



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

DIEGO ROMÃO GONDIM

**SELEÇÃO DE MATERIAIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA
PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA**

FORTALEZA

2017

DIEGO ROMÃO GONDIM

SELEÇÃO DE MATERIAIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO
DE IgG HUMANA

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 Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Coorientadora: Prof^a. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

G635s Gondim, Diego Romão.
Seleção de materiais com potencial aplicação na purificação de IgG humana / Diego Romão Gondim. – 2017.
166 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.

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

Coorientação: Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo.

1. Imunoglobulina G. 2. Cromatografia. 3. Hidróxido Duplo Lamelar. 4. Sílica Mesoporosa. I. Título.

CDD 660

DIEGO ROMÃO GONDIM

SELEÇÃO DE MATERIAIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO
DE IgG HUMANA

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

Aprovada em 12/04/2017

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Jouciane de Sousa Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha saúde e por ter me concedido disposição para os estudos.

Ao meu pai, que não está mais aqui com a nossa família, mas tenho certeza que estaria muito orgulhoso por eu estar conseguindo alcançar os objetivos traçados.

A minha Mãe, Socorro, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida e aos meus irmãos, Louise Aline, Aurélia e Antônio de Pádua que me incentivaram a nunca desistir.

A minha namorada, Tigressa Helena, por sua paciência e apoio incondicional a enfrentar todas as dificuldades que apareceram nesse período final da dissertação.

Ao meu orientador prof. Dr. Ivanildo Jose da Silva Jr, que em todos os momentos demonstrou muita motivação e confiança, além de sempre estar presente em todos os momentos que tive alguma dificuldade na pesquisa.

A minha coorientadora profa Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo que participou intensamente em todas as etapas desse trabalho, sempre contribuindo de todas as formas.

Aos membros da banca de defesa, Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin, Dra. Maria Cristiane Martins de Souza, Dr. Rodrigo Silveira Vieira e Dra. Jouciane de Sousa Silva. Obrigado por terem aceitado dar suas contribuições nesse trabalho.

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

Aos amigos “gringos”, Enrique e Juan, que tive o prazer de conhecer e formar grandes amizades, além de realizar trabalhos em parceria.

Aos amigos da família LP1, em especial aos meus queridos IC's Natália, Santângela, Thaina, Isabela e Jansen. Muito bom compartilhar todos esses momentos com todos vocês: Bruna, Rosi, Sandrinha, Eurânio, Pedro, Paula, Larissa, Burnier, Luno e Tiago.

Aos meus amigos da pós-graduação, Adriano, Flávio, Carol, Fátima, Kamilly, Jessyca, Renata, Débora.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

Imunoglobulinas são proteínas do sistema imunológico, consideradas anticorpos de todos os animais, sendo responsáveis pelo principal mecanismo de defesa contra corpos estranhos (antígeno). Logo, o presente trabalho teve como principal objetivo a purificação das imunoglobulinas humanas do isotipo G (IgG) através das técnicas de cromatografia por troca iônica e por afinidade utilizando diferentes matrizes cromatográficas. Para alcançar tais objetivos foram sintetizados Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) contendo Mg/Al ou Zn/Al e o ânion CO_3^{2-} ; sílicas mesoporosas SBA 15 com e sem a inserção do heteroátomo de zircônio; e matrizes a base de quitosana modificada com corantes (reativo vermelho 120 - RV120 e procion red – MXR) imobilizados. Os HDL e as SBA 15 são considerados matrizes cromatográficas de troca iônica enquanto que as matrizes a base de quitosana com corantes são matrizes de pseudoafinidade. Os materiais sintetizados foram caracterizados por Difração de Raios X (DR-X), Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Isoterma de adsorção-dessorção de N_2 . Em seguida, foram obtidos dados fundamentais em batelada utilizando soluções com as proteínas Albumina do Soro Humano (HSA) e IgG, além de soluções com soro humano diluído em tampão. O Zn/Al-HDL e a SBA 15 (sem zircônio) foram as principais matrizes de troca iônica, pois apresentaram maior quantidade de IgG adsorvida, com valores acima de 600 mg/g. Entretanto, de acordo com as análises de eletroforese SDS-PAGE, esses materiais não foram capazes de purificar IgG humana, sendo melhor recomendado para uma pré-purificação desta proteína. Em contrapartida, as matrizes de pseudoafinidade apresentaram seletividade por domínios específicos da IgG, pois análises de eletroforese SDS-PAGE comprovaram que IgG foi purificada, a partir de misturas binárias e do soro humano diluído.

Palavras-Chave: Imunoglobulina G. Cromatografia. Hidróxido Duplo Lamelar. Sílica Mesoporosa.

