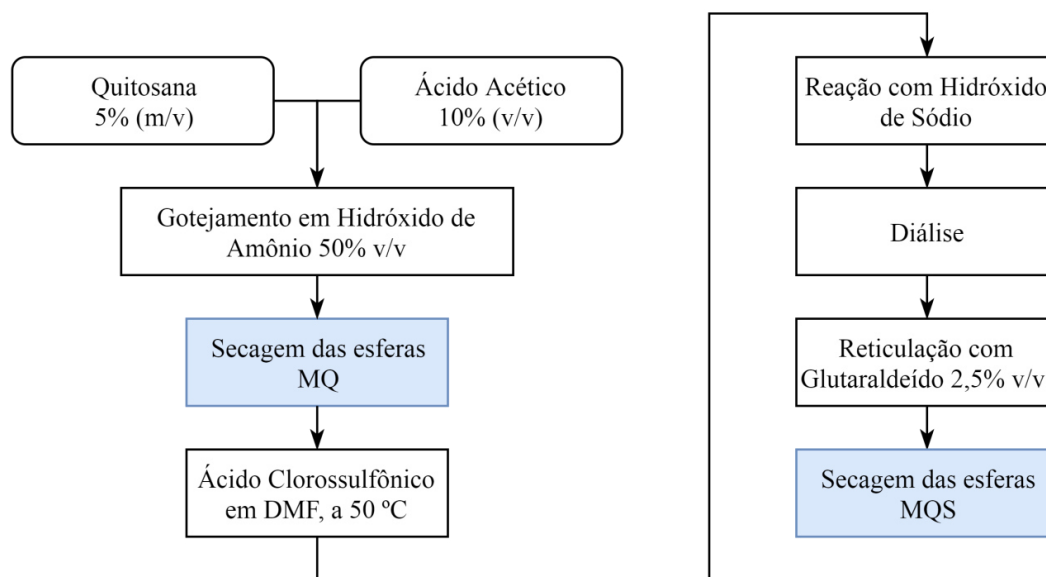
Como processo de pré-sulfatação, foram adicionados 15 mL de N,N-dimetilformamida (DMF), para cada grama de MQ, sendo mantidas sob agitação por 15 horas. Decorrido o tempo especificado, retirou-se o excesso de solvente e procedeu-se com a sulfatação.

Em um balão de três bocas conectado a um condensador de refluxo, o reagente de sulfatação foi preparado a partir da adição gota a gota, de 6 mL de ácido clorossulfônico (HClSO_3) a 60 mL de DMF arrefecida a temperatura entre 0 e 4 °C, sendo os mencionados volumes proporcionais a massa de 1 g de MQ. Nesta etapa, para estabilização da temperatura, a mistura foi mantida em banho de gelo e sob leve agitação magnética até atingir a temperatura ambiente. Após esse processo, foram adicionadas as microesferas e a mistura foi mantida a temperatura de 50 °C e agitação por 5 horas. Uma solução amarelada foi obtida e reagida com NaOH 10 M até que fosse atingido o pH 12. Feito isso, retirou-se o excesso de solvente e, em seguida, foram realizados seis ciclos de lavagens, sob agitação, com metanol (CH_3OH). Por fim, as esferas sulfatadas foram deixadas para secar em estufa a 50 °C.

Posteriormente, para a remoção de reagentes não reagidos remanescentes, os sólidos secos foram dispersos em aproximadamente 100 mL de água destilada em membranas de diálise com *cut-off* de peso molar de 12000-16000 g/mol e procedeu-se a diálise contra água destilada por dois dias, sendo trocada a água duas vezes ao dia.

Finalmente, foi feita a reticulação das microesferas utilizando solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), sendo mantidas em contato por 1 hora. Decorrido o tempo determinado, as esferas foram lavadas com etanol para remoção do excedente do agente reticulante e concluindo o processo com lavagens com água destilada. Foi feita a secagem do material em estufa, a 50 °C, e assim obtiveram-se as microesferas de quitosana sulfatadas reticuladas (MQS), as quais consistem no objeto principal de estudo no presente trabalho. Esquemáticamente, a Figura 6 apresenta um resumo das principais etapas da síntese realizada.

Figura 6 – Procedimento de preparação das microesferas de quitosana sulfatadas a partir de modificações às metodologias propostas por Pires *et al.* (2013) e Moraes (2016).



Fonte: Próprio autor.

3.3 Caracterização dos adsorventes

A fim de caracterizar os adsorventes sintetizados, estes foram analisados através de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (do inglês, *Fourier Transform Infrared* – FTIR) e por meio de testes de estabilidade química.

3.3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho – FTIR

Na obtenção dos espectros por FTIR, foi utilizado espectrômetro Perkin Elmer (EUA) 2000. Para realização das análises, as amostras foram misturadas com Brometo de Potássio (KBr) e colocadas em uma prensa para formar uma pastilha. Os espectros foram obtidos em comprimentos de onda na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} . Foram analisadas amostras de três estágios da síntese realizada: microesferas de quitosana (MQ), microesferas de quitosana sulfatadas não reticuladas e as microesferas de quitosana sulfatadas reticuladas (MQS).

3.3.2 Avaliação da estabilidade química

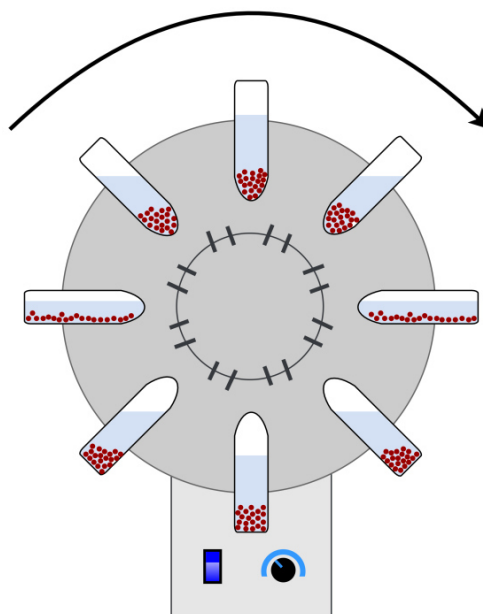
Para análise da estabilidade química foi utilizada a metodologia apresentada por Torres (2006). As amostras de quitosana em pó, de MQ e de MQS foram mantidas em

soluções de ácido clorídrico 0,2 mol/L, em repouso por 24 horas. As solubilidades destas foram avaliadas visualmente em ensaios realizados em duplicata.

3.4 Ensaios de adsorção com IgG de alta pureza

Os ensaios de adsorção de IgG foram realizados em duplicata, no modo batelada, utilizando um sistema circular com rotação constante, tendo como parâmetros acompanhados a massa de adsorvente, o volume e concentração de adsorbato, tempo de contato entre as fases, além do pH e concentração dos tampões empregados. Fixou-se, para a todos os ensaios deste tópico, a velocidade de agitação em 18 rpm em agitador rotativo Tecnal (Brasil), modelo TE-165, o volume da solução de proteína (adsorbato) em 3 mL e a concentração de 25 mM para os tampões avaliados. Decorrido o tempo de ensaio, alíquotas de 2 mL do sobrenadante foram centrifugadas em microcentrífuga Cientec (Brasil), modelo CT-15000R por 10 minutos com rotação de 10.000 rpm, para a separação de eventuais resquícios de adsorvente presente na amostra. Uma representação do sistema de agitação utilizado é mostrada na Figura 7.

Figura 7 – Representação do sistema de agitação para ensaios em batelada.



Fonte: Próprio autor.

A princípio foi realizada a avaliação da influência do pH e do tampão empregado na preparação do adsorbato. Nestes ensaios, 5 mg de MQS foram mantidas em contato com solução de IgG 0,75 mg/mL por 2 horas. A fim de verificar qual apresentava a melhor

condição de adsorção, foram testados os tampões Fosfato, Acetato, MOPS, HEPES, MES e Tris/HCl, sempre respeitando a faixa de propriedade tamponante dos mesmos.

