



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LARISSA DA SILVA LAURENTINO

**PURIFICAÇÃO DE IgG DO SORO HUMANO UTILIZANDO MATRIZES DE
HIDROXIAPATITA DE ESTRÔNCIO E DE QUITOSANA-ALGINATO COM
CORANTES IMOBILIZADOS**

FORTALEZA

2022

LARISSA DA SILVA LAURENTINO

**PURIFICAÇÃO DE IgG DO SORO HUMANO UTILIZANDO MATRIZES DE
HIDROXIAPATITA DE ESTRÔNCIO E DE QUITOSANA-ALGINATO COM CORANTES
IMOBILIZADOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Pierre Basílio de Almeida Fechine

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L413p Laurentino, Larissa da Silva.
Purificação de IgG do soro humano utilizando matrizes de hidroxiapatita de estrôncio e de quitosana-alginato com corantes imobilizados / Larissa da Silva Laurentino. – 2023.
107 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.
Coorientação: Prof. Dr. Pierre Basílio de Almeida Fechine.
1. Imunoglobulina G. 2. corantes reativos. 3. hidroxiapatita. 4. estrôncio. I. Título.

CDD 660

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha saúde e por ter me concedido disposição para os estudos. Por me manter de pé em todos os momentos, por todos os anjos que colocastes no meu caminho.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida e as minhas irmãs, Louane, Lorena e Kátia que me incentivaram a nunca desistir.

Ao Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMAT) da Universidade Federal do Ceará, em especial ao meu coorientador Prof. Pierre Basílio de Almeida Fechine, pela gentileza em abrir as portas do laboratório, pela paciência e todas as contribuições em todas as etapas desse trabalho, sempre contribuindo de todas as formas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior, pela oportunidade, confiança e apoio ao longo do doutorado. Obrigada pelo enorme incentivo e força para que eu pudesse concluir o doutorado.

Aos professores participantes da banca examinadora, Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin, Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo, Prof. Dr. Micael de Andrade Lima, Prof. Dr. Diego Romão Gondim pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos do LAPS&C (Luno, Paulinha, Tiago, Bruna, Darlyson, Natália, Jéssica Cunha, Jéssica Martins, Érika Maria, Isa, Santângela, Thaina, Jansen), obrigada por todo o apoio e por tornar tudo mais leve.

A todos meus IC's durante o doutorado (Francisco de Assis e Isabele Braga), muito obrigada pelo suporte nas pesquisas e por me ajudarem tanto.

Aos laboratórios parceiros que contribuíram de alguma maneira para obtenção de importantes resultados: LPACO₂ e NPL.

Aos amigos de trabalho por toda compreensão e incentivo para que eu pudesse concluir o meu doutorado, sem vocês não teria conseguido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

RESUMO

Imunoglobulinas humanas, com destaque à IgG, são anticorpos com ampla aplicação terapêutica no tratamento de doenças do sistema imunológico, o que justifica a sua necessidade de alta pureza, normalmente atingida com métodos cromatográficos. O presente trabalho teve por finalidade avaliar o potencial das matrizes microcompósitas de quitosana-alginato com corantes reativos imobilizados e nanopartículas de hidroxiapatita de estrôncio (SrHAp) em processo cromatográfico visando a purificação de IgG humana. Foram obtidos 4 microcompósitos quitosana-alginato (MQA) com corantes reativos imobilizados: MQA-Cibacron Blue F3GA (MQA-CB), MQA-Reactive Blue 4 (MQA-RB), MQA-Reactive Red 120 (MQA-RR) e MQA-Procion Red MX5B (MQA-PR). Os materiais foram caracterizados por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Já as nanopartículas de SrHAp foram sintetizadas via co-precipitação e submetidas a tratamento térmico por 5h. Foram obtidos dados fundamentais em batelada (efeito do pH, cinética e isoterma de adsorção) utilizando soluções com a IgG, além de soluções com a mistura de IgG e albumina do soro humano (HSA). A incorporação dos corantes em estudo aumentaram significativamente a adsorção de IgG, apresentando uma adsorção de 625,28 mg/g para o MQA-CB, 1022,17 mg/g para o MQA-RB, 698,38 e 718,57 mg/g para o MQA-PR e MQA-RR, respectivamente. Nos ensaios cromatográficos, de acordo com as análises de eletroforese SDS-PAGE, foi conseguido uma purificação de IgG com a matriz MQA-RR. Em contrapartida, os outros materiais não foram capazes de purificar IgG humana, sendo melhor recomendado para uma pré-purificação desta proteína. No que se refere à SrHAp, esta apresentou elevada capacidade de adsorção (1128,63 mg/g). E, através das análises de eletroforese SDS-PAGE, comprovaram que a IgG foi a de maior retenção na matriz com misturas binárias e do soro humano diluído.

Palavras-chave: Imunoglobulina G; corantes reativos; hidroxiapatita; estrôncio.

ABSTRACT

Human immunoglobulins, especially IgG, are antibodies with wide therapeutic application in the treatment of diseases of the immune system, which justifies their need for high purity, normally achieved with chromatographic methods. This work aimed to evaluate the potential of chitosan-alginate microcomposite matrices with immobilized reactive dyes and strontium hydroxyapatite nanoparticles (SrHAp) in a chromatographic process aiming at the purification of human IgG. Four chitosan-alginate (MQA) microcomposites were obtained with immobilized reactive dyes: MQA-Cibacron Blue F3GA (MQA-CB), MQA-Reactive Blue 4 (MQA-RB), MQA-Reactive Red 120 (MQA-RR) and MQA- Procion Red MX5B (MQA-PR). The materials were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). SrHAp nanoparticles were synthesized via co-precipitation and subjected to heat treatment for 5h. Fundamental batch data (effect of pH, kinetics and adsorption isotherm) were obtained using solutions with IgG, in addition to solutions with a mixture of IgG and human serum albumin (HSA). The incorporation of the dyes under study significantly increased the adsorption of IgG, showing an adsorption of 625.28 mg/g for MQA-CB, 1022.17 mg/g for MQA-RB, 698.38 and 718.57 mg/g for the MQA-PR and MQA-RR, respectively. In the chromatographic assays, according to the SDS-PAGE electrophoresis analyses, a purification of IgG with the MQA-RR matrix was achieved. In contrast, the other materials were not able to purify human IgG, being better recommended for a pre-purification of this protein. With regard to SrHAp, it showed a high adsorption capacity (1128.63 mg/g). And, through SDS-PAGE electrophoresis analysis, they proved that IgG was the one with the highest retention in the matrix with binary mixtures and diluted human serum.

Keywords: Immunoglobulin G; reactive dyes; hydroxyapatite; strontium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de agitação rotatório empregado para os ensaios de adsorção em batelada.	36
Figura 2 - Sistema operacional em leito fixo composto por: 1: Alimentação; 2: Bomba peristáltica; 3: Coluna; 4: Coletor de frações	41
Figura 3 - Matrizes cromatográfica a base de quitosana-alginato MQA (a) e com os corantes Cibacron Blue F3GA (b), Reactive Blue 4 (c), Reactive Red 120 (d) e Procion Red (e) imobilizados.....	44
Figura 4 - Espectros FTIR de (a) quitosana natural, (b) AlgNa e (c) MQA.....	45
Figura 5 - Espectros FTIR do MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-RR (c) e MQA-PR.	47
Figura 6 - Curvas de TG da quitosana natural (a) e MQA (b).	48
Figura 7 - Curvas de DTG da quitosana natural (a) e MQA (b).....	49
Figura 8 - Curvas de TG das amostras MQA-CB (linha vermelha), MQA-RB (linha preta), MQA-PR (linha azul) e MQA-RR (linha verde).....	50
Figura 9 - Curva de DTG das amostras MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-PR (c) e MQA-RR.....	50
Figura 10 - Curva de DSC para quitosana pura (a) e MQA (b)	52
Figura 11 - Curvas de DSC para os corantes MQA-CB (linha preta), MQA-RB (linha vermelha).....	52
Figura 12 - Curvas de DSC para os corantes MQA-PR (linha preta) e MQA-RR (linha vermelha).....	53
Figura 13 - Ponto de carga zero dos adsorventes sintetizados: MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-RR (c), MQA-PR (d) e MQA (e).....	54
Figura 14 - Efeito da adsorção de IgG (0,75 mg/mL) com a variação do pH e tampões (25 mM) para o MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-PR (c) e MQA-RR (d).....	56
Figura 15 - Adsorção de IgG em MQA-CB (FOS pH 6,5), MQA-RB (Tris/HCl pH 7,2), MQA-RR (FOS pH 6,0) e MQA-PR (FOS pH 6,0) sob influência de diferentes massas de adsorvente. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h).....	58
Figura 16 - Massa adsorvida de IgG em MQA-CB (FOS pH 6,5), MQA-RB (Tris/HCl pH 7,2), MQA-RR (FOS pH 6,0) e MQA-PR (FOS pH 6,0) sob influência de diferentes massas de matriz cromatográfica. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h).....	59

Figura 17 - Cinética de adsorção de IgG em MQA-CB (FOS pH 6,5), MQA-RB (Tris/HCl pH 7,2), MQA-RR (FOS pH 6,0) e MQA-PR (FOS pH 6,0) (concentração inicial de 1,0 mg/mL, massa de adsorvente 5 mg).....	60
Figura 18 - Isotermas de adsorção de IgG (concentrações de 0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-CB e MQA ^{CB} usando o tampão FOS pH 6,5 (25 mM) e tempo de adsorção de 6 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir.	62
Figura 19 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-RB e MQA ^{RB} usando o tampão TRIS/HCl pH 7,2 (25 mM) e tempo de adsorção de 7 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir	63
Figura 20 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-RR e MQA ^{RR} usando o tampão FOS pH 6,0 (25 mM) e tempo de adsorção de 6 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir.	64
Figura 21 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-PR e MQA ^{PR} usando o tampão FOS pH 6,0 (25 mM) e tempo de adsorção de 4 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir.	65
Figura 22 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando MQA-CB (cinza) e MQA ^{CB} (preto) com diferentes proporções de IgG (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão fosfato pH 6,5, 1,0 mg/mL de IgG/HSA)	67
Figura 23 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA-CB e MQA ^{CB} com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão fosfato pH 6,5, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).....	67
Figura 24 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando MQA-RB (cinza) e MQA ^{RB} (preto) com diferentes proporções de IgG (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 7 h, tampão Tris/HCl pH 7,2, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).	68
Figura 25 - Géis de eletroforese da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA-RB e MQA ^{RB} com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 7 h, tampão Tris/HCl pH 7,2, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).....	69
Figura 26 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando MQA-RR, MQA-PR e MQA com diferentes proporções de IgG (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão FOS pH 6,0, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).	70

- Figura 27 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA-RR e MQA-PR com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão FOS pH 6,0, 1,0 mg/mL de IgG/HSA). 70
- Figura 28 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 4 h, tampão fosfato pH 6,0, 1,0 mg/mL de IgG/HSA). 71
- Figura 29 - Perfis cromatográficos com soro humano (SH) diluído em diferentes tampões na concentração de 2 mg/mL a uma vazão de 0,5 mL/min utilizando a matriz MQA-CB. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: Tampão 50 mM + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R). 73
- Figura 30 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz MQA-CB com o soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 6,5 (a); Tris/HCl 25mM pH 7,2 (b) e HEPES 25 mM pH 6,8 (c) em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G. 74
- Figura 31 - Perfis cromatográficos com soro humano (SH) diluído em diferentes tampões na concentração de 2 mg/mL a uma vazão de 0,5 mL/min utilizando a matriz MQA-RB. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: Tampão 50 mM + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R). 76
- Figura 32 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz MQA-RB com o soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,0 (a); Tris/HCl 25mM pH 7,2 (b) e HEPES 25 mM pH 6,8 (c) em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G. 77
- Figura 33 - Perfis cromatográficos com soro humano (SH) diluído em diferentes tampões na concentração de 2 mg/mL a uma vazão de 0,5 mL/min utilizando a matriz MQA-RR. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: Tampão 50 mM + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R). 79

- Figura 34 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz MQA-RR com o soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 6,0 (a); Tris/HCl 25mM pH 7,2 (b) e HEPES 25 mM pH 6,8 (c) em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P:** Padrão de alto peso molecular; **A:** amostra de soro humano; **I:** Adsorção; **L:** Lavagem; **E:** Eluição; **R:** Regeneração; **IgG:** Imunoglobulina do tipo G..... 79
- Figura 35 - Efeito da adsorção de IgG (1,0 mg/mL) com a variação do pH e tampões (10 mM) usando SrHAp. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h). 82
- Figura 36 - Adsorção de IgG em SrHAp (FOS pH 7,4) sob influência de diferentes quantidade de massa de matriz multimodal. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h)..... 84
- Figura 37 - Massa adsorvida de IgG em SrHAp (FOS pH 7,4) sob influência de diferentes massas de matriz multimodal. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h). 84
- Figura 38 - Cinética de adsorção de IgG em SrHAp (FOS pH 7,4; concentração inicial de 1,0 mg/mL; massa de adsorvente 5 mg). 85
- Figura 39 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em SrHAp usando o tampão FOS pH 7,4 (10 mM), massa de adsorvente 5 mg, tempo de adsorção de 300 min. Equações de ajustes de Langmuir (linha vermelha). 86
- Figura 40 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando nanopartículas de SrHAp (massa = 5 mg, tempo de contato 5 h, FOS pH 7,4; concentração da solução = 1,0 mg/mL). 88
- Figura 41 - Géis de eletroforese da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando SrHAp com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 5 h, tampão FOS pH 7,4). 89
- Figura 42 - Perfis cromatográficos com IgG (a), HSA (b) de alta pureza e a mistura binária IgG/HSA diluídos no tampão FOS 25 mM pH 7,4, concentração de 1 mg/mL a uma vazão de 0,8 mL/min utilizando a matriz SrHAp. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: FOS 50 mM pH 7,4 + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A); Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R). 91
- Figura 43 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz SrHAp com a mistura IgG/HSA diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,4 em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P:** Padrão de

alto peso molecular; **A:** amostra de soro humano; **I:** Adsorção; **L:** Lavagem; **E:** Eluição; **R:** Regeneração; **IgG:** Imunoglobulina do tipo G. 92

Figura 44 - Perfis cromatográficos com soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,4, concentração de 3 mg/mL a uma vazão de 0,8 mL/min utilizando a matriz SrHAp. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: FOS 50 mM pH 7,4 + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A); Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R). 94

Figura 45 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz SrHAp com soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,4 em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P:** Padrão de alto peso molecular; **A:** amostra de soro humano; **I:** Adsorção; **L:** Lavagem; **E:** Eluição; **R:** Regeneração; **IgG:** Imunoglobulina do tipo G. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química e massa molar (Mw) dos ligantes corantes.	33
Tabela 2 - Frações mássicas utilizadas nos ensaios de adsorção com mistura IgG/HSA	39
Tabela 3 - Bandas e atribuições obtidas em cada etapa da síntese	46
Tabela 4 - Bandas e atribuições obtidas com a imobilização dos corantes na matriz quitosana-alginato.	47
Tabela 5 - Resultado dos ensaios da determinação do pH_{PCZ}	55
Tabela 6 - Parâmetros de ajuste obtidos através do modelo de Langmuir (L) para adsorção de IgG em MQA-CB e MQA ^{CB} utilizando tampão Fosfato pH 6,5 (25 mM) e em MQA-RB e MQA ^{RB} utilizando tampão Tris/HCl pH 7,2 (25 mM).	64
Tabela 7 - Parâmetros de ajuste obtidos através do modelo de Langmuir (L) para adsorção de IgG em MQA-PR, MQA-RB e MQA utilizando tampão Fosfato pH 6,0 (25 mM).	66
Tabela 8 - Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF), para adsorção de IgG em SrHAp utilizando tampão FOS pH 7,4 (10 mM).	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlNa	Alginato de sódio
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BSA	Albumina do Soro Bovino
CB	Cibacron Blue F3GA
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
FOS	Fosfato de Sódio
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
F	Freundlich
HEPES	Ácido hidroxietilpiperazina etano sulfônico
HSA	Albumina do Soro Humano
IgG	Imunoglobulinas do Isotipo G
L	Langmuir
LF	Langmuir-Freundlich
MOPS	Ácido morfolinopropano sulfônico
MQA	Microcompósito quitosana/alginate
Mw	Massa molecular
PAGE	Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
PR	Procion Red M5XB
RR	Reactive Red 120
RB	Reactive Blue 4
QT	Quitosana Natural
Tris	Trizima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Hemoderivados	21
2.2	Imunoglobulinas G (IgG).....	22
2.3	Técnicas para purificação de proteínas	23
2.3.1	<i>Cromatografia de afinidade</i>	24
2.3.1.1	<i>Matrizes para cromatografia de afinidade.....</i>	25
2.3.1.1.1	<i>Quitosana.....</i>	26
2.3.1.1.2	<i>Alginato</i>	27
2.3.1.1.3	<i>Complexo polimérico Quitosana-Alginato.....</i>	27
2.3.2	<i>Cromatografia de modo misto</i>	28
2.4	Hidroxiapatita.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Síntese e caracterização das microesferas compósitas quitosana-alginato (MQA).....	32
3.1.1	<i>Imobilização dos corantes reativos nas microesferas compósitas quitosana/alginato</i>	32
3.1.2	<i>Caracterização das microesferas compósitas quitosana-alginato imobilizadas com corantes.....</i>	34
3.2	Hidroxiapatita de estrôncio (SrHAp).....	36
3.3	Ensaio em Batelada com IgG de alta pureza.....	36
3.3.1	<i>Estudo do efeito do tampão e pH na adsorção de proteínas</i>	37
3.3.2	<i>Estudo para o efeito da massa do adsorvente</i>	37
3.3.3	<i>Cinética e Isoterma de adsorção</i>	38
3.3.4	<i>Ensaio de adsorção com mistura IgG/HSA</i>	38

3.3.5	<i>Eletofórese em gel de Poliacrilamina com Dodecilsulfato de sódio (SDS-PA)</i>	40
3.4	Ensaio em leito fixo	40
3.4.1	<i>Matrizes de pseudoafinidade</i>	40
3.4.2	<i>Matriz multimodal</i>	42
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	43
4.1	Matriz de pseudoafinidade	43
4.1.1	<i>Síntese das microesferas compósita quitosana-alginato</i>	43
4.1.2	<i>Caracterização das microesferas compósita quitosana-alginato</i>	44
4.1.2.1	<i>FTIR</i>	44
4.1.1.2	<i>Análise termogravimétrica</i>	48
4.1.1.3	<i>Análise de DSC</i>	51
4.1.1.4	<i>Ponto de carga zero</i>	53
4.1.3	Ensaio em batelada	55
4.1.3.1	<i>Efeito do pH e tampão</i>	55
4.1.3.2	<i>Efeito da massa de adsorvente</i>	58
4.1.3.3	<i>Cinética e Isoterma de adsorção</i>	59
4.1.3.4	<i>Ensaio de adsorção com mistura IgG/HSA</i>	66
4.1.4	Ensaio em leito fixo	72
4.2	Matriz Multimodal	80
4.2.1	<i>Síntese e caracterizações das nanopartículas de SrHAp</i>	80
4.2.2	Ensaio em batelada	81
4.2.2.1	<i>Efeito do pH e tampão</i>	81
4.2.2.2	<i>Efeito da massa de adsorvente</i>	83
4.2.2.3	<i>Cinética e isoterma de adsorção</i>	84
4.2.2.4	<i>Ensaio de adsorção com mistura IgG/HSA</i>	87
4.2.3	Ensaio em leito fixo	89

5	CONCLUSÕES.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A imunoglobulina é uma proteína produzida por plasmócitos e outros linfócitos, que exerce seu efeito imunomodulador em diferentes componentes do sistema imunológico. É obtido do sangue através do processo de fracionamento do plasma e é purificado para aplicações em hipogamaglobulinemia, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP), imunodeficiência, miastenia gravis e outras aplicações (BURNOUF, 2007; AYYAR *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2019).

O mercado global de imunoglobulina foi avaliado em aproximadamente US\$ 11.575 milhões em 2020 e espera-se que atinja US\$ 16.890 milhões em 2026 com CAGR (do inglês, *Compound Annual Growth Rate*, taxa de crescimento anual composto) de 6,5% durante o período de previsão. Espera-se que o mercado de imunoglobulinas mostre um rápido crescimento devido ao aumento da prevalência de doenças de imunodeficiência, maior adoção de imunoglobulinas para tratamentos de doenças e crescentes atividades de pesquisa e desenvolvimento (MORDOR INTELLIGENCE, 2022).

As imunoglobulinas possuem cinco diferentes tipos: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD (AYYAR *et al.*, 2012). As IgGs representam cerca de 75% das imunoglobulinas séricas e, é reconhecida como um produto chave dentre as imunoglobulinas decorrente da crescente demanda em aplicações terapêuticas, como câncer, doenças infecciosas e deficiências seletivas de anticorpos (BURNOUF, 2007; AYYAR *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2019). Além dessas importantes aplicações, a IgG é muito utilizada em kits de diagnósticos e como ligante de imunoafinidade para purificação de proteínas e antígenos. Para todas as aplicações é de suma importância que se tenha um grau de pureza elevado (LIU *et al.*, 2019).

A purificação de IgG é um desafio devido à grande quantidade de albumina presente no soro humano combinada com a complexidade de outros componentes do soro. Para aplicações biomédicas, as IgGs são completamente purificadas usando uma combinação de vários métodos. Normalmente, primeiro utiliza-se a precipitação com etanol a frio para fracionar as proteínas presentes no plasma. Em seguida, utilizam-se técnicas cromatográficas para aumentar a pureza da IgG (PRASANNA e VIJAYALAKSHMI 2010; DHANDAPAN *et al.*, 2022).

Nosso grupo de pesquisa estudou a imobilização do ligante corante Cibacron Blue F3G-A em matriz de quitosana/alginato epoxilado para purificação de IgG humana utilizando a técnica por cromatografia de afinidade. Um material em forma de grânulos foi obtido e, pela análise de micrografia eletrônica de varredura, foi formado poros com alta rugosidade. A nova fase estacionária mostrou alta afinidade para IgG podendo ser um potencial em processos cromatográficos para purificação de IgG humana (GONDIM *et al.*, 2012; GONDIM *et al.*, 2014). Entretanto, um material para grandes proporções em escala industrial, deve apresentar considerável estabilidade química e física controladas (ÖZKARA *et al.*, 2004; TÜZMEN *et al.*, 2010). Como o material obtido não apresentou uniformidade faz-se necessário uma melhoria do material obtido.

A cromatografia de hidroxiapatita (HAC) é um dos métodos de cromatografia mais antigos no campo de separações de biomoléculas (TISELIUS *et al.*, 1956; BERNARDI, 1971) e tem sido usada para separação de proteínas e DNAs (CUMMINGS *et al.*, 2009; GAGNON *et al.*, 2009; GAGNON e BEAM 2009; NAKAGAWA *et al.*, 2010; MORRISON *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2018). É considerada uma cromatografia de modo misto ou multimodal. A maior parte da cromatografia de modo misto tem ligantes hidrofóbicos, de troca iônica e de ligações de hidrogênio. HAC é único na exploração de interação eletrostática (troca iônica) e afinidade de metal (ITOH *et al.*, 2019). Muitos estudos mostraram que o HAC permitiu um bom desempenho de separação de difícil separação, como a remoção de agregados de anticorpos monoclonais (GAGNON *et al.*, 2009; MORRISON *et al.*, 2011), que não pode ser alcançado por uma cromatografia de modo único, como cromatografia de troca iônica ou cromatografia de interação hidrofóbica.

Estudos demonstraram o significado e os benefícios das substituições de íons na estrutura cristalina da hidroxiapatita (HAp) (EDWIN e WILSON, 2019). Essas incorporações de íons produzem modificações em muitas propriedades físicas devido aos diferentes raios iônicos, como cristalinidade, tamanho do cristalito, parâmetros de rede, morfologia ou mesmo na estabilidade térmica e solubilidade (RATNAYAKE *et al.*, 2017; KOVÁSC *et al.*, 2018). Materiais de apatita dopada com estrôncio e/ou hidroxiapatita de estôncio mostraram possuir potencial para várias aplicações, como materiais bioeletrônicos (AL-WAFI *et al.*, 2017), regeneração óssea (LANDI *et al.*, 2007; EHRET *et al.*, 2017; FRASNELLI *et al.*, 2017) administração de drogas e

implantes dentários (PARK; KIM; JANG, 2010; HORI; HIRANO; OHTA, 2017). No entanto, tanto quanto sabemos, não há relatos sobre a potencial aplicação de hidroxiapatita de estrôncio como matriz para purificação de IgG. Portanto, diante dessa prerrogativa, tem-se a necessidade de investigar o potencial uso desse material em processos cromatográficos, visto que há um melhoramento do desempenho da hidroxiapatita de estrôncio frente à de cálcio.

Diante disso, o objetivo geral do trabalho é investigar o uso de duas matrizes cromatográficas visando a purificação ou pré-purificação de IgG humana. Para isso, foram empregadas técnicas cromatográficas, como a técnica por pseudoafinidade e multimodal. Além disso, ensaios em batelada e experimentos cromatográficos, foram importantes para obter parâmetros que possibilitem um melhor estudo desses adsorventes na purificação de IgG humana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hemoderivados

Para se entender o que são hemoderivados, primeiro se faz necessário entender a diferença entre plasma e soro humano. Ambos, plasma e soro, são obtidos a partir da centrifugação do sangue humano. Após a coleta do sangue, o que determina a diferenciação entre plasma e soro é a presença ou não de anticoagulante. Sendo assim, plasma é a parte líquida de um sangue com presença de anticoagulante e soro é a parte líquida de um sangue sem anticoagulante (SOTELO-OROZCO *et al.*, 2021).

Os hemoderivados são produtos industrializados produzidos pelo fracionamento industrial do plasma humano. Depois de colhido, o sangue total é processado nos Serviços de Hemoterapia e dá origem a até quatro hemocomponentes: concentrado de hemácias, concentrados de plaquetas, plasma e crioprecipitado. Na imensa maioria das vezes, os serviços de Hemoterapia preparam apenas os três primeiros hemocomponentes mencionados acima (HEMOBRÁS, 2013).

O mercado global de plasma é considerado como tendo uma taxa de crescimento anual composta de 7,5% e será superior a US\$ 31 bilhões em 2024 (GREEN, 2019). A quantidade estimada de plasma coletado nas doações de sangue é de 700.000 L, onde 490.000 L é a quantidade de plasma com qualidade para fracionamento. Grande parte do fracionamento do plasma é realizada no exterior, onde o orçamento anual do Ministério da Saúde para aquisição de hemoderivados é de R\$ 1,3 bilhão. Esse alto valor de aquisição dos hemoderivados é justificado pelo grande número de doenças que podem ser tratadas com seu uso: hemofilias, cânceres, imunodeficiência primária, AIDS dentre outras doenças (HEMOBRÁS, 2013).

No que diz respeito à composição do plasma, este é composto por 91% de água, 7% proteínas do sangue e 2% nutrientes (aminoácidos, lipídios, açúcares), hormônios (eritropoetina, insulina, etc.), eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, etc.) podendo haver variações (WRIGHT *et al.*, 2018). As proteínas, por sua vez, são representadas pela albumina do soro humano (HSA - do inglês, *Human Serum Albumin*) (61%), imunoglobulinas (18%) e os fatores de coagulação ($\pm 1\%$). Entretanto, cerca de 40-50% do mercado mundial das proteínas plasmáticas é compreendido pelas imunoglobulinas (Igs) (OLIVEIRA, 2016).

A produção e aplicação das Igs têm sido muito significante nas últimas décadas e, espera-se que o aumento das atividades de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos impulse, ainda mais, o crescimento do mercado. Por exemplo, em janeiro de 2019, a empresa Kedrion Biopharma recebeu a aprovação da Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para realizar um ensaio clínico para avaliar a eficácia e segurança de uma imunoglobulina intravenosa a 10% no tratamento de pacientes com doenças de imunodeficiência primária (MORDOR INTELLIGENCE, 2022). Além disso, esse aumento do mercado está envolvido no desenvolvimento de medicamentos inovadores e na descoberta de novas áreas terapêuticas para os medicamentos existentes. De acordo com o Registro Nacional de Ensaio Clínicos (NCT), em fevereiro de 2020, na China, o Peking Union Medical College Hospital, em colaboração com o Tongji Hospital of Tongji Medical College e a Huazhong University of Science and Technology, iniciaram ensaios clínicos para avaliar a eficácia e segurança da imunoglobulina intravenosa para pneumonia grave por novo coronavírus de 2019 (2019-nCoV) (MORDOR INTELLIGENCE, 2022).

2.2 Imunoglobulinas G (IgG)

Dentre os cinco possíveis tipos das imunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), as do isotipo G (IgG) é uma das proteínas mais abundantes no soro humano (DAOUD-ATTIEH *et al.*, 2013; PERÇIN *et al.*, 2019). É um agente ativo para a regulação do sistema imunológico e desempenha um papel crucial no tratamento de várias doenças, como imunodeficiência e doenças autoimunes (SAYLAN *et al.*, 2014; PERÇIN *et al.*, 2019).

As IgG's são constituídas por cerca de 82 a 96% de proteínas e 4 a 18% de carboidratos. Encontram-se dispostas na molécula de IgG em um formato semelhante a um "Y" formando 4 cadeias polipeptídicas ligadas por ligações covalentes de dissulfeto e interações não covalentes. As cadeias polipeptídicas compostas por duas cadeias leves (L) de massa molar 25 kDa e duas pesadas de massa molar 50 à 70 kDa (H). As cadeias pesadas e leves são ainda divididos em regiões variáveis (V), sítios de ligação do antígeno, e regiões constantes (C) nas moléculas de Ig's (AYYAR *et al.*, 2012).