ABSTRACT

Immunoglobulins are proteins of the immune system, considered as antibodies of all animals, being responsible for the main mechanism of defense against foreign bodies (antigen). Therefore, the main objective of the present work was to purify the human immunoglobulins from isotype G (IgG) by ion exchange and affinity chromatography using different chromatographic matrix. To reach these objectives were synthesized Hydroxides, containing Mg/Al or Zn/Al and the CO_3^{2-} anion; SBA 15 with and without zirconium heteroatom; and matrix based on chitosan modified with immobilized dyes (Reactive Red 120 - RV120 and Procion Red - MXR. HDL and SBA 15 are considered ion exchange chromatographic matrix whereas chitosan-based with dyes-ligand are pseudo-affinity matrix. The synthesized materials were characterized by X-Ray Diffraction (DR-X), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and N_2 Adsorption-Desorption Isotherm. Subsequently, fundamental batch data were obtained using solutions with Human Serum Albumin (HSA) and IgG, as well as solutions with diluted human serum in buffer. Zn/Al-LDH and SBA 15 (without zirconium) were the main ion exchange matrix, since they had a higher amount of IgG adsorbed, with values above 600 mg g^{-1} . However, according to the SDS-PAGE electrophoresis analyzes, these materials were not able to purify human IgG, being best recommended for a pre-purification of this protein. In contrast, pseudo-affinity matrix showed selectivity for specific IgG domains, since SDS-PAGE electrophoresis analyzes showed that IgG was purified from binary mixtures and diluted human serum.

Keywords: Immunoglobulin G. Chromatography. Layered Double Hydroxide. Mesoporous Silica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Estrutura das Imunoglobulinas.....	25
Figura 2.2 -	Estrutura da proteína HSA.....	28
Figura 2.3 -	Esquema simplificado para a Cromatografia de Afinidade.....	33
Figura 2.4 -	Visualização do sistema Contichrom instalado no GPSA (Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção).....	41
Figura 2.5 -	Composição principal do sistema Contichrom.....	42
Figura 3.1 -	Aparato experimental da síntese de HDL.....	45
Figura 3.2 -	Difratogramas de raios X obtidas para: Zn/Al-HDL (linha preta), Zn/Al-HDL+IgG (linha vermelha), Zn/Al-HDL+HSA (linha verde) e Mg/Al-HDL (linha azul).....	53
Figura 3.3 -	FTIR dos HDL: Mg/Al (A) e Zn/Al (B). Linha preta (HDL sem proteína, i) e Linha vermelha (HDL com IgG, ii).....	55
Figura 3.4 -	Isotermas de adsorção-dessorção de N ₂ nos HDL: Mg/Al e Zn/Al. Pontos experimentais de adsorção (●) e dessorção (□).....	57
Figura 3.5 -	Ponto de Carga Zero(pH _{ZPC}) para o Zn/Al-HDL(-■-) e para o Mg/Al-HDL(-▲-).....	58
Figura 3.6 -	Potencial Zeta (ZPC) para o Mg/Al-HDL quando em contato com água (-■-) e os tampões MOPS (-●-), HEPES (-■-), TRIS-HCl (-▲-) e FOSFATO (-▲-).....	60
Figura 3.7 -	Efeito do pH em diferentes tampões biológicos na adsorção de IgG e HSA (concentração inicial de 1,0 mg/mL) em HDL: (A) Mg/Al-HDL e IgG; (B) Mg/Al-HDL e HSA; (C) Zn/Al-HDL e IgG; (D) Zn/Al-HDL e HSA. Faixa de pH para cada tampão: ACETATO (4,0-5,6) FOSFATO (6,0-8,0) MOPS (6,5-7,9) HEPES (6,8-8,0) TRIS (7,2-9,0).....	62
Figura 3.8 -	Perfis cinéticos de adsorção de IgG e HSA (concentração inicial de 1,0 mg/mL) em HDL usando os tampões MOPS (◆), HEPES (▲), TRIS-HCl (●) e FOSFATO (■): (A) Mg/Al-HDL e IgG; (B) Mg/Al-HDL e HSA; (C) Zn/Al-HDL e IgG; (D) Zn/Al-HDL e HSA.....	67