Procedendo-se os experimentos, foi feita a análise da influência da massa de adsorvente nos ensaios. Para tanto, foram realizados ensaios com massa de MQS variando de 5 a 25 mg, colocadas em contato por 2 horas com solução de IgG 0,75 mg/mL em tampão HEPES, pH fixo em 6,8.

Para obtenção do tempo de equilíbrio para o processo adsorptivo, foi preparada solução de IgG 0,75 mg/mL com tampão HEPES, pH fixo em 6,8 e esta foi mantida em contato com 5 mg de adsorvente, variando-se a duração do ensaio de 5 minutos a 24 horas.

Uma vez definido o tempo de equilíbrio, foram realizados ensaios com concentrações iniciais de IgG variando de 0,5 a 4,0 mg/mL, preparadas em tampão HEPES, pH 6,8, a partir dos quais foram obtidas as isotermas de adsorção (quantidade de soluto presente na fase fluida em equilíbrio com a quantidade de soluto adsorvido). As soluções de IgG, em cada concentração, foram mantidas em contato com 5 mg do adsorvente por um período de 10 horas.

Para fins comparativos, os experimentos para obtenção do perfil cinético e das isotermas de adsorção foram reproduzidos, sob mesmas condições, utilizando as microesferas sulfatadas (MQS) e as não sulfatadas (MQ).

Terminados os ensaios e colhidas as amostras, estas foram quantificadas por espectrofotometria UV-Vis, Thermo Scientific Biomate B (EUA) em comprimento de onda de 280 nm. Os valores de absorbâncias obtidos foram convertidos para concentração através de curvas de calibração previamente obtidas. A quantidade de soluto adsorvido na fase fluida foi quantificada a partir de um balanço de massa simples, conforme apresentado na Equação 1.

$$q = \frac{V_{sol} \cdot (C_0 - C_f)}{m_{ads}} \quad (1)$$

Em que q expressa a quantidade adsorvida por grama de adsorvente (mg/g), V_{sol} é o volume da solução (mL) mantida em contato com a massa m_{ads} de adsorvente (g) e sendo C_0 e C_f as concentrações inicial e final na fase líquida (mg/mL), respectivamente.

Como modelos de ajuste para os dados experimentais das isotermas de adsorção foram aplicados os modelos de Langmuir e de Langmuir-Freundlich, apresentados nas Equações 2 e 3, respectivamente, por meio da utilização da ferramenta de ajuste não linear do software OriginPro8 (EUA).

$$q = \frac{q_{max} \cdot (k_L \cdot C_{eq})}{1 + (k_L \cdot C_{eq})} \quad (2)$$

$$q = \frac{q_{max} \cdot (k_{LF} \cdot C_{eq})^N}{1 + (k_{LF} \cdot C_{eq})^N} \quad (3)$$

Nestas, q é a quantidade de proteína adsorvida (mg/g); q_{max} é a capacidade máxima de adsorção pelo adsorvente (mg/g); C_{eq} é a concentração da fase líquida no equilíbrio (mg/mL); N é o parâmetro de cooperatividade do sistema e k_L e k_{LF} são as constantes de Langmuir e Langmuir-Freundlich (mL/mg), respectivamente.

3.5 Ensaios de adsorção com mistura IgG/BSA

Partindo das melhores condições para a adsorção de IgG obtidas conforme descrito no tópico anterior, foram feitos ensaios de adsorção com misturas de proteínas. Uma vez que, segundo Andrade e Hlady (1987), os componentes majoritários do plasma sanguíneo são HSA e IgG, procurou-se analisar a seletividade das microesferas de quitosana sulfatadas para a adsorção de IgG em meios com a presença de albumina. Sabendo que as albuminas apresentam similaridades estruturais e em suas propriedades, nos experimentos fez-se a substituição da HSA pela albumina do soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin* – BSA), pois esta apresenta menor custo de aquisição, em comparação com a albumina do soro humano.

Foram selecionadas cinco frações mássicas (0, 25, 50, 75 e 100%) de IgG e BSA (fração complementar) de modo a verificar o efeito da interação destas em diferentes configurações. Em todos os casos, a concentração de proteínas totais foi de 1 mg/mL de proteína em tampão HEPES 25 mM, pH 6,8. Os ensaios foram conduzidos de modo análogo aos ensaios com IgG de alta pureza, em sistema de agitação rotativo a 18 rpm, por 10 horas, mantendo em contato 5 mg de adsorvente em 3 mL da solução de proteínas, conforme apresentado na Tabela 3.

Finalizados os ensaios, colhidas as amostras e centrifugadas, estas foram quantificadas por espectrofotometria UV-Vis, Thermo Scientific Biomate B (EUA), em comprimento de onda 595 nm, utilizando metodologia adaptada a partir de Bradford (1976) para leitura de proteínas totais, diferenciado desta apenas no método de elaboração das curvas de calibração, pois foram consideradas as proporções de cada proteína do ensaio, em vez de

considerar apenas a presença da proteína BSA. Para cada 0,02 mL de amostra deixou-se em contato com 1,0 mL do reagente de Bradford por aproximadamente 10 min em cubetas plásticas em ambiente com ausência de luz. Os valores de absorbâncias obtidos foram convertidos, para concentração, através de curvas de calibração previamente obtidas conforme supracitado. A quantidade de soluto adsorvido na fase fluida foi quantificada a partir do balanço de massa já mostrado na Equação 1. A análise qualitativa da seletividade dos adsorventes para a purificação de IgG foi realizada por meio de eletroforeses.

Tabela 3 – Frações mássicas utilizadas nos ensaios de adsorção com mistura IgG/BSA.

Experimento	Fração Mássica de IgG	Fração Mássica de BSA
1	0 %	100 %
2	25 %	75 %
3	50 %	50 %
4	75 %	25 %
5	100 %	0 %

Fonte: Próprio autor.

3.6 Eletroforeses

Os ensaios de eletroforese foram realizados em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE). Em conformidade com a metodologia apresentada por Laemmli (1970), utilizou-se um sistema Mini-Protean III, adquirido da Bio-Rad (EUA). As corridas foram realizadas a 150 V com géis de separação de 7,5% com 4% de gel do tipo stacking. Foi utilizado marcador de alto peso molecular obtido da GE Healthcare (EUA), para identificação das faixas de peso molecular, e corante Coomassie Brilhante Blue, para a coloração das bandas.

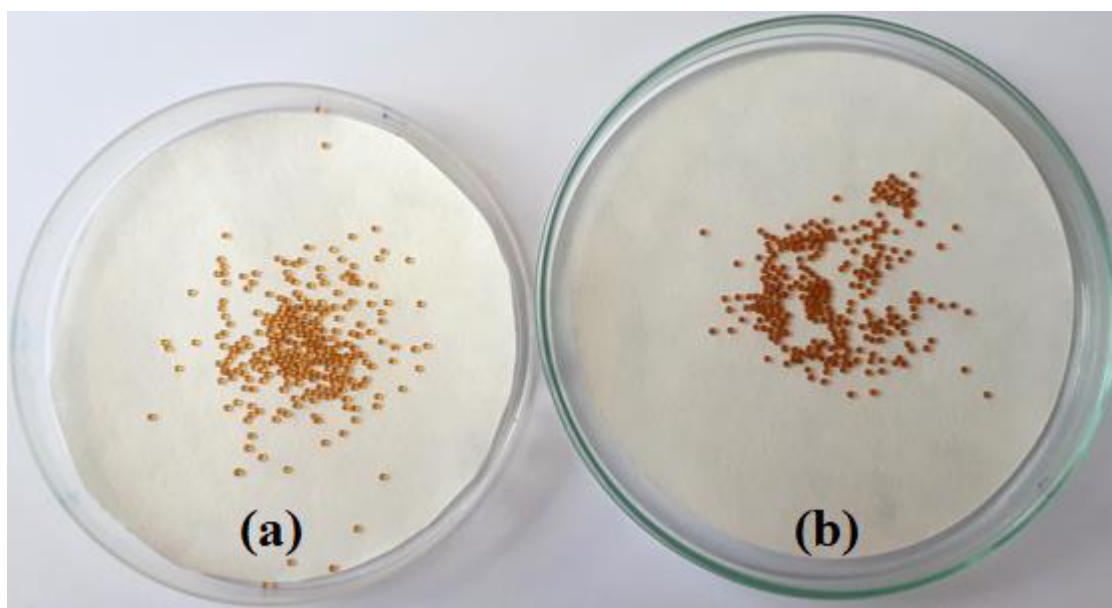
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados e discutidos os resultados obtidos conforme metodologia apresentada anteriormente, dividindo-se em três partes: síntese das microesferas de quitosana sulfatadas, ensaios de adsorção com IgG de alta pureza e ensaios de adsorção com mistura IgG/BSA.