A classe IgG pode ainda ser dividida em quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (por ordem decrescente de abundância no soro humano). Do ponto de vista

biofarmacêutico, IgG1 e IgG2 são de especial interesse, pois a maioria dos produtos de anticorpos aprovados pertence a uma dessas duas subclasses (KREPPER *et al.*, 2018). As infecções virais estimulam principalmente a resposta IgG1 e IgG3 (VIDARSSON *et al.*, 2014). Conseqüentemente, durante a infecção por vírus são as próprias moléculas IgG1 e IgG3 que constituem a subclasse dominante de anticorpos específicos para a proteína spike do vírus, bem como seu domínio de ligação ao receptor (YATES *et al.*, 2021).

Devido aos rigorosos padrões regulatórios e de qualidade exigidas para muitas aplicações biofarmacêuticas, as IgGs necessitam estar altamente purificadas e com atividade funcional, sendo esta responsável por várias reações metabólicas. Com isso, tem-se a necessidade de obtê-las na forma ativa, pois quando a proteína é desnaturada perde sua atividade funcional, o que leva eventualmente ao desenvolvimento de métodos de isolamento mais seletivos (SOUSA 2019). Assim, as indústrias farmacêuticas vêm buscando processos cada vez mais eficientes para purificação de proteínas, pois elas podem ter diversas aplicações.

2.3 Técnicas para purificação de proteínas

A precipitação com etanol frio é um dos métodos não cromatográficos que foi introduzido por Cohn na década de 1940 (COHN, *et al.*, 1946) e ainda é largamente usado para purificação de proteínas. Em resumo, as proteínas do plasma são precipitadas após o adição crescente de etanol ao plasma. Com a diminuição da solubilidade ocorre a precipitação das proteínas (COHN, *et al.*, 1946).

Na literatura facilmente é encontrado inúmeros trabalhos publicados com a proposta de purificação de proteínas do soro humano (ZOU *et al.*, 2019; KREPPER *et al.*, 2018; SALIMI *et al.*, 2018; GONDIM *et al.*, 2014; GONDIM *et al.*, 2012). Há uma variedade quanto ao emprego de técnicas cromatográficas utilizadas para purificação de proteínas, destacando-se a cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade com ligantes bio ou pseudobioespecíficos, além da cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Além dessas técnicas mencionadas, outras podem ser citadas, como por exemplo: Interações Hidrofóbicas, Cromatografia de Modo Misto e Exclusão por Tamanho (GONDIM, 2017).

2.3.1 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é uma das técnicas tradicionais de purificação de proteínas, que utiliza a capacidade de uma proteína para reconhecer e se ligar com os ligantes bioespecíficos e pseudobioespecíficos. A interação da proteína com o ligante é governada pela lei de ação de massa; sua especificidade é dependente da constante de dissociação de afinidade, que é um termo probabilístico que indica a rapidez com que a interação entre os componentes moleculares (a proteína a ser separada e o ligante) ocorre com o aumento da concentração de cada componente (PERRET e BOSCHETTI, 2018).

Ao considerar a especificidade dos sistemas de cromatografia de afinidade, percebe-se rapidamente que um painel muito grande de ligantes disponíveis para alcançar a separação de grande número de proteínas diferentes. Uma grande variedade de moléculas funcionais, incluindo enzimas, coenzimas, cofatores, anticorpos, proteínas e ácidos nucleicos podem ser utilizados como ligantes bioespecíficos (DENIZLI e PIŞKIN, 2001). Os ligantes bioespecíficos, apesar de amplamente utilizados na purificação de anticorpos devido a sua alta especificidade, possuem a desvantagem de terem custo elevado, baixa estabilidade e a possibilidade de desnaturação do ligante nas etapas de eluição e regeneração da coluna cromatográfica (DENIZLI e PIŞKIN, 2001; YAVUZ *et al.*, 2006).

Os ligantes pseudobioespecíficos (íons metálicos quelatados, ligantes tiofílicos, corantes, aminoácidos), apresentam normalmente média afinidade para proteínas do soro humano (VIJAYALAKSHMI, 1989). Os ligantes corantes tem desempenhado um papel importante e atraído grande atenção na adsorção de afinidade de proteínas, pois muitos corantes são baratos, estáveis, grande disponibilidade e podem ser usados para a separação de um grande número de proteínas e enzimas. Além disso, as diferentes interações entre os corantes e as proteínas fornecem uma combinação de ligações, eletrostática, hidrofóbica e de hidrogênio, que favorecem ainda mais o seu uso (ZHANG *et al.*, 2016; FERRARIS *et al.*, 2011). Embora os corantes sejam de natureza sintética, eles são classificados como ligantes de afinidade porque interagem com os sítios ativos de muitas proteínas e enzimas, mimetizando a estrutura de seus substratos, cofatores ou agentes ligantes (DENIZLI e PIŞKIN, 2001). Vários trabalhos são reportados na literatura utilizando ligantes corantes em cromatografia de afinidade.

Gondim *et al.*, (2014) apresentaram um estudo visando a purificação de IgG humana, a partir de amostras diluídas do soro humano, por cromatografia de afinidade com o corante Cibacron Blue F3GA imobilizado em matriz de quitosana modificada, onde investigaram a influência de diferentes sistemas tamponantes na adsorção de IgG. Observaram que, devido a diferença considerável entre o pI das proteínas, IgG (pI 6,3-9,0) e HSA (pI 4,8), foi possível tornar a adsorção de IgG mais seletiva que HSA, de acordo com as análises de eletroforese.

Li e colaboradores (2014) utilizaram Reactive Red 120 como um corante-ligante de afinidade em microesferas magnéticas de quitosana para melhorar a capacidade de adsorção de lisozima. O impacto do pH, força iônica, tempo de adsorção e concentração inicial de lisozima na adsorção de lisozima de soluções aquosas foi investigado. Uma quantidade de adsorção aumentada de 116,9 mg/g de lisozima em microesferas com Reactive Red 120 foi alcançada em comparação com 24,6 mg/g em microesferas magnéticas de quitosana sem o corante.

Dou e colaboradores (2018) estudaram a adsorção de albumina do soro bovino (BSA) utilizando microesferas magnéticas de poli(metilmetacrilato) com diferentes massas molares de polietilenoimina (enxerto) imobilizado com corante Cibacron Blue F3GA (CB-PEI-PMMA). Foi observado um aumento da capacidade de adsorção de BSA das microesferas de CB-PEI-PMMA (84,8 mg/g) em comparação com as microesferas de PEI-PMMA (sem a imobilização do corante) (73 mg/g), o que demonstrou a forte e eficiente interação de afinidade entre Cibacron Blue F3GA e BSA, que pode ser atribuída à combinação de força de atração eletrostática e força de afinidade.

Como visto, a cromatografia de afinidade utilizando corantes como ligantes, possibilita alta seletividade e elevada capacidade para com a proteína alvo. Além disso, diferentes matrizes podem ser utilizadas, o que pode possibilitar a obtenção de elevados níveis de produtividade e pureza.

2.3.1.1 Matrizes para cromatografia de afinidade

Na cromatografia de afinidade uma adequada matriz é fundamental, pois esta atua como suporte para o ligante de afinidade. Ser uniforme, macroporosa, hidrofílica, mecânica e quimicamente estável, seletiva, insolúvel no solvente utilizado

na purificação e fornecer grande área superficial para o ligante, é características essenciais para uma boa matriz (AYYAR *et al.*, 2012).

2.3.1.1.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico obtido pela desacetilação da quitina extraída do esqueleto externo de crustáceos marinhos (ROSCA *et al.*, 2005). O grau de desacetilação da quitosana tem forte influência também em suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade (WU *et al.*, 2014), assim como a massa molecular (MA e SAHAI, 2013; LARSSON *et al.*, 2013). Quanto maior o grau de desacetilação da quitosana, maior será a interação entre sua superfície e células, uma vez que o grupo amino livre interage com as células causando adesão celular e proliferação (DASH *et al.*, 2011).

É uma base fraca insolúvel em água e em solventes orgânicos. Os grupos amina presentes em toda a extensão da cadeia polimérica da quitosana atuam como polieletrólitos catiônicos em $\text{pH} < 6,5$, ou seja, possuem grupos catiônicos ionizáveis ao longo da cadeia. Assim, este biopolímero pode se dissolver facilmente em soluções de ácidos fracos diluídos, sendo o ácido acético o solvente mais empregado, formando uma solução viscosa. Por outro lado, conforme o pH é ajustado para valores acima de 6,5, os grupamentos amina se tornam desprotonados e o polímero perde suas cargas, tornando-se insolúvel em água e em solventes orgânicos (DASH *et al.*, 2011; SINHA *et al.*, 2004).

A quitosana tem sido amplamente utilizada aos longos dos últimos 25 anos na ciência biomédica e de separação devido às suas características intrínsecas. Dentre elas destacam-se sua não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade (ZHANG *et al.*, 2010), baixa imunogenicidade, policatiônica (MAFIRAD *et al.*, 2018), capacidade de formar hidrogel, bioadesão, presença de grupos reativos -OH e -NH₂, capacidade carreadora para substâncias hidrofílicas e possui elevada resistência mecânica (SINHA *et al.*, 2004). Além disso, a presença de grupos funcionais, hidroxila e amino, são fundamentais para derivatizar a superfície para aumentar a capacidade de adsorção (ACET *et al.*, 2018).

2.3.1.1.2 Alginato

O alginato é um polissacarídeo aniônico linear solúvel em água e extraído de algas marrons e de algumas bactérias, formado por dois tipos de ácido poliurônico, o ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) unidos por ligações (1 \rightarrow 4)-glicosídicas, de composição e sequência variada (MARTINS *et al.*, 2007). Estes monômeros são epímeros com orientações diferentes na cadeia polimérica e a unidade G é a responsável por permitir a ligação iônica cruzada (LAWRIE *et al.*, 2007).

O alginato é um polímero hidrofílico, insolúvel em etanol, em soluções hidroalcoólicas contendo mais de 30% (v/v) de etanol e em solventes orgânicos. Sabe-se que a solubilidade do alginato é decisivamente influenciada pelo pH do meio. Os valores de pKa (constante de dissociação do ácido) das unidades ácido manurônico e ácido gulurônico do alginato é de 3,38 e 3,65, respectivamente. Quando o pH é inferior ao pKa do alginato, este sofre precipitação levando à formação do ácido algínico, o qual é insolúvel em água. Quando o valor do pH se encontra acima desse valor, o alginato torna-se carregado negativamente. Ele é quimicamente estável em valores de pH entre 5,0 e 10,0, sendo que valores muito ácidos causam sua descarboxilação. A viscosidade do polímero varia de acordo com os valores de pH, sendo que, a viscosidade aumenta à medida que o pH diminui. A massa molar do alginato comercial gira em torno de 32.000 e 400.000 g/mol (LEE e MOONEY, 2012).

2.3.1.1.3 Complexo polimérico Quitosana-Alginato

Complexos de polieletrólitos são sistemas macromoleculares auto-montados. Eles são formados através da interação entre polieletrólitos de cargas opostas em soluções aquosas por simples mistura em condições brandas. Tal complexação evita o uso de agentes de reticulação e solventes orgânicos (RAMACHANDRAN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013). A estrutura e as propriedades dos complexos de polieletrólitos dependem das propriedades físico-químicas das soluções de polieletrólitos separadas, como pH, força iônica. A natureza química dos polieletrólitos que interagem, seu peso molecular, a proporção inicial de suas concentrações, a ordem de sua mistura e a temperatura também desempenham um papel importante na formação de complexos de polieletrólitos (IBRAHIM *et al.*, 2022).

Os complexos polieletrólitos de quitosana-alginato são amplamente estudados devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (RAMASAMY *et al.*, 2014). São mecanicamente forte em baixos valores de pH em que a quitosana é solúvel, assim, a fácil dispersibilidade da quitosana em meio ácido é prevenida pela presença do alginato que é insolúvel em condições ácidas (LUCINDA-SILVA *et al.*, 2010). É formado a partir da forte interação eletrostática dos grupos amino da quitosana com os grupos carboxílicos do alginato. A estabilidade do complexo alginato-quitosana pode ser influenciada por parâmetros como o pH e força iônica, devido a protonação do grupo amino da quitosana e a ionização do grupo ácido carboxílico do alginato (LI *et al.*, 2002).

O complexo de quitosana-alginato foi preparado como esferas, microesferas, nanopartículas, membranas, curativos, complexos scaffolds e fibras (GONDIM *et al.*, 2014; RAFIE *et al.*, 2014; BILAL *et al.*, 2017; IBRAHIM *et al.*, 2022). Dois métodos para a preparação de complexos polieletrólitos são mais publicados, um método de uma etapa e duas etapas ou método de pré-gelificação. No método de uma etapa a gelificação direta entre alginato e quitosana é alcançada, enquanto que no método de duas etapas a pré-gelificação do alginato com CaCl_2 é feita antes da adição de quitosana (IBRAHIM *et al.*, 2022).

Gondin e colaboradores (2012) usaram como matriz de suporte quitosana/alginato epoxilado para imobilização de corante ligante visando a purificação de IgG humana. O complexo quitosana/alginato foi formado pela gelificação direta. Os autores evidenciaram que o ligante foi acoplado com sucesso, não demonstrando desprendimento da matriz.

2.3.2 Cromatografia de modo misto

A cromatografia de modo misto ou multimodal (CMM) consiste em combinar em uma mesma matriz pontes de hidrogênio, forças de Van Der Waals, interações de troca iônica, hidrofóbica e de afinidade entre a fase estacionária e o soluto na matéria-prima, visando à separação e/ ou purificação mais eficiente de moléculas (GAO *et al.*, 2013). Segundo Hanke e Ottens (2014) o grande interesse obtido pela CMM, o qual está associado ao seu bom desempenho na adsorção e purificação de proteínas. Muitos processos promovem a separação de proteínas utilizando apenas um

tipo de interação ou combinações deles, como troca iônica, hidrofóbica ou de afinidade. Na cromatografia de modo misto um único adsorvente pode separar as moléculas através do conjunto dessas interações. Para que essas interações ocorram, é necessário conhecer a natureza da molécula a ser purificada, para fazer a escolha correta do adsorvente. Além disso, as condições do processo, onde a variação das condições pode favorecer a todas as interações presentes na resina (YU *et al.*, 2015).

Segundo Du e colaboradores (2014) ao comparar resinas de troca iônica com as de modo misto, estas desempenham uma forte afinidade sobre as proteínas, apresentando diferentes perfis de eluição, permitindo assim a possibilidade de separar os oligômeros de proteínas solúveis. A eficiência das resinas de modo misto é influenciada pelo pH e concentração de sal. O aumento do pH reduz significativamente a capacidade de adsorção devido ao enfraquecimento das interações eletrostáticas entre a proteína e a resina.

As resinas de modo misto disponíveis comercialmente incluem Capto MMC, Capto adhere e Capto Core 700 da Cytiva (antiga GE Healthcare), PPA Hypercel, HEA Hypercel e MEP Hypercel da Pall Corporation, Eshmuno HXC da Merck Millipore, Toyopearl MX-Trp-650 M da TOSOH Bioscience e Nuvia cPrime, CHT Ceramic Hydroxyapatite e CFT Ceramic Fluoroapatite da Bio-Rad (GAO *et al.*, 2013).

O uso de hidroxiapatita (HAp) tem sido extensivamente relatado para purificações de proteínas (NAKAGAWA *et al.*, 2010; MORRISON *et al.*, 2011; CUMMINGS *et al.*, 2014). Este suporte de modo misto oferece seletividades únicas e muitas vezes separam biomoléculas que parecem homogêneas usando outros métodos cromatográficos. As diversas capacidades de ligação HAp para proteínas da célula hospedeira, proteína A lixiviada, dímeros e agregados de anticorpos, ácidos nucleicos e vírus permitem seu uso em qualquer estágio, desde a captura inicial até o polimento final (BIO RAD, 2022).

2.4 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita é uma apatita de cálcio natural e sua fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. As apatitas são os compostos químicos do fósforo com íons hidroxila (OH^-), cloreto (Cl^-) ou fluoreto (F^-). A massa molecular de HAp é 1004,6 g/mol. A

HAp tem uma estrutura cristalina hexagonal, na qual a razão estequiométrica de Ca:P geralmente é 1,67. Ele exibe ligações covalentes (P–O e O–H) e ligações iônicas (Ca–O) em sua rede cristalina. A HAp pura é extremamente hidrofílica e possui um ângulo de contato de cerca de 10° (ARONOV *et al.*, 2006; PANDA *et al.*, 2021).

A estrutura cristalina descrita das apatitas confere à HAp natural propriedades atraentes a diferentes campos de pesquisa. Durante décadas, essa biocerâmica tem sido de interesse em aplicações biológicas devido à sua excelente biocompatibilidade, alta estabilidade termodinâmica sob condições fisiológicas e boa afinidade com biopolímeros (SADAT-SHOJAI, 2015). Essa variabilidade de propriedades na HAP permite a possibilidade da utilização do material em diversas aplicações, por exemplo, processo de catálise heterogênea (FIHRI *et al.*, 2017), purificação de proteínas (SWAIN e SARKAR, 2013; KANDORI *et al.*, 2014; ESFAHANI *et al.*, 2015) e remoção de contaminantes por adsorção (COSTA, *et al.*, 2009), o que faz da HAp um importante material tecnológico.

Devido a estabilidade e flexibilidade da estrutura da HAp diferentes substituições iônicas podem ser realizadas. É possível induzir a troca de muitos cátions e ânions modificando a estrutura estequiométrica da HAp para se assemelhar à apatita biológica. Entre os vários cátions que podem substituir o cálcio na estrutura do HAp, o estrôncio tem despertado grande interesse devido ao seu potencial papel biológico (EDWIN e WILSON 2019). O estrôncio pode substituir o cálcio na estrutura do HAp na matriz completa de composição para formar soluções sólidas. Vários trabalhos de pesquisa sobre a síntese de hidroxiapatita de estrôncio (SrHAp) usando um processo sol-gel (SADER *et al.*, 2009; MARDZIAH *et al.*, 2009), precipitação (COX *et al.*, 2014), co-precipitação (CARVALHO *et al.*, 2020) e um método hidrotérmico (LIN *et al.*, 2013) foram relatados.

A co-precipitação é o método mais simples e frequentemente utilizado para a preparação de SrHAp. Este processo químico consiste em uma fonte de reação do ligante PO_4^{3-} com uma fonte de cálcio na presença de outros aditivos (por exemplo, base ou ácido); várias fontes desses dois reagentes são usadas. As condições do método de co-precipitação são variáveis, mas em geral, este processo é geralmente realizado em valores de pH que variam de 3 a 12 e em temperaturas que variam da temperatura ambiente à temperatura de ebulição da água (FIHR *et al.*, 2017).

Ghosh e Sarkar (2017) examinaram vários métodos de síntese e relataram que SrHAp produzido por co-precipitação possui maior densidade e tem respostas positivas para bioatividade. Carvalho (2017) sintetizou nanopartículas de HAp e SrHAp via co-precipitação e submetidas a diferentes tratamentos térmicos, obtendo-se cristais com diferentes propriedades, como cristalinidade, tamanho de cristalito, superfície e morfologia.

As concentrações estudadas de estrôncio ($\text{Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$) variaram até 50% (mol/mol). A precipitação de uma solução supersaturada produz HAp nanocristalina com um grau de substituição de Sr dependendo de sua concentração na solução (PAN *et al.*, 2009). Edwin e Wilson (2019) sintetizaram hidroxiapatita de estrôncio (SrHAp) nas composições de 0, 10, 20, 50 e 100% (mol/mol), pelo método de precipitação e os precipitados obtido, foram submetidos a tratamento ultrassônico por diferentes intervalos de tempo para obter informações sobre o papel do ultrassom na modificação da morfologia do SrHAp. Este estudo revelou que a proporção do SrHAp variou com a duração do ultrassom. O estudo indicou que a deformação na rede da HAp tem correlação com a incorporação de estrôncio, levando a extensão variada pelas ondas de ultrassom. Além disso, a investigação sugeriu que a substituição de 100% dos locais de cálcio por estrôncio leva a uma tensão relativamente menor e, portanto, a uma fragmentação pobre.

Muitos outros trabalhos tem sido estudados na substituição de cálcio por estrôncio na estrutura do HAp (HUANG *et al.*, 2016; AINA *et al.*, 2012; KRISHNAN *et al.*, 2016) entretanto, em sua grande maioria, a SrHAp é destinada para aplicação como substituinte ósseo nas áreas de ortopedia, odontologia e em implantes artificiais (CARVALHO *et al.*, 2020; TAO *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; AINA *et al.*, 2012). Portanto, o seu estudo em diferentes áreas é de grande interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese e caracterização das microesferas compósitas quitosana-alginato (MQA)

O procedimento de preparação das microesferas compósitas quitosana-alginato baseou-se na metodologia de Gondin *et al.* (2012) e Mendes *et al.* (2013) com algumas adaptações. A quitosana utilizada foi obtida da Polymar (Brasil), com grau de desacetilação de 87,4%, de acordo com a fabricante. As partículas de quitosana/alginato foram obtidas por adição de 200 mL de solução de quitosana a 5% m/v (em solução aquosa de ácido acético, Vetec). Primeiramente, foi obtida uma solução estoque de quitosana preparada em 200 ml de ácido acético a 10% v/v, onde 10 g de pó de quitosana foram primeiramente suspensos em 180 mL de água destilada, com agitação mecânica (TECNAL, modelo TE-165, Brasil) por 1 h à temperatura ambiente, a aproximadamente 800 rpm para solubilização. Após esse período, foram adicionados 20 mL de ácido acético e agitado por mais 2 h. Em seguida, foram acrescentados 20 mL de álcool metílico e 2 mL de anidrido acético (Vetec) e agitou-se por mais 1 h.

À solução de quitosana, foi adicionada 2 g de alginato de sódio (AlNa) e manteve-se sob agitação durante 20 h. Esta proporção quitosana/alginato foi escolhida mediante ensaios preliminares, o qual se conseguiu obter uma solução homogênea e viscosa o suficiente para formar as microesferas. A solução foi então filtrada para eliminação de eventuais impurezas, em seguida, foi gotejada a uma solução de hidróxido de amônio, NH₄OH (1:1), para formar as microesferas por coagulação a pH alcalino. Após o término do gotejamento, as microesferas permaneceram em repouso durante 24 h. Passado o período, as microesferas foram lavadas abundantemente com água destilada até pH neutro. Assim, foram formadas as MQA.

3.1.2 Imobilização dos corantes reativos nas microesferas compósitas quitosana/alginato

Foram utilizados 4 corantes reativos na síntese: Cibacron Blue F3GA (CB), Reactive Blue 4 (RB), Procion Red MX5B (PR) e Reactive Red 120 (RR). Suas estruturas e massa moleculares estão mostradas na Tabela 1. Os corantes foram

covalentemente acoplados às microesferas compósitas quitosana-alginato por meio da reação nucleofílica entre o grupo de cloro dos anéis de triazina dos corantes e os grupos amino dos microcompósitos sob condições alcalinas.

Tabela 1 - Estrutura química e massa molar (Mw) dos ligantes corantes.

Corantes	Estrutura	Mw (g/mol)	Fonte
Cibacron Blue F3GA		774,16	SIGMA ALDRICH, 2018a.
Reactive Blue 4		637,43	SIGMA ALDRICH, 2018b.
Procion Red MX5B		615,33	SIGMA ALDRICH, 2018c.
Reactive Red 120		1569,68	SIGMA ALDRICH, 2018d.

Fonte: elaborada pela autora.

Para a imobilização do corante, primeiro foi realizada uma etapa de epoxidação para favorecer a imobilização dos corantes à matriz polimérica. Este procedimento foi realizado de acordo com Mendes e colaboradores (2013). Para cada 10 g de MQA obtidas, 100 mL de N,N dimetilformamida (Vetec) foi adicionado e mantido sob agitação por 30 min a 60 °C. Posteriormente, foram adicionados 0,8 g de hidróxido de potássio (KOH) (Vetec) dissolvido em 3 mL de isopropanol e 10 mL de epícloridrina (Vetec). O sistema permaneceu em agitação a 60 °C por mais 12 horas. Após, as MQA foram lavadas com água destilada, para remoção de solventes da reação e, postas a secar em temperatura ambiente por 24 h.

Os corantes foram imobilizados ao MQA de acordo com a metodologia descrita por Gondim e colaboradores (2012), com algumas adaptações como descrito a seguir: 15 g do MQA foram agitadas (200 rpm) em uma incubadora (TECNAL, modelo TE-420) em temperatura constante de 55 °C durante 1 h com 100 mL da solução de corante (5 mg/mL). Em seguida, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de NaCl (20 % m/m) mantendo a agitação e a temperatura constante. Após 30 min, adicionou-se 2 mL da solução aquosa de bicarbonato de sódio (Na_2CO_3 - 25 % m/m) com o objetivo de aumentar o pH e acelerar a reação química entre o corante e o MQA. Esta solução foi mantida em agitação durante 4 h à temperatura de 55 °C. Após a incubação, os microcompósitos imobilizados com os corantes foram filtrados e lavados várias vezes com água destilada gelada (4 °C), metanol, NaCl 2M, Uréia 6M, Tween 80 (1 % p/v), água destilada, tampão de ensaio e finalmente com solução de albumina do soro humano (HSA), até que todas as moléculas de corantes fisicamente adsorvidas fossem removidas. Essa lavagem com HSA é essencial, pois segundo Rukenstein e Zeng (1998) os corantes fracamente ligados seriam removidos.

Ao final, foram obtidas 4 microesferas compósitas quitosana/alginate imobilizado com corantes reativos: MQA-Cibacron Blue F3GA (MQA-CB), MQA-Reactive Blue 4 (MQA-RB), MQA-Reactive Red 120 (MQA-RR) e MQA-Procion Red MX5B (MQA-PR).

3.1.3 Caracterização das microesferas compósitas quitosana-alginate imobilizadas com corantes

Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): A análise de FTIR foi utilizada para investigar a efetividade de cada etapa das reações na síntese do adsorvente. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos com placa de ATR com ponteira de diamante (Shimadzu FTIR 8300), com uma resolução de 16 cm^{-1} , compreendendo a região de 600 a 4000 cm^{-1} , na Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química.

Análise termogravimétrica (TGA): A termogravimetria nos permite medir a variação de uma substância em função da temperatura ou do tempo, permitindo obter informações relacionadas à composição e estabilidade térmica de compostos. As curvas de análise termogravimétrica (TGA) e a sua primeira derivada (DTG) foram obtidas no aparelho Shimadzu (modelo ATG 50 Shimadzu, Kioto – Japão) em uma faixa de temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando cadinho de platina e uma amostra de aproximadamente 5 mg , sob uma atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 ml/min com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC): O comportamento térmico das microesferas de quitosana foi estudado através da técnica de DSC. As análises foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer (Jade DSC). As curvas de DSC foram determinadas com $5,0\text{ mg}$ de amostra, usando uma faixa de aquecimento constante de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 com vazão de 50 mL/min , em uma faixa de temperatura de 25 a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os eventos térmicos foram registrados em função da composição, estrutura do material e de sua história térmica.

Ponto de Carga Zero: o ponto de carga zero (pH_{PCZ}) é definido como o pH em que a superfície do adsorvente possui carga neutra. Para a determinação do pH_{PCZ} dos adsorventes foi utilizado o Método de Park e Regalbuto (1995), onde inicialmente foi preparado uma solução de NaCl (1 mol/L), em seguida, essa solução foi distribuída em 10 beakers, cada um contendo 50 mL e pH aferido na faixa de 2 à 11 . Em seguida, foram adicionados 50 mg dos adsorventes sintetizados e mantidos em repouso por 48 h . Após esse período, quantificou-se o pH final das soluções. O pH_{PCZ} corresponde à faixa na qual o pH final se mantém constante, independentemente do pH inicial, ou seja, a superfície comporta-se como um tampão.

3.2 Hidroxiapatita de estrôncio (SrHAp)

A SrHAp usada para todo o estudo foi sintetizada conforme estudo de Carvalho *et al.*, (2020). Ambos os estudos foram realizados pelo Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMat). Em suma, a síntese foi realizada pela adição de solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,3 mol/L em solução de nitrato de estrôncio ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) (razão molar Sr/P = 1,67) sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Um precipitado branco foi obtido pela adição de solução de NH_4OH até atingir pH 9. O precipitado branco foi lavado com água destilada e filtrado a vácuo. Posteriormente, o pó foi disperso em solução de NH_4Cl 0,1 mol/L. As suspensões foram colocadas em autoclave de Teflon coberta com aço inoxidável para receber o tratamento hidrotérmico a 150°C por 5 horas. A amostra foi filtrada a vácuo, lavada e seca e armazenada em dessecador.

3.3 Ensaio em Batelada com IgG de alta pureza

No presente estudo foram utilizadas como amostras as proteínas puras IgG e humana e de soro do sangue humano foram adquiridas da Sigma Aldrich (USA). Todos os ensaios em batelada com IgG de alta pureza foram realizados em agitador rotativo Tecnal (Brasil), modelo TE-165 (Figura 1), com rotação constante, tendo como parâmetros acompanhados o tipo e pH dos tampões, tempo de contato entre as fases (perfil cinético) e concentração de adsorbato (isotermas de adsorção). Fixou-se a velocidade de agitação em 18 rpm, o volume da solução de proteína (adsorbato) em 3 mL estudo.

Figura 1 - Sistema de agitação rotatório empregado para os ensaios de adsorção em batelada.



Fonte: elaborada pela autora.

3.3.1 Estudo do efeito do tampão e pH na adsorção de proteínas

Durante o processo de adsorção, o pH da solução é uma das variáveis significativas que afeta o grau de ionização e as características da superfície dos adsorventes. Assim, inicialmente foi estudado o efeito do tampão e faixa de tamponamento na adsorção de IgG.

Para o estudo com as matriz de quitosana-alginato, MQA-CB, MQA-RB, MQA-RR e MQA-PR, foi utilizado o tampão fosfato de sódio (FOS), Tris/HCl, HEPES, MOPS e MES com concentração de 25 mM, variando a faixa de pH de 5,5 a 8,6. Já para o SrHAp foram preparados tampões FOS, Tris/HCl, HEPES e acetato de sódio, todos com 10 mM, variando a faixa de pH de 4,5 a 8,5.