Figura 3.9 -	Isotermas de adsorção com IgG e HSA em HDL usando os tampões MOPS (◆), HEPES (▲), TRIS-HCl (●) e FOSFATO (■): (A) Mg/Al-HDL e IgG; (B) Mg/Al-HDL e HSA; (C) Zn/Al-HDL e IgG; (D) Zn/Al-HDL e HSA. Modelos de ajustes de Langmuir (linha tracejada) e Langmuir-Freundlich (linha contínua).....	69
Figura 3.10 -	Difratogramas de raios X obtidas para: SBA 15-FTMB, SBA 15-Si/Zr5 (linha preta, iii), SBA 15-Si/Zr10 (linha azul, ii), SBA 15-Si/Zr20 (linha vermelha, i).....	78
Figura 3.11 -	FTIR das SBA 15 sintetizadas com IgG (A) e com HSA (B). SBA 15-FTMB (linha preta, ii), SBA 15-Si/Zr5 (linha verde, iv), SBA 15-Si/Zr10 (linha azul, i), SBA 15-Si/Zr20 (linha vermelha, iii).....	79
Figura 3.12 -	Isotermas de adsorção-dessorção de N ₂ nos SBA 15: FTMB (linha preta), Si/Zr20 (linha azul), Si/Zr10 (linha vermelha) e Si/Zr5 (linha verde).....	80
Figura 3.13 -	Ponto de Carga Zero (pH _{ZPC}) dos adsorventes: SBA 15-FTMB (■), SBA 15-Si/Zr5 (●), SBA 15-Si/Zr10 (▲), SBA 15-Si/Zr20 (▼).....	82
Figura 3.14 -	Efeito do pH na adsorção de IgG e HSA (concentração inicial de 1,0 mg/mL). A) SBA 15-FTMB com IgG, B) SBA 15-FTMB com HSA, C) SBA 15-Si/Zr 5 com IgG e D) SBA 15-Si/Zr 5 com HSA. Faixa de pH para cada tampão: ACETATO (4,0-5,6) FOSFATO (6,0-8,0) MOPS (6,5-7,9) HEPES (6,8-8,0) TRIS (7,2-9,0).....	85
Figura 3.15 -	Perfis cinéticos de adsorção de IgG (A e C) e HSA (B e D) em SBA (SBA 15-FTMB (▲), SBA 15-Si/Zr20 (*), SBA 15-Si/Zr10 (□) e SBA 15-Si/Zr5 (○)) utilizando os tampões ACETATO (A e B) com pH 4,8 e FOSFATO (C e D) com pH 7,0.....	89
Figura 3.16 -	Isotermas de adsorção de IgG (A e C) e HSA (B e D) em SBA (SBA 15-FTMB (▲), SBA 15-Si/Zr20 (*), SBA 15-Si/Zr10 (□) e SBA 15-Si/Zr5 (○)) utilizando os tampões ACETATO (A e B)	

	com pH 4,8 e FOSFATO (C e D) com pH pH 7,0.....	92
Figura 3.17 -	Isotermas de adsorção com IgG (●) e HSA (▲) em Zn/Al-HDL (A) e SBA 15-FTMB (B) utilizando o tampão TRIS-HCl nos pH 7,2 e 9,0, respectivamente para Zn/Al-HDL e SBA-15 FTMB. Modelos de ajustes de Langmuir (linha tracejada preta) e Langmuir-Freundlich (linha contínua preta) e o modelo de Henry (linha contínua vermelha).....	102
Figura 3.18 -	Ensaio de adsorção com misturas binárias de proteínas utilizando os adsorventes Zn/Al-HDL (A) e SBA 15-FTMB (B). Tempo de contato de 3 h, volume de injeção de 3,0 mL, massa do adsorvente de 15 mg. Caso I (○), Caso II (▲), Caso III (●), 100% IgG (■) e 100% HSA (*)......	106
Figura 3.19 -	Eletoforese SDS page com revelador comassie brilhante blue dos ensaios com misturas de proteínas (IgG/HSA) nos três casos estudados utilizando Zn/Al-HDL (A) e SBA 15 FTMB (B). Proteínas diluídas em tampão TRIS/HCl 25 mM pH 7,2 (HDL) e 9,0 (SBA). Indicação dos poços: Padrão de Peso Molecular (HMW), Concentrações Iniciais (CI): 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0; e Concentrações Finais (CF): 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0; Padrão de IgG com alto grau de pureza (IgG). Proteínas do padrão HMW: Miosina (220 kDa), α-macroglobulina (170 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), Transferrina (76 kDa) e Lutaminc Dehidrogenase (53 kDa).....	109
Figura 3.20 -	Experimentos em batelada com os adsorventes Zn/Al-HDL (▲) e SBA 15-FTMB (■) com amostras do soro humano diluído em tampão TRIS-HCl. Condições: Tempo de 4 h, massa de adsorvente de 15 mg e volume de amostra de 3,0 mL. Quantificação de proteínas totais a partir do método de Bradford (Bradford, 1976).....	112
Figura 3.21 -	Eletoforese SDS page com revelador comassie brilhante blue dos ensaios com soro humano e os adsorventes SBA 15-FTMB (A) e Zn/Al-HDL (B). Proteínas diluídas em tampão TRIS/HCl 25 mM pH 7,2 (HDL) e 9,0 (SBA 15). Indicação dos poços:	