4.1 Síntese das microesferas de quitosana sulfatadas

Na Figura 8 são mostradas as MQ e as MQS obtidas a partir da metodologia descrita neste trabalho.

Figura 8 – Microesferas de quitosana (a) e microesferas de quitosana sulfatadas (b).



Fonte: Próprio autor.

Para a formação de microesferas, a solução de quitosana utilizada deve estar em baixas concentrações (até 5% m/v), neste caso, diluída em ácido acético. Desse modo, a solução atingirá uma viscosidade entre 340 e 630 cP a 29 °C e apresentará uma densidade adequada que possibilite a produção de microesferas sem cauda e com boa resistência mecânica (DIAS *et al.*, 2008).

Ao adicionar por gotejamento a solução de quitosana em solução de hidróxido de amônio, ocorre a neutralização da solução ácida de quitosana, promovendo a coagulação desta

em forma de gotas. Assim, sob agitação mecânica lenta, há formação de microesferas em suspensão na solução coagulante (DIAS *et al.*, 2008).

O processo de secagem após a etapa supramencionada é de grande importância para a sulfatação, pois o ácido clorossulfônico, agente sulfatante empregado, é inativado ao reagir com água. Desse modo, a fim de aumentar a dissolução da quitosana foi utilizada DMF, permanecendo este último inerte ao meio reacional (CAVALHEIRO, 2009).

Para que as microesferas apresentassem maior estabilidade química, foi promovida a reticulação com glutaraldeído por meio do bloqueio dos grupos amino presentes na cadeia polimérica pelos grupos aldeído do agente reticulante (TORRES, 2006).

Com o intuito de verificar os resultados obtidos na síntese do adsorvente, foram realizadas análises de espectroscopia de FTIR e de estabilidade química.

4.1.1 Espectroscopia de FTIR

Através da técnica de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é possível identificar os grupos funcionais do material. Nesse contexto, foram analisadas amostras das microesferas de quitosana em diferentes estágios da modificação química realizada. Os espectros de absorção obtidos são apresentados na Figura 9.

A quitosana, mostrada na Figura 9(a), apresenta, principalmente, bandas referentes aos modos vibracionais dos grupos funcionais envolvidos em ligações de hidrogênio. Isso pode ser observado em torno de 3465 cm^{-1} , onde aparece um sinal largo que pode ser atribuído à deformação axial do grupo O–H agregado a outros grupos polares por pontes de hidrogênio. Há também, em 2925 cm^{-1} , bandas vibracionais de deformação simétrica do grupo C–H (LIMA *et al.*, 2013; WANG, TURHAN e GUNASEKARAN, 2004).

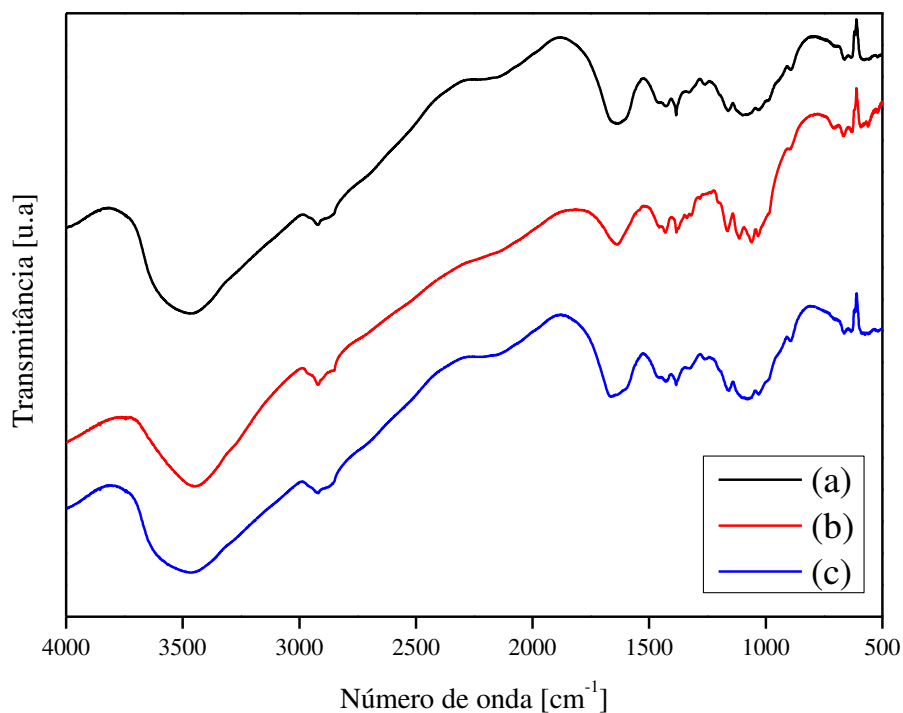
Também foi possível verificar a presença de grupamentos acetamida ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}$) remanescentes na estrutura da quitosana utilizada, uma vez que o grau de desacetilação desta foi de 87,4%, por meio de vibrações em torno de 1653 cm^{-1} , atribuídas à deformação axial de C=O, referente à amida primária (LAUS *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2009).

Analisando o espectro referente às microesferas de quitosana sulfatadas, na Figura 9(b), verifica-se a presença de bandas semelhantes às da quitosana (Figura 9(a)), no entanto, algumas mudanças referentes à reação de sulfatação foram notadas. Em 1035 cm^{-1} pode ser identificada uma banda atribuída ao estiramento C–O em (COSO_3) e em 1066 cm^{-1} atribuída a vibração simétrica do SO_2 (PIRES *et al.*, 2013; RAKHMANOVA *et al.*, 2009; VIKHOREVA

et al., 2005). Além destas, foram identificadas bandas específicas de grupos de sulfato na faixa de 1200 a 1260 cm^{-1} , características de flutuações de valência assimétricas de S=O.

Com a utilização de glutaraldeído como agente de entrecruzamento, a reticulação ocorre via adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila do agente. Desse modo, após reação de eliminação, ocorre a produção de aldíminas ou bases de Schiff (GONSALVES *et al.*, 2011). Conforme mostrado na Figura 9(c), a intensidade da banda em 1140 cm^{-1} referente à amina alifática diminuiu, o que indica que estes grupos ligaram-se ao glutaraldeído, formando iminas (N=C) em 1668 cm^{-1} .

Figura 9 – Espectro na região do infravermelho das amostras (a) microesferas de quitosana antes da sulfatação, (b) microesferas de quitosana sulfatadas não reticuladas, (c) microesferas de quitosana sulfatadas e reticuladas.



Fonte: Próprio autor.

4.1.2 Estabilidade química

Decorridas 24 horas do contato entre as amostras e a solução de ácido clorídrico, verificou-se que as amostras de quitosana não reticuladas (MQ e quitosana em pó) estavam

totalmente solubilizadas na solução. As microesferas reticuladas (MQS) apresentaram uma maior estabilidade química, quando comparadas às não reticuladas, ficando apenas deformadas, mas não totalmente solúveis na solução ácida. Com isso, foi possível verificar que a etapa de reticulação foi satisfatória e resultou em um adsorvente com maior resistência.