Em tubos acrílicos, foram adicionados 5 mg do adsorvente juntamente com 3 mL da solução da proteína IgG (1,0 mg/mL) em cada tampão. O sistema permaneceu sob agitação durante 180 min. Em seguida, alíquotas do sobrenadante foram coletadas, centrifugada em microcentrífuga refrigerada (CT-15000R CIENTEC) por 10 min com rotação igual a 10000 rpm e, após, analisadas por espectrofotometria UV-Vis (Thermo Scientific Biomate B) no comprimento de onda de 280 nm, para a determinação da concentração da solução de proteína após a adsorção.

A quantidade de proteína adsorvida foi quantificada a partir de um balanço de massa pelo uso da Equação 1 descrita a seguir:

$$q = \frac{V_{SOL} (C_0 - C_{eq})}{m_{ads}} \quad (1)$$

em que q é a quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente (mg/g), V_{SOL} o volume da solução (mL) disponível para o contato com o adsorvente, C_0 é a concentração inicial de proteína na fase líquida (mg/mL), C_{eq} a concentração de proteína na fase líquida (mg/mL) em equilíbrio com q e m_{ads} é a massa seca de adsorvente (g).

3.3.2 Estudo para o efeito da massa do adsorvente

Para avaliar a influência da massa do material adsorvente foram realizados ensaios com massa de adsorvente variando de 5 a 25 mg com os melhores resultados do tópico anterior, colocadas em contato por 3 horas com solução de IgG 1,0 mg/mL.

3.3.3 Cinética e Isoterma de adsorção

Para obtenção do tempo de equilíbrio para o processo adsorptivo, foi preparada uma solução de IgG 1,0 mg/mL e esta foi mantida em contato com 5 mg das matrizes variando-se a duração do ensaio de 5 minutos até 10 horas.

Uma vez definido o tempo de equilíbrio, foram realizados ensaios com concentrações iniciais de IgG variando de 0,25 a 6,0 mg/mL, para se obter as isotermas de adsorção (quantidade de soluto presente na fase fluida em equilíbrio com a quantidade de soluto adsorvido). Como modelo de ajuste para os dados experimentais das isotermas de adsorção foram aplicados o modelo de Langmuir apresentado na Equação 2, por meio da utilização da ferramenta de ajuste não linear do software OriginPro8 (EUA). Para a matriz SrHAp também foi realizado como modelo de ajuste para os dados experimentais das isotermas de adsorção o Langmuir-Freundlich, apresentado na Equação 3.

$$q = \frac{q_m \cdot C_{eq}}{k_D + C_{eq}} \quad (2)$$

$$q = \frac{q_m \cdot (k_{LF} \cdot C_{eq})^n}{1 + (k_{LF} \cdot C_{eq})^n} \quad (3)$$

Nesta, q é a quantidade de proteína adsorvida (mg/g); q_m é a capacidade máxima de adsorção pelo adsorvente (mg/g); C_{eq} é a concentração da fase líquida no equilíbrio (mg/mL), k_D e k_{LF} constante de Langmuir (mol/L) e Langmuir-Freundlich (mL/mg) respectivamente, e n é o parâmetro de cooperatividade do sistema.

3.3.4 Ensaios de adsorção com mistura IgG/HSA

Partindo das melhores condições para a adsorção de IgG obtidas conforme descrito nos tópicos anteriores, foram feitos ensaios de adsorção com misturas de

proteínas. Uma vez que, segundo Andrade e Hlady (1987), os componentes majoritários do plasma sanguíneo são albumina do soro humano e IgG, procurou-se analisar o comportamento das matrizes para a adsorção de IgG em meios com a presença de albumina.

Foram selecionadas cinco frações mássicas (0, 25, 50, 75 e 100%) de IgG e HSA (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. Os ensaios foram conduzidos de modo análogo aos ensaios com IgG de alta pureza, em sistema de agitação rotativo a 18 rpm, mantendo em contato 5 mg de adsorvente em 3 mL da solução de proteínas, conforme apresentado na Tabela 2. Finalizados os ensaios, colhidas as amostras e centrifugadas, o teor de proteínas totais foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Tabela 2 - Frações mássicas utilizadas nos ensaios de adsorção com mistura IgG/HSA

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

Fonte: elaborada pela autora.

Primeiramente, foi preparado o reagente de Bradford diluindo-se 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol sob agitação. Em seguida, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%, deixando-o em agitação por 2 h. No final desse período o volume da solução foi aferido para 1,0 L com água ultrapura. Essa solução permaneceu sob agitação overnight. O reagente no final foi filtrado e conservando em geladeira. Vale ressaltar que todos os frascos utilizados para preparo do reagente de Bradford foram cobertos com papel alumínio. Após preparo do reagente, foi realizada a curva de calibração com a proteína BSA para quantificação das amostras dos ensaios de adsorção. Para quantificação foram realizadas leituras das amostras iniciais (alimentação) e finais (amostras coletadas nas etapas da corrida cromatográfica). Para cada 20 µL de amostra utilizou-se 1,0 mL do reagente de Bradford, o qual foi mantido

em contato por 10 min em cubetas de poliestireno na ausência de luz. Por fim, foram realizadas as leituras das amostras em espectrofotômetro UV-Vis, Thermo Scientific Biomate B (EUA) no comprimento de onda de 595 nm.

A quantidade de soluto adsorvido foi quantificada a partir do balanço de massa já mostrado na Equação 1. A análise qualitativa da seletividade da IgG e HSA nas matrizes foi realizada por meio de eletroforeses.

3.3.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamina com Dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

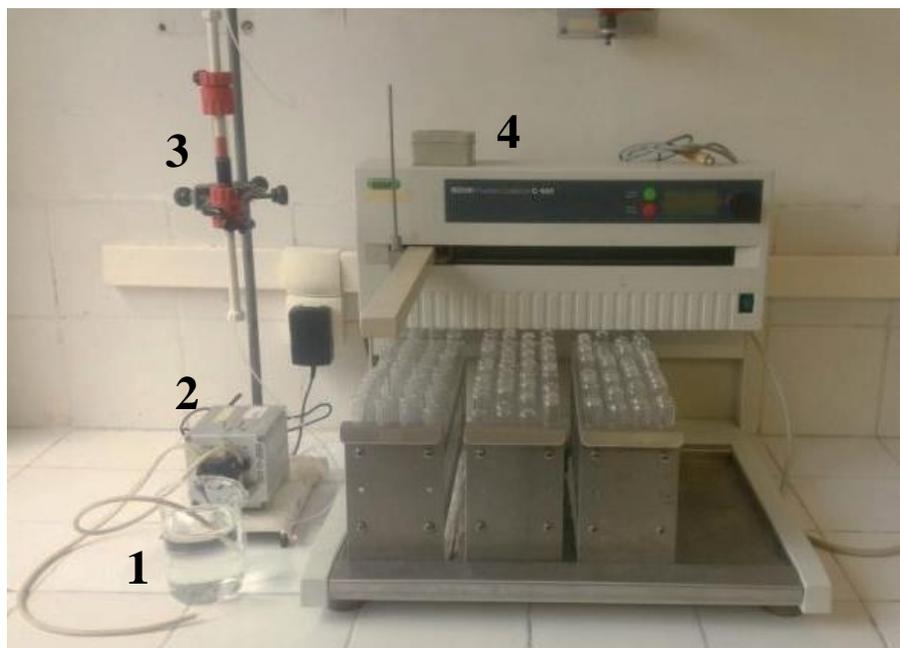
Os ensaios de eletroforese foram realizados em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE), onde as amostras da mistura IgG/HSA, antes e após a adsorção, foram submetidas à presença de 7,5% de géis de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) usando um sistema de Mini-Protean III (Bio-Rad, USA). As amostras analisadas foram aquecidas a 100 °C por 10 min e uma alíquota de 10 µL de cada fração foram aplicadas aos géis. A corrida eletroforética ocorreu a uma voltagem de 150 V em cubas verticais e a revelação dos géis se deu com o corante comassie brilhante blue. Foi utilizado marcador de alta massa molecular obtido da GE Healthcare (EUA), para identificação das faixas de peso molecular.

3.4 Ensaios em leito fixo

3.4.1 Matrizes de pseudoafinidade

Para as matrizes de pseudoafinidade, as análises cromatográficas foram realizadas com soro humano, com concentração inicial, aproximadamente, de 2,0 mg/mL diluída nos tampões com melhores adsorção no processo em batelada. O volume injetado na coluna foi de 8 mL, e todas as amostras foram coletadas para a realização do balanço de massa. Para isso, foi utilizado um sistema cromatográfico composto por uma bomba peristáltica (WATSON MARLOW, Modelo Q 400), uma coluna cromatográfica de vidro (GE Healthcare - 10 cm x 10mm) e um coletor de frações (BUCHI, Modelo C-660) e um espectrofotômetro (Termocientific Biomat 3) (Figura 2).

Figura 2 - Sistema operacional em leito fixo composto por: 1: Alimentação; 2: Bomba peristáltica; 3: Coluna; 4: Coletor de frações



Fonte: elaborada pela autora.

As condições experimentais para os ensaios com o soro humano: concentração de 2,0 mg/mL, vazão de 0,5 mL/min e massa de adsorvente de 0,8 g, o que resultou em um leito com aproximadamente 2,0 cm de altura. As etapas cromatográficas foram constituídas por: Alimentação; Lavagem; Eluição; Regeneração; Reequilíbrio. Para estes ensaios, o tempo de coleta para cada amostra foi de 2 min e o tempo total de realização desses experimentos foram entre 70 e 90 min. As frações foram coletadas na saída da coluna e o teor de proteínas totais foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para tratamento dos dados, utilizou-se o software OriginPro 8 e o percentual de recuperação das proteínas, que relaciona as concentrações finais e iniciais da proteína em estudo, foi obtida através da Equação 4.

$$R (\%) = \left(\frac{C_I - C_F}{C_I} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

em que C_i corresponde à concentração inicial e C_f a concentração final. A análise qualitativa da seletividade da IgG e HSA nas matrizes foi realizada por meio de eletroforeses (descrito na sessão 3.3.5).

3.4.2 Matriz multimodal

Os ensaios em leito fixo foram realizados apenas com a matriz SrHAp devido sua maior seletividade para com a IgG, como observado do teste da mistura IgG/HSA e, também, por ser uma matriz pouco estudada para purificação de IgG a partir do soro humano. Neste sentido, por se tratar de um material com poucos estudos, no quesito purificação de IgG humana, foi necessário alguns testes iniciais para otimizar o processo de purificação. A matriz, por sua característica em pó, apresentou uma certa dificuldade de empacotar a coluna. Para sanar esse problema, foram adicionados microesferas de vidro, pois estas são inertes e não reagem com as proteínas do soro humano e com a SrHAp. A coluna foi empacotada com 2g de SrHAp e 2g de microesferas de vidro, resultando em uma altura de leito de 2 cm.

Primeiro, foram realizados os ensaios com a IgG de alta pureza, HSA e mistura binária da IgG/HSA. Concentração de 1,0 mg/mL, vazão de 0,8 mL/min, volume injetado de 10mL. Desse último ensaio, as frações foram coletadas na saída da coluna e o teor de proteínas totais foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A análise qualitativa da seletividade da IgG e HSA nas matrizes foi realizada por meio de eletroforeses (descrito na sessão 3.3.5).

As condições experimentais para os ensaios com o soro humano foram utilizados uma concentração de, aproximadamente, 3,0 mg/mL, vazão de 0,8 mL/min. As etapas cromatográficas e os tempos de coleta foram semelhantes aos ensaios com as proteínas de alto padrão. As frações foram coletadas na saída da coluna e o teor de proteínas totais foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). E as análises de eletroforese seguiram conforme descrito anteriormente.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Matriz de pseudoafinidade

4.1.1 Síntese das microesferas compósita quitosana-alginato

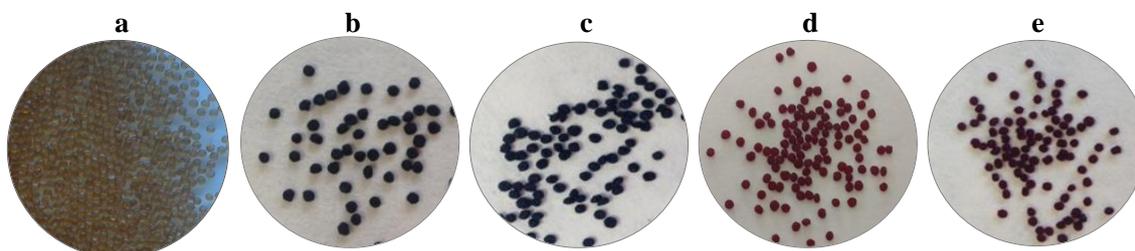
Foram realizados testes iniciais para consolidar uma melhor rota de síntese das MQA e da imobilização dos ligantes corantes. Para a formação dos microesferas compósitas, a solução de quitosana utilizada deve estar em baixas concentrações (até 5% m/v), neste caso, diluída em ácido acético. Desse modo, a solução apresentará uma densidade e viscosidade adequada que possibilite a produção de microesferas sem cauda e com boa resistência mecânica (DIAS *et al.*, 2008).

Várias tentativas de otimização da produção de microesferas de quitosana-alginato foram realizadas para se obter uma relação ótima de viscosidade e densidade para a solução de quitosana-alginato usada neste trabalho. Esta relação foi elaborada preparando-se soluções com diferentes proporções de quitosana e alginato e, em seguida, testando-as no sistema para formar as microesferas. Os resultados observados indicaram que ao utilizar uma proporção de 50/50, de quitosana e alginato, uma solução muito viscosa foi formada, o que impossibilitou a produção de microesferas. Ao utilizar uma proporção 60/40, quitosana e alginato, respectivamente, ainda se tinha uma alta viscosidade, o que impossibilitou a passagem da solução pelo sistema, onde ocorria sempre o entupimento da tubulação. A proporção final ficou de 80/20, onde foi formada uma solução que possibilitou a produção das microesferas sem cauda.

Como relatado anteriormente, no estudo de Gondim et al. (2012) a matriz quitosana/alginato epoxilado imobilizado com o corante Cibacron Blue FG3A apresentou forma de grânulos. Nesse estudo, uma tentativa de melhorar estruturalmente as matrizes cromatográficas foi conseguida com sucesso. Na

Figura 3 apresenta as microesferas compósita quitosana-alginato (a) e o MQA com a imobilização dos corantes Cibacron Blue F3GA (b), Reactive Blue 4 (c), Reactive Red MX-5B 120 (d) e Procion Red (e). Foi conseguido obter um material visualmente rígido, uniforme e com formatos esféricos de $\approx 0,02\text{cm}$, onde suas caracterizações são descritas a seguir.

Figura 3 - Matrizes cromatográfica a base de quitosana-alginato MQA (a) e com os corantes Cibacron Blue F3GA (b), Reactive Blue 4 (c), Reactive Red 120 (d) e Procion Red (e) imobilizados.



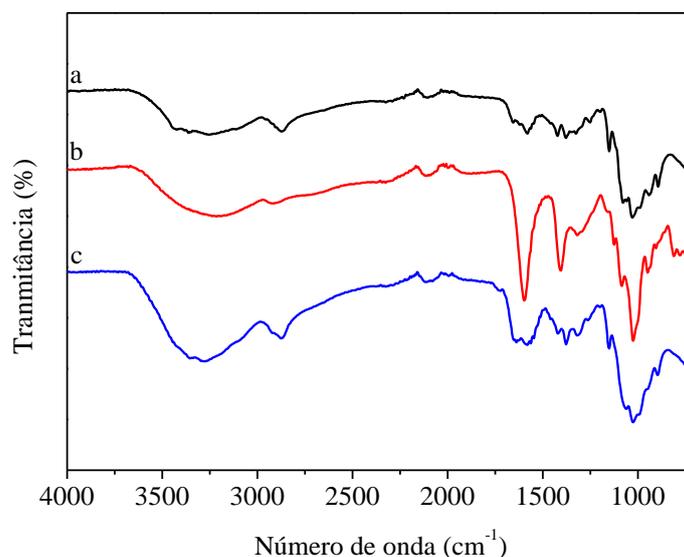
Fonte: elaborada pela autora.

4.1.2 Caracterização das microesferas compósita quitosana-alginato

4.1.2.1 FTIR

Os espectros de absorção no infravermelho da quitosana natural (QT), alginato de sódio e do microesfera compósito quitosana/alginato (MQA), são mostrados na Figura 4. No espectro da QT (Figura 4a) está caracterizado pela presença de bandas de absorção correspondentes aos modos vibracionais característicos dos grupos funcionais envolvidos em ligações de hidrogênio como O-H, cuja região espectral aparece em sinal largo com máximo de 3475 cm^{-1} atribuída à deformação axial do grupo associado a outros grupos polares através de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Na região, em torno de 3300 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , também contém bandas de deformação axial N-H (amina), normalmente sobreposta pela formação de pontes de hidrogênio com os grupos OH, e deformação angular ($\delta(\text{N-H})$), respectivamente. As bandas na região de $1250\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ estão associadas ao estiramento assimétrico do anel piranosídico, refletindo a ligação C-O-C e β -glicosídica, bem como o C-O relacionado à álcoois primários e secundários (LIMA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2009).

Figura 4 - Espectros FTIR de (a) quitosana natural, (b) AlgNa e (c) MQA.



Fonte: elaborada pela autora.

A Figura 4b mostra o espectro de alginato de sódio e suas bandas características. A partir desta pode-se observar que as bandas de absorção em torno de 1597 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} e 1307 cm^{-1} são atribuídas a vibrações de alongamento de bandas assimétricas e simétricas de ânions carboxilatos, respectivamente. As bandas em torno de 1023 cm^{-1} (estiramento C-O-C) são atribuídas à sua estrutura sacarídica (LI *et al.*, 2008; SMITHA *et al.*, 2005).

A formação do MQA é apoiada pela banda larga de intensidade $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ (Figura 4c), indicando aumento de álcool ligado a hidrogênio (O-H). Esta alta intensidade pode ser atribuída à interação dos grupos hidroxila na estrutura da quitosana com os da estrutura do alginato de sódio, que se tornam mais amplos com a formação do complexo MQA. A banda a 2928 cm^{-1} corresponde a um alongamento -OH, 1630 , 1415 e 1030 cm^{-1} , à carbonila (C = O) que se estende da amida secundária (banda amida I), às vibrações de curvatura do N-H (resíduos N-acetilado, banda amida II) e ao grupo hidroxila primário (pico característico de $-\text{CH}_2 - \text{OH}$ em álcoois primários, estiramento C-O), respectivamente, como relatado na literatura para outros materiais à base de quitosana/alginato (HONARY *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2008; MALESU *et al.*, 2011). As bandas de absorção da QT, AlNa e MQA estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Bandas e atribuições obtidas em cada etapa da síntese

Atribuições	Faixa de absorção (cm ⁻¹)
γ (O-H)	3500-3400
(-OH)	2928
γ (N-H)	3300
δ (N-H)	1540
ν_{as} (C-O-C)	1250-1150
ν (C=O-NHR)	1652
COO-	1597
C=O	1630

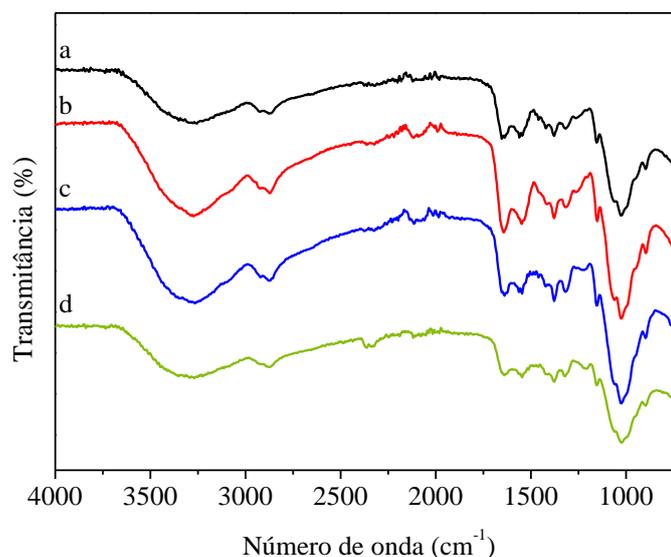
ν_{as} - estiramento assimétrico, ν_s - estiramento simétrico, γ deformação angular fora do plano,
 δ - deformação angular.

Fonte: elaborada pela autora.

Os ligantes utilizados no estudo são corantes aromáticos de triazina e contêm grupos sulfônicos, carboxil, hidroxil. Como os corantes utilizados possuem algumas semelhanças, estes serão discutidos em conjunto e, suas bandas de absorção mostrados nos espectros que estão sumarizados na Tabela 4.

De acordo com Nie e Zhu (2007) as vibrações de estiramento de C-N dos corantes aparecem em 1230 cm⁻¹. O número de onda em torno de 1537 cm⁻¹ caracteriza as triazinas (SU *et al.*, 2016), como apresentado na Figura 5. A faixa de absorção na região de 1600–1450 cm⁻¹ é característica do anel de benzeno. Nessas mesmas faixas de absorção existem muitas bandas características do MQA, no entanto, elas são mais intensas nos espectros dos MQA imobilizado com os ligantes corantes. Por outro lado, a intensidade de adsorção a 1060 cm⁻¹ representa o alongamento simétrico de S=O, em 3375 cm⁻¹ o alongamento assimétrico característico de N-H, em 1150 cm⁻¹ alongamento assimétrico S=O, além de uma banda pequena perto de 1246 cm⁻¹ originada provavelmente pelos grupos ácidos sulfônicos da molécula do corante (SU *et al.*, 2016).

Figura 5 - Espectros FTIR do MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-RR (c) e MQA-PR.



Fonte: elaborada pela autora.

Quando os espectros das amostras de MQA e MQA-corantes são comparados entre si, a principal diferença é a aparência da banda de absorção aromática a 1574 cm^{-1} , característica dos anéis aromáticos que se estendem da faixa de vibração (C...C), oriunda de moléculas de corantes imobilizados. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Nie e Zuh (2007) e Zhang *et al.*, (2006). Os dados indicaram que o acoplamento dos corantes na matriz quitosana/alginate foi bem sucedido.

Tabela 4 - Bandas e atribuições obtidas com a imobilização dos corantes na matriz quitosana-alginato.

Atribuições	Faixa de absorção (cm^{-1})			
	MQA-CB	MQA-RB	MQA-RR	MQA-PR
Triazinas	1537	1537	1555	1549
Anel benzeno	1600-1450	1600-1450	1600-1450	1600-1450
ν_s (S=O)	1060	1065	1060	1060
ν_{as} (N-H)	3375	3375	3375	3375
ν_{as} (S=O)	1156	1156	1150	1146
Ácido sulfônico	1277	1246	1265	1277

Fonte: elaborada pela autora.

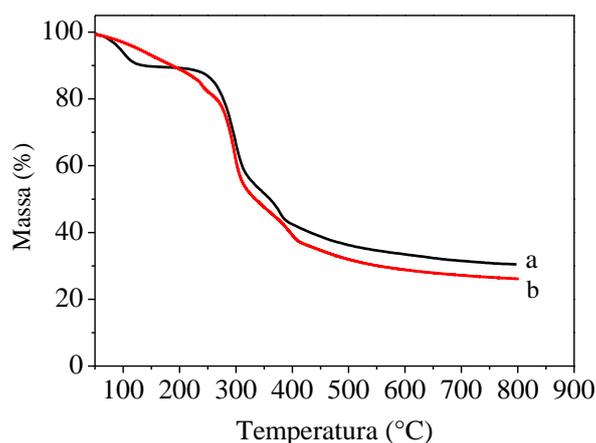
4.1.1.2 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA e DTG) foi realizada para as amostras de quitosana natural e as microesferas de quitosana-alginato immobilizadas com corantes para verificar a estabilidade térmica antes e depois da modificação química.

Primeiro foi analisada a comparação entre os perfis de degradação para a quitosana e MQA, mostrados na Figura 6. A quitosana apresenta o primeiro estágio de perda de massa de 9 % entre as temperaturas de 55 a 125 °C, como se evidencia na curva derivada da Figura 7a. Assim como a MQA (Fig. 7b) na faixa de temperatura de 33 a 220 °C apresenta uma perda de 12%, também evidenciado na curva derivada. O segundo evento térmico é considerado o início da degradação polimérica da QT e MQA, entre as temperaturas 239 - 390 °C e 230 - 405 °C, respectivamente.

As duas amostras apresentaram a mesma temperatura máxima de degradação em 310 °C, representando uma perda de massa de 43% (QT) e 50% (MQA). Segundo Ziegler-Borowska *et al.*, (2014) a degradação está ligada a reações de desidratação, desacetilação, desaminação, quebra das ligações glicosídicas, abertura do anel pirano, vaporização e eliminação de produtos de degradação

Figura 6 - Curvas de TG da quitosana natural (a) e MQA (b).

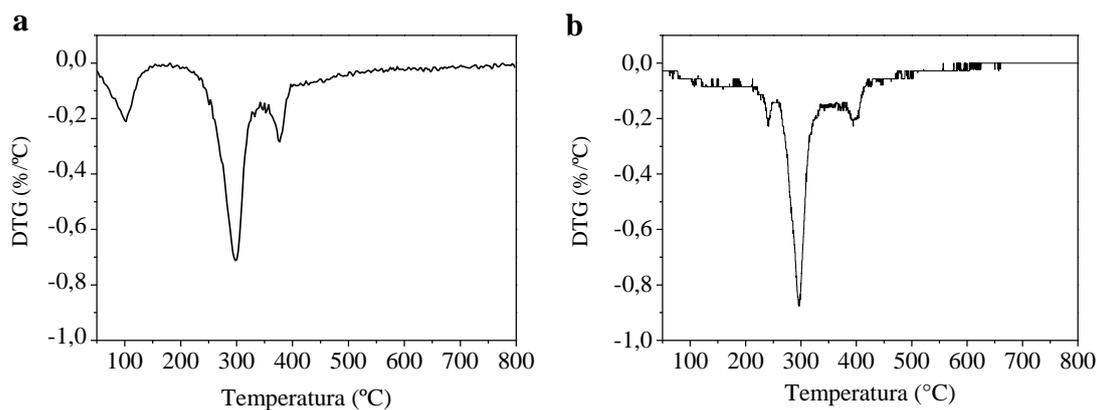


Fonte: elaborada pela autora.

Há ainda um terceiro estágio que varia de 400 a 793 °C para QT e de 405 a 800 °C para MQA, com perda de massa correspondente a 10% e 12%, respectivamente,

atribuídos à decomposição térmica do restante do polímero investigado. A maior perda de massa da microesfera de quitosana-alginato aqui encontrada comparado com a quitosana natural justifica-se pela incorporação do AlNa que possui natureza hidrofílica (ZIEGLER-BOROWSKA *et al.*, 2014).

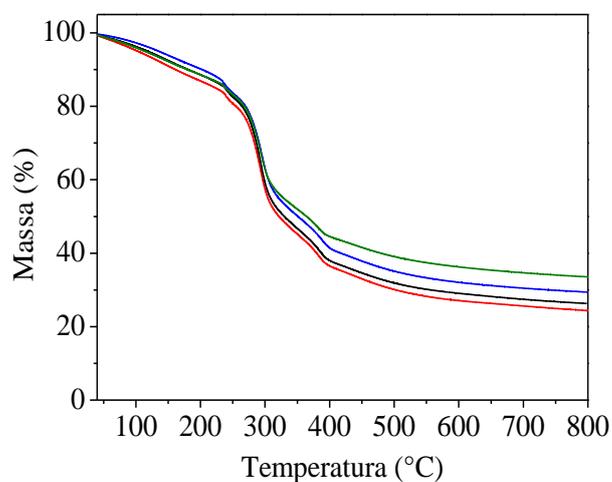
Figura 7 - Curvas de DTG da quitosana natural (a) e MQA (b).



Fonte: elaborada pela autora.

Com a imobilização dos corantes a temperatura máxima de degradação foi de 292 ± 2 °C para todas as microesferas compósitas imobilizada com corantes (Figura 8), apresentando aproximadamente $45 \pm 2\%$ de perda de massa referente à decomposição térmica da cadeia polimérica. Essa maior perda de massa está associada à modificação química da QT com incorporação do AlNa e a imobilização dos corantes e, conseqüentemente, levou a este polímero ter menor estabilidade térmica, isso porque a introdução destes grupos hidrofílicos na cadeia da quitosana desorganiza sua estrutura semicristalina, tornando-a mais hidrofílica e termicamente instável (TSAI *et al.*, 2010).

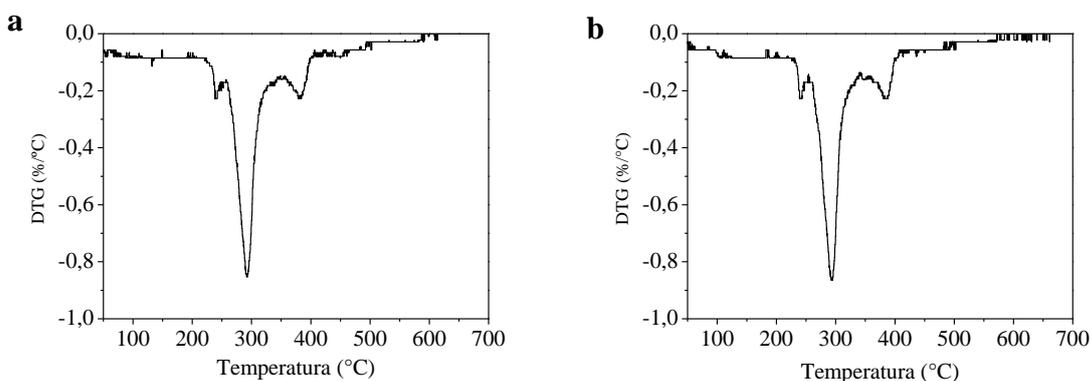
Figura 8 - Curvas de TG das amostras MQA-CB (linha vermelha), MQA-RB (linha preta), MQA-PR (linha azul) e MQA-RR (linha verde).