	Padrão de Peso Molecular (HMW), Amostra Inicial (Ci) e Amostra Final (Fij), onde “i” variou-se de 1,0 a 7,0 mg/mL e “j” refere-se as amostras, em duplicatas, após a adsorção. Padrão de IgG (IgG) e Padrão de HSA (HSA). Proteínas do padrão HMW: Miosina (220 kDa), α -macroglobulina (170 kDa), β -Galactosidase (116 kDa), Trasnferrina (76 kDa) e Lutamic Dehidrogenase (53 kDa).....	113
Figura 4.1 -	Procedimento de preparação do compósito de quitosana/alginate epoxidado proposto por Fangkangwanwong e colaboradores (Fangkangwanwong <i>et al.</i> , 2006) com a adição de alginato de sódio.....	117
Figura 4.2 -	Efeito do pH e do tipo de tampão na adsorção de IgG utilizando QAE-R120 (a) e QAE-PR-MX (b). Concentração de IgG: 1,0 mg/mL; Tempo de análise: 2,0 h; massa de adsorvente: 15 mg; volume de solução de proteína: 3,0 mL; agitação constante em orbital shaker: 18 rpm.....	125
Figura 4.3 -	Perfil da cinética de adsorção de IgG utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX (b). Tempo de análise: 0 à 360 min; concentração de IgG: 1,0 mg/mL; massa de adsorvente: 15 mg; volume de solução de proteína: 3,0 mL; tampão de diluição: TRIS-HCl 25 mM (pH7,2); agitação constante em orbital shaker: 18 rpm.....	127
Figura 4.4 -	Perfis de isotermas de adsorção de IgG utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX (b). Tempo de análise: 240 min; massa de adsorvente: 15 mg; volume de solução de proteína: 3,0 mL; tampão de diluição: TRIS-HCl 25 mM (pH7,2); agitação constante em orbital shaker: 18 rpm. Modelos de ajustes de Langmuir (linha contínua) e Langmuir-Freundlich (linha tracejada).....	128
Figura 4.5 -	Perfis cromatográficos dos ensaios com IgG de alta pureza diluída em TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) utilizando os adsorventes: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX. Volume de injeção (I): 10 mL de IgG de alta pureza (1,0 mg/mL); massa de	

	adsorvente: 0,5 g; vazão de operação: 0,8 mL/min. Etapas: Adsorção (A); Lavagem (L); Eluição (E); Regeneração (R).....	131
Figura 4.6 -	Perfis cromatográficos dos ensaios com soro humano (SH) diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) utilizando os adsorventes: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX. Volume de injeção (I): 15 mL de SH (4,0-5,0 mg/mL); massa de adsorvente: 0,5 g; vazão de operação: 0,8 mL/min. Etapas: Adsorção (A); Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R).....	133
Figura 4.7 -	Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos com o soro humano diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH7,2) e utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX (b). Marcador de peso molecular (M); Amostra de Injeção (INJ); amostras da Lavagem (L), amostras da Eluição (E), Imunoglobulina Humana (IgG) e Albumina Humana (HSA) da Sigma.....	135
Figura 4.8 -	Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com a proteína HSA utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (A), QAE-PR-MX (B), HCB (C) e HPA (D). Condições de operação: vazão (0,8 mL/min), volume de injeção (3,0 mL), concentração de proteínas diluídas em TRIS-HCl 25 mM em pH 7,2 (1,0 mg/mL), eluição por gradiente linear com adição de NaCl 1,0 M ao tampão de adsorção e regeneração com NaOH 0,5 M.....	138
Figura 4.9 -	Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com a proteína IgG utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (A), QAE-PR-MX (B), HCB (C) e HPA (D). Condições de operação: vazão (0,8 mL/min), volume de injeção (3,0 mL), concentração de proteínas diluídas em TRIS-HCl 25 mM em pH 7,2 (1,0 mg/mL), eluição por gradiente linear com adição de NaCl 1,0 M ao tampão de adsorção e regeneração com NaOH 0,5 M.....	140
Figura 4.10 -	Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com mistura binária de IgG/HSA (1,0 mg/mL) utilizando QAE-	

RV120 (A) e QAE-PR-MX (B). Condições de operação: vazão (0,8 mL/min), volume de injeção (3,0 mL), concentração de proteínas (1,0 mg/mL), eluição por gradiente linear com adição de NaCl 1,0 M ao tampão de adsorção e regeneração com NaOH 0,5 M. Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas. Marcador de peso molecular (HMW); Amostra de Injeção (INJ); amostras da Adsorção (A1 e A2), amostras da Eluição (E1, E2, E3 e E4), Imunoglobulina Humana (IgG) e Albumina Humana (HSA) da Sigma..... 143