4.2 Ensaio de adsorção com IgG de alta pureza

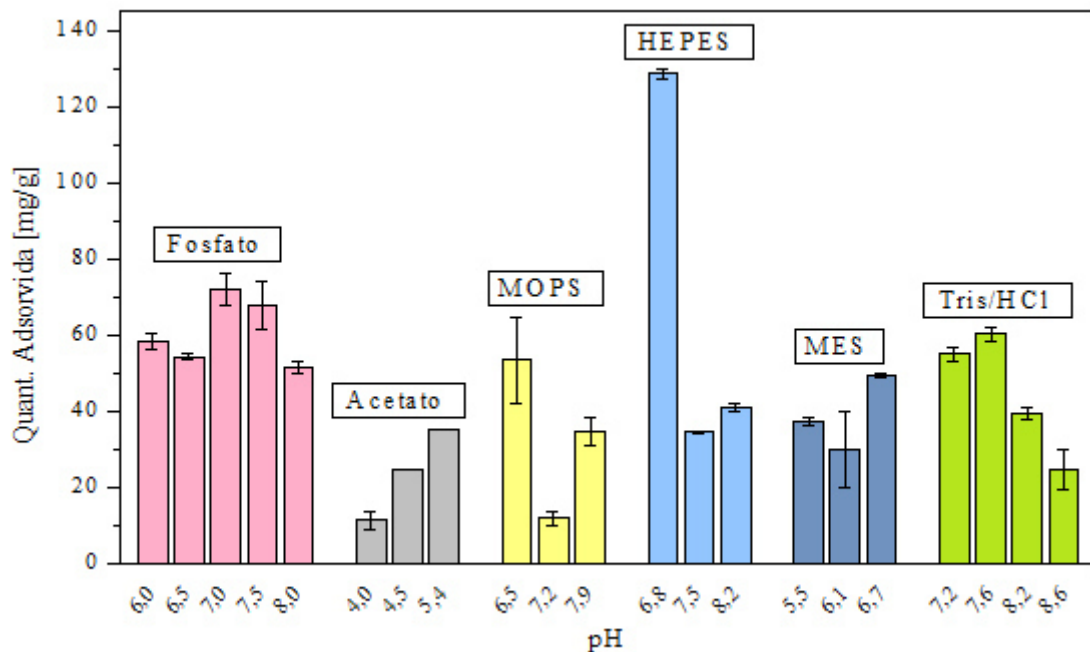
Foram realizados ensaios com IgG de alta pureza a fim de verificar a influência dos principais parâmetros que afetam o fenômeno adsorptivo e para encontrar melhores condições operacionais para a purificação ou concentração dessa imunoglobulina. As análises feitas serão apresentadas em seguida.

4.2.1 Estudo do pH

Uma vez que a adsorção de proteínas é consideravelmente influenciada pelo ponto isoelétrico (pI) destas, devido a existência de cargas líquidas na superfície, mostra-se relevante a manutenção de um pH favorável a adsorção. Em $\text{pH} > \text{pI}$, as proteínas estão carregadas negativamente e, em $\text{pH} < \text{pI}$, estão carregadas positivamente. Sabe-se também que, quando há equivalência entre o pH e o pI, a carga superficial líquida é nula, condição em que as interações entre as moléculas de proteínas são reduzidas, favorecendo as interações proteína-adsorvente. Deste modo, a diferença de cargas pode favorecer ou desfavorecer a interação biomolécula-adsorvente (SANTOS, 2017).

Foi realizado o estudo do pH para obter o melhor tipo de solução tampão para a adsorção de IgG em MQS. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10 e indicam uma maior quantidade de IgG adsorvida, aproximadamente 128 mg/g de adsorvente, em pH 6,8 usando o tampão HEPES. Vale destacar que o pH 6,8 encontra-se dentro da faixa de pI da imunoglobulina G, condição em que as interações IgG-adsorvente foram favorecidas. Dessa forma, o tampão HEPES 25 mM em pH 6,8 foi utilizado nos ensaios posteriores.

Figura 10 – Efeito do pH e do tipo de tampão na adsorção de IgG utilizando MQS ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 2 h).

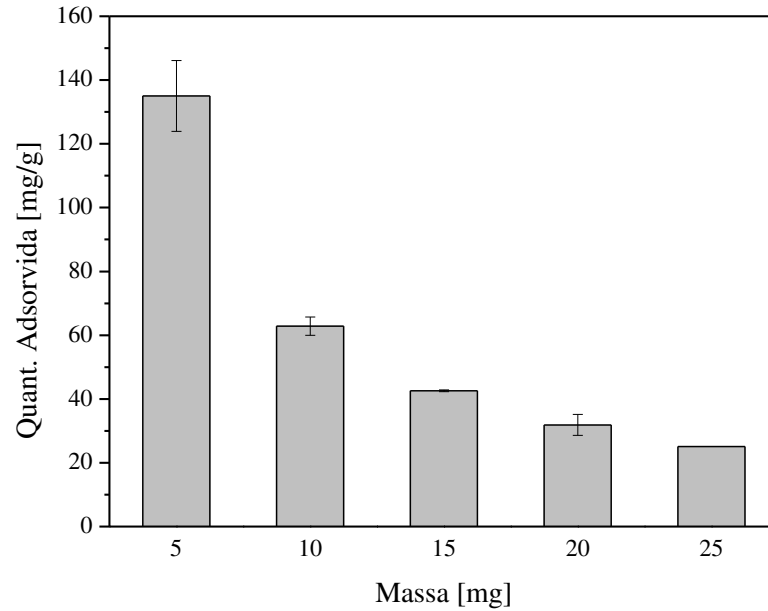


Fonte: Próprio autor.

4.2.2 Estudo da massa

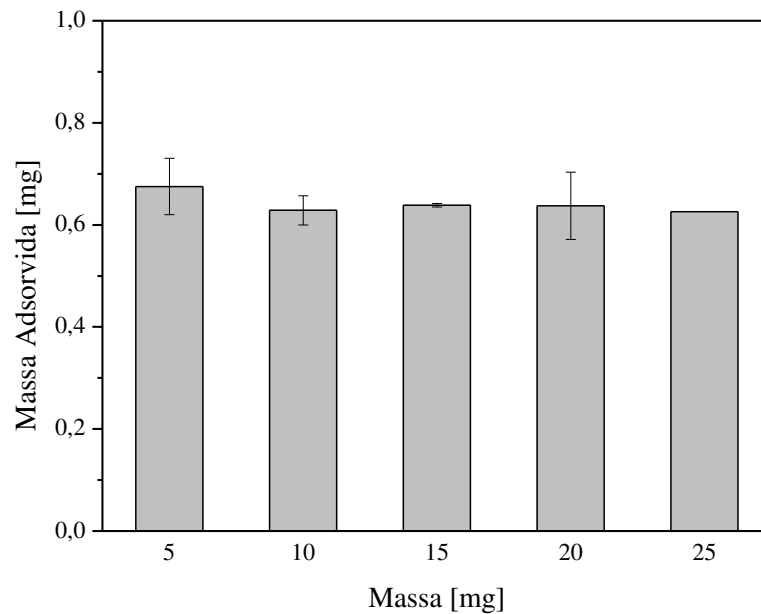
A fim de verificar a menor quantidade de adsorvente necessária para os ensaios de adsorção, foram feitos ensaios com quantidades variáveis de MQS de 5 a 25 mg. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 11 e mostram que o melhor resultado foi obtido com a massa de 5 mg de MQS. Apesar de, aparentemente, esse gráfico mostrar que o fenômeno adsorptivo é prejudicado pela adição de adsorvente, é importante ressaltar que os resultados em questão estão apresentados em função da massa de adsorvente (mg/g de adsorvente), parâmetro variável do ensaio. Para uma melhor visualização e interpretação dos resultados, multiplicou-se as quantidades adsorvidas pela massa utilizada no ensaio, obtendo-se assim a massa total de IgG adsorvida (em miligramas), conforme mostrado na Figura 12. A partir deste, é possível observar que a massa adsorvida é praticamente invariável entre os ensaios, o que nos permite concluir que é mais vantajoso utilizar a massa de 5 mg por resultar em menor gasto do material.