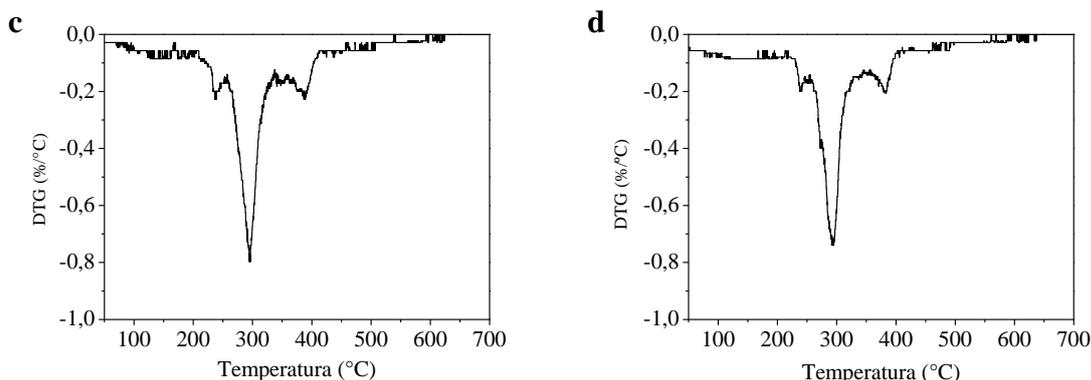


Fonte: elaborada pela autora.

Assim como as amostras de quitosana natural e o MQA, os MQA imobilizados com os ligantes corantes apresentaram os mesmos estágios térmicos. O primeiro estágio que varia aproximadamente de 30 a 235 °C é referente à evolução de água adsorvida no polímero. O segundo e mais importante foi entre 238 a 390 °C, com temperatura máxima de degradação em torno de 300 °C, melhor observado pela DTG (Figura 9), apresentando 46 % de perda de massa para MQA-CB, 47% para MQA-RB, 45 % MQA-PR e 40 % para MQA-RR, referente à decomposição térmica cadeia polimérica. Há ainda um terceiro estágio que varia de 393 a 800 °C, melhor observado nas derivadas, com perda de massa correspondente a aproximadamente 12%, atribuídos à decomposição térmica do restante do material investigado.

Figura 9 - Curva de DTG das amostras MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-PR (c) e MQA-RR.





Fonte: elaborada pela autora.

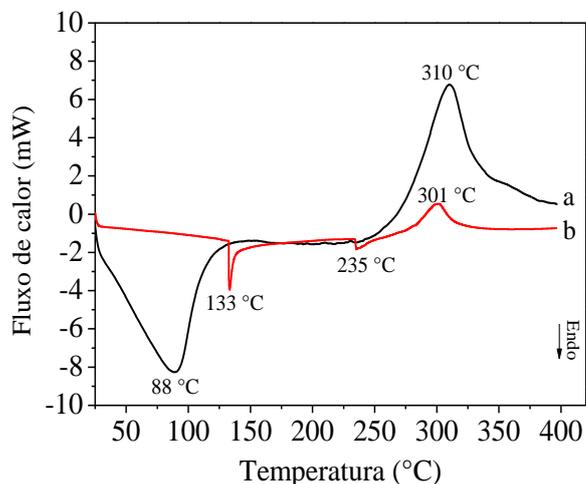
4.1.1.3 Análise de DSC

A caracterização estrutural dos materiais sintetizados ocorreu por meio de medidas de DSC e as curvas resultantes destas análises estão apresentadas a seguir. As curvas de DSC da QT e MQA, contidas na Figura 10, apresentam transição de primeira ordem e a formação de picos endotérmicos e exotérmicos podem ser claramente identificadas. A quitosana é um polímero semi-cristalino, e em função das forças de interação fortes (pontes de hidrogênio) inter e intra-moleculares em suas cadeias poliméricas esta não apresenta picos de transição vítrea (T_g), fusão (T_f) e cristalização (T_c) por DSC (LEE *et al.*, 2000). Na curva da QT (Figura 10a), há um pico exotérmico próximo de 88 °C atribuído à evaporação de substâncias voláteis, como água ligada a pontes de hidrogênio com grupos hidroxila da quitosana e um pico endotérmico em 310 °C correspondente à decomposição da cadeia do polímero. Os dois processos estão coerentes com os eventos observados nas curvas TG e concordam com o que foi observado por Pereira e colaboradores (2013) que descreveu dois eventos térmicos para amostras de QT, sob N_2 em curvas DSC.

Na curva DSC das MQA (Figura 10b), pode-se observar que o pico endotérmico, correspondente à perda de substâncias voláteis como a água, foi deslocado para próximo de 130°C devido à incorporação do alginato de sódio, e aparece um pequeno pico exotérmico, 235 °C, correspondente a decomposição do AlNa. Foi encontrado um pico exotérmico em 301 °C o que pode ser atribuído à decomposição da

quitosana-alginato, demonstrando assim a interação entre a QT e o AlNa. Resultado semelhante foi encontrado por Gondim e colaboradores (2014).

Figura 10 - Curva de DSC para quitosana pura (a) e MQA (b)



Fonte: elaborada pela autora.

Ao incorporar ligante corante na matriz polimérica quitosana-alginato (Figura 11 e Figura 12) pode-se observar que as duas curvas são significativamente diferentes, uma vez que os picos endotérmicos na faixa de 91 a 138 °C e 233 a 239 °C são mais intensos e um pico exotérmico em torno de 297 °C aparece, sugerindo que a imobilização dos corantes foi efetiva, levando à formação de um novo produto.

Figura 11 - Curvas de DSC para os corantes MQA-CB (linha preta), MQA-RB (linha vermelha).

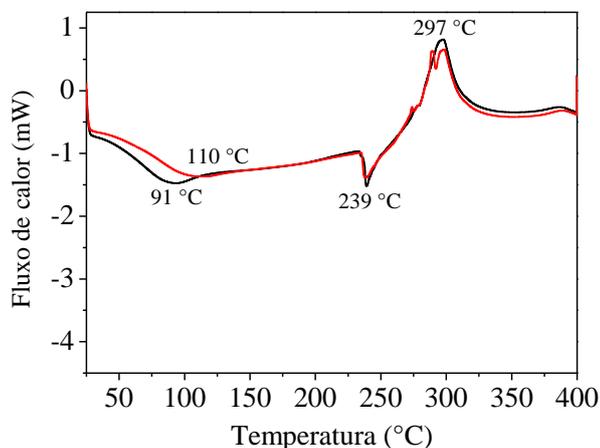
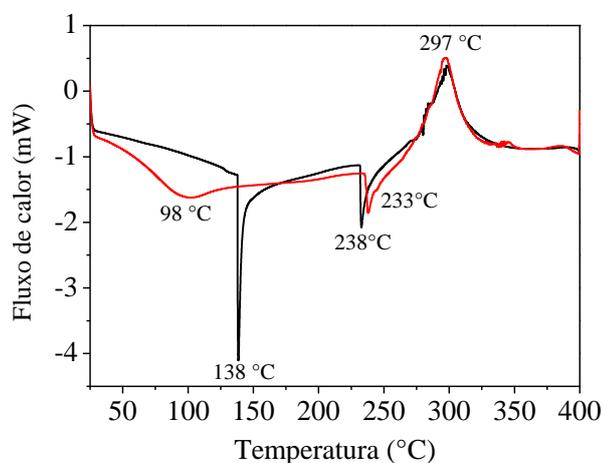


Figura 12 - Curvas de DSC para os corantes MQA-PR (linha preta) e MQA-RR (linha vermelha).



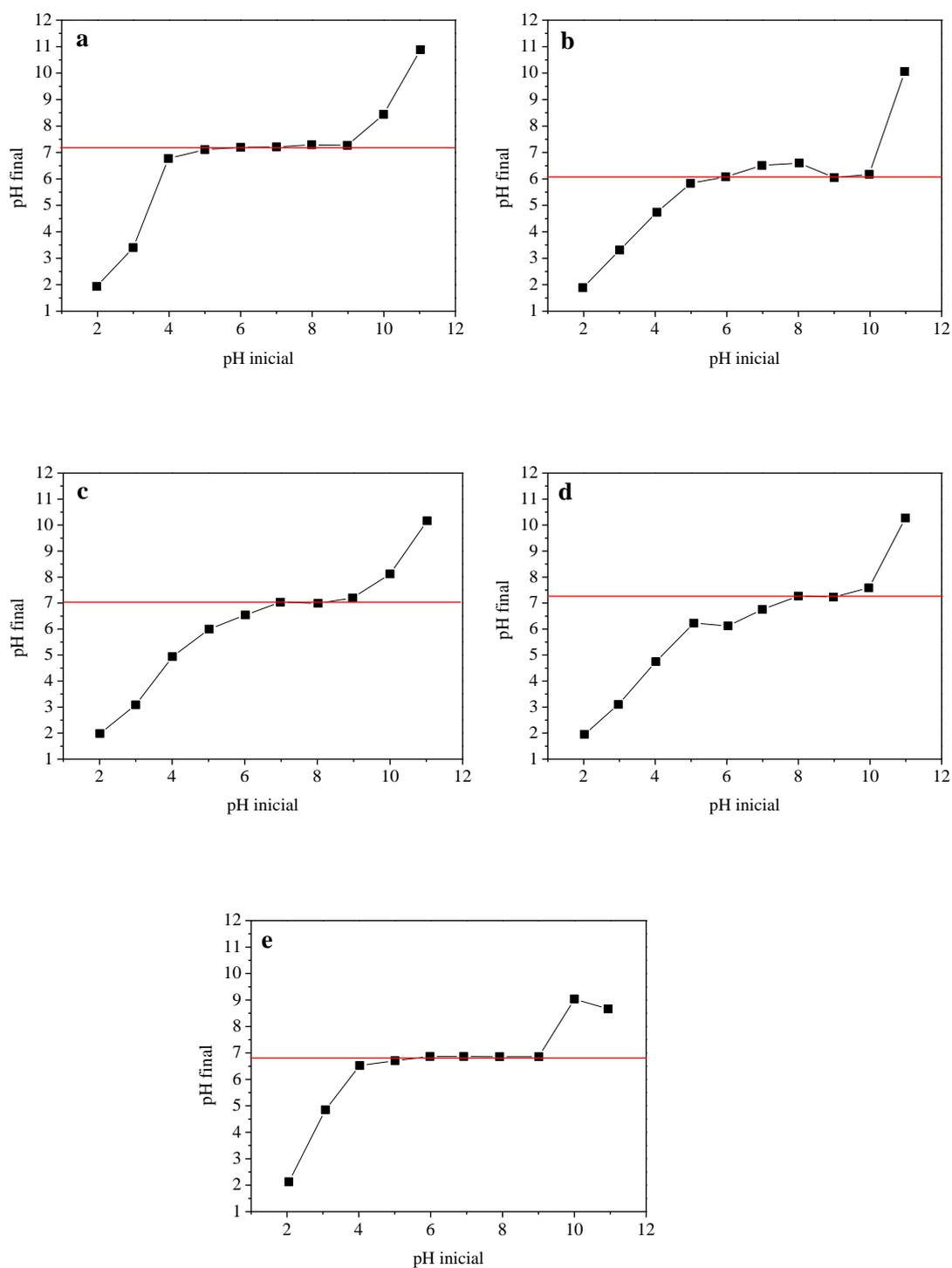
Fonte: elaborada pela autora.

4.1.1.4 Ponto de carga zero

Os ensaios para a obtenção do ponto de carga zero proporcionaram conhecer o comportamento das cargas superficiais das amostras de adsorventes, sendo possível compreender os processos de dispersão e agregação na operação de adsorção. Foi realizado o teste de pH_{PCZ} com a matriz MQA e com os corantes imobilizados. O pH_{PCZ} foi calculado a partir da média aritmética dos pontos que se apresentaram constantes para o pH final e assim, se obter o gráfico referente aos materiais em estudo (Figura 13).

Os valores encontrados para os adsorventes utilizados estão dispostos na Tabela 5. O ponto de carga zero corresponde ao pH no qual a superfície da matriz se encontra com a carga líquida nula. Isso indica que em valores de pH inferiores ao PCZ do adsorvente, a superfície retém espécies H^+ o que leva a uma carga positiva favorecendo a interação com cátions, enquanto em valores de pH superiores ao PCZ, a superfície das matrizes é carregada negativamente devido a liberação de H^+ , o que promove uma carga superficial negativa das matrizes em estudo por desprotonação dos grupos OH, favorecendo a afinidade por cátions. De acordo com a Tabela 5, as matrizes apresentarem um pH_{PCZ} entre 6,3-7,4. Essa faixa de PCZ encontrada está de acordo com materiais à base de quitosana (JOUDE *et al.*, 2020).

Figura 13 - Ponto de carga zero dos adsorventes sintetizados: MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-RR (c), MQA-PR (d) e MQA (e).



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 5 - Resultado dos ensaios da determinação do pH_{PCZ} .

Adsorventes	Ponto de Carga Zero (PCZ)
MQA	$6,8 \pm 0,14$
MQA-CB	$7,2 \pm 0,07$
MQA-RB	$6,3 \pm 0,25$
MQA-RR	$7,4 \pm 0,19$
MQA-PR	$7,1 \pm 0,11$

Fonte: elaborada pela autora.

Para alcançar um bom desempenho durante a operação em leito fixo, é necessário que o adsorvente apresente resistência a condições drásticas de pH, força iônica e estabilidade química. Durante o período da análise do PCZ, o adsorvente MQA-PR não apresentou estabilidade na faixa de pH 8,0 - 11,0. Nestes pHs ocorreu o desprendimento do ligante corante, evidenciando que em pH mais elevado o MQA-PR não é aconselhável seu uso. Com o MQA, em pH 2,0 a matriz foi totalmente solubilizada e em pH 3,0 e 4,0 as microesferas compósitas quitosa-alginato perderam seu formato devido ao seu elevado intumescimento. Foi demonstrado que a solubilidade da quitosana ocorre na faixa de um grau de protonação $\alpha \approx 0,5$ e que $pK_0 \approx 6$ (RINAUDO e DESBRIÈRES 1999; JOUDI *et al.*, 2020)

4.1.3 Ensaios em batelada

4.1.3.1 Efeito do pH e tampão

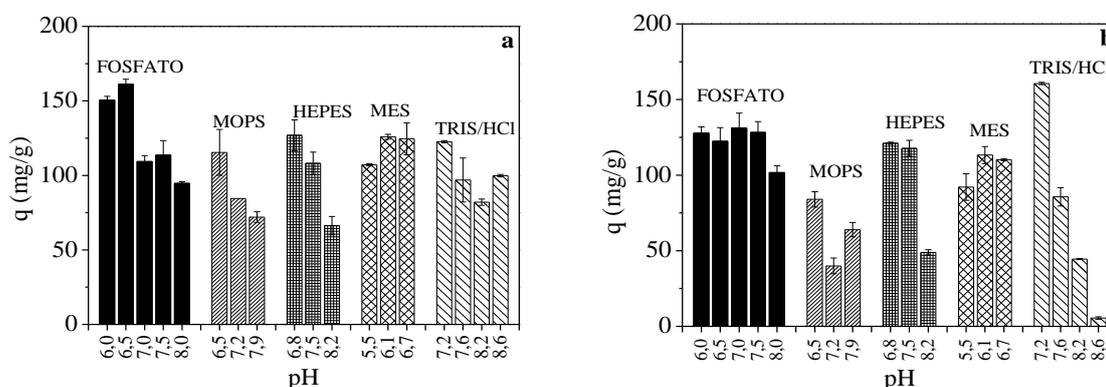
As condições sob as quais os experimentos de adsorção de proteínas são conduzidos têm uma influência decisiva no comportamento de adsorção. Os principais parâmetros externos são temperatura, pH, força iônica e composição do tampão biológico (RABE *et al.*, 2011). Nesse estudo, todos os ensaios foram realizados em triplicata. De acordo com os resultados apresentados por Gondim e colaboradores (2014), os parâmetros de concentração (25 mM) e temperatura (22 °C) foram fixados e foi investigado o parâmetro pH em uma faixa de 5,5 – 8,6. A Figura 14 apresenta o efeito do pH e tipo de tampão na adsorção de IgG nos microesferas compósitas quitosana-alginato com ligantes corantes imobilizados.

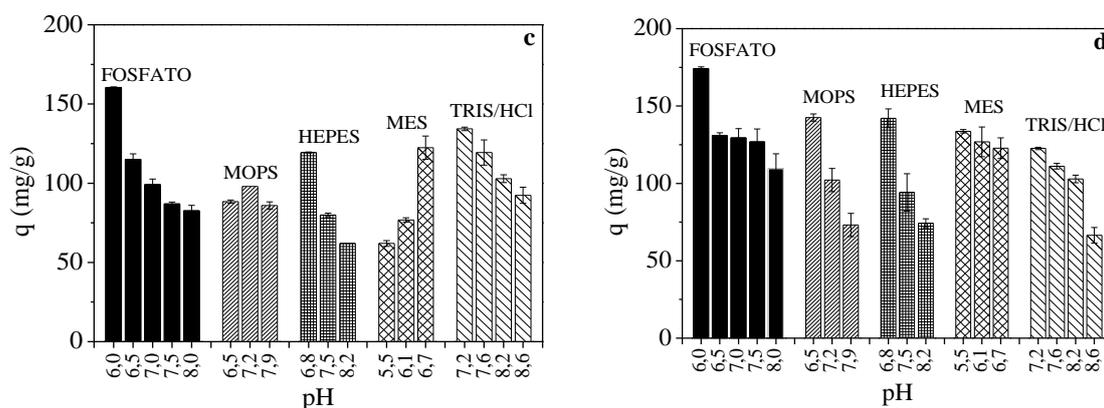
Como mencionado anteriormente, a adsorção de proteínas por cromatografia de afinidade é bastante influenciada pelo ponto isoelétrico (pI) da proteína, pH na qual a carga da proteína é neutra e portanto, as interações proteína-proteína são minimizadas. Dessa maneira, as proteínas tendem a interagir mais facilmente com os ligantes de afinidade, proporcionando normalmente elevadas quantidades adsorvidas.

A Figura 14 apresenta os resultados do estudo dos tampões e pH. Foi verificado que a capacidade máxima de adsorção de IgG foi alcançada com tampão fosfato de sódio pH 6,5 para MQA-CB (a) (161,12 mg/g), Tris/HCl pH 7,2 para o MQA-RB (b) (160,61 mg/g) e FOS pH 6,0 para o MQA-PR (c) (160,46 mg/g) e MQA-RR (d) (175,21 mg/g). A IgG apresenta uma faixa de pI de 6,3 à 9,0 devido a presença de diferentes subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) (BRESOLIN *et al.*, 2010), o que leva uma parcela das proteínas no pH 6,3 a 7,2 apresentar uma carga líquida neutra, já outras subclasses possuem carga positiva (pI entre 7,5 - 9,0). Todos os pHs onde a maior capacidade de adsorção foi alcançada, estão muito próximos ao pI da IgG. Além disso, essas interações entre corante e IgG podem resultar não apenas dos estados de ionização de vários grupos nas cadeias laterais dos corantes e aminoácidos da IgG, mas também do estado conformacional das moléculas de proteína nesse pH (RABE *et al.*, 2011).

Segundo Dogan e colaboradores (2012), interações específicas podem resultar num efeito cooperativo de diferentes mecanismos, tais como interações hidrofóbicas e/ou efeitos de troca iônica, causados pelas várias estruturas aromáticas, grupos amino básicos e grupos de ácido sulfônico dos corantes e a cadeia lateral de grupos aminos da molécula da IgG.

Figura 14 - Efeito da adsorção de IgG (0,75 mg/mL) com a variação do pH e tampões (25 mM) para o MQA-CB (a), MQA-RB (b), MQA-PR (c) e MQA-RR (d).





Fonte: elaborada pela autora.

Pode-se verificar que a quantidade adsorvida de IgG diminuiu a valores de pH inferiores e superiores ao pH de maior adsorção de IgG, o que poderia ter sido ocasionado pelo estado de ionização da IgG e forças eletrostáticas repulsivas entre a IgG e as moléculas de corante. Pode-se observar também, que a capacidade máxima de adsorção ficou muito similar para todas as matrizes com corantes imobilizados, com exceção do MQA-RR, que pode ser atribuído a maior disponibilidade de sítios disponíveis para interação devido a sua estrutura molecular ($M_w = 1569,68$ g/mol). Esse fato pode ter contribuído para uma melhor adsorção em todos os tampões estudados utilizando a MQA-RR.

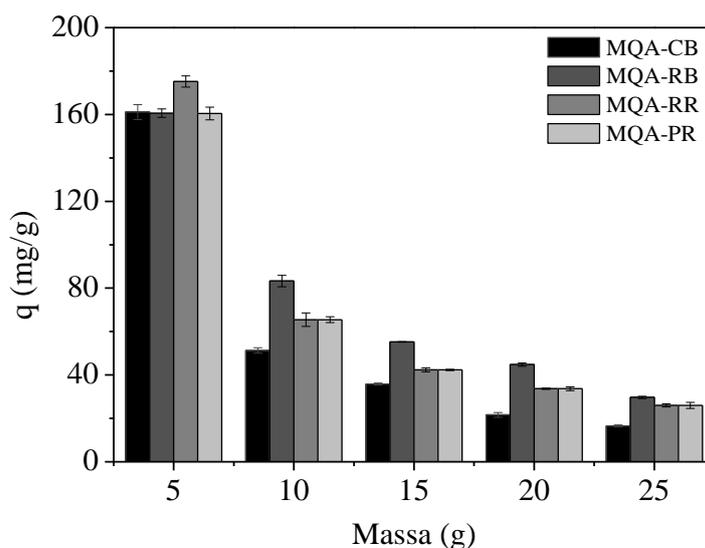
Gondim (2012) imobilizou os corantes Cibacron Blue F3GA, Reactive Green 5 e Reactive Blue 4 em matriz de quitosana/alginate epoxilado visando a purificação de IgG. Foi alcançada uma maior capacidade de adsorção de IgG com o tampão HEPES pH 6,8 para os corantes Cibacron Blue F3GA (76,56 mg/g) e Reactive Green 5 (72,58 mg/g) e o tampão MOPS pH 6,8 para o Reactive Blue 4 (73,33 mg/g). Em outro estudo, Gondim e colaboradores (2012) utilizaram a mesma matriz com o Cibacron Blue F3GA imobilizado para purificação de IgG. Foi investigado o efeito do pH 6,0 – 8,0 no tampão fosfato de sódio (25mM) na adsorção de IgG. Observou-se que a adsorção máxima de IgG ocorreu em pH 6,0 (quantidade adsorvida: cerca de 43,34 mg proteína/g) enquanto o aumento do pH diminuiu a adsorção. Os autores atribuíram que a interação eletrostática do ligante corante, que tende a ser carregado negativamente e a IgG em pH 6,0 tem carga líquida total positiva.

Diferentemente do resultado encontrado nesse estudo, Gondim (2017) observou uma quantidade de IgG adsorvida elevada no sistema em que a proteína IgG foi diluída com o tampão TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) que proporcionou quantidades de IgG adsorvidas de 80,0 e 120,0 mg/g, respectivamente com a matriz quitosana/alginato imobilizado com o corante Reactive Red 120 (QAE-RV120) e o Procion Red MX-5B (QAE-PR-MX). A adsorção de IgG quando a proteína estava diluída em tampão HEPES (pH 6,8) também foi expressiva, com valores próximos de 70,0 e 120,0 mg/g, respectivamente com QAE-RV120 e QAE-PR-MX.

4.1.3.2 Efeito da massa de adsorvente

A fim de verificar a menor quantidade de matriz necessária para os ensaios de adsorção, foram realizados ensaios com quantidades variáveis de MQA-CB, MQA-RB, MQA-RR e MQA-PR empregando de 5 a 25 mg. O teste foi realizado em triplicata e os resultados obtidos são mostrados na Figura 15. Podemos observar que o melhor resultado para todos os adsorventes em estudo foi obtido com a massa de 5 mg.

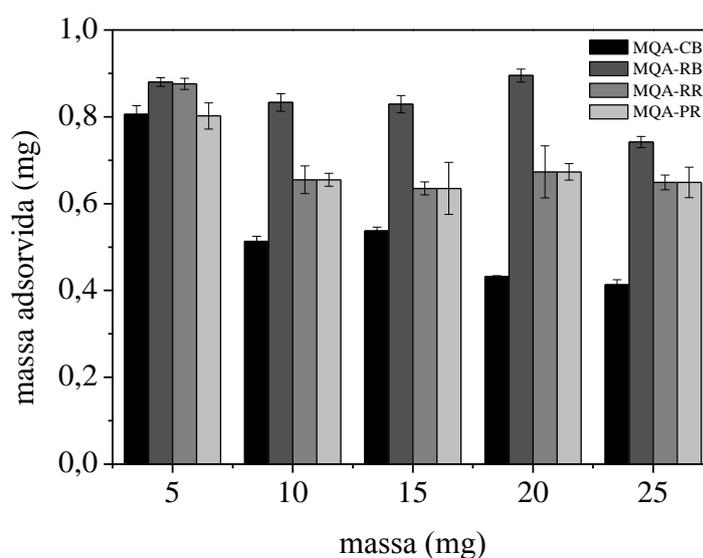
Figura 15 - Adsorção de IgG em MQA-CB (FOS pH 6,5), MQA-RB (Tris/HCl pH 7,2), MQA-RR (FOS pH 6,0) e MQA-PR (FOS pH 6,0) sob influência de diferentes massas de adsorvente. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h).



Fonte: elaborada pela autora.

Apesar de o gráfico mostrar que a adsorção diminui com adição de maiores quantidades de adsorvente, é importante ressaltar que os resultados em questão estão apresentados em função da massa, 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 16. A partir deste, é possível observar que a massa adsorvida de IgG é maior para menores quantidades de massa de matriz, o que nos permite concluir que é mais vantajoso utilizar a massa de 5 mg por resultar em menor gasto do material e que também proporciona uma maior quantidade de adsorção.

Figura 16 - Massa adsorvida de IgG em MQA-CB (FOS pH 6,5), MQA-RB (Tris/HCl pH 7,2), MQA-RR (FOS pH 6,0) e MQA-PR (FOS pH 6,0) sob influência de diferentes massas de matriz cromatográfica. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h)



Fonte: elaborada pela autora.

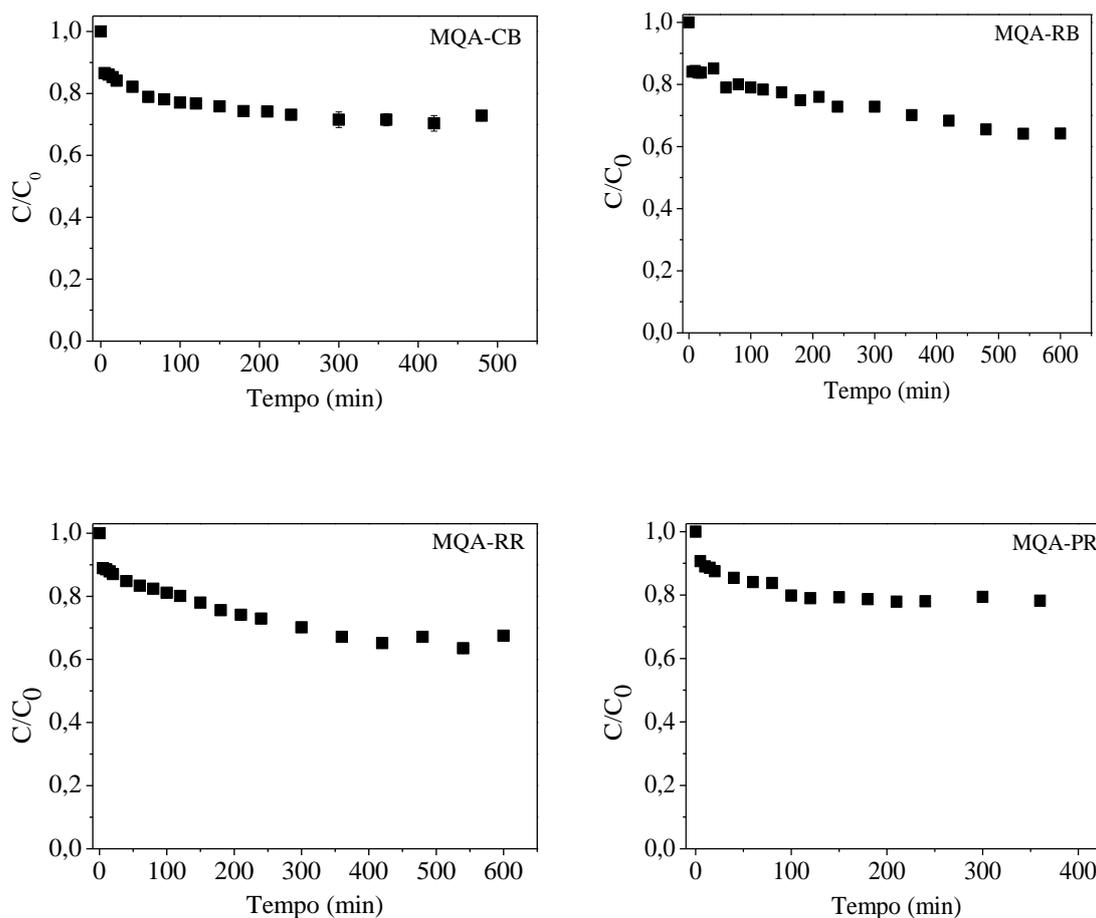
4.1.3.3 Cinética e Isoterma de adsorção

Os experimentos de cinética e isoterma de equilíbrio foram realizados nas condições de pH que promoveram a maior quantidade adsorvida, ou seja, no tampão fosfato de sódio pH 6,0 para o MQA-RR e MQA-PR, tampão Tris/HCl pH 7,2 para MQA-RB e fosfato de sódio pH 6,5 para o MQA-CB. Todos os tampões biológicos

foram preparados com força iônica de 25 mM e os experimentos foram realizados em triplicata.