Figura 4.11 - Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com o soro humano utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (A), QAE-PR-MX (B), HCB (C) e HPA (D). Eletroforese SDS-PAGE dos referentes aos perfis dos cromatográficos (A) e (B). Marcador de peso molecular (HMW); Amostra de Injeção (INJ); amostras da Adsorção (A1 e A2), amostras da Eluição (E1, E2, E3 e E4), Imunoglobulina Humana (IgG) e Albumina Humana (HSA) da Sigma..... 144

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Concentrações das soluções binárias de cada caso estudado.....	50
Tabela 3.2 -	Propriedades texturais para os HDL: Mg/Al e Zn/Al.....	58
Tabela 3.3 -	Carga superficial aparente dos HDL e das proteínas em função do pH.....	59
Tabela 3.4 -	Quantidade adsorvida de IgG e HSA, após 2,0 h de contato, em Mg/Al-HDL e Zn/Al-HDL com diferentes tampões.....	66
Tabela 3.5 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em Mg/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos.....	72
Tabela 3.6 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de IgG em Mg/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos.....	73
Tabela 3.7 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em Zn/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos.....	74
Tabela 3.8 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L), Langmuir-Freundlich (LF) e Henry (H) para adsorção de IgG em Zn/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos....	75
Tabela 3.9 -	Propriedades texturais para os SBA 15 sintetizadas e da literatura.....	81
Tabela 3.10 -	Carga superficial aparente das SBA 15 e das proteínas em função do pH.....	83
Tabela 3.11 -	Quantidade adsorvida de IgG e HSA, após 2,0 h de contato, em SBA 15-FTMB e SBA 15-Si/Zr5 com diferentes tampões.....	88
Tabela 3.12 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em SBA utilizando tampão ACETATO (pH 4,8).....	95
Tabela 3.13 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de IgG em SBA	

	utilizando tampão ACETATO (pH 4,8).....	96
Tabela 3.14 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em SBA utilizando tampão FOSFATO (pH 7,0).....	97
Tabela 3.15 -	Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de IgG em SBA utilizando tampão FOSFATO (p H 7,0).....	98
Tabela 3.16 -	Parâmetros de ajustes obtidos a partir dos modelos de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Henry com os dados de adsorção de IgG e HSA em Zn/Al-HDL e SBA-15 FTMB.....	104
Tabela 4.1 -	Parâmetros de ajuste obtidos a partir dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich ajustado aos dados experimentais na adsorção de IgG nas matrizes de afinidade QAE-RV120 e QAE-PR-MX.....	129
Tabela 4.2 -	Balanço de massa na adsorção de IgG diluída no tampão de adsorção TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) utilizando QAE-RV120 e QAE-PR-MX (0,50 g). Etapas dos ensaios cromatográficos para a injeção (I) de 10 mL de IgG (1,0 mg/mL): Adsorção (A), Lavagem (L), Eluição (E), Regeneração (R) e quantidade de proteína total (PT) de cada etapa obtida a partir de leituras a 280 nm em espectrofotômetro e a Recuperação (REC).....	132
Tabela 4.3 -	Balanço de massa dos ensaios cromatográficos com amostras do soro humano (SH), diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2), utilizando os adsorventes: QAE-RV120 e QAE-PR-MX. Etapas dos ensaios cromatográficos após a injeção (I) de 15 mL de SH (4,0 – 5,0 mg/mL): Adsorção (A), Lavagem (L), Eluição (E), Regeneração (R) e quantidade de proteína total (PT) a partir de Bradford e a Recuperação (REC).....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACETATO	Acetato de Sódio
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BSA	Albumina do Soro Bovino
CEL	Celulase
DR-X	Difração de Raio-X
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
FOSFATO	Fosfato de Sódio
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatograph (Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas)
HG	Hemoglobina
HSA	Albumina do Soro Humano
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	Ácido hidroxietilpiperazina etano sulfônico
IgG	Imunoglobulinas do Isotipo G
LIS	Lisozima
MIO	Mioglobina
MOPS	Ácido morfolinopropano sulfônico
pH	Potencial Hidrogeniônico
pHzpc	Ponto de Carga Zero
pI	Ponto Isoelétrico
QAE	Quitosana/Alginato epoxidado
RA120	Reativo Azul 120
PRMX	Procion Red MX
SBA	Santa Barbara Amorfa
TEOS	Tetraetilortosilicato
TMB	1,3,5 Trimetilbenzeno
ZPC	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1	Proteínas em Geral.....	24
2.1.1	<i>Soro e Plasma humano.....</i>	24
2.1.2	<i>Imunoglobulinas Humana (Ig).....</i>	24
2.1.2.1	<i>Anticorpos Monoclonais.....</i>	26
2.1.2.2	<i>Anticorpos Policlonais.....</i>	27
2.1.2.3	<i>Anticorpos Recombinantes (Fragmentos de anticorpos).....</i>	27
2.1.3	<i>Albumina do Soro Humano (HSA – “Human Serum Albumin”).....</i>	27
2.2	Mercado Nacional dos Hemoderivados.....	28
2.3	Importância da Cromatografia na Purificação de proteínas.....	31
2.3.1	<i>Cromatografia de Troca Iônica (CTI).....</i>	31
2.3.2	<i>Cromatografia de Afinidade.....</i>	32
2.3.2.1	<i>Matrizes Cromatográficas.....</i>	33
2.3.2.2	<i>Ligantes de Afinidade.....</i>	34
2.3.2.2.1	Ligantes Bioespecíficos.....	34
2.3.2.2.2	Principais Ligantes pseudobioespecíficos.....	35
2.3.2.2.3	Outros Ligantes Pseudobioespecíficos.....	38
2.3.3	<i>Outras Técnicas Cromatográficas por Afinidade.....</i>	40
2.4	Purificação de Proteínas em Sistemas Contínuos.....	40
3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES CROMATOGRÁFICAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR TROCA IÔNICA.....	43
3.1	Objetivos Específicos.....	43
3.2	Materiais e Métodos.....	44
3.2.1	<i>Reagentes.....</i>	44
3.2.2	<i>Sínteses dos Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL).....</i>	44
3.2.3	<i>Síntese das Sílicas Mesoporosas SBA 15.....</i>	45
3.2.4	<i>Caracterizações Químicas e Estruturais dos Materiais.....</i>	46
3.2.5	<i>Experimentos de Adsorção em Batelada.....</i>	47
3.2.6	<i>Ensaio de Purificação em Misturas de Proteínas.....</i>	48