Figura 11 – Quantidade adsorvida em estudo da massa de MQS na adsorção de IgG
($C_0 = 0,75$ mg/mL, Duração = 2 h, HEPES pH 6,8).



Fonte: Próprio autor.

Figura 12 – Massa adsorvida em estudo da massa de MQS na adsorção de IgG
($C_0 = 0,75$ mg/mL, Duração = 2 h, HEPES pH 6,8).

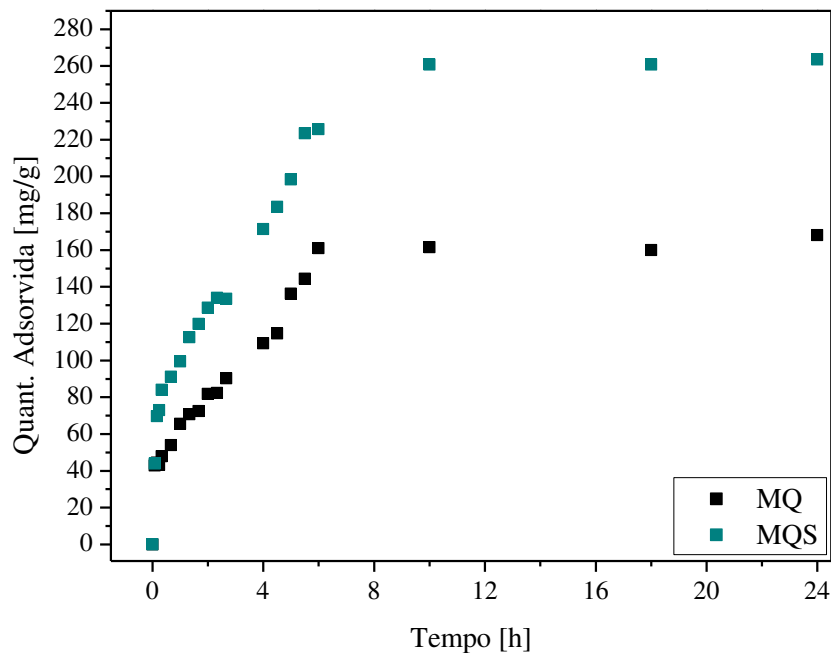


Fonte: Próprio autor.

4.2.3 Cinéticas de adsorção

Para verificar o andamento do processo adsorptivo em diferentes tempos de contato, foram obtidas as curvas cinéticas de adsorção. Para fins comparativos, os ensaios foram realizados com as microesferas sulfatadas e com as não sulfatadas. As curvas com a quantidade adsorvida estão apresentadas na Figura 13, a partir do qual é possível observar que o tempo de equilíbrio para a adsorção das MQS é de 10 horas, enquanto que para as MQ é de 6 horas. Apesar de demandar um tempo maior até alcançar o equilíbrio, as quantidades adsorvidas com as MQS, cerca de 260 mg/g, foram consideravelmente superiores às das MQ, aproximadamente 160 mg/g.

Figura 13 – Variação da quantidade adsorvida em ensaios cinéticos com MQS e MQ na adsorção de IgG ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Massa de adsorvente = 5 mg, HEPES pH 6,8).

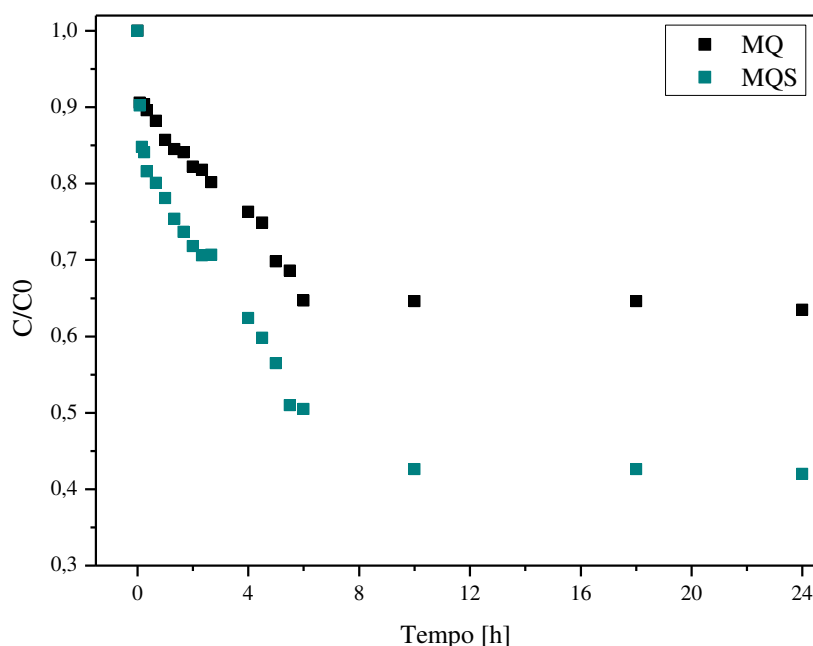


Fonte: Próprio autor.

Outra forma de expressar e analisar esses dados é a partir do decaimento da concentração da fase líquida, adimensionalizado pela concentração inicial do ensaio, conforme apresentado na Figura 14. De acordo com este, é possível observar que há um rápido decaimento da concentração nos primeiros instantes do ensaio, velocidade que vai sendo reduzida com a ocupação dos sítios ativos e diminuição do gradiente de concentração

no decorrer dos ensaios. Por fim, obteve-se que ao atingir o equilíbrio, com a utilização do adsorvente sulfatado, cerca de 60% da massa de IgG presente no meio foi adsorvida, enquanto com o não sulfatado apenas 35% da massa de IgG foi adsorvido.

Figura 14 – Variação da concentração da fase líquida em ensaios cinéticos com MQS e MQ na adsorção de IgG ($C_0 = 0,75$ mg/mL, Massa de adsorvente = 5 mg, HEPES pH 6,8).



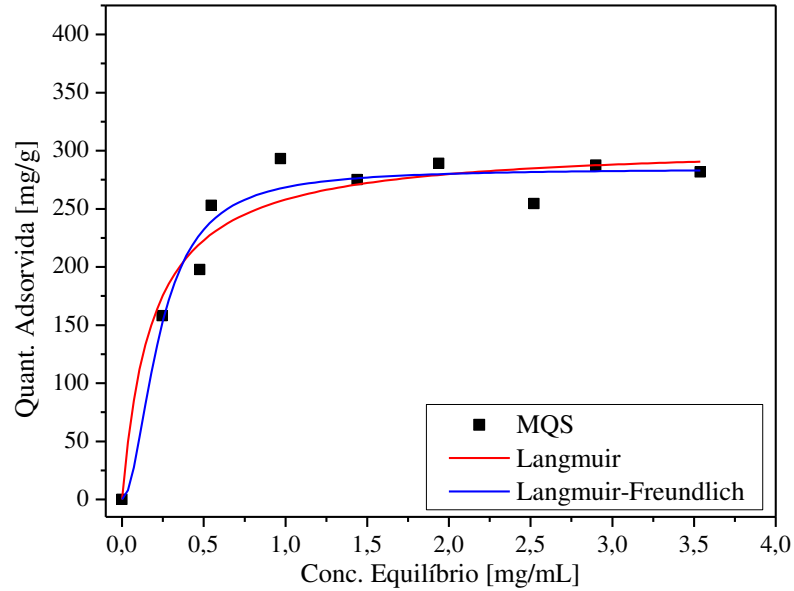
Fonte: Próprio autor.

4.2.4 Isotermas de adsorção

Isotermas de adsorção colaboram significativamente para a compreensão do mecanismo de adsorção, pois esta permite obter informações como a capacidade máxima de adsorção pelo adsorvente. Normalmente, a quantidade de soluto adsorvida aumenta com o aumento da concentração inicial da solução em estudo, embora não em proporção direta, considerados os limites de saturação do adsorvente.