Para interpretar como ocorre a adsorção em diferentes tempos de contato entre proteína-adsorvente foram obtidas as curvas de cinética de adsorção. A partir da análise da Figura 17 foi observado um decaimento na concentração de IgG relativamente lento, mas de maneira eficaz, para todos os adsorventes estudados. Nota-se, também, que a partir de 300 min o decaimento torna-se ainda mais lento e nos minutos seguintes as concentrações alcançam o equilíbrio evidenciando uma considerável taxa de adsorção nas matrizes cromatográficas.

Figura 17 - Cinética de adsorção de IgG em MQA-CB (FOS pH 6,5), MQA-RB (Tris/HCl pH 7,2), MQA-RR (FOS pH 6,0) e MQA-PR (FOS pH 6,0) (concentração inicial de 1,0 mg/mL, massa de adsorvente 5 mg).



Fonte: elaborada pela autora.

Para MQA-CB e MQA-RR, foi alcançado um tempo de equilíbrio 360 min. Para o MQA-PR o tempo de equilíbrio foi alcançado em menor tempo (240 min) e para o MQA-RB foi alcançado em 420 min. Esses diferentes tempos de equilíbrio podem ser atribuídos a mecanismos difusionais, levando em conta a estrutura molecular dos ligantes corantes e os grupos funcionais presentes na superfície da matriz que podem ter retardado ou acelerado o processo de adsorção.

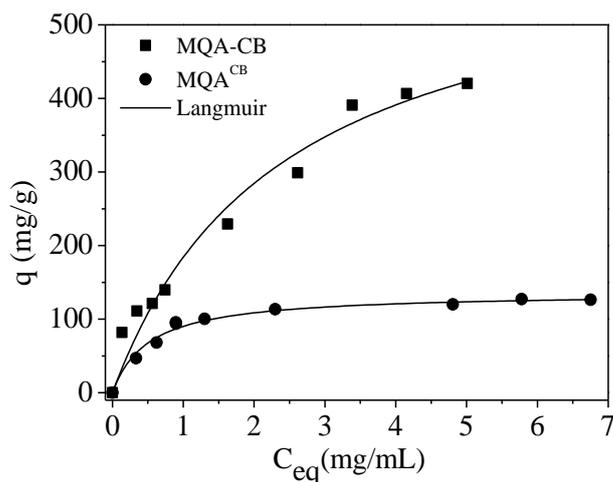
Com o tempo de equilíbrio definido, os ensaios de isotermas de adsorção foram iniciados a fim de obter as quantidades máximas de IgG adsorvida em cada uma das matrizes analisadas. Para fins comparativos, os ensaios de isoterma de adsorção foram realizados, também, com o MQA sem a imobilização dos corantes em todas as condições realizadas para cada MQA imobilizado com o corante, assim, será possível avaliar a influência da incorporação do ligante corante na matriz polimérica do composto quitosana-alginato. Para facilitar a interpretação, foi designado MQA^{CB} para as isotermas com a matriz MQA nas mesmas condições experimentais realizadas com MQA-CB; MQA^{RB} para as isotermas realizadas com o MQA nas mesmas condições experimentais executadas com MQA-RB e, de forma análoga, MQA^{RR} e MQA^{PR} para as isotermas utilizando a matriz MQA nas mesmas condições experimentais realizadas com MQA-RR e MQA-PR, respectivamente.

Neste trabalho as isotermas foram representadas pela equação de ajuste de Langmuir aos dados experimentais por meio de um algoritmo não linear (Origin Lab. 8.0). Comparando-se os dados experimentais com o ajuste feito a partir da Equação 2, observa-se que a equação de ajuste reproduziu satisfatoriamente os dados experimentais de isoterma de IgG nas matrizes de pseudoafinidade estudadas, onde valores de R^2 foram próximos da unidade, indicando boa aceitação dos dados experimentais.

Na Figura 18, pode-se verificar que para a MQA^{CB} em baixas concentrações de proteína, se obtém uma elevada quantidade adsorvida e para concentrações mais altas atinge-se um platô, com uma capacidade de adsorção de 136,17 mg/g de IgG pela isoterma de Langmuir. Este resultado mostra que a incorporação do ligante corante Cibacron Blue F3GA aumentou significativamente a adsorção de IgG, com uma capacidade máxima de adsorção de 625,28 mg/g para Langmuir, mostrando-se vantajoso a utilização, neste caso, do corante ligante CB em processos de adsorção por pseudoafinidade. Além disso, pode considerar que a incorporação do CB além de

favorecer a adsorção proteína-adsorvente, pode prevalecer outros mecanismos de reações, visto que apresentou uma maior quantidade adsorvida.

Figura 18 - Isotermas de adsorção de IgG (concentrações de 0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-CB e MQA^{CB} usando o tampão FOS pH 6,5 (25 mM) e tempo de adsorção de 6 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir.



Fonte: elaborada pela autora.

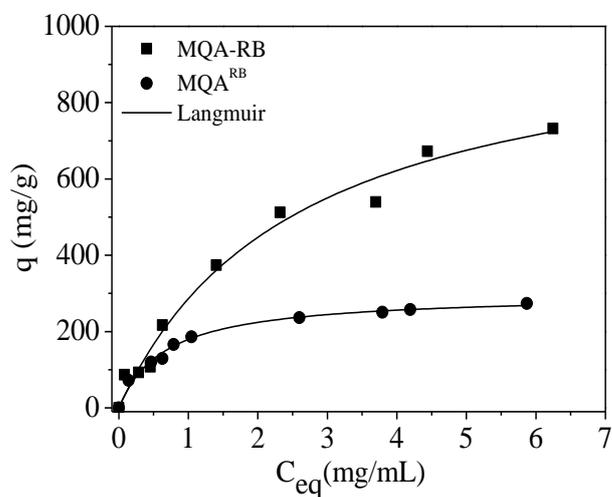
Gondim e colaboradores (2014) usaram uma matriz de quitosana/alginato epoxilado imobilizado com corante Cibacron Blue F3GA (E-Ch/Al-Cibacron) para adsorção de IgG e verificaram que a melhor equação de ajuste foi de Langmuir-Freundlich (R^2 0,99) e uma capacidade de adsorção de 117,5 mg/g de IgG. Este resultado está bem menor ao encontrado nesse trabalho, podendo ser atribuído à otimização do adsorvente, uma vez que foi conseguido obter microesferas compósita com formas bem definidas (esféricas) e mais resistentes.

Foi realizado, também, um estudo de isoterma utilizando somente a solução de proteína IgG (sem a presença das matrizes), a fim de se verificar se nas condições estudadas (concentrações de IgG de 1,0 – 5,0 mg/mL) havia precipitação da proteína nos tampões e pH em estudo. Foi observado que na concentração de 5,0 mg/mL de IgG nos tampões Tris/HCl pH 7,2 e no FOS pH 6,5 houve uma leve precipitação da IgG, 3,5% e 5%, respectivamente. Isso pode acontecer porque a capacidade de interação com as partículas de soluto é diferente para cada solvente devido a constante dielétrica, além disso, pode ter ocorrido precipitação isoelétrica, que pode ter reduzido a repulsão

eletrostática proteína-proteína e causando a precipitação por conta do ponto isoelétrico da proteína (DORAN, 2013).

A Figura 19 ilustra o perfil adquirido para as matrizes MQA-RB e da MQA^{RB}, bem como o ajuste do modelo. De acordo com os resultados, verificou-se que a isoterma obtida apresentou comportamento favorável, indicando que grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de IgG na solução. Além disso, observa-se que nas concentrações 2 e 3 mg/mL já ocorre a saturação do MQA^{RB}. Portanto, a imobilização do corante Reactive Blue 4 aumentou significativamente a adsorção de IgG. O modelo de ajuste Langmuir adequou satisfatoriamente aos dados experimentais do MQA-RB e MQA^{RB} (Tabela 6), com capacidade máxima de adsorção (q_m) superior ao encontrado por Gondim (2012). Este obteve valores de q_m de 192 mg/g para Langmuir, usando matriz de quitosana/alginato epoxilado imobilizado com o corante Reactive Blue 4 em tampão HEPES pH 6,8.

Figura 19 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-RB e MQA^{RB} usando o tampão TRIS/HCl pH 7,2 (25 mM) e tempo de adsorção de 7 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir



Fonte: elaborada pela autora.

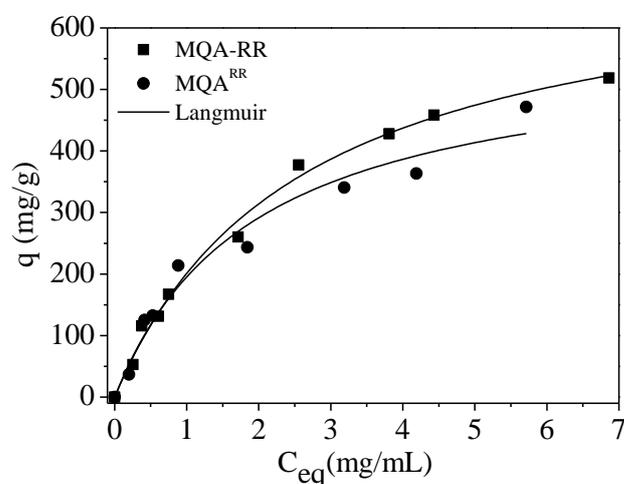
Tabela 6 - Parâmetros de ajuste obtidos através do modelo de Langmuir (L) para adsorção de IgG em MQA-CB e MQA^{CB} utilizando tampão Fosfato pH 6,5 (25 mM) e em MQA-RB e MQA^{RB} utilizando tampão Tris/HCl pH 7,2 (25 mM).

Parâmetros	MQA-CB	MQA ^{CB}	MQA-RB	MQA ^{RB}
q_m (mg/g)	625,28 ± 31,32	136,17 ± 4,19	1022,17 ± 43,74	298,61 ± 8,45
k_D (mol/L)	1,59x10 ⁻⁵ ± 0,61	3,38x10 ⁻⁶ ± 0,06	1,50x10 ⁻⁵ ± 0,54	4,43x10 ⁻⁶ ± 0,01
R^2	0,97	0,98	0,98	0,99

Fonte: elaborada pela autora.

O modelo de Langmuir se ajustou aos dados experimentais para MQA-RR e MQA-PR conforme pode ser observado nas Figuras 20 e 21. De acordo com o parâmetro de q_m , o ligante Reactive Red 120 proporcionou uma quantidade de IgG adsorvida superior em relação ao Procion Red MX-5B. Foi encontrado um q_m para o modelo de Langmuir de 718,57 mg/g e de 698,38 mg/g para o MQA-RR e MQA-PR, respectivamente. O MQA sem a imobilização do corante e nas condições dos ensaios do MQA-RR e da MQA-PR apresentou afinidade por IgG, entretanto com uma adsorção de 573,75 mg/g. Portanto, imobilização dos corantes aumentou significativamente a adsorção de IgG.

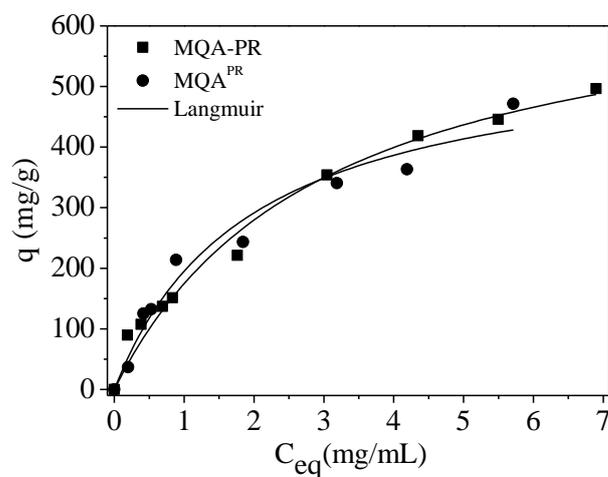
Figura 20 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-RR e MQA^{RR} usando o tampão FOS pH 6,0 (25 mM) e tempo de adsorção de 6 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir.



Fonte: elaborada pela autora.

Li e colaboradores (2014) utilizaram o corante Reactive Red 120 como um corante-ligante de afinidade para modificar a superfície de microesferas magnéticas de quitosana para melhorar a capacidade de adsorção de lisozima. Uma quantidade de adsorção aumentada de 116,9 mg/g de lisozima em microesferas modificadas Reactive Red 120 foi alcançada em comparação com 24,6 mg/g em microesferas magnéticas de quitosana não modificadas. A equação de Langmuir se ajustou melhor aos dados experimentais, com a capacidade máxima de adsorção calculada a partir da equação de Langmuir foi de 144,9 mg/g. Os resultados aqui encontrados são superiores ao encontrados na literatura com a utilização de ligantes corantes (GONDIM *et al.*, 2012; GONDIM *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016; DOU *et al.*, 2018).

Figura 21 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em MQA-PR e MQA^{PR} usando o tampão FOS pH 6,0 (25 mM) e tempo de adsorção de 4 h (massa de adsorvente de 5 mg). Equações de ajustes de Langmuir.



Fonte: elaborada pela autora.

Um dos parâmetros relevante nos ensaios de isotermas é o k_D , onde se avalia o quão forte é a ligação entre a proteína e o adsorvente, e quanto menor o valor desta constante maior a interação entre proteína-adsorvente. Os valores de k_D para todas as matrizes com os corantes imobilizados foram na ordem de 10^{-5} e 10^{-6} mol/L (Tabela 6 e 7). Neste caso, os ligante corantes imobilizados apresentaram afinidade para IgG com uma constante de dissociação que está dentro da faixa de 10^{-4} a 10^{-8} mol/L e adequado para um ligante pseudobioespecífico (VIJAYALAKSHM, 1989). Além disso, De

acordo com esses resultados, podemos afirmar que a imobilização dos corantes diminuiu a heterogeneidade, uma vez que o modelo de Langmuir baseia-se na hipótese de homogeneidade da adsorção, tais como locais de adsorção igualmente disponíveis, cobertura de superfície em monocamada e ausência de interação entre espécies adsorvidas (NIE e ZHU, 2007).

Tabela 7 - Parâmetros de ajuste obtidos através do modelo de Langmuir (L) para adsorção de IgG em MQA-PR, MQA-RB e MQA utilizando tampão Fosfato pH 6,0 (25 mM).

Parâmetros	MQA-PR	MQA-RR	MQA*
q_m (mg/g)	$698,38 \pm 60,46$	$718,57 \pm 35,32$	$573,75 \pm 61,19$
k_D (mol/L)	$1,99 \times 10^{-5} \pm 0,59$	$1,71 \times 10^{-5} \pm 0,29$	$1,29 \times 10^{-5} \pm 0,50$
R^2	0,98	0,99	0,96

* Isoterma com a matriz sem a imobilização de corantes em tampão FOS pH 6,0.

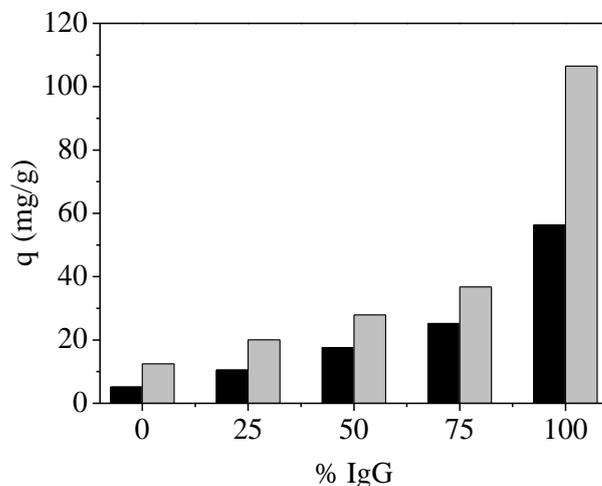
Fonte: elaborada pela autora.

4.1.3.4 Ensaios de adsorção com mistura IgG/HSA

A fim de verificar a seletividade dos ligantes corantes para adsorção de IgG, foram realizados ensaios de adsorção com misturas de IgG de alta pureza com HSA em diferentes proporções e, as análises qualitativas foram realizadas por meio de eletroforeses. Na análise quantitativa, realizada por meio de metodologia por Bradford (1976), foram obtidos resultados referentes à quantidade total de proteína adsorvida em cada ensaio, não se podendo distinguir quantitativamente cada componente.

A Figura 22 mostra a adsorção de uma mistura binária de HSA e IgG em diferentes proporções de IgG (0, 25, 50, 75 e 100%) usando MQA-CB e MQA^{CB}. A partir do gráfico, observa-se um comportamento semelhante aos das isotermas, em que a matriz com o ligante corante imobilizado demonstrou superioridade de quantidade adsorvida. A MQA-CB adsorveu mais HSA do que a MQA^{CB}, podendo ser atribuído à atração eletrostática da proteína e o corante. Em pH 6,5 a HSA possui carga líquida total negativa e pode interagir principalmente com as cargas positivas (PCZ do MQA-CB 7,2) do corante-ligante por interações eletrostáticas. Apesar de não ser tão seletivo para a IgG, o material pode ser aplicado em etapas anteriores ao fracionamento do plasma sanguíneo.

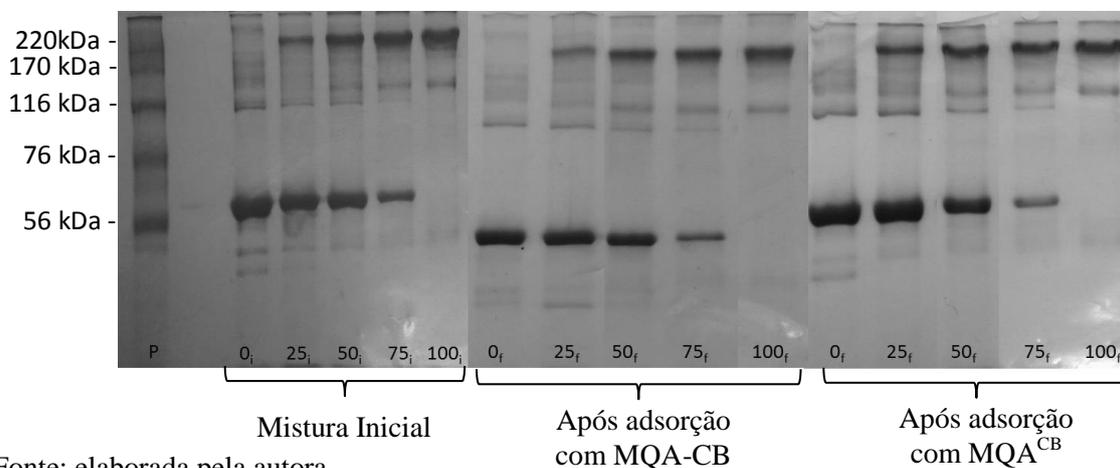
Figura 22- Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando MQA-CB (cinza) e MQA^{CB} (preto) com diferentes proporções de IgG (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão fosfato pH 6,5, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).



Fonte: elaborada pela autora.

Os resultados das eletroforeses das matrizes MQA-CB e MQA^{CB} estão apresentados na Figura 23, onde foi utilizada a seguinte identificação: marcador de peso molecular (P), amostra inicial do ensaio com mistura $n\%$ IgG (i) e amostra final do ensaio com mistura $n\%$ IgG (f). Pode ser observadas que ambas as proteínas foram mais adsorvidas na matriz MQA-CB, porém a IgG foi obtiver maior seletividade.

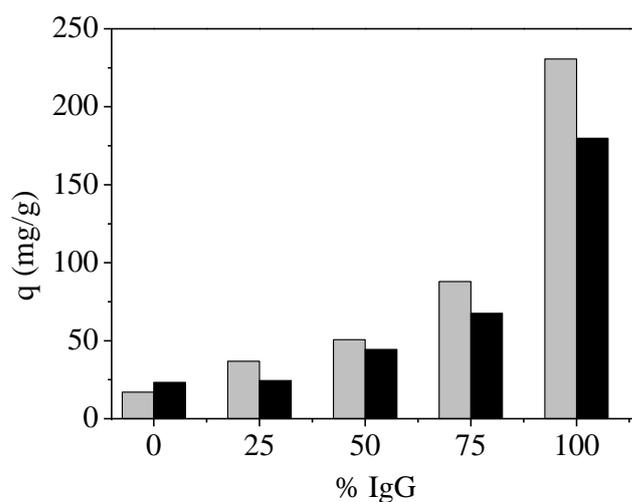
Figura 23 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA-CB e MQA^{CB} com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão fosfato pH 6,5, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).



Analisando os resultados da Figura 24 é possível verificar que a matriz de pseudoafinidade com a imobilização do corante RB apresenta seletividade para a IgG, uma vez que o decréscimo na intensidade das bandas da IgG nas amostras finais é relativamente superior ao decréscimo verificado nas bandas referentes a HSA, e que há um crescimento linear de adsorção de IgG até os 75% e na concentração 100% de IgG há um salto na adsorção. Portanto, a presença de HSA dificulta a adsorção de IgG, podendo ser atribuído pela competição por sítios de ligação entre proteína-adsorvente.

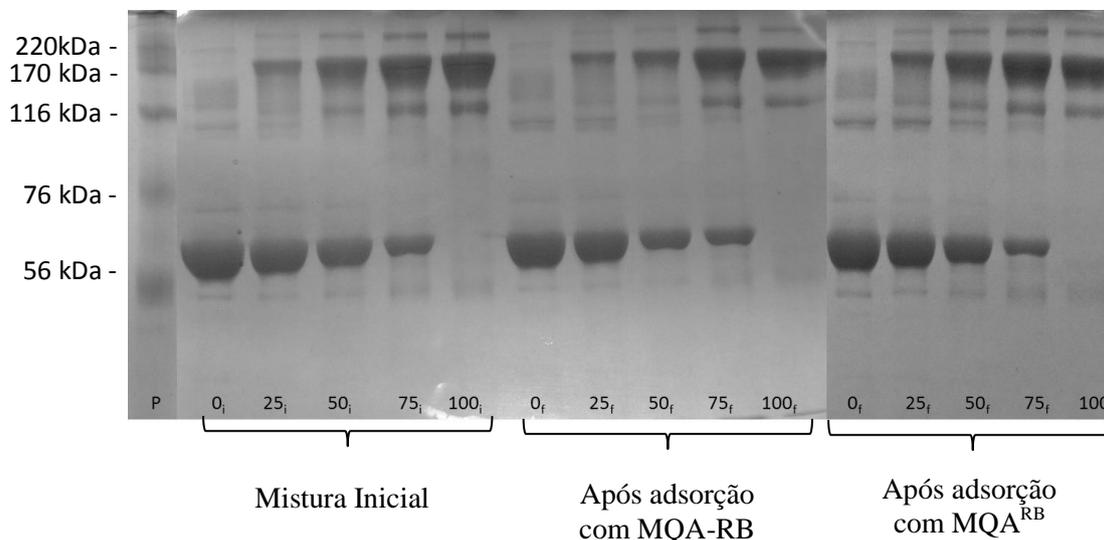
De acordo com a Figura 25 o corante RB se mostrou seletivo para IgG, uma vez que a matriz MQA adsorveu menos IgG quando esta estava em concentração 100% (sem a HSA).

Figura 24 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando MQA-RB (cinza) e MQA^{RB} (preto) com diferentes proporções de IgG (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 7 h, tampão Tris/HCl pH 7,2, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 25 - Géis de eletroforese da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA-RB e MQA^{RB} com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 7 h, tampão Tris/HCl pH 7,2, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).

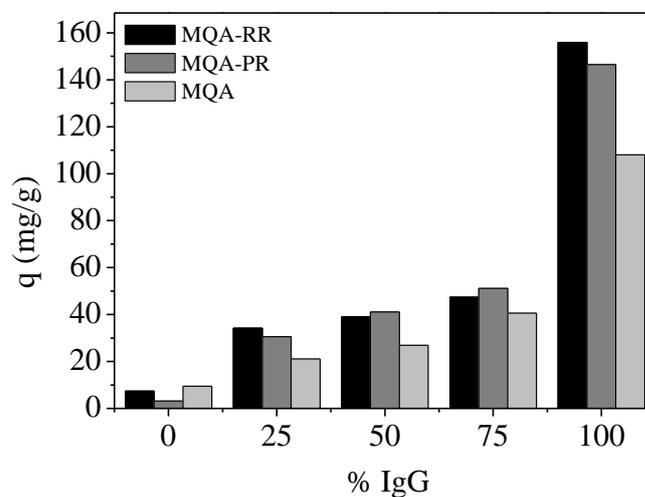


Fonte: elaborada pela autora.

Como o tampão FOS pH 6,0 (25 mM) foi o tampão de maior adsorção nos estudos para as matrizes MQA-PR e MQA-RR e, como as matrizes MQA^{PR} e MQA^{RR} trata-se da matriz sem a imobilização de corantes (MQA) nas condições de estudo da MQA-RR e MQA-PR, respectivamente, os resultados dos ensaios da mistura da IgG/HSA serão apresentados juntos.

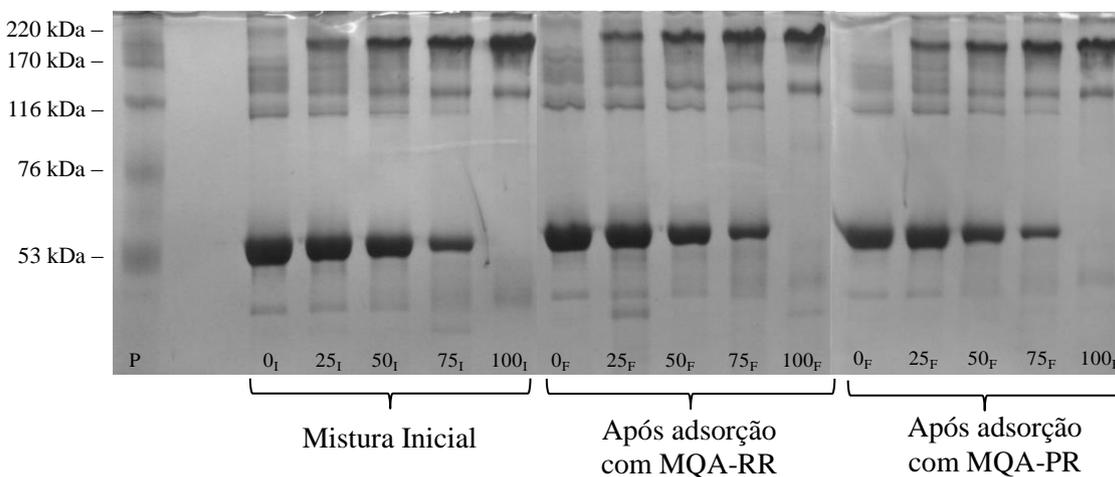
Na Figura 26 observa-se que o monocomponente HSA proporcionou menor adsorção para as matrizes com os corantes imobilizados comparados com a MQA e, que a presença de HSA na mistura proporcionou menor quantidade adsorvida de IgG, visto que quando se utilizou o monocomponente IgG houve uma elevada adsorção com todas as matrizes, com destaque para MQA-PR e MQA-RR, mostrando a seletividade dos corantes imobilizados. Nesse caso, uma provável competição pelos poros das matrizes deve estar ocorrendo, porém a IgG está sendo adsorvida preferencialmente, como mostram os resultados da eletroforese (Figura 27 Figura 28). Provavelmente, devido às significantes repulsões eletrostáticas entre as cargas de mesmo sinal entre as matrizes e HSA, pois ambas apresentaram carga superficial negativa.

Figura 26 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando MQA-RR, MQA-PR e MQA com diferentes proporções de IgG (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão FOS pH 6,0, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).



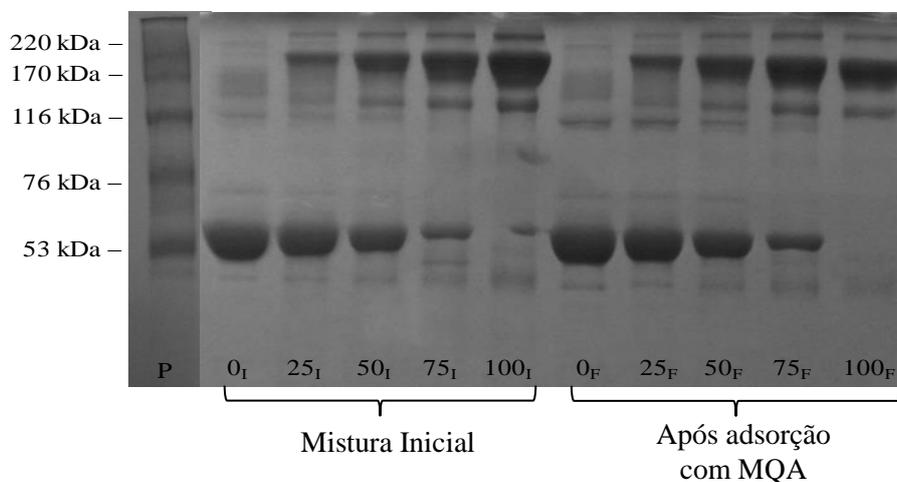
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 27 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA-RR e MQA-PR com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 6 h, tampão FOS pH 6,0, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 28 - Eletroforese SDS-PAGE da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando MQA com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 4 h, tampão fosfato pH 6,0, 1,0 mg/mL de IgG/HSA).



Fonte: elaborada pela autora.

Avaliando-se todas as matrizes pode-se verificar um mesmo comportamento frente ao monocomponente HSA. Esse resultado pode-se, também, ser atribuído ao efeito de impedimento estérico devido às possibilidades de interações moleculares na solução e na superfície do adsorvente, no qual há uma diferença de quantidades adsorvidas à medida que aumenta a proporção de uma proteína em relação à outra. Além disso, outra explicação refere-se às forças de repulsão entre as cargas da molécula de BSA possivelmente tenham causado um auto impedimento estérico. Resultados semelhantes foram encontrados por Dahman e Jayasuriya (2013) e por Gondim (2017).