3.2.6.1	<i>Preparo das Soluções Binárias (IgG e HSA).....</i>	48
3.2.6.2	<i>Determinação de Proteínas no Sistema Binário.....</i>	50
3.2.7	<i>Ensaio de Purificação com Soro Humano diluídas em Tris-HCl.....</i>	51
3.2.7.1	<i>Determinação de Proteínas Totais.....</i>	51
3.2.8	<i>Eletroforese (SDS-PAGE).....</i>	52
3.3	Resultados e Discussão.....	52
3.3.1	<i>Caracterização dos HDL.....</i>	52
3.3.2	<i>Adsorção de proteínas em HDL.....</i>	61
3.3.3	<i>Caracterização das SBA 15.....</i>	77
3.3.4	<i>Adsorção de proteínas em SBA 15.....</i>	84
3.3.5	<i>Ensaio de purificação de IgG humana.....</i>	99
3.3.5.1	<i>Ensaio com as Proteínas IgG ou HSA.....</i>	101
3.3.5.2	<i>Ensaio com Mistura Binária de IgG e HSA.....</i>	104
3.3.5.3	<i>Ensaio com Soro Humano.....</i>	111
3.4	Conclusão Parcial.....	114
4	PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR CROMATOGRAFIA DE PSEUDOAFINIDADE.....	115
4.1	Objetivos Específicos.....	115
4.2	Materiais e Métodos.....	115
4.2.1	<i>Reagentes.....</i>	116
4.2.2	<i>Síntese do composto de Quitosana/Alginato Epoxidado.....</i>	117
4.2.3	<i>Imobilização dos Corantes (RV120 e PR-MX) em QAE.....</i>	118
4.2.4	<i>Experimentos de Adsorção em Batelada.....</i>	119
4.2.5	<i>Ensaio Cromatográfico Iniciais.....</i>	120
4.2.5.1	<i>Determinação de Proteínas Totais.....</i>	121
4.2.5.2	<i>Eletroforese (SDS-PAGE).....</i>	121
4.2.6	<i>Ensaio de Purificação em FPLC.....</i>	121
4.3	Resultados e Discussão.....	122
4.3.1	<i>Caracterização da Matriz Cromatográfica de Afinidade.....</i>	122
4.3.2	<i>Experimentos em Batelada com QAE-RV120 e QAE-PR-MX.....</i>	123
4.3.3	<i>Ensaio de Cromatográfico de Purificação de IgG Humana</i>	130
4.3.4	<i>Ensaio cromatográfico no sistema FPLC Contichrom.....</i>	136
4.4	Conclusão Parcial.....	146

5	CONCLUSÃO GERAL.....	147
	REFERÊNCIAS.....	147

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho apresenta uma abordagem sobre a importância em se trabalhar com adsorção de proteínas visando sua purificação. As técnicas cromatográficas normalmente são os principais métodos empregados para atingir tais objetivos. Essas técnicas necessitam fundamentalmente da escolha do adsorbato, proteína ou biomolécula de interesse, e do adsorvente que deverá apresentar as qualidades necessárias para adsorver seletivamente a proteína de interesse.