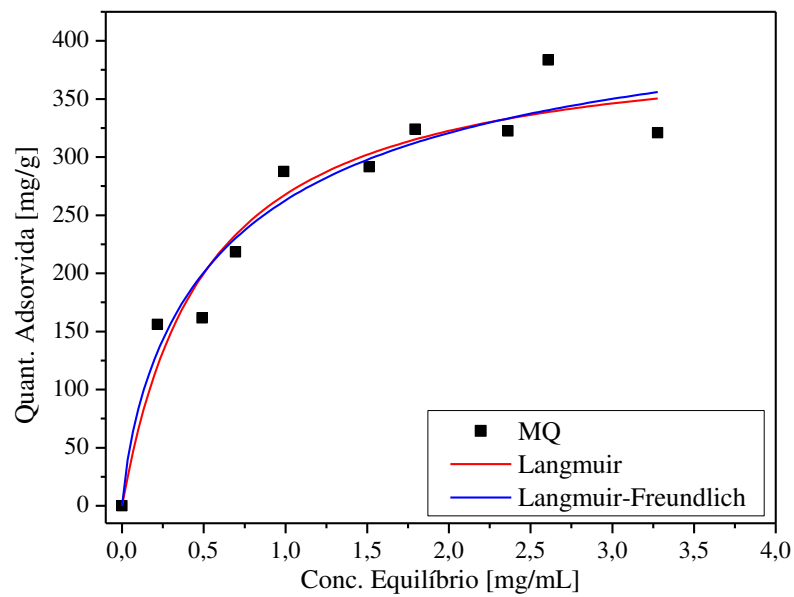
Nesse contexto, foram obtidas as isotermas para as microesferas de quitosana sulfatadas e para as não sulfatadas, utilizando soluções de IgG com concentrações iniciais variando de 0,5 a 4,0 mg/mL. Nas Figuras 15 e 16, respectivamente, estão apresentadas as isotermas obtidas para as MQS e para as MQ. Para verificar o ajuste aos dados experimentais, foram utilizados os modelos de Langmuir e de Langmuir-Freundlich.

Figura 15 – Isoterma de adsorção de IgG utilizando MQS
(Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8).



Fonte: Próprio autor.

Figura 16 – Isoterma de adsorção de IgG utilizando MQ
(Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8).



Fonte: Próprio autor.

De acordo com as figuras 15 e 16 e os parâmetros de ajuste mostrados na Tabela 4, pode-se verificar que os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram satisfatoriamente aos dados experimentais, com valores de coeficiente de determinação (R^2) próximos a unidade, indicando que estes modelos são representativos para o sistema em questão.

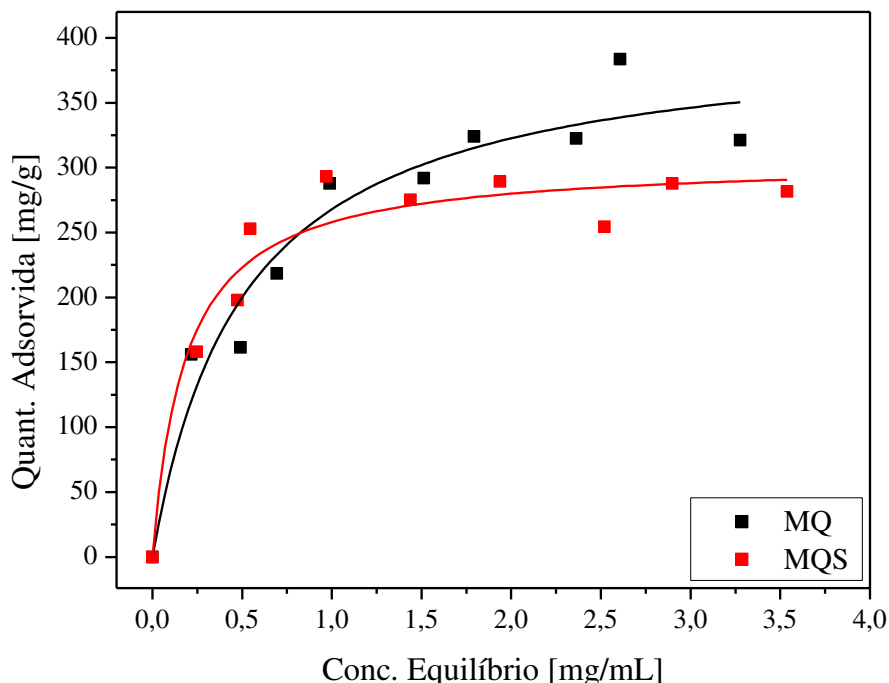
Tabela 4 – Parâmetros de ajuste obtidos a partir dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) ajustado aos dados experimentais na adsorção de IgG com MQS e MQ.

Parâmetros	MQS		MQ	
	L	LF	L	LF
q_{max} (mg/g)	$305,91 \pm 14,43$	$284,54 \pm 11,40$	$405,44 \pm 30,37$	$465,99 \pm 187,21$
k_L (mL/mg)	5,38	–	1,95	–
k_{LF} (mL/mg)	–	4,35	–	1,39
N	–	1,92	–	0,77
R^2	0,94	0,95	0,94	0,93

Fonte: Próprio autor.

A partir dos ajustes realizados é possível observar que ambos adsorventes apresentam elevadas capacidades adsorptivas, sendo o da MQS acima de 284 mg/g e o da MQ acima de 405 mg/g. A fim de comparar melhor o comportamento das isotermas, foram reunidos ambos os resultados na Figura 17, onde é mostrado o ajuste de Langmuir para a MQ e MQS. A partir deste, é possível observar que a quantidade de IgG adsorvida pelas MQS apenas é superior a das MQ para soluções com concentrações de IgG no equilíbrio de até 0,8 mg/mL, condição esta que só foi obtida neste trabalho nos ensaios com soluções de concentração inicial de até 1,0 mg/mL.

Figura 17 – Comparativo entre isotermas de adsorção de IgG utilizando MQ e MQS com ajuste de Langmuir (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8).



Fonte: Próprio autor.

4.3 Ensaios de adsorção com mistura IgG/BSA

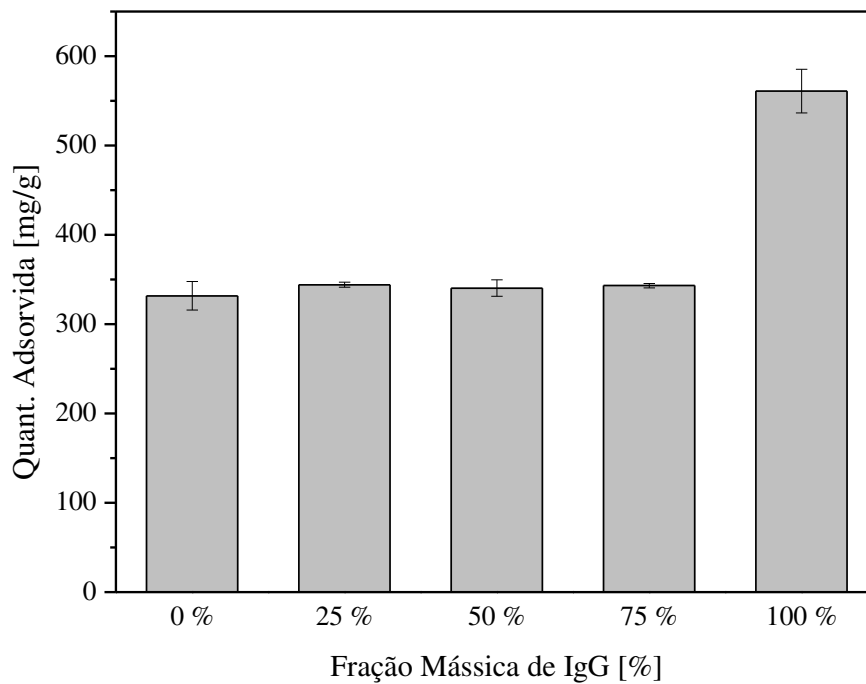
A fim de verificar a seletividade das MQS para adsorção de IgG, foram realizados ensaios de adsorção com misturas de IgG/BSA em diferentes proporções e as análises qualitativas foram realizadas por meio de eletroforeses. Na análise quantitativa, realizada por meio de metodologia adaptada a partir de Bradford (1976), cujos resultados estão expostos na Figura 18, foram obtidos resultados referentes à quantidade total de proteína adsorvida em cada ensaio, não podendo-se distinguir qual a quantidade referente a cada componente.