Confirmou-se através desse ensaio de mistura binárias com IgG/HSA que todos os adsorventes com corantes imobilizados apresentaram elevada interação por IgG, entretanto considerável HSA foi adsorvida. Tais resultados mostraram que nessas condições estudadas os adsorventes são mais indicados para ensaios com propósito de uma pré-purificação de IgG, podem vir a serem bons adsorventes em etapas intermediárias na purificação de IgG.

Contudo, os estudos realizados nessa sessão podem proporcionar condições de otimização para o uso de matriz de pseudoafinidade com ligantes corantes. Ao fazer uma comparação geral podemos observar, nitidamente, que o aperfeiçoamento da síntese das microesferas compósitas de quitosana-alginato proporcionaram uma elevada quantidade adsorvida de IgG, mesmo não sendo realizada em condições otimizadas. E a inserção dos corantes ligantes favoreceram a adsorção de IgG.

4.1.4 Ensaio em leito fixo

Com o propósito de investigar o potencial das matrizes cromatográficas na adsorção seletiva de IgG humana, foram realizados ensaios com amostras de soro humano. Mediante os ensaios preliminares foi constatado que ao utilizar condições de eluição contendo NaCl e/ou NaOH ocorreu o desprendimento do corante Procion Red MX-5B, o que já estava previsto pelo resultado da análise de ponto de carga zero. Portanto a matriz com o corante imobilizado Procion Red MX-5B não foi utilizada para os ensaios em leito fixo.

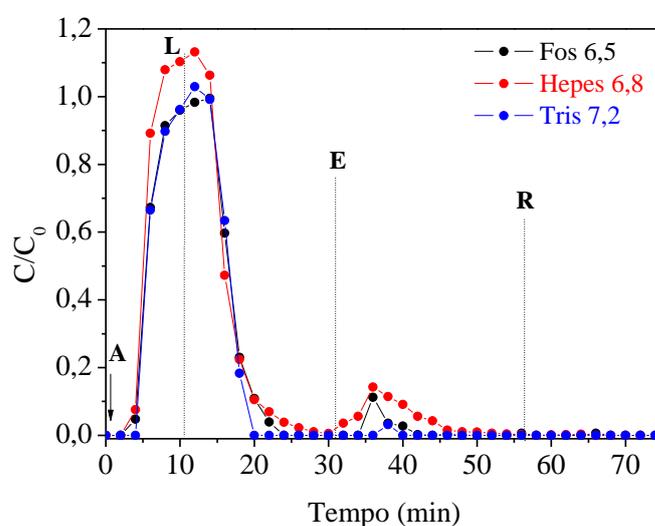
Gondim (2017) realizou estudos com a matriz quitosana/alginato epoxilado imobilizado com o corante Procion Red MX-5B em sistema de leito fixo. Foi conseguido uma considerável afinidade do ligante pela biomolécula IgG, cerca de 80% da massa total injetada na coluna foi adsorvida, com uma quantidade de IgG retida, em massa, 7,54 mg na matriz estudada. Estudos para melhorar a imobilização do corante RR na matriz MQA é necessário serem realizados.

Para se confirmar o potencial uso dessas matrizes de pseudoafinidade para purificação de IgG humana, novos ensaios em sistema cromatográfico foram necessários serem realizados. Para uma otimização na etapa de eluição, foi utilizada uma concentração do tampão de eluição de 50 mM + NaCl 1M. Como é de conhecimento, o soro humano contém além de HSA e IgG outras proteínas, portanto foi realizado ensaios com os três tampões que mais se destacaram nos ensaios em batelada. Deste modo, para a matrizes MQA-CB foram realizadas corridas cromatográficas com os tampões Tris/HCl pH 7,2, FOS pH 6,5 e HEPES pH 6,8; para o MQA-RB os tampões Tris/HCl pH 7,2, FOS pH 7,0 e HEPES pH 6,8; o MQA-RR Tris/HCl pH 7,2, FOS pH 6,0 e HEPES pH 6,8.

A Figura 29 apresenta os perfis cromatográficos com MQA-CB nas amostras de soro humano diluído em TRIS-HCl pH 7,2, FOS pH 6,5 e HEPES pH 6,8 na concentração de 25 mM. O volume de injeção definido foi de 5 mL e as amostras injetadas na coluna com o soro humano foram diluídas no tampão de adsorção proporcionando amostras com concentrações em torno de 2,0 mg/mL. Conforme é possível observar, o tampão que mais adsorveu proteínas foi o HEPES pH 6,8 (11,71%) seguido pelo FOS pH 6,5 (7,1%), verificado pela presença de dois picos cromatográficos representando as proteínas que não foram adsorvidas (pico 1) e as

proteínas dessorvidas na eluição (pico 2). O tampão Tris/HCl pH 7,2 quase não houve adsorção das proteínas, diferentemente do resultado em batelada. Como falado anteriormente, a presença de outras proteínas podem ter provocado um impedimento estérico, o que pode ter ocasionado essa menor retenção de proteínas na MQA-CB.

Figura 29 - Perfis cromatográficos com soro humano (SH) diluído em diferentes tampões na concentração de 2 mg/mL a uma vazão de 0,5 mL/min utilizando a matriz MQA-CB. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: Tampão 50 mM + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R).



Fonte: elaborada pela autora.

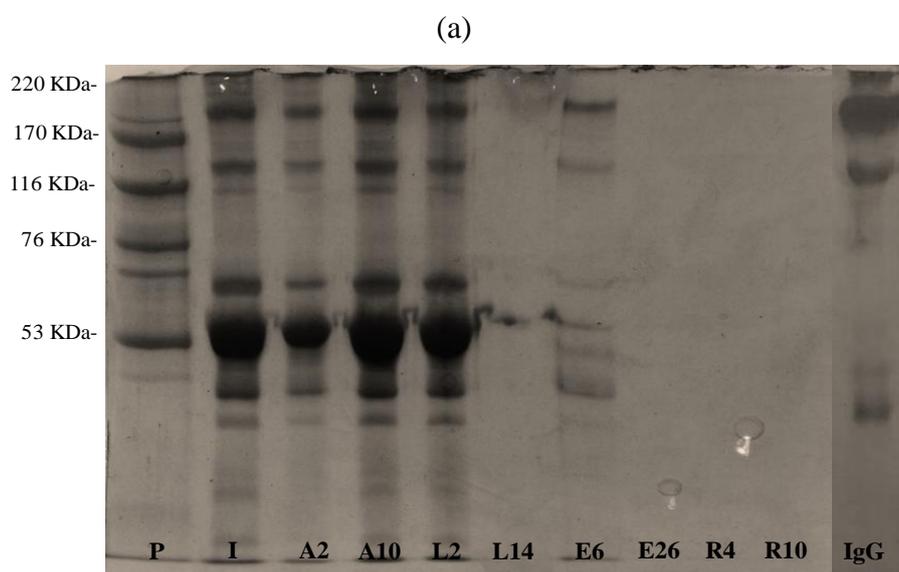
Gondim *et al.* (2014) usando o mesmo corante CB e mesmo tampão, HEPES pH 6,8 (25mM), visando a purificação de IgG a partir do soro humano, obtiveram uma capacidade de adsorção recuperada de 4,3% nos ensaios cromatográficos, onde também foi encontrado uma considerável adsorção de HSA. Portanto, o ligante CB estudado no presente trabalho apresentou resultados na adsorção de IgG superiores aos da literatura utilizando a mesma matriz de MQA. Essa maior retenção das proteínas pode ser atribuído à otimização da síntese dessas matrizes.

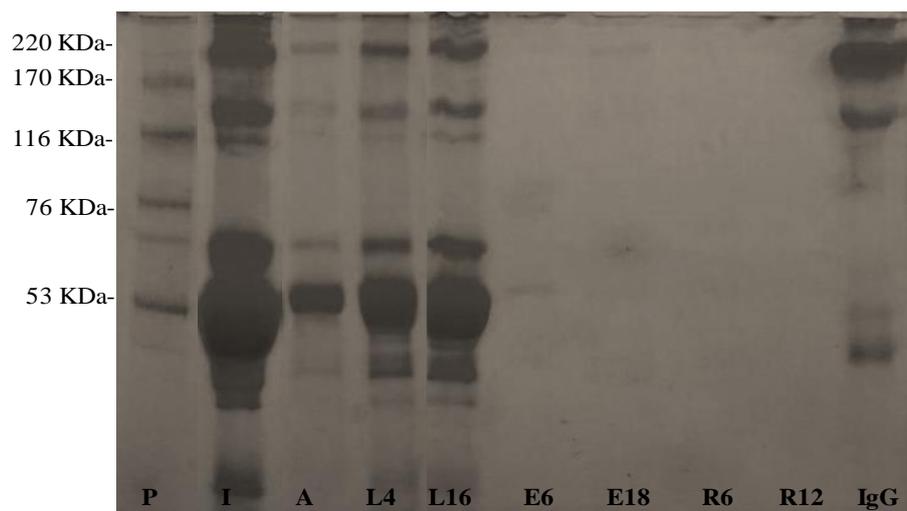
A Figura 30 apresenta as eletroforeses das amostras selecionadas nos ensaios cromatográficos realizados com a matriz MQA-CB com soro humano. A partir das amostras de adsorção pode-se observar, para todos os tampões estudados, a presença principal de HSA, indicando que esta proteína não apresentou tanta seletividade pela matriz cromatográfica MQA-CB, uma vez que é possível observar uma pequena

presença de HSA no perfil eletroforético da eluição. O tampão HEPES pH 6,8, o qual houve maior pico de retenção de proteínas, verifica-se uma predominância de adsorção de IgG, entretanto, também, foi adsorvido outras proteínas e HSA. Constata-se nesse pico, uma coeluição das proteínas IgG e HSA, o que pode estar associado ao modo de eluição utilizado, visto que no modo isocrático trabalha-se somente em uma condição fixa de concentração salina e/ou pH. O mesmo ocorreu com o tampão FOS pH 6,5.

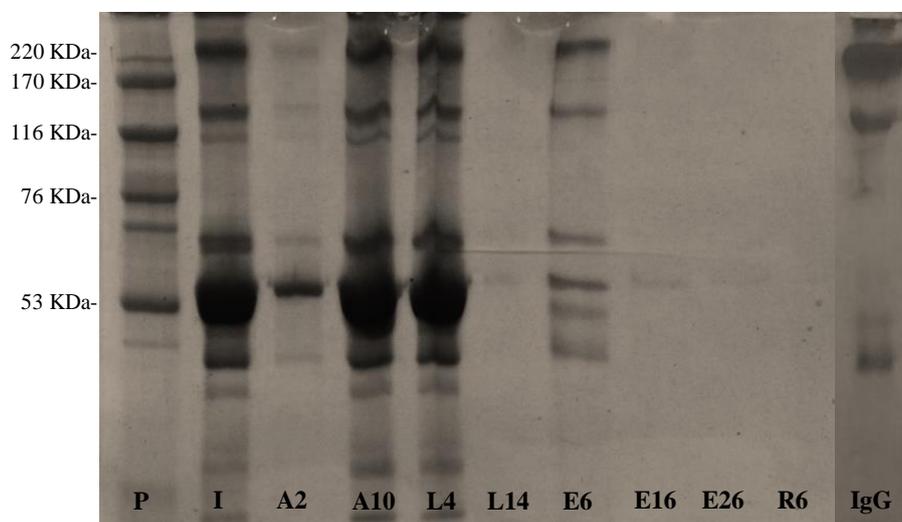
Já para o tampão Tris/HCl pH 7,2, os resultados da eletroforese (Figura 30b) corroboram com os resultados do ensaio da mistura HSA/IgG, onde a presença da proteína HSA diminuiu a adsorção de IgG, e com o soro humano, devido maior presença de HSA e de outras proteínas, pode ter ocasionado uma menor adsorção de IgG. Portanto, pode-se observar a forte influência do tipo e pH dos tampões na adsorção de IgG.

Figura 30 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz MQA-CB com o soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 6,5 (a); Tris/HCl 25mM pH 7,2 (b) e HEPES 25 mM pH 6,8 (c) em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G.





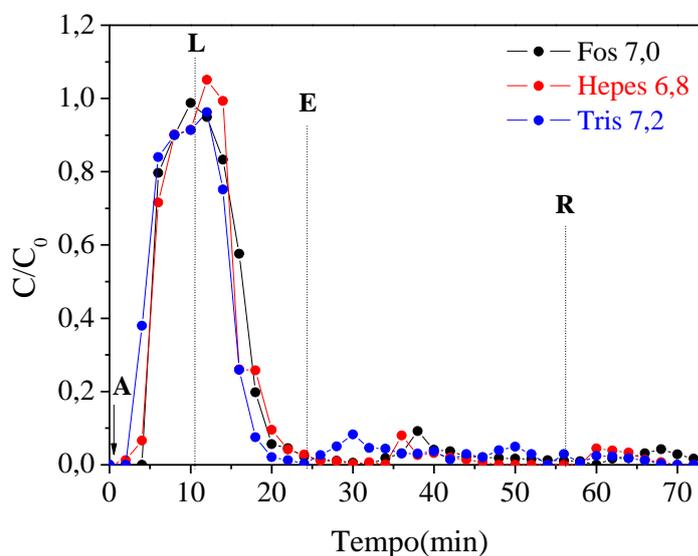
(c)



Fonte: elaborada pela autora.

A Figura 31 ilustra o perfil cromatográfico obtido para a amostra de soro humano utilizando a matriz MQA-RB. Nota-se que a matriz cromatográfica reteve baixas quantidades de proteínas para todos os tampões em estudo, entretanto apenas com as análises pela eletroforese poderá ser confirmada qual proteína foi retida em maior proporção. Vale salientar que os ligantes corantes são classificados de média afinidade.

Figura 31 - Perfis cromatográficos com soro humano (SH) diluído em diferentes tampões na concentração de 2 mg/mL a uma vazão de 0,5 mL/min utilizando a matriz MQA-RB. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: Tampão 50 mM + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R).



Fonte: elaborada pela autora.

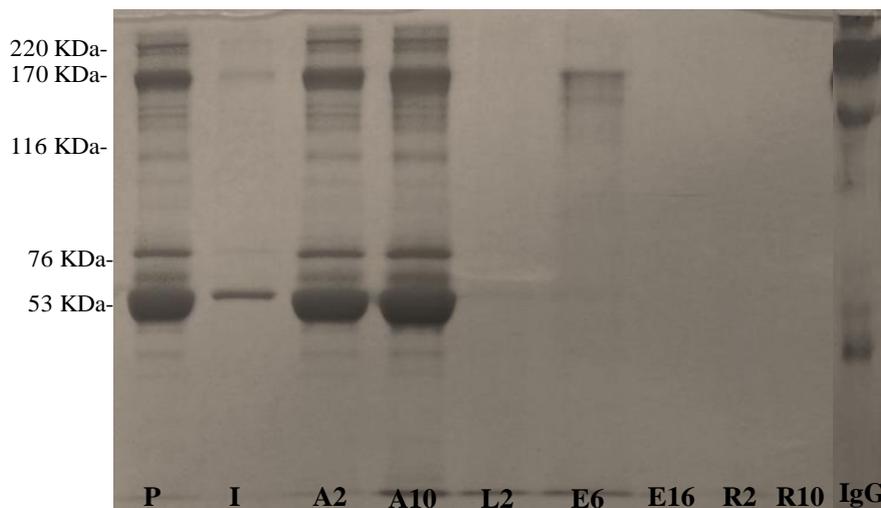
De acordo com as Figura 31 e Figura 32a, pode-se observar a presença de apenas um picos na etapa de eluição para o tampão FOS pH 7,0. Houve uma adsorção seletiva por domínios específicos da IgG, onde praticamente nada foi observado de impurezas (HSA). Logo, confirma-se que a matriz, no tampão em estudo, realmente apresentou considerável afinidade com a proteína IgG. Portanto, o corante RB atua como um ligante de média afinidade possibilitando uma forte interação entre o ligante e a proteína alvo e pode vir a ser utilizado como fase estacionária na purificação de IgG humana. Vale ressaltar que esse tampão e pH não foi o que obteve maior adsorção nos estudos em batelada.

Em relação às amostras da eluição para os ensaios com o MQA-RB com o tampão Tris/HCl pH 7,2 e o HEPES pH 6,8 (Figura 32b e c) foi possível observar que a IgG não foi a principal proteína adsorvida. Esses dados corroboram com o ensaio de adsorção da mistura IgG/HSA que foi demonstrado que a MQA-RB apresenta considerável interação por IgG e HSA. Gondim e colaboradores (2012) observaram, a partir de análises de eletroforeses, presença de certas impurezas, dentre elas a HSA, nas frações de eluição. Porém, as frações de eluição foram enriquecidas em termos do teor

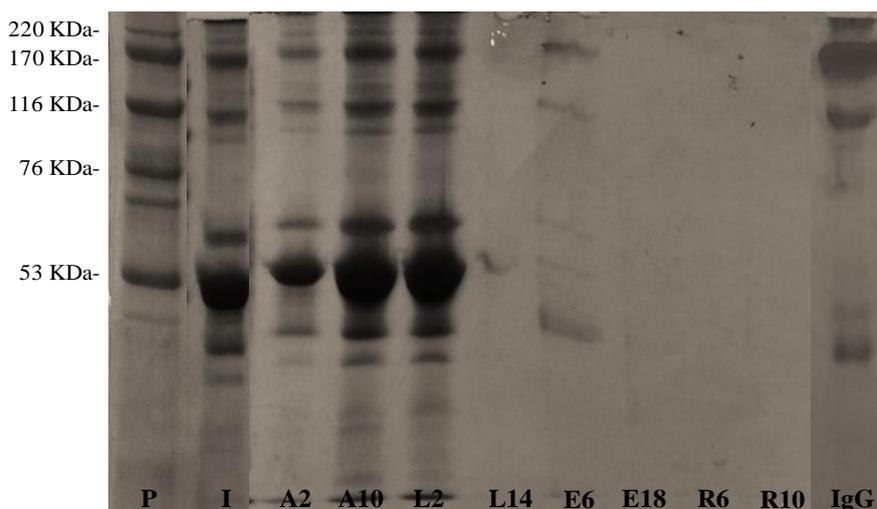
de IgG em comparação com as bandas de proteína apresentadas na injeção. Uma otimização no processo cromatográfico poderia melhorar a presença de impurezas.

Figura 32 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz MQA-RB com o soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,0 (a); Tris/HCl 25mM pH 7,2 (b) e HEPES 25 mM pH 6,8 (c) em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G.

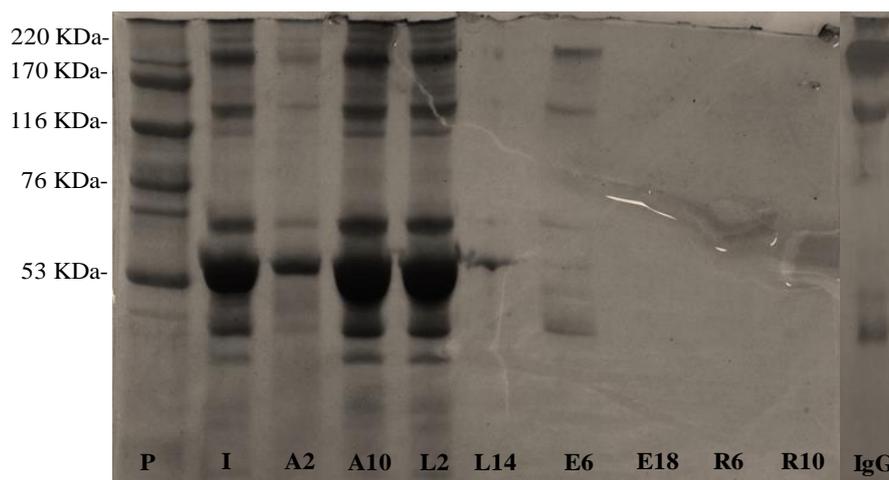
(a)



(b)



(c)

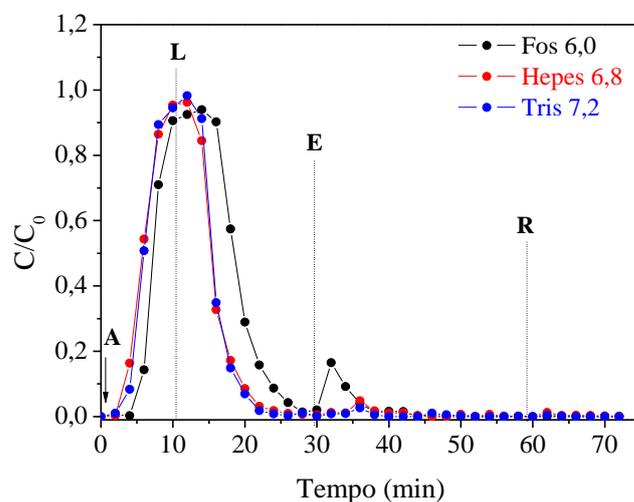


Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com Figura 33 pode-se verificar um elevado pico durante a etapa de lavagem, evidenciando as proteínas do soro que não foram adsorvidas nos três tampões estudados com a matriz MQA-RR. Nas etapas da eluição para os três trampões verificou-se quantidades de proteínas adsorvidas superiores para o FOS pH 6,0, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios em batelada. Para o ensaio com Tris/HCl pH 7,2 apenas 1,40% de massa injetada ficou retida na matriz MQA-RR. Esse resultado está bem abaixo do que o estudo realizado por Gondim (2017), onde foi conseguido utilizando o mesmo corante e o mesmo tampão de diluição para o soro humano, cerca de 4% de massa retida. Tal resultado pode ser efeito das condições do processo, tais como diluição, gradiente, volume do leito dentre outros parâmetros.

Analisando os resultados da eletroforese na Figura 34 foi possível observar que IgG foi a principal proteína adsorvida na matriz MQA-RR para todos os tampões em estudo. Praticamente nada foi retido de HSA ou outras proteínas nas amostras da eluição, mostrando que o MQA-RR apresentou considerável afinidade com a proteína IgG. Deste modo, o corante Reactive Red 120 atuou como um corante de média afinidade permitindo uma interação entre o corante e a proteína IgG, podendo vir a ser utilizado como fase estacionária na purificação de IgG humana.

Figura 33 - Perfis cromatográficos com soro humano (SH) diluído em diferentes tampões na concentração de 2 mg/mL a uma vazão de 0,5 mL/min utilizando a matriz MQA-RR. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: Tampão 50 mM + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A); Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R).



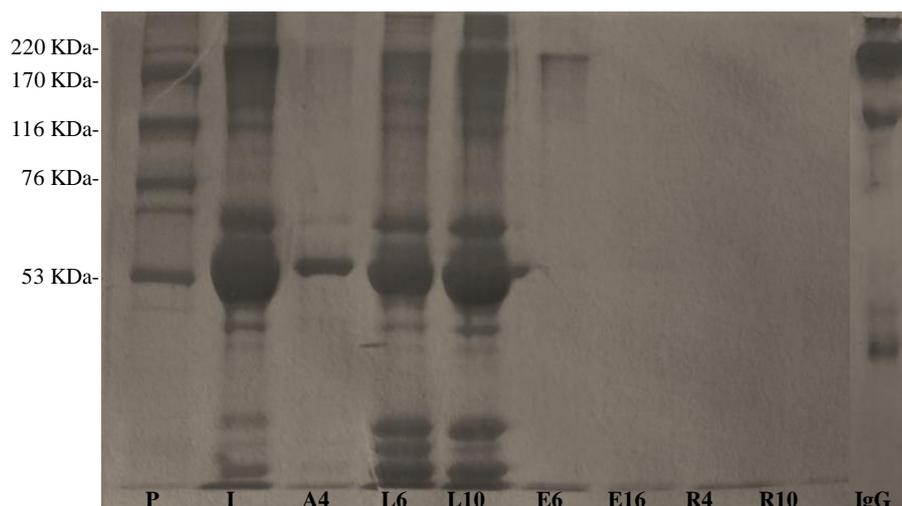
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 34 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz MQA-RR com o soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 6,0 (a); Tris/HCl 25mM pH 7,2 (b) e HEPES 25 mM pH 6,8 (c) em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G.

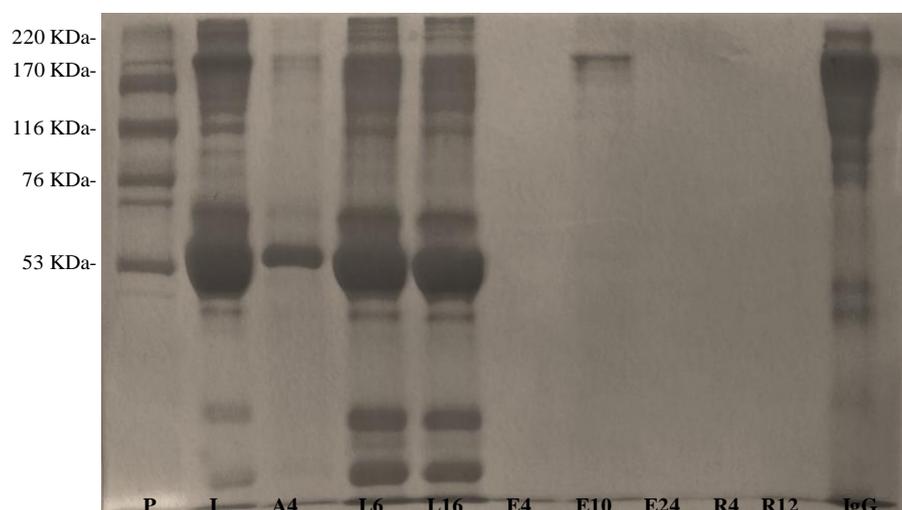
(a)



(b)



(c)



Fonte: elaborada pela autora.

4.2 Matriz Multimodal

4.2.1 Síntese e caracterizações das nanopartículas de SrHAp

As nanopartículas de hidroxiapatita de estrôncio foram concedidas pelo GQMat. A síntese e caracterização do material pode ser encontrada no estudo de Carvalho *et al.*, (2020). A SrHAp mostrou uma única fase cristalina: $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (sistema hexagonal), com característica das partículas em forma de bastão com comprimento médio de partícula de 105nm. O material mostrou uma isoterma de fisissorção obtida por análise de gás de adsorção/dessorção. O ciclo de histerese

associado do espécime SrHAp é classificado como Tipo IV e H1, onde as isotermas do tipo IV são dadas por adsorventes mesoporosos. A SrHAp possui uma área superficial específica de 33,07 m²/g, o volume mesoporoso de 0,18 cm³/g e o diâmetro médio dos poros de 558,5 Å. De acordo com os autores, o estudo apresentou um método simples e de baixo custo para a síntese de nanopartículas de SrHAp pura, com alta cristalinidade, morfologia definida e porosidade não homogênea.

Edwin e colaboradores (2019) comparou a porosidade de materiais à base de HAp. Em seu estudo, eles concluíram que as amostras ricas em cálcio eram predominantemente de natureza mesoporosa, enquanto as amostras ricas em estrôncio têm uma distribuição de poros mais ampla, apresentando uma combinação de mesoporosa e macroporosa. Esse tipo de material, com porosidade heterogênea, encontra variadas aplicações biomédicas e industriais.

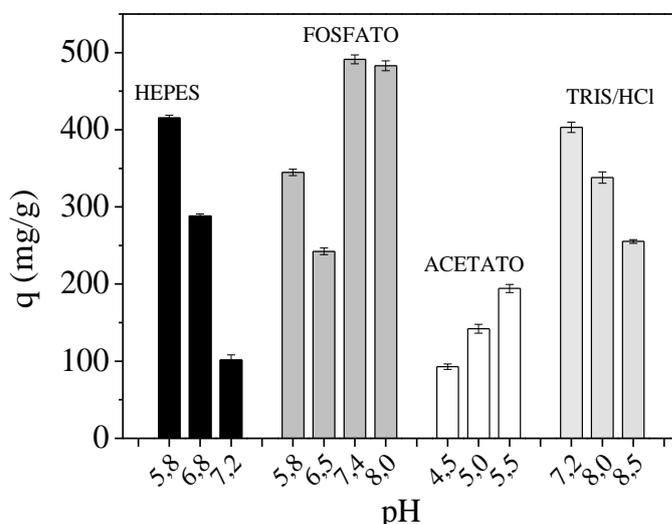
4.2.2 Ensaios em batelada

4.2.2.1 Efeito do pH e tampão

Os ensaios do estudo de pH e solução tampão para adsorção de IgG em SrHAp foram realizados em triplicata. Para valores de pH baixo a SrHAp não apresenta estabilidade podendo ocorrer sua solubilização. Como pode ser observado na Figura 35, no tampão acetato (pH 4,5 - 5,5) houve uma menor adsorção de IgG, o que pode estar relacionado a estabilidade da SrHAp frente a pH mais baixo.

Avaliando-se os tampões na mesma faixa de pH (Figura 35), pode-se observar a diferença de quantidade de IgG adsorvida, uma vez que para o tampão Hepes e Tris/HCl em pH 7,2 houve uma adsorção de 101,48 e 403,15 mg/g, respectivamente. Isso pode ser pelo fato do diferente comportamento das cargas da SrHAp nos tampões estudados, e assim interações/competição entre as proteínas adsorvidas dependendo das características do substrato são esperadas.

Figura 35 - Efeito da adsorção de IgG (1,0 mg/mL) com a variação do pH e tampões (10 mM) usando SrHAp. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h).



Fonte: elaborada pela autora.

Foi observada uma maior quantidade de IgG adsorvida no tampão FOS, com destaque para o pH 7,4 (491 mg/g de IgG). Essa elevada adsorção pode estar relacionado com as interações de superfície-proteína mais fracas, como também pode ser devido a diferentes frações das proteínas adsorvidas na matriz SrHAp e interações proteína-proteína nas superfícies (GAGNON *et al.*, 2009).