As proteínas modelos estudadas foram: albumina do soro humano (HSA - Human Serum Albumin) e as imunoglobulinas do isotipo G (IgG) com alto grau de pureza obtidas comercialmente da Sigma. Essas proteínas foram escolhidas por serem proteínas do soro humano com alto valor agregado quando purificadas. Há grande relevância em se estudar processos que visam obter tais proteínas com alto grau de pureza.

Analisando o mercado mundial observa-se facilmente o real interesse na obtenção dessas e de outras proteínas com elevado grau de pureza e com atividade biológica destinada ao tratamento de diversas doenças. O Brasil não é diferente, há grande demanda por esses hemoderivados, que são exatamente as proteínas obtidas após processos de purificação sendo destinadas ao tratamento de doenças específicas. Porém, há enorme carência na autonomia de obtenção devido a forte dependência do Brasil na importação de tais hemoderivados, chegando a ter praticamente toda sua demanda importada. Todos esses hemoderivados importados são destinados ao Sistema Único de Saúde (SUS) e a partir deste a população brasileira é atendida em todo o território nacional.

A Hemobrás vem a ser a principal empresa brasileira e que futuramente deve diminuir por completo a necessidade de importação desses hemoderivados para atender a demanda interna. Logo, podem surgir os seguintes questionamentos: por que não poderíamos desenvolver metodologias com técnicas cromatográficas já bem estabelecidas, porém com materiais adsorventes empregados normalmente para outras finalidades? Há adsorventes com potencial para adsorver tais proteínas e conseqüentemente obter essas proteínas puras ou com alto grau de pureza? No desenvolvimento da tese, respostas para essas perguntas serão uma das preocupações a serem analisadas.

A seguir, uma breve, e importante discussão sobre proteínas e suas particularidades, bem como em seguida, uma abordagem sobre os adsorventes utilizados no presente capítulo.

Primeiramente, o leitor necessita se familiarizar com o assunto sobre proteínas, logo podem surgir algumas dúvidas: O que são proteínas? Onde podem ser localizadas? Quais suas principais características? E quais são as proteínas de maior destaque? Proteínas são biopolímeros formados por sequências de aminoácidos lineares (estrutura primária), dispostos em unidades tridimensionais formando principalmente α -hélice e folhas β (estrutura secundária) que são dobradas em maiores estruturas 3D conferindo a forma das proteínas (estrutura terciária). Essas estruturas terciárias podem ser agrupadas originando a estrutura quaternária da proteína (Norde, 2008; Bhakta *et al.*, 2015). As proteínas estão presentes em todos os sistemas vivos, representando cerca de 50-80% do peso seco das células e podem ser constituídas por uma sequência de vários aminoácidos (Murray *et al.*, 2008). As proteínas apresentam propriedades elétricas, logo, suas cargas são afetadas pelas condições as quais estão submetidas, visto que as cadeias laterais das proteínas possuem a capacidade de se ionizar em meios ácidos ou básicos. Portanto, cada proteína possui um ponto isoelétrico (pI), ponto esse que confere a proteína uma carga líquida igual a zero (Murray *et al.*, 2008).

O plasma humano apresenta inúmeras proteínas, dentre elas a Albumina do Soro Humano (HSA) (50% m/m), imunoglobulinas (12% m/m), fibrinogênio (4% m/m) além de outras (32% m/m) (Travis *et al.*, 1976). HSA representa considerável quantidade das proteínas encontradas no plasma humano (Faser e Chamberlain, 1999; Indest *et al.*, 2010) com alta concentração no sangue, em torno de 35-52 g/L (Indest *et al.*, 2010). Essa proteína é conhecida por desempenhar um papel importante no transporte e disposição de ligantes endógenos e exógenos presentes no sangue. Muitas drogas e outras moléculas pequenas bioativas se ligam reversivelmente à albumina do soro.