Analisando os resultados da Figura 18, foi observado que a presença de BSA interfere negativamente nos resultados de adsorção de IgG, pois nos ensaios sem a albumina em solução, a quantidade adsorvida total de proteínas aumentou consideravelmente, em comparação aos ensaios com a presença desta.

Os resultados das eletroforeses estão apresentados na Figura 19, onde foi utilizada a seguinte identificação: marcador de peso molecular (M), amostra inicial do ensaio com mistura $n\%$ IgG (I- n) e amostra final do ensaio com mistura $n\%$ IgG (F- n). A partir da análise

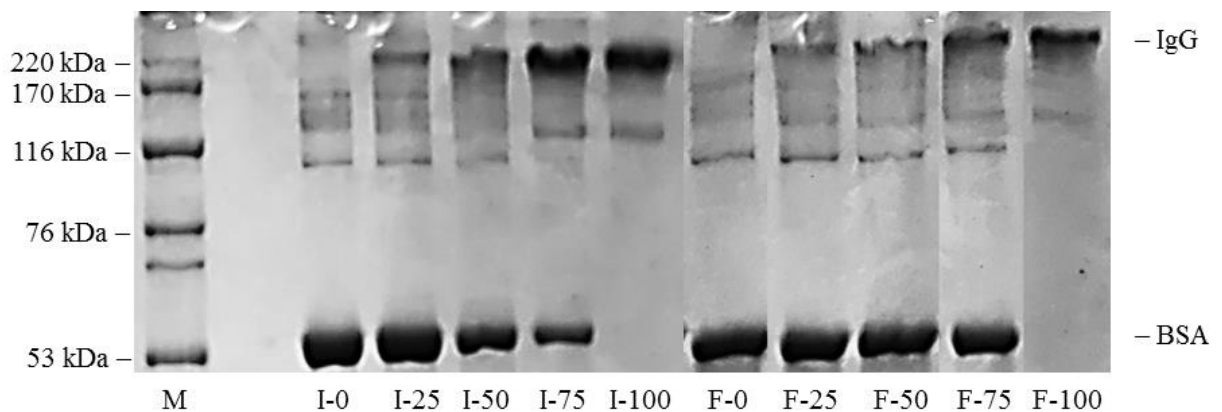
desta, é possível verificar que o adsorvente sulfatado apresenta seletividade para a IgG, uma vez que o decréscimo na intensidade das bandas da imunoglobulina nas amostras finais é relativamente superior ao decréscimo verificado nas bandas referentes a albumina.

Figura 18 – Efeito da presença da proteína BSA na adsorção de IgG utilizando MQS (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8, 1,0 mg/mL de IgG/BSA).



Fonte: Próprio autor.

Figura 19 – Eletroforese das amostras dos ensaios com misturas IgG/BSA, utilizando MQS (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 10 h, HEPES pH 6,8, 1,0 mg/mL de IgG/BSA).



Fonte: Próprio autor.

A partir desses resultados, é possível verificar que, apesar das microesferas de quitosana sulfatadas apresentarem menor capacidade adsorptiva que as MQ para concentrações de IgG superiores a 0,8 mg/mL, estas mostram-se seletivas a adsorção de imunoglobulinas G, tendo potencial aplicação em processos de purificação ou concentração da mesma. Observou-se também que, na presença de BSA, a quantidade de proteína adsorvida diminuiu consideravelmente, utilizando as MQS, o que dá indícios de que este adsorvente seja mais apropriado para processos de concentração de IgG, pois nestes a albumina está presente em menor quantidade que em processos de purificação.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que as microesferas de quitosana sulfatadas apresentam potencial aplicação em processos de purificação ou concentração de imunoglobulina G.

A análise do efeito do tampão empregado e do pH no processo adsorativo mostrou que uma maior quantidade adsorvida é alcançada em tampão HEPES, pH 6,8.

As curvas cinéticas mostraram que ambos os materiais testados entraram em equilíbrio com o sistema lentamente, em torno de 10 horas para as MQS e 6 horas para as MQ. As isotermas de adsorção se ajustaram satisfatoriamente aos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, com coeficientes de determinação próximos a unidade e os ajustes indicaram boas capacidades adsorativas para ambos os adsorventes, aproximadamente 290 mg/g para as MQS e 405 mg/g para as MQ. Verificou-se também que as MQS apenas superam as MQ, em quantidades adsorvidas de IgG, em casos onde a concentração inicial da solução de imunoglobulina é de até 0,8 mg/mL.

A partir dos ensaios com misturas IgG/BSA com as MQS, foi observado que a imunoglobulina G foi preferencialmente adsorvida, em relação a albumina. Constatou-se também que a presença de BSA reduz a quantidade adsorvida de proteína, o que talvez indique que este adsorvente é mais apropriado para processos de concentração de IgG, pois nestes a albumina está presente em menor quantidade.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ANDRADE , Joseph D.; HLADY, Vladimir. Plasma Protein Adsorption: The Big Twelve. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New York, v. 516 p. 158-172, 1987.
- BARCZA, Marcos Villela. **Sulfonação e/ou Sulfatação**. Lorena, 2012. Disponível em: <<http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/SulfonacaoSulfatacao.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- BEZERRA, Bruna Tarciana Cavalcante. **Estudo da remoção de corantes presentes em efluentes da indústria têxtil empregando um bioadsorvente a base de quitosana**. TCC (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.l.: S.n.] v. 72. p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 36**, 20 de maio de 2004. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B7489-5-0%5D.PDF>>. Acesso em: 8 out. 2017.
- BRESOLIN, Igor Tadeu Lazzarotto; SOUZA, Maria Cristiane Martins de; BUENO, Sonia Maria Alves. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto ω -aminodecyl-agarose. **Journal of Chromatography B**, [S.l.]: Elsevier, n. 878, p. 2087-2093, 2010.
- BURNOUF, Thierry. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, [S.l.]: Elsevier, n. 664, p. 3-15, 1995.
- BURNOUF, Thierry; RADOSEVICH, Mirjana. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. **Journal of biochemical and biophysical methods**, [S.l.]: Elsevier, n. 49, p. 575-586, 2001.
- CAVALHEIRO, Alexandre Boeira. **Modificação da superfície da quitosana através da reação de sulfatação semi-heterogênea**. TCC (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/99777>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Hemoderivados**. Rio de Janeiro: 2006. Disponível em: <<https://goo.gl/aWavb6>>. Acesso em: 1 out. 2017.
- COHN, E. J. *et al.* Preparation and properties of serum and plasma protein. IV. A system for the separation into fractions of protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of American Chemical Society**. v. 8, p. 459-475, 1946.

CONDINO-NETO, A. *et al.* Guidelines for the use of human immunoglobulin therapy in patients with primary immunodeficiencies in Latin America. **Allergologia et Immunopathologia**, [S.l.], v. 42, p. 245-260, 2013.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7. p. 21-25, 1998. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>>. Acesso em: 9 out. 2017.

DIAS, Francisco S. *et al.* Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 31, n. 1. p. 160-163, 2008. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No1_160_27-NT06369.pdf>. Acesso em: 11 out. 2017.

FAN, Wen *et al.* Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerface**, [S.l.]: Elsevier, n. 90, p. 21-27, 2012.