Existem basicamente dois tipos de adsorção entre HAp e moléculas de proteína, adsorção física fraca na superfície de HAp através de estrutura porosa e forte interação eletrostática entre HAp e proteína (DASGUPTA *et al.*, 2010). Mais importante, é relatado que HAp tem dois tipos diferentes de sítios de adsorção para ligação a proteínas, que são chamados de sítios C e P, respectivamente. Os sítios C (principalmente Ca^{2+}) com carga positiva se combinarão com grupos ácidos (principalmente $-\text{COO}^-$) das proteínas, enquanto os sítios P (principalmente PO_4^{3-} e OH^-) com carga negativa se combinarão com grupos básicos (principalmente NH_3^+) após a HAp serem imersas em solução tampão (GUO *et al.*, 2014). Devido a semelhança do estrôncio e do cálcio, esse mecanismo de interações pode ter ocorrido entre a IgG e a SrHAp ocasionando uma elevada adsorção da proteína.

Xu *et al.*, (2018) sintetizaram por via hidrotérmica hidroxiapatita substituída com estrôncio com quantidades de 1 a 20 mol%. Os autores avaliaram a aplicação das

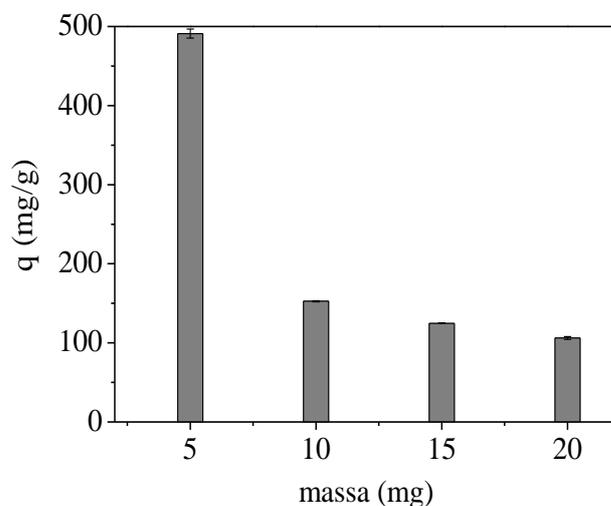
SrHAp para a adsorção de BSA e lisozima (LIS). Foi utilizado o tampão fosfato de sódio pH 7,4 (10 mM). Os testes de adsorção e liberação de proteínas indicaram que a incorporação de Sr na rede de HAp aumentou as quantidades de adsorção de BSA e LIS. A capacidade de adsorção de BSA na SrHAp foi de 55,52 mg/g, que foi cerca de 14,64% maior que a de HAp (sem a substituição com Sr). O SrHAp possuiu a maior quantidade de adsorção da LIS 90,54 mg/g, que foi cerca de três vezes maior que a HAp. As quantidades adsorvidas de IgG no presente estudo foram muito superiores aos resultados encontrado na literatura.

Portanto, o tampão FOS pH 7,4 (10 mM) foi usado nos ensaios subsequentes. Vale ressaltar que o pH 7,4 está dentro da faixa de pI da imunoglobulina G, condição em que as interações IgG-adsorventes são favorecidas. Além disso, o pH do plasma humano está entre 7,4 e 7,5.

4.2.2.2 Efeito da massa de adsorvente

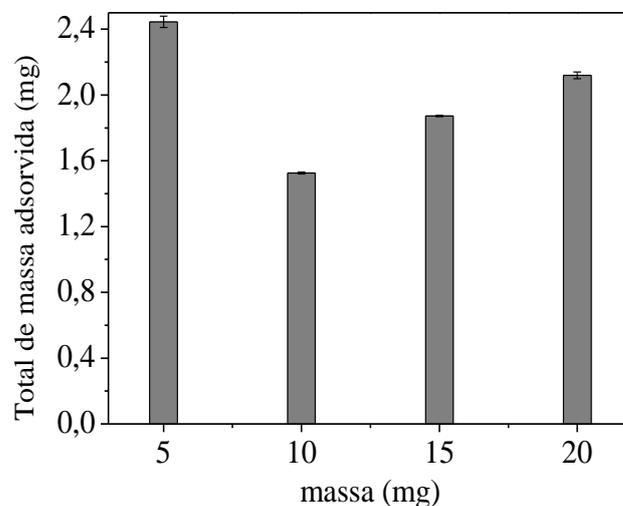
A fim de verificar a menor quantidade de adsorvente necessária para os ensaios de adsorção, os experimentos foram executados em quantidades variadas de SrHAp (5 a 20 mg). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 36 e Figura 37, mostram que o melhor resultado foi obtido com a massa de 5 mg de SrHAp (491 mg/g) com um total de massa total de IgG adsorvida de 2,44 mg. Portanto, a quantidade de 5 mg foi usada para os ensaios posteriores.

Figura 36 - Adsorção de IgG em SrHAp (FOS pH 7,4) sob influência de diferentes quantidade de massa de matriz multimodal. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h).



Fonte: elaborada pela autora

Figura 37 - Massa adsorvida de IgG em SrHAp (FOS pH 7,4) sob influência de diferentes massas de matriz multimodal. (concentração inicial de 1,0 mg/mL e tempo de contato de 3 h).



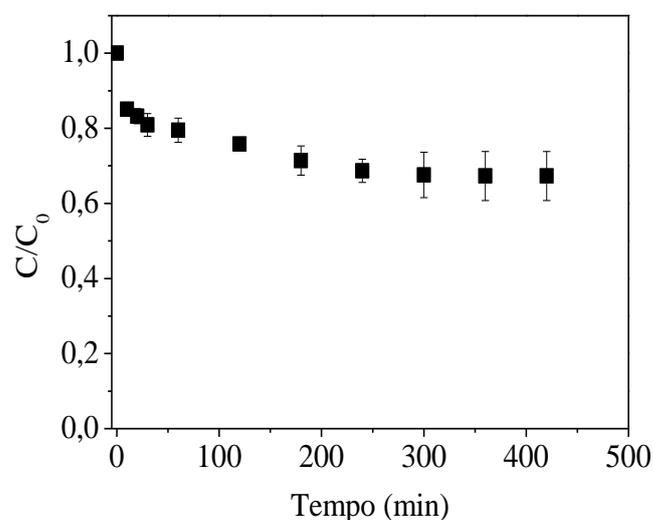
Fonte: elaborada pela autora.

4.2.2.3 Cinética e isoterma de adsorção

O tempo de contato é um parâmetro relevante no processo de adsorção. Os ensaios de cinética foram realizados na condição ótima de adsorção obtida nas etapas anteriores. Conforme mostrado na Figura 38, a quantidade de IgG adsorvida foi

aumentada com a extensão do tempo de contato até o tempo de equilíbrio de adsorção. Quase 33% da proteína podem ser adsorvidas na matriz SrHAp, finalmente atingindo o equilíbrio após 300 min de tempo de contato entre IgG. Uma vez definido o tempo de equilíbrio de 300 min, a isoterma de adsorção foi construída com soluções de IgG nas concentrações de 0,25 a 6,0 mg/mL, preparadas em tampão fosfato (10 mM, pH 7,4).

Figura 38 - Cinética de adsorção de IgG em SrHAp (FOS pH 7,4; concentração inicial de 1,0 mg/mL; massa de adsorvente 5 mg).



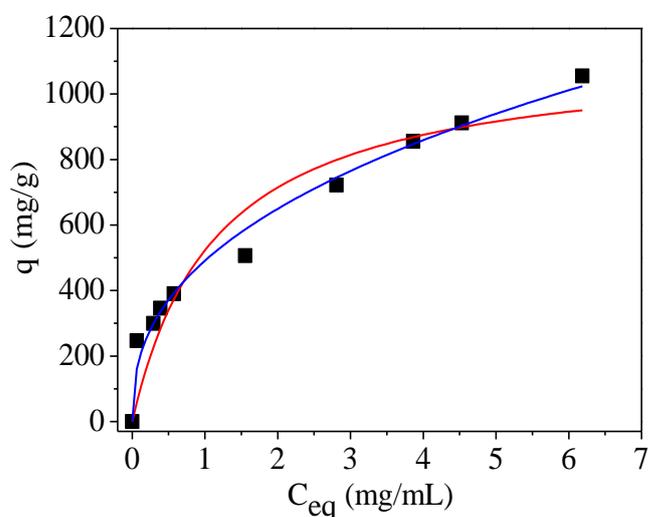
Fonte: elaborada pela autora.

A teoria clássica de Langmuir para adsorção de gás é frequentemente aplicada para tratar qualitativamente a adsorção de proteínas em solução. Esta aplicação pode ser inadequada para alguns casos de adsorção de proteínas devido à grande diferença entre as macromoléculas e os mecanismos de adsorção em interfaces. As diferenças resultam principalmente de (a) ligação de múltiplos sítios para proteínas, que geralmente resulta em adsorção irreversível, (b) natureza heterogênea da maioria das superfícies sólidas e (3) interações laterais e outras interações cooperativas (cooperatividade). Devido a essas possíveis presunções, foi realizado um ajuste do modelo de Langmuir-Freundlich para a isoterma de adsorção com IgG em SrHAp.

A Figura 39 ilustra o perfil da isoterma e o ajuste do modelo de Langmuir e Lagmuir-Freundlich. O perfil da isoterma revela que o material possui alta capacidade de adsorção, o que pode estar relacionado ao fato das interações entre a SrHAp e a

proteína ser de diferentes naturezas (troca iônica, afinidade e pontes de hidrogênio). O perfil obtido apresentou comportamento favorável, indicando que grandes quantidades adsorvidas podem ser obtidas com baixas concentrações de IgG na solução. Registra-se a capacidade máxima de adsorção, $q_m = 1128,63$ mg/g. Os parâmetros de isotermas medidos juntamente com R^2 estão listados na Tabela 8.

Figura 39 - Isotermas de adsorção com IgG (0,25, 0,75, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 6,0 mg/mL) em SrHAp usando o tampão FOS pH 7,4 (10 mM), massa de adsorvente 5 mg, tempo de adsorção de 300 min. Equações de ajustes de Langmuir (linha vermelha).



Fonte: elaborada pela autora.

Podemos observar que a equação de ajuste por Langmuir-Freundlich reproduziu satisfatoriamente os dados experimentais de isoterma de IgG na matriz SrHAp. Mavropoulos e colaboradores (2011) em estudo de adsorção de albumina do soro humano em HAp observaram que os resultados obtidos foram correspondentes a um processo de adsorção obedecendo a uma isoterma de Langmuir-Freundlich, ou a um mecanismo de adsorção em duas etapas, seguindo uma isoterma Langmuir-Freundlich para concentrações baixas e uma isoterma de Freundlich para concentrações altas de proteína. A existência de interações proteína-proteína e proteína composto tamponante podem explicar tais resultados, mas é fundamental observar a formação de multicamadas de proteína em ambos os casos.

Tabela 8 - Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF), para adsorção de IgG em SrHAp utilizando tampão FOS pH 7,4 (10 mM).

Parâmetros	SrHAp	
	L	LF
q_m (mg/g)	$1128,63 \pm 24,12$	$2393,47 \pm 42,61$
k_D (mg/mL)	$7,73 \times 10^{-6} \pm 0,40$	-
k_{LF} (mg/mL)	-	$2,35 \pm 0,002$
n	-	$0,40 \pm 0,14$
R^2	0,91	0,98

Fonte: elaborada pela autora.

Segundo Gagnon e colaboradores (2009), a proximidade dos grupos de cálcio e fosfato da HAp destaca o potencial de cooperatividade entre as interações da HAp. Isso complica ainda mais a interpretação ao criar isotermas de adsorção não lineares que desafiam modelos baseados em mecanismos de adsorção mais simples. A cooperatividade é descrita como positiva nos casos em que as interações multimodais produzem ligações progressivamente mais fortes e negativas nos casos em que as interações diminuem a retenção líquida.

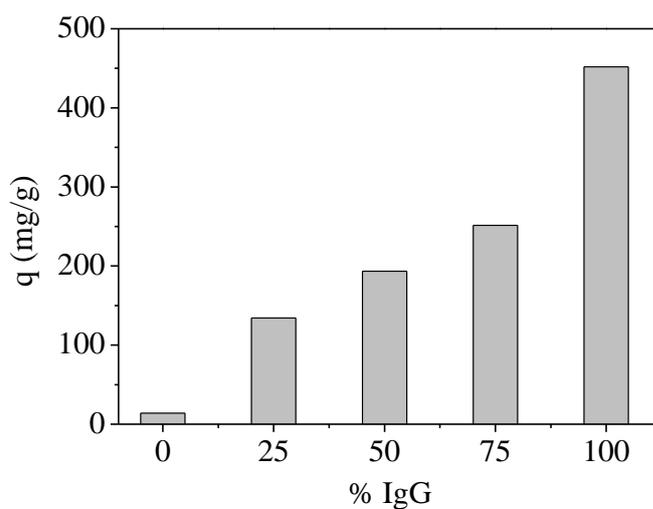
4.2.2.3 Ensaio de adsorção com mistura IgG/HSA

Analisando os resultados da Figura 40, observa-se que as nanopartículas de SrHAp apresentaram maior seletividade para IgG, uma vez que a adsorção foi quase inexistente quando uma solução monocomponente de HSA foi utilizada e, à medida que a concentração de IgG foi aumentada, a quantidade total de proteína adsorvida aumentou consideravelmente.

Segundo Andrade e colaboradores (1992) a adsorção de proteínas não depende apenas das propriedades da estrutura dos adsorventes, mas também, das propriedades das proteínas. Na literatura relata-se que as proteínas podem ser classificadas em moles (“soft”) e duras (“hard”) de acordo com seu tamanho, composição e estabilidade de sua estrutura. Proteínas com tamanhos intermediários, como as proteínas do plasma, Albumina, Transferrina, Imunoglobulinas, e outras, são chamadas de proteínas moles e frequentemente são capazes de sofrer reorientações

conformacionais após o contato superficial. Como uma simplificação, a estrutura complexa pode ser decomposta em domínios individuais que exibem propriedades específicas como: hidrofílico/hidrofóbico, polar/não polar, ou carregado/não carregado (ANDRADE *et al.*, 1992; GONDIM, 2017).

Figura 40 - Adsorção em batelada da mistura IgG e HSA utilizando nanopartículas de SrHAp (massa = 5 mg, tempo de contato 5 h, FOS pH 7,4; concentração da solução = 1,0 mg/mL).

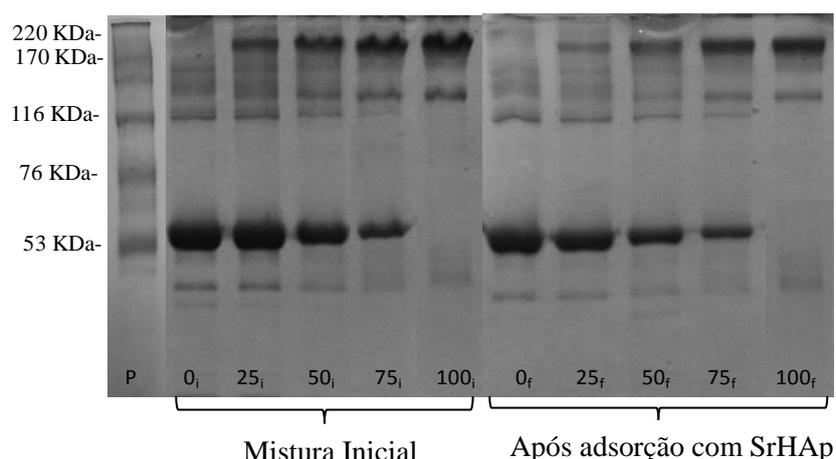


Fonte: elaborada pela autora.

Em relação à adsorção de IgG e HSA em SrHAp pode se confirmar a aparente seletividade de IgG frente a HSA nessas condições de estudo. Sabe-se que as proteínas são bastante influenciadas pela alteração de pH, pois pode provocar alterações de cargas na superfície e desta forma colaborar ou não com a interação entre as cargas opostas da superfície dos adsorventes. Observou-se que tanto HSA como a SrHAp apresentaram cargas superficiais negativas, sendo esta a principal justificativa para a baixa quantidade adsorvida dessa proteína. Além disso, HSA está sendo adsorvida em valores de pH bem superiores ao pH correspondente ao seu pI (pH 4,8). Nessa condição de estudo a proteína IgG está no limite do seu pI, com carga líquida não definida, pois devido as subclasses da IgG há a possibilidade de IgG carregada (positivamente ou negativamente) ou até mesmo neutra, enquanto que a SrHAp está carregada negativamente. Estas justificativas apresentadas foram os principais argumentos para justificar a elevada adsorção de IgG, com valores próximos a 452 mg/g, em SrHAp.

Na Figura 41 são apresentados os géis de eletroforese, nos quais foram utilizadas as seguintes identificações: marcador de peso molecular (P); amostra inicial do teste com n% IgG (i) e amostra final do teste com n% IgG (f). Por sua análise, é possível verificar que a matriz SrHAp apresentou seletividade à IgG, uma vez que a diminuição da intensidade das bandas de IgG nas amostras finais é relativamente superior à diminuição verificada nas bandas relacionadas à HSA. Em estudo, Os estudo relatados por Wensel *et al.*, (2008) e Gagnon *et al.*, (2009), relataram cerca de 20 anticorpos monoclonais IgG, demonstraram que a IgG é retida predominantemente por uma combinação de afinidade de cálcio-metal e troca de cátions fosforil, independentemente da subclasse, tipo de cadeia leve ou pI.

Figura 41 - Géis de eletroforese da adsorção em batelada da mistura de IgG e HSA (1 mg/mL) empregando SrHAp com diferentes proporções de IgG (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) (Massa de adsorvente = 5 mg, Duração = 5 h, tampão FOS pH 7,4).



Fonte: elaborada pela autora.

4.2.3 Ensaio em leito fixo

Diante dos resultados discutidos em batelada para a matriz multimodal SrHAp, foi possível afirmar que o material apresenta considerável interação por afinidade por IgG de alta pureza. Entretanto, para se confirmar o potencial desse adsorvente na purificação de IgG humana, novos ensaios, em sistema cromatográfico, foram necessários ser realizados.

Inicialmente, foram realizados ensaios cromatográficos variando a força iônica, tanto para a etapa de alimentação como para a etapa de eluição. Esses ensaios foram conduzidos com IgG de alta pureza diluída no tampão FOS com 10 mM, 25 mM e 50 mM, em pH 7,4. Foi conseguido um melhor resultado quando foi realizado uma corrida com as condições: tampão FOS 25 mM pH 7,4 para etapa de alimentação e tampão FOS 50 mM pH 7,4 + NaCl 1M para a etapa de eluição.

Com a otimização do processo, foi realizado ensaios com IgG e HSA de alta pureza e a mistura binária IgG/HSA. O volume de injeção foi de 10,0 mL com concentração de proteínas de 1,0 mg/mL. Em todos os ensaios foram realizados balanços de massa, bem como a quantificação de proteínas para as etapas de alimentação, lavagem, eluição e regeneração.

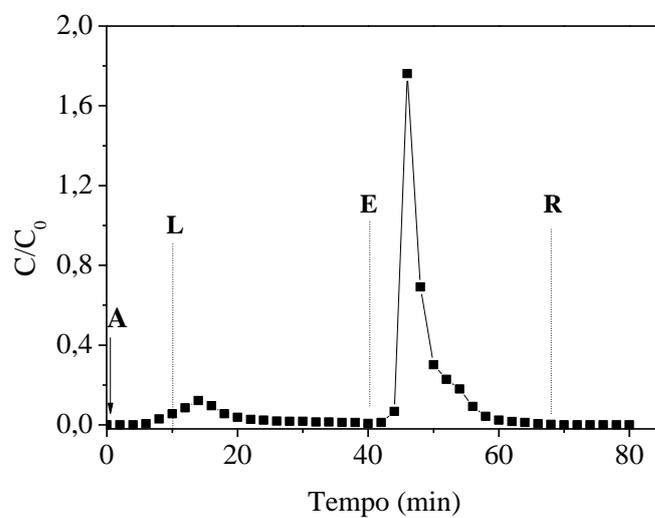
De acordo com a Figura 42a pode-se verificar um pequeno pico durante a etapa de lavagem, evidenciando a proteína IgG que não foi adsorvida na matriz SrHAp. Na etapa da eluição verificou-se quantidade elevada de IgG adsorvida, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios em batelada. Portanto, observou-se nitidamente considerável afinidade da matriz pela biomolécula IgG, devido ao baixo nível do pico 1 (etapa da adsorção) indicando que a maior quantidade de IgG foi adsorvida na fase estacionária. A quantidade de IgG adsorvida foi de 68,79% o que deu uma massa de 7,39 mg de IgG adsorvida. Do contrário, na Figura 42b, observa-se um pico elevado na etapa da adsorção indicando que a menor quantidade de HSA foi adsorvida na fase estacionária. O pequeno pico de eluição confirma que o SrHAp não apresentou afinidade por HSA.

As Figura 42c e Figura 43 ilustram o perfil cromatográfico obtido para a amostra da mistura binária IgG/HSA e o ensaio de eletroforese, respectivamente. Em ambas as Figuras pode-se verificar que no pico 02, correspondente a etapa de eluição, não houve uma separação das proteínas IgG e HSA. Contudo, observou-se nitidamente uma considerável afinidade da matriz pela biomolécula IgG, visto que, na eletroforese a proteína foi a de maior adsorção e somente uma pequena presença de HSA foi retida na matriz SrHAp. Uma quantidade total de proteínas adsorvidas na matriz SrHAp foi de 5,52 mg, o que representa 55,52% total da massa injetada. Se, com a IgG de alta pureza a matriz reteve 7,39 mg e com a HSA apenas 0,142 mg totais de proteínas adsorvidas na SrHAp, pode concluir que, na mistura binária, praticamente, quase toda essa massa retida é de IgG de alta pureza, e que essa presença de HSA é de apenas pequenos traços.

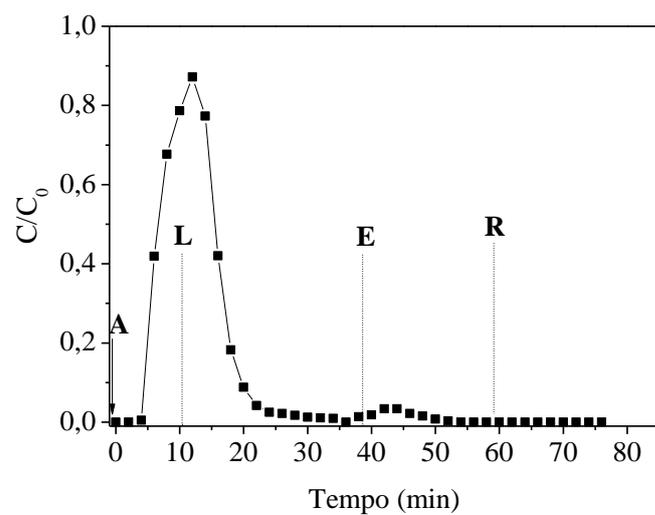
Esse resultado é favorável para a utilização de soro humano na matriz SrHAp, corroborando com as observações realizadas anteriormente nos ensaios em batelada.

Figura 42 - Perfis cromatográficos com IgG (a), HSA (b) de alta pureza e a mistura binária IgG/HSA diluídos no tampão FOS 25 mM pH 7,4, concentração de 1 mg/mL a uma vazão de 0,8 mL/min utilizando a matriz SrHAp. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: FOS 50 mM pH 7,4 + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R).

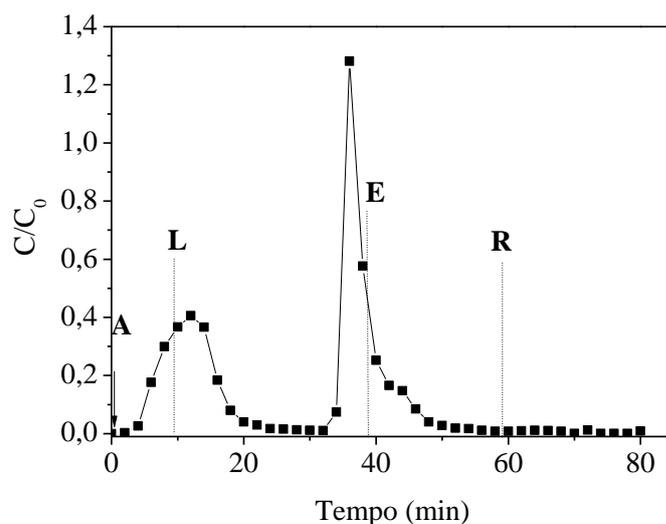
(a)



(b)

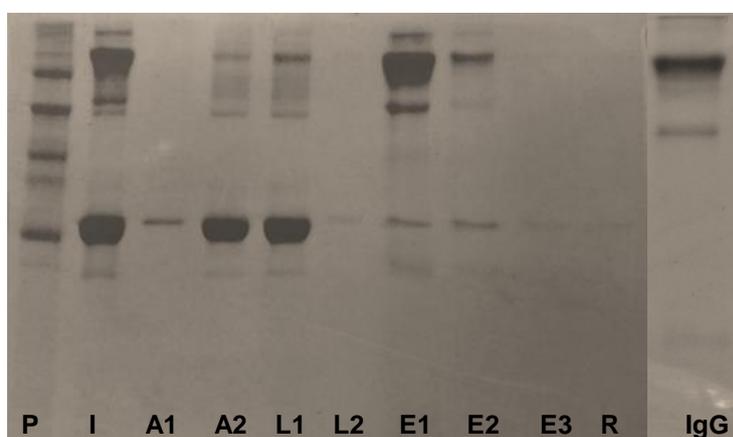


(c)



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 43 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz SrHAp com a mistura IgG/HSA diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,4 em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G.



Fonte: elaborada pela autora.

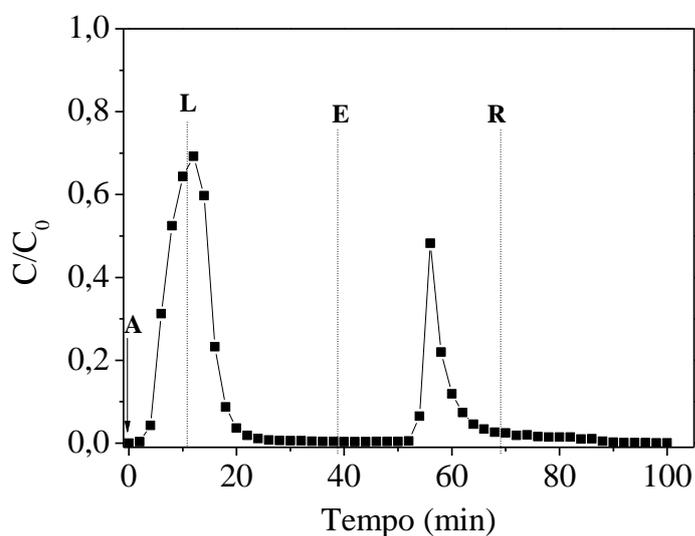
Segundo Xu *et al.*, (2018) a modificação por Sr na HAp, leva os sítios de adsorção mais ativos de SrHAp serem expostos e a capacidade de SrHAp de adsorver moléculas de proteína melhora efetivamente devido à adsorção física. Existem principalmente dois tipos de adsorção entre HAp e moléculas de proteína, adsorção física fraca na superfície de HAp através de estrutura porosa e forte interação

eletrostática entre HAp e proteína (DASGUPTA *et al.*, 2010). E, devido o tamanho da SrHAp ser menor que o da HAp, mais estruturas de rede e poros acumulados são formados entre as partículas. Portanto, sítios de adsorção mais ativos de SrHAp são expostos e a capacidade de SrHAp de adsorver moléculas de proteína melhora efetivamente devido à adsorção física.

A Figura 44 apresenta os perfis cromatográficos dos ensaios cromatográficos com amostras de soro humano diluído em FOS (pH 7,4). O propósito desses experimentos foi avaliar o desempenho da fase estacionária na adsorção de IgG humana. Para esse ensaio, o volume de injeção definido foi de 10 mL, volume necessário para atingir a saturação do leito cromatográfico. As amostras injetadas na coluna com o soro humano foram diluídas no tampão de adsorção proporcionando amostras com concentrações em torno de 3,0-4,0 mg/mL. Notou-se que a matriz cromatográfica reteve considerável quantidade de proteínas, com 7,19 mg de proteína retida, o que representou 23,10% do total de massa injetada que foram retidas na matriz SrHAp. Essa quantidade de massa de proteína retida foi bem mais alta ao se comparar com as matrizes de pseudoafinidade. Como já mencionado, a SrHAp por ter diferentes mecanismos de interações com a proteína, pode-se ter resultado nessa quantidade adsorvida.

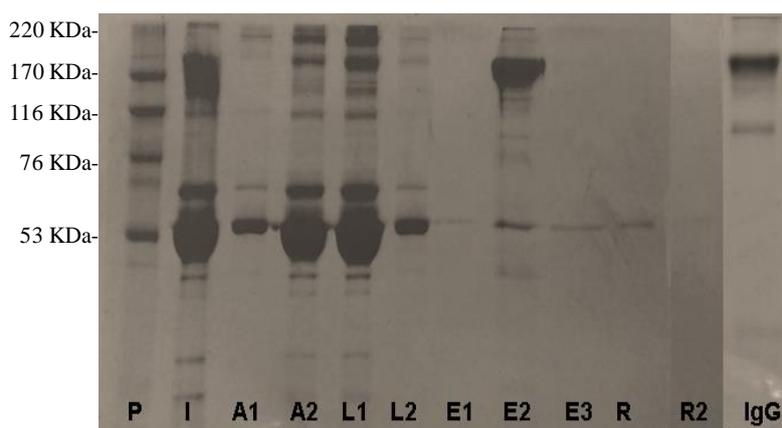
O resultado de eletroforese para o soro humano (Figura 45), como já previsto pelo ensaio com a mistura binária, ocorreu significativa afinidade por IgG e uma pequena quantidade retida de HSA. Como a matriz SrHAp apresenta diferentes tipos de interações, talvez o ideal seja realizar a eluição no modo gradiente, como realizado por alguns autores para matriz multimodal (BHAMBURE *et al.*, 2013). Contudo, como o soro humano é constituído por outras proteínas e não adsorção por estas, e que com um gradiente no modo isocrático pode-se, possivelmente, ocorrer a separação das proteínas, o que poderá confirmar o potencial uso dessa fase estacionária para purificação de IgG humana.