FARIA, Ricardo Adriano Dorledo de; BATISTA, Marina Lidiane; HENEINE, Luiz Guilherme Dias. Purificação e caracterização de subtipos slow-moving e fast-moving de imunoglobulina G a partir de soro de coelho. **e-xacta**, Belo Horizonte, v. 6, n. 2, p. 55-60, 2013.

FERREIRA, Bruno Burnier Arcanjo. **Avaliação das resinas de troca iônica (amberlite IRA 67 e IRA 96) para adsorção de ácido láctico obtido a partir do glicerol em coluna de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/25554>>. Acesso em: 10 out. 2017.

FREIRE, Tiago Melo. **Síntese e caracterização de nanoquitosanas magnéticas por sonoquímica e sua aplicação na remoção de azo compostos**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/21820>>. Acesso em: 15 out. 2017.

GERBERDING, S.J.; BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. **Journal of Chromatography**, [S.l.], v. 808, p.141-151, 1998.

GONDIM, Diego Romão. **Quitosana/Alginato epoxilado com corantes imobilizados como potencial fase estacionária para purificação de IgG do soro humano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/5046/1/2012_dis_drgondim.pdf>. Acesso em: 7 out. 2017.

GONSALVES, Arlan de Assis *et al.* Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000700021>>. Acesso em: 15 out. 2017.

HAMILTON, Robert G. The Human IgG Subclasses. **Calbiochem**, [S.l.], 2001. Disponível em: <<https://goo.gl/qir1ig>>. Acesso em: 4 out. 2017.

HARLOW, Edward; LANE, David. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HOFBAUER, Lucia *et al.* Affinity Chromatography for Purification of IgG from Human Plasma. *In*: MAGDELDIN, Sameh (Ed.). **Affinity Chromatography**. [S.l.]: InTech, 2012, p. 107-124. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/affinity-chromatography-for-purification-of-igg-from-human-plasma>>. Acesso em: 10 out. 2017.

HUSE, Klaus; BOHME, Hans-Joachim; SCHOLZ, Gerhard H. Purification of antibodies by affinity chromatography. **Journal of biochemical and biophysical methods**, [S.l.]: Elsevier, n. 50. p. 217-231, maio 2002.

INSTITUTO BUTANTAN. **Audiência Pública**: Fábrica de Hemoderivados. São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/noticias/Documents/2017_09_11%20-%20Apresentacao_AP_Hemoderivados.ppt>. Acesso em: 7 out. 2017.

KEMPF, Christoph; STUCKI, Martin; BOSCHETTI, Nicola. Pathogen inactivation and removal procedures used in the production of intravenous immunoglobulins. **Biologicals**, [S.l.]: Elsevier, n. 35, p. 35-42, 2007.

KOPACIEWICZ, W. *et al.* Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography**, [S.l.]: Elsevier, v. 266. p. 3-21, 1983.

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

LAUS, Rogério *et al.* Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1. p. 34-39, 2006. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol29No1_34_07-AR04317.pdf>. Acesso em: 15 out. 2017.

LEANDRO, Carol Góis *et al.* Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 13, n. 5, p. 343-348, Out. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v13n5/12.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2017.

LIMA, Pedro H. L. *et al.* Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and κ -carrageenan films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.]: Elsevier, n. 111, p. 719-725, 2013.

MACHADO, Margarete O. *et al.* The effectiveness of the protected amino group on crosslinked chitosans for copper removal and the thermodynamics of interaction at the solid/liquid interface. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.]: Elsevier, n. 77, p. 760-766, 2009.

MADIGAN, Michael T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MALE, David. *et al.* **Immunology**. 7th ed. Philadelphia: Mosby, 2006.

MARTÍNEZ, Alfredo Córdova; ALVAREZ-MON, Melchor. O sistema imunológico (I): conceitos gerais, adaptação ao exercício físico e implicações clínicas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 5, n. 3, p. 120-125, jun. 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v5n3/10.pdf>>. Acesso em: 4 out. 2017.

MAYER, Gene. Imunoglobulinas: estrutura e função. *In*: ESCOLA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DA CAROLINA DO SUL. **Imunologia** [Carolina do Sul], [20--]. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/Portuguese/immuno-port-chapters.htm>>. Acesso em: 5 out. 2017.

MIRANDA, Emerson Alves *et al.* **Processo de purificação de imunoglobulina G (IgG) a partir do soro ou plasma humano por cromatografia em gel (omega)-aminoxil-agarose**. BR nº PI 0900276-6 A2, 06 fev. 2009, 26 out. 2010. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/84718>>. Acesso em: 8 out. 2017.

MORAES, Anaftália Felismino. **Quitosana sulfatada: caracterização e estudo da hemocompatibilidade**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/23214>>. Acesso em: 11 out. 2017.

MOURA NETO, Érico de. **Síntese de nanopátulas da galactomanana da fava danta (*Dimorphandra gardneriana*) modificada**. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/11586>>. Acesso em: 11 out. 2017.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do *et al.* **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 2014. Disponível em: <<http://www.repositoriobib.ufc.br/000016/000016ea.pdf>>. Acesso em: 9 out. 2017.

PESSOA Jr., Adalberto; KILIKIAN, Beatriz Vahan (Coord.) **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

PIRES, Natália R. *et al.* Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.]: Elsevier, n. 91, p. 92-99, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.011>>. Acesso em: 15 out. 2017.

RAKHMANOVA, V. N. *et al.* Determination of the degree of sulfation of Bombyx mori chitosan by conductometric titration. **Russian Journal of Applied Chemistry**, [S.l.], v. 82, p. 2192-2196, 2009.

RIBEIRO, Mariana Borsoi. **Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/266196>>. Acesso em: 8 out. 2017.

ROQUE, A. Cecília A.; LOWE, Christopher R.; TAIPA, M. Ângela. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. **Biotechnology Progress**, [United States], n. 20. p. 639-654, 2004. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/8529752>>. Acesso em: 5 out. 2017.

ROQUE, Ana C. A.; SILVA, Cláudia S. O.; TAIPA, M. Ângela. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: Advances and perspectives. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1160. p. 44-55, 2007.

SANTOS, Santangela Oliveira. **Purificação de IgG humana por cromatografia de afinidade utilizando corantes vermelhos imobilizados em matriz de quitosana modificada**. TCC (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SCHROEDER Jr., Harry W.; CAVACINI, Lisa. Structure and function of immunoglobulins. **The Journal of allergy and clinical immunology**, [S.l.], v. 125 (2 0 2), p. 41-52, 2010. Disponível em: <[http://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(09\)01465-1/fulltext](http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(09)01465-1/fulltext)>. Acesso em: 6 out. 2017.

SOUZA, Maria Cristiane Martins de. **Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/266393>>. Acesso em: 9 out. 2017.

TEVA, Antônio; FERNANDEZ, José Carlos Couto; SILVA, Valmir Laurentino. Imunologia. *In*: MOLINARO, Etelcia; CAPUTO, Luzia; AMENDOEIRA, Regina (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2010, v. 4, p. 19-124.

TORRES, Marco Antônio. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/266181>>. Acesso em: 9 out. 2017.

VIEIRA, Adriana Pires. **Quitosana modificada quimicamente como agente na remoção de metais e corantes e liberação controlada de fármacos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/250067>>. Acesso em: 10 out. 2017.

VIKHOREVA, G. *et al.* Preparation and anticoagulant activity of a low-molecular-weight sulfated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.]: Elsevier, n. 62, p. 327-332, 2005.

WAN NGAH, W. S.; FATINATHAN, S. Pb(II) biosorption using chitosan and chitosan derivatives beads: Equilibrium, ion exchange and mechanism studies. **Journal of Environmental Sciences**, [S.l.]: Elsevier, n. 22, p. 338-346, 2010.

WANG, Tao; TURHAN, Mahir; GUNASEKARAN, Sundaram. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, [S.l. : S.n.], n. 53, p. 911-918, 2004.

ZUÑIGA, Abraham Damian Giraldo *et al.* Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S.l.], 2003, v. 21, n. 1, p. 61-82. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1149>>. Acesso em: 9 out. 2017.