Figura 44 - Perfis cromatográficos com soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,4, concentração de 3 mg/mL a uma vazão de 0,8 mL/min utilizando a matriz SrHAp. Condições operacionais: Adsorção: Tampão em 25 mM; Eluição: FOS 50 mM pH 7,4 + NaCl 1 M. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R).



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 45 - Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos em matriz SrHAp com soro humano diluído em tampão FOS 25 mM pH 7,4 em géis de acrilamida na concentração de 7,5%. Pontos coletados: **P**: Padrão de alto peso molecular; **A**: amostra de soro humano; **I**: Adsorção; **L**: Lavagem; **E**: Eluição; **R**: Regeneração; **IgG**: Imunoglobulina do tipo G.



Fonte: elaborada pela autora.

Esses ensaios cromatográficos confirmaram o potencial de adsorção de IgG pelas fases estacionárias estudadas onde as matrizes cromatográficas com hidroxiapatita

modificada por estrôncio podem ser usadas como potencial uso para purificação de IgG. E as matrizes de quitosana-alginato imobilizado com corante são mais indicados para uma etapa de pré-purificação da IgG humana, visto que, em muitas vezes alguns processos industriais utilizam mais de uma etapa para purificação das proteínas as matrizes.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados verificou-se que, foi conseguido uma otimização da síntese de quitosana-alginato imobilizado com corantes, onde foi possível formar um material esférico e rígido. O uso dessas matrizes de pseudoafinidade, proporcionaram uma elevada quantidade adsorvida de IgG, mesmo não sendo realizada em condições otimizadas. E a inserção dos corantes ligantes favoreceram a adsorção de IgG. Nos processos cromatográficos, as matrizes MQA-CB e MQA-RB apresentaram baixa retenção de proteína na fase estacionária, sendo indicado o seu uso para etapas de pré-purificação da IgG humana. Em contrapartida, com a matriz de MQA-RR foi conseguido uma purificação de IgG.

A matriz multimodal, hidroxiapatita de estrôncio, apresentou elevada capacidade de adsorção de IgG nos ensaios em batelada. Nos ensaios cromatográficos a matriz proporcionou elevada adsorção por IgG, apresentando-se como potencial uso para purificação de IgG a partir do soro humano.

As condições encontradas no presente trabalho se mostraram eficientes na separação e/ou purificação da IgG a partir do soro humano. No entanto, na eluição é necessária uma investigação mais abrangente de parâmetros como pH, força iônica e uso de gradientes de pH e salino para se conseguir separar agregados e outras proteínas do meio.

REFERÊNCIAS

- ACET, Ö.; BARAN, T.; ERDÖNMEZ, D.; AKSOY, H. N.; ALACABEY, I.; MENTES, A.; ODABAS, M. O-Carboxymethyl Chitosan Schiff Base Complexes as Affinity Ligands for Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography of Lysozyme. **Journal of Chromatography A**, v. 1550, n. 18, p. 21-27, 2018.
- AINA, V., LUSVARDI, G., ANNAZ, B., GIBSON, I.R., IMRIE, F.E., MALAVASI, G.; MENABUE, L.; CERRATO, G.; MARTRA, G. Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, p. 2867–2879, 2012.
- AL-WAFI, R.; JAFER, R.; YAHIA, I.S.; AL-GHAMDI, A.A.; AL-GHAMDI, M.A.; EL-NAGGAR, A.M. Fast and easy synthesis of novel Strontium apatite nanostructured phase: structure, spectroscopy, and dielectric analysis. **Ceramics International**, v. 43, p. 17153–17159, 2017.
- ANDRADE NETO, D.M.; CARVALHO, E.V.; RODRIGUES, E.A.; FEITOSA, V.P.; SAURO, S.; MELE, G.; CARBONE, L.; MAZZETTO, S.E.; RODRIGUES, L.K.; FECHINE, P.B.A. Novel hydroxyapatite nanorods improve anti-caries efficacy of enamel infiltrants. **Dental Materials**, v. 32, p. 784–793, 2016.
- ANDRADE, J. D.; HLADY, V.; WEI, A. P. Adsorption of complex proteins at interfaces. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1777-1781. 1992.
- ARONOV, D.; ROSEN, R.; RON, E. Z.; ROSENMAN, G. Tunable hydroxyapatite wettability: effect on adhesion of biological molecules. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2367–2372, 2006.
- AYYAR, B. V.; ARORA, S.; MURPHY, C.; O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. **Methods**, v. 56, n. 2, p. 116-29, 2012.
- BERNARDI, G. Chromatography of proteins on hydroxyapatite. **Methods Enzymol**, v. 22, p. 325–342. 1971.
- BHAMBURE, R.; GUPTA, D.; RATHORE, A. S. A novel multimodal chromatography based single step purification process for efficient manufacturing of an E. coli based biotherapeutic protein product. **Journal of Chromatography A**, v. 1314, p. 188-198, 2013.
- BILAL, M; RASHEED, T.; IQBAL, H. M. N.; LI, C.; HU, H.; ZHANG, X. Development of silver nanoparticles loaded chitosan-alginate constructs with biomedical potentialities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, part 1, p.393-400, 2017.

BIO RAD. **CHT Ceramic Hydroxyapatite Type I Support**. Disponível em: <<https://www.bio-rad.com/pt-br/product/cht-ceramic-hydroxyapatite-type-i-support?ID=34cbb522-888f-43c7-aaf5-a61cfada935e>>. Acesso em: 2 agosto 2022.

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

BRESOLIN, I. T. L.; DE SOUZA, M. C. M.; BUENO, S. M. A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto β -aminodecyl-agarose. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 23, p. 2087–2093, 2010.

BURNOUF, T. Plasma fractionation in the world: current status. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 14, n. 1, p. 41-50, 2007.

CARVALHO, E. V.; DE PAULA, D. M.; ANDRADE NETO, D. M.; COSTA, L. S.; DIAS, D. F.; FEITOSA, V.P.; FECHINE, P. B. A. Radiopacity and mechanical properties of dental adhesives with strontium hydroxyapatite nanofillers. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 101, p. 1-10, 2020.

CARVALHO, E. V. **Apatitas nanoparticuladas incorporadas a matrizes poliméricas para aplicação odontológica**. 2017. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

COSTA, A.C.F.M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4.3, p. 29-38, 2009.

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

COX, S. C.; JAMSHIDI, P.; GROVER, L. M.; MALLICK, K K. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 35, p. 106 -114, 2014.

CUMMINGS, L. J.; SNYDER, M. A.; BRISACK K. Chapter 24 Protein Chromatography on Hydroxyapatite Columns. **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 387-404, 2009.

CUMMINGS, L. J.; FROST, R. G.; SNYDER, M. A. Monoclonal antibody purification by ceramic hydroxyapatite chromatography. **Monoclonal Antibodies**, v. 1131, p. 241–251, 2014.

DASGUPTA, S.; BANERJEE, S. S.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S.. Zn- and Mg- doped hydroxyapatite nanoparticles for controlled release of protein. **Langmuir**, v. 26, p. 4958-4964, 2010.

DAHMAN, Y.; JAYASURIYA, K. E. Preliminary study of binary protein adsorption system and potential bioseparation under homogeneous field of shear in airlift biocontactor. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 710-718, 2013.

DAOUD-ATTIEH, M.; CHAIB, H.; ARMUTCU, C.; UZUN, L.; ELKAK, A.; DENIZLI, A. Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels, **Separation and Purification Technology**. v. 118, p. 816–822, 2013.

DASH, M.; CHIELLINE, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINE, E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DENIZLI, A.; PIŞKIN, E. Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49. p. 391–416, 2001.

DIAS, FRANCISCO S; NASCIMENTO, RONALDO F. ; LIMA, M. B. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 160–163, 2008.

DOGAN, A.; ÖZKARA, S.; SARI, M.M.; UZUN, L.; DENIZLI, A. Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system. **Journal of Chromatography B**, v. 894, p. 69–76, 2012.

DORAN, P. M. Unit operations. **Bioprocess engineering principles**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2013.

DOU, Y. F.; ZHANG, LIU, H.; XIA, Y. P.; ZHI, G, Y. Polyethyleneimine grafting and Cibacron Blue F3GA modifying poly(methylmethacrylate) magnetic microspheres for protein adsorption. **Journal Chem Technol Biotechnol**, v. 93: p. 994–1002, 2018.

DU, Q. Y.; LIN, D. Q.; ZHANG, Q. L.; YAO, S. J. An integrated expanded bed adsorption process for lactoferrin and immunoglobulin G purification from crude sweet whey. **Journal of Chromatography B**, v. 947 – 948, p. 201-207, 2014.

EDWIN, N.; WILSON, P. Investigations on sonofragmentation of hydroxyapatite crystals as a function of strontium incorporation. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v 50, p. 188–199, 2019.

ESFAHANI, H.; PRABHAKARAN, M. P.; SALAHI, E.; TAYEBIFARD, A.; KEYANPOUR-RAD, M.; RAHIMIPOUR, M. R.; RAMAKRISHNA, S. Protein adsorption on electrospun zinc doped hydroxyapatite containing nylon 6 membrane: Kinetics and isotherm. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 443, p. 143-152, 2015.

EHRET, C.; AID-LAUNAI, R.; SAGARDOY, T.; SIADOUS, R.; BAREILLE, R.; REY, S.; PECHEV, S.; ETIENNE, L.; KALISKY, J.; MONES, E.; LETOUMEUR, D.; VILAMITJANA, J. A. Strontium-doped hydroxyapatite polysaccharide materials effect on ectopic bone formation. **PLoS One** v. 12, . 2017.

FERRARIS, M. P.; BARRERA, G. I.; PADILLA, A. P.; RODRÍGUEZ, J. A. Affinity adsorption of lysozyme on a macroligand prepared with Cibacron Blue F3GA attached to yeast cells. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2741–2745, 2011.

FIHRI, A.; LEN, C.; VARNA, R. S.; SOLHY, A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 347, p. 48–76, 2017.

FRASNELLI, M.; CRISTOFARO, F.; SGLAVO, V.M.; DIRÈ, S.; CALLONE, E.; CECCATO, R.; BRUNI, G.; CORNAGLIA, A. I.; VISAI, L. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 653–662, 2017.

GAGNON, P.; CHEUNG, C.W.; YAZAKI, PAUL J. Cooperative multimodal retention of IgG, fragments, and aggregates on hydroxyapatite. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 22, p. 3857–3865. 2009.

GAGNON P.; BEAM K. Antibody aggregate removal by hydroxyapatite chromatography. **Current Pharmaceutic. Biotechnology**. v. 10, p. 440–446, 2009.

GAO, D.; WANG, L. L.; LIN, D. Q.; YAO, S. J. Evaluating antibody monomer separation from associated aggregates using mixed-mode chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1294, p. 70 - 75, 2013.

GONDIM, D. R.; LIMA, L. P.; DE SOUZA, M. C. M.; BRESOLIN, I. T. L.; ADRIANO, W. S.; AZEVEDO, D. C. S.; SILVA, I. J. JR, Dye Ligand Epoxide Chitosan/Alginate: A Potential New Stationary Phase for Human IgG Purification. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 8-9, p. 701–711, 2012.

GONDIM, D. R.; DIAS, N. A.; BRESOLIN, I. T. L.; BAPTISTIOLLI, A. M.; AZEVEDO, D. C. S.; SILVA, I. J. JR. Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: Influence of buffer system. **Adsorption**, v. 20, n. 8, p. 925–934, 2014.

GONDIM, D. R. **Seleção de materiais com potencial aplicação na purificação de IgG humana**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GHOSH, R.; SARKAR, R. Synthesis and characterization of sintered hydroxyapatite: a comparative study on the effect of preparation route. **Journal of the Australian Ceramic Society**, v. 54, p. 71–80, 2017.

GREEN, N. Sustainable production of plasma proteins, **Pharma's Almanac Q3**. p.78–80, 2019.

GUO, Y.; SHI, X.; FANG, Q.; ZHANG, J.; FANG, H.; JIA, W.; YANG, G.; YANG, L. Facile preparation of hydroxyapatite–chondroitin sulfate hybrid mesoporous microrods for controlled and sustained release of antitumor drugs. **Materials Letters**, v. 125, p. 111-115, 2014.

HANKE, A. T.; OTTENS, M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 210 - 220, 2014

HEMOBRÁS. Uma empresa do Sistema Único de Saúde (SUS). CEBES, **Divulgação em saúde para debate - DSD**, 2013. Disponível em: <<http://cebes.org.br/publicacao/revista-divulgacao-50-hemobras-uma-empresa-do-sus/>>. Acesso em: 14 agosto 2022.

HORI, S.; HIRANO, M.; OHTA, R. Electrodeposition of strontium apatite nanorod arrays and their cell compatibility. **Ceramics International**, v. 43, p. 9047–9052, 2017

HONARY, S.; MALEKI, M.; KARAMI, M. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate / chitosan microparticles containing prednisolone. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 53–61, 2009.

HUANG, Y., HAO, M., NIAN, X., QIAO, H., ZHANG, X., ZHANG, X., SONG, G.; GUI, J.; PANG, X.; ZHANG, H. Strontium and copper co-substituted hydroxyapatite-based coatings with improved antibacterial activity and cytocompatibility fabricated by electrodeposition. **Ceramics. International**. v. 42, p. 11876–11888, 2016.

IBRAHIM, H. K.; SOROUR, R. M. H.; AD-DIN, I.S. Application of mathematical modelling to alginate chitosan polyelectrolyte complexes for the prediction of system behavior with Venlafaxine HCl as a model charged drug. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2022.

ITOH, D.; YOSHIMOTO, N.; YAMAMOTO, S. Retention Mechanism of Proteins in Hydroxyapatite Chromatography – Multimodal Interaction Based Protein Separations: A Model Study. **Current Protein and Peptide Science**, v. 20, p. 75-81, 2019,

JOUDI, M.; NASSERLAH, H.; HAFDI, H.; MOULDAR, J.; HATIMI, B.; EL-MHAMMEDI, M. A.; BAKASSE, M. Synthesis of an efficient hydroxyapatite–chitosan montmorillonite thin film for the adsorption of anionic and cationic dyes: adsorption isotherm, kinetic and thermodynamic study. **Springer Nature Journal**, v. 1078, 2020.

KANDORI, K.; HAMAZAKI, H.; MATSUZAWA, M.; TOGASHI, S. Selective adsorption of acidic protein of bovine serum albumin onto sheet-like calcium hydroxyapatite particles produced by microreactor. **Advanced Powder Technology**, v. 25, n. 1, p. 354-359, 2014.

KREPPER, W.; SATZER, P.; BEYER, B. M.; JUNGBAUER, A. Temperature dependence of antibody adsorption in protein A affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1551, p. 59–68, 2018.

KRISHNAN, V., BHATIA, A., VARMA, H. Development, characterization and comparison of two strontium doped nano hydroxyapatite molecules for enamel repair/regeneration. **Dental Materials Journal**, v. 32, p. 646–659, 2016.

KOVÁCS, F. M.; SECO, J.; ROYUELA, A.; BETEGON, J. N.; SÁNCHEZ-HERRÁEZ, S.; MELI, M.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, M. E.; NÚÑEZ, M.; ÁLVAREZ-GALOVICH, L.; MOYÁ, J.; SÁNCHEZ, C.; LUNA, S.; BORREGO, P.; MOIX, J.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, V.; TORRES-UNDA, J.; BURGOS-ALONSO, N.; GAGO-FERNÁNDEZ, I.; GONZÁLEZ-RUBIO, Y.; ABRAIRA, V. The association between sleep quality, low back pain and disability: A prospective study in routine practice. **European Journal of Pain**, v. 22, p. 114-126, 2018.

KUMAR, V.; RATHORE, A. S. Two-stage chromatographic separation of aggregates for monoclonal antibody therapeutics. **Journal of Chromatography A**, v. 1368, p. 155-162, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680 - 685, 1970.

LANDI, E.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S.; SANDRI, M.; LOGROSCINO, G. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. **Acta Biomateriale**, v. 3, p. 961–969, 2007.

LARSSON, M HUANG, W.C.; HSIAO, M.H.; WANG, Y.J.; NYDÉN, M.; CHIOU, S.H.; LIU, D.M. Biomedical applications and colloidal properties of amphiphilically modified chitosan hybrids. **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 1307–1328, 2013.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LEE, K.Y; MOONEY, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, p. 106– 126, 2012.

LEE, S. J., KIM, S. S., LEE, Y. M. Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly-ethylene glycol macromer and chitosan. **Carbohydrate Polymer**, v. 41, p. 197–205, 2000.

LIU, W.; ZHOU, D.; SUN, Y., YU, J.; CHEN, Q.; BAO, Z.; NIAN, R. Reduction of chromatin heteroaggregates by acid precipitation of mammalian cell culture and ramification in protein A chromatography for recombinant immunoglobulin G purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 65-74, 2019.

LI, P.; DAI, Y.-N.; ZHANG, J.-P.; WANG, A.-Q.; WEI, Q. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 3, p. 221–228, 2008.

LI, S.; WANG, X.; ZHANG, X.; YANG, R.; ZHANG, H.; ZHU, L.; HOU, X. Studies on alginate–chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits. **Journal of Controlled Release**, v. 84, p. 87–98, 2002.

LI, B.; SHAN, C.-L.; ZHOU, Q.; FANG, Y.; WANG, Y.-L.; XU, F.; HAN, L.-R.; IBRAHIM, M.; GUO, L.-B.; XIE, G.-L.. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. **Marine Drugs**, v.11, p. 1534–1552, 2013.

LI, Z.; CAO, M.; ZHANG, W.; LIU, L.; WANG, J.; GE, W.; YUAN, Y.; YUE, T.; LI, R.; YU, W. W. Affinity adsorption of lysozyme with Reactive Red 120 modified magnetic chitosan microspheres. **Food Chemistry**, v. 145, p. 749–755, 2014.

LIN, K.; LIU, P.; WEI, L.; ZOU, Z.; ZHANG, W. QIAN, Y.; SHEN, Y.; CHANG, J. Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release, **Chemical Engineering Journal**, v. 222, p. 49–59, 2013.

LIMA, P. H. L.; PEREIRA, S. V. A.; RABELLO, R. R.; CASTELLÓN, E. R.; BEPPU, M. M.; CHEVALLIER, P.; MANTOVANI, D.; VIEIRA, R. S.. Blood protein adsorption on sulfonated chitosan and β -carrageenan films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 719–725, 2013.

LUCINDA-SILVA, R. M.; SALGADO, H. R. N.; EVANGELISTA, R. C. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 260–268, 2010.

MA, J.; SAHAI, Y. Chitosan biopolymer for fuel cell applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 955–975, 2013.

MACHADO, M. O.; LOPES, E. C. N.; SOUSA, K. S.; AIROLDI, C. 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**, v. 77, n. 4, p. 760–766, 2009.

MAFIRAD, F.; MEHRNIA, M. R.; ZAHEDI, P.; HOSSEINI, S. N. Chitosan-Based Nanocomposite Membranes With Improved Properties: Effect of Cellulose Acetate Blending and TiO₂ Nanoparticles Incorporation. **Polymer Composites**, v. 39, n. 12, p. 4452–4466, 2018.

MALESU. V. K.; SAHOO, D.; NAYAK, P. L. Materials Preparation of Chitosan-Alginate Nanocomposit. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, n. 3, p. 402–411, 2011.

MARDZIAH, C.M.; SOPYAN, I.; RAMESH, S. Strontium-doped hydroxyapatite nanopowder via sol-gel method: effect of strontium concentration and calcination temperature on phase behavior. **Trends Biomaterials Artificial Organs**, v. 23, p. 105–113, 2009.

MARTINS, S.; SARMENTO, B.; SOUTO, E.B.; FERREIRA, D.C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 725–731, 2007.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy-chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 160 – 167, 2013.

MORDOR INTELLIGENCE. **Immunoglobulin market - growth, trends, covid-19 impact, and forecast (2022 - 2027)**. Telegana, 2022. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/immunoglobulin-market>>. Acesso em: 10 mar 2022.

MORRISON, C. J.; GAGNON, P.; CRAMER, S. M. Purification of monomeric mAb from associated aggregates using selective desorption chromatography in hydroxyapatite systems. **Biotechnol Bioeng**, v. 108, p. 813–821, 2011.

NAKAGAWA, T.; ISHIHARA, T.; YOSHIDA, H.; YONEYA, T.; WAKAMATSU, K.; KADOYA, T. Relationship between human IgG structure and retention time in hydroxyapatite chromatography with sodium chloride gradient elution. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 37–45, 2010.

NIE, H. L.; ZHU, L. M. Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 261–267, 2007.

OLIVEIRA, G. C. **Plasma humano: componentes e derivados. Conservação e utilização terapêutica em ambiente hospitalar**. 2016. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, 2016.

OZKARA, S.; AKAGOL, S.; CANAK, Y.; DENIZLI, A. A Novel Magnetic Adsorbent for Immunoglobulin-G Purification in a Magnetically Stabilized Fluidized Bed. **Biothechnology Progress**, v. 20, p. 1169-1175, 2004.

PANDA, S.; BISWAS, C. K.; PAUL, S. A comprehensive review on the preparation and application of calcium hydroxyapatite: A special focus on atomic doping methods for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 47, n. 20, p. 28122–28144, 2021.

PARK, J.; REGALBUTO, J. R. A Simple, Accurate Determination of Oxide PZC and the Strong Buffering Effect of Oxide Surfaces at Incipient Wetness. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 175, p. 239-252, 1995.

PARK, J.-W.; KIM, Y.-J.; JANG, J.-H. Enhanced osteoblast response to hydrophilic strontium and/or phosphate ions-incorporated titanium oxide surfaces. **Clinical Oral Implants Research**, v.21, p. 398–408. 2010.

PEREIRA, F.S.; AGOSTINI, D.L.S.; JOB, A.E.; GONZÁLEZ, E.R.P. Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, p. 321-327, 2013.

PRASANNA, R. R.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Characterization of metal chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 23, p. 3660-3667, 2010.

PERÇİN, I.; IDİL, N.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted poly(N-isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G purification. **Process Biochemistry**. v. 80, p. 181–189, 2019.

PERRET, G.; BOSCHETTE, E. Aptamer affinity ligands in protein chromatography. **Biochimie**, v. 145, p. 98–112, 2018.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, n. 1-2, p. 87–106, 2011.

RAFIEE, A.; ALIMOHAMMADIAN, M.; GAZORI, T.; RIAZI-RAD, F.; FATEMI, S.M.R.; PARIZADEH, A.; HARIRIAN, I.; HAVASKARY, M. Comparison of chitosan, alginate and chitosan/alginate nanoparticles with respect to their size, stability, toxicity and transfection. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**. v. 4, p. 372–377, 2014.

RAMACHANDRAN, S.; NANDHAKUMAR, S.; DHANARAJU, M. D. Formulation and characterization of glutaraldehyde cross-linked chitosan biodegradable microspheres loaded with famotidine. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v.10, n. 3, 2011.

RAMASAMY, A.; TRABZUNI, D.; GUELFI, S.; VARGHESE, V.; SMITH, C.; WALKER, R.; DE. T.; et al. Genetic variability in the regulation of gene expression in ten regions of the human brain. **Nature Neuroscience**, v. 10, p. 1418-1428, 2014.

RATNAYAKE J. T. B.; MUCALO, M.; DIAS, G. J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Appl Biomater**, v. 105, n. 5, p. 1285-1299, 2017.

RINAUDO, M., PAVLOV, G., DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, n. 40, v.25, p.7029–7032, 1999.

ROSCA, C.; POPA, M. I.; LISA, G.; CHITANU, G. C. Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan–carboxymethylcellulose complex. **Carbohydrate Polymer**, v. 62, p. 35–41, 2005.

RUCKENSTEIN, E.; ZENG, X. Albumin separation with Cibracon Blue carrying macroporous chitosan and chitin affinity membranes. **Journal Membrane Science**, v. 142, p. 13-26, 1998.

SADAT-SHOJAI, M. Calcium Phosphate–Reinforced Polyester Nanocomposites for Bone Regeneration Applications. **Biodegradable Polymeric Nanocomposites**, [s.l.] p. 1–34, 2015.

SADER, M.S.; MOREIRA, E.L.; MORAES, V.C.A.; ARAÚJO, J.C.; LEGEROS, R.Z.; SOARES, G.A. Rietveld refinement of sintered magnesium substituted calcium apatite. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 277–280, 2009.

SAYLAN, Y.; ÜZEK, R.; UZUN, L.; DENIZLI, A.; Surface imprinting approach for preparing specific adsorbent for IgG separation. **J. Biomater. Sci. Polym.** v. 25 p. 881–894, 2014.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 1–33, 2004.

SIGMA ALDRICH. Disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b1064?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em 10 de outubro de 2018a.

SIGMA ALDRICH. Disponível em: <
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/244813?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em 10 de outubro de 2018b.

SIGMA ALDRICH. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/404365?lang=pt®ion=BR&gclid=Cj0KCQjwxvbdBRC0ARIsAKmec9a6vhkWsReBBwKu0cwch59gR4-qcCM_ZAHcQMqpx24KF_i-nEOlbuAaAv4XEALw_wcB>.
Acesso em 10 de outubro de 2018c.

SIGMA ALDRICH. Disponível em: <
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0378?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em 10 de outubro de 2018d.

SMITHA, B.; SRIDHAR, S.; KHAN, A. A. Chitosan – sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. **European polymer**, v. 41, p. 1859–1866, 2005.

SOUSA, P. L. R. **Novas estratégias cromatográficas visando a recuperação e purificação de proteínas do soro de sangue humano e do leite bovino 2019**. Tese

(Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SOTELO-OROZCO, J.; CHEN, S. Y.; IRVA HERTZ-PICCIOTTO, I.; SLUPSKY, C. M. A Comparison of Serum and Plasma Blood Collection Tubes for the Integration of Epidemiological and Metabolomics Data. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v 8, 2021.

SU, C. X.; TENG, T.T.; WONG, Y.S.; MORAD, N.; RAFATULLAH, M. Chemosphere Catalytic thermolysis in treating Cibacron Blue in aqueous solution: **Kinetics and degradation pathway**. **Chemosphere**, v. 146, p. 503–510, 2016.

SWAIN, S. K.; SARKAR, D. Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 286, p. 99-103, 2013.

TISELIUS A.; HJERTEN, S.; LEVIN, O. Protein chromatography on calcium phosphate columns. **Arch. Biochem. Biophys**, v.65, p. 132–155,1956.

TÜZMEN, N.; AKDOGAN, F.; KALBURCU, T.; AKGÖL, S.; DENIZLI, A. Development of the magnetic beads for dye ligand affinity chromatography and application to magnetically stabilized fluidized bed system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 556–562, 2010.

TAO, Z.S.; ZHOU, W.S.; HE, X.W.; LIU, W.; BAI, B.L.; ZHOU, Q.; HUANG, Z.L.; TU K.; LI, H.; SUN, T.; LV, Y.X.; CUI, W.; YANG, L. A comparative study of zinc, magnesium, strontium-incorporated hydroxyapatite-coated titanium implants for osseointegration of osteopenic rats. **Materials Science and Engineering**, v. 62, p. 226–232, 2016.

TSAI, H.; WANG, Y.Z.; LIN, J.J.; LIEN, WF. Preparation and Properties of Sulfopropyl Chitosan Derivatives with Various Sulfonation Degree. **Journal of applied Polymer Science**, v. 116, n. 3, p. 1686-1693, 2010.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 520 – 532, 2014.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Trends Biotechnological**, v. 7, p. 71-76, 1989.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.Y.;. Chitosan-alginate-CaCl(2) system for membrane coat application. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 1134–1142, 2001.

WENSEL, D. L.; KELLEY, B. D.; COFFMAN, J. L.. High-Throughput screening of chromatographic separations: III. Monoclonal antibodies on ceramic hydroxyapatite. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 839–854, 2008.

WU, C.; KAO, C. Y.; TSENG, S.Y.; CHEN, K. C.; CHEN, S. F. Determination of the degree of deacetylation of chitosan by capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 236–244, 2014.

XU, Y.; AN, L.; CHEN, L.; XU, H.; ZENG, D.; WANG, G. Controlled hydrothermal synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite nanorods and their application as a drug carrier for proteins. **Advanced Powder Technology**, v. 29, p. 1042-1048 2018.

YATES, J. L.; EHRBAR, D.J.; HUNT, D.T.; GIRARDIN, R.C.; DUPUIS II, A. P.; PAYNE, A. F. Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 7, p. 1-15, 2021.

YAVUZ, H.; AKGÖL, S.; SAY, R.; DENIZLI, A. Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, p. 303–309, 2006.

YU, L.; ZHANG, L.; SUN, Y. Protein behavior at surfaces: Orientation, conformational transitions and transport. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 118 - 134, 2015.

ZIEGLER-BOROWSKA, M.; CHEŁMINIAK, D.; KACZMAREK, H. Thermal stability of magnetic nanoparticles coated by blends of modified chitosan and poly(quaternary ammonium) salt. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, p. 499 - 506, 2014.

ZHANG, D. H.; CHEN, N.; YANG, M. N.; DOU, Y. F.; SUN, J.; LIU, Y. D. Effects of different spacer arms on Cibacron Blue modification and protein affinity adsorption on magnetic microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 136–143, 2016.

ZHANG, J.; ZHANG, Z.; SONG, Y.; CAI, H. Bovine serum albumin (BSA) adsorption with Cibacron Blue F3GA attached chitosan microspheres. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 916–923, 2006.

ZHANG, K.; HELM, J.; PESCHEL, D.; GRUNER, M.; GROTH, T.; FISCHER. NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution. **Polymer**, v. 51 p. 4698-4705, 2010.