HSA apresenta ponto isoelétrico (pI) de 4,8 e massa molecular de 66,4 kDa com dimensões aproximadamente: 7,5 nm x 6,5 nm x 4,0 nm (Liu *et al.*, 2015). As Imunoglobulinas do isotipo G (IgG) são uma das proteínas mais importantes do soro humano, sendo indicadas para o tratamento de diversas doenças, como câncer, doenças infecciosas e deficiências seletivas de anticorpos (Burnouf e Radosevich, 2001; Burnouf, 2007).

A IgG é formada por um grupo de glicoproteínas, a qual é composta por quatro subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), por isso apresenta um pI variável entre 6,3 à 9,0 e massa molecular de 170 kDa (Bresolin *et al.*, 2010) com dimensões aproximadas de 14,5 nm x 8,5 nm x 4,0 nm (Tan *et al.*, 2008).

Até o presente momento destacou-se o papel fundamental das proteínas no sistema humano e suas diferentes funções biológicas. Porém, há de salientar que essas proteínas necessitam estar em seu estado puro e com atividade biológica, principalmente quando o objetivo é utilizá-las para o tratamento de doenças específicas em seres humanos. Tais razões justificam os inúmeros trabalhos que visam purificar proteínas do soro humano. Logo, faz-se necessário o uso de técnicas cromatográficas, como por exemplo, interações iônicas ou por afinidade para obter tais proteínas puras.

Inúmeros materiais, tais como os hidróxidos duplos lamelares (HDL) (Bellezza *et al.*, 2009; Ralla *et al.*, 2011; Bellezza *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2012), hidroxiapatitas (HA) (Swain e Sarkar, 2013; Kandori *et al.*, 2014; Esfahani *et al.*, 2015), quitosanas (Torres *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2009; Gondim *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Gondim *et al.*, 2014), alguns polímeros metacrilatos (Denizli *et al.*, 1999; Bayramoğlu *et al.*, 2005; Bayramoğlu *et al.*, 2006; Bayramoğlu *et al.*, 2007a) e as sílicas mesoporosas (Khamlichi *et al.*, 1995; Katiyar *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2008; Diao *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2010; Salis *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2013; Nakanishi *et al.*, 2013; Steri *et al.*, 2013) têm sido reportados para adsorção de diversas proteínas. Das inúmeras matrizes cromatográficas reportadas escolheu-se trabalhar com os HDL, as sílicas mesoporosas do tipo SBA 15, e matrizes a base de quitosana com corantes imobilizados. A seguir uma abordagem sobre esses adsorventes.

Os HDL são materiais aniônicos podendo ser naturais ou sintéticos. O termo “Hidróxido Duplo Lamelar” (HDL) se refere a características estruturais do material, sendo formado por cátions divalente e trivalente em suas lamelas, e por ânions carbonatos no domínio interlamelar. O HDL possui como fórmula geral: $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}[A^{n-}_{x/n}]^{x-} \cdot mH_2O$, onde M^{II} e M^{III} são metais divalente (Mg²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ e Mn²⁺) e trivalente (Al³⁺, Cr³⁺, Fe³⁺, Mn³⁺, Ni³⁺, Co³⁺, Sc³⁺ e Ga³⁺, Fe³⁺, Cr³⁺), respectivamente, Aⁿ⁻ é o ânion com carga n, e m é a quantidade molar de água intercalada entre as lamelas (Bellezza *et al.*, 2009; Olf *et al.*, 2009; Ralla *et al.*, 2011; Bellezza *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013).

O termo “hidrotalcita” é frequentemente usado como sinônimo para o Mg/Al-HDL. A hidrotalcita é uma argila aniônica natural e sua estrutura é semelhante ao da brucita ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), que apresenta um empacotamento hexagonal próximo aos grupos hidroxilas, em que os cátions de magnésio preenchem todos os sítios octaédricos entre as duas camadas adjacentes. A substituição isomorfa, Mg^{2+} (0,72 Å) por Al^{3+} (0,50 Å) provoca a distorção da célula, bem como dá origem ao desenvolvimento da carga positiva nas camadas, sendo balanceada pela presença de íons carbonatos, localizados no espaço interlamelar, que originalmente estavam vazios na brucita (De Roy, 1992; Jin *et al.*, 2012) apresentando fórmula geral: $[\text{Mg}^{2+}_6\text{Al}^{3+}_2(\text{OH})_{16}]^{2+}\text{CO}_3^{2-} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Os HDL podem ser sintetizados por várias rotas (Rives *et al.*, 2014), tais como: pelo método de coprecipitação a pH constante ou variável (Olfs *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2012), do sal-óxido (De Roy, 1992), da reconstrução do HDL pelo efeito memória (Kwon e Pinnavaia, 1989), além da síntese hidrotérmica e micro-ondas (Benito *et al.*, 2006). Coprecipitação é o método mais utilizado para síntese de HDL (De Roy, 1992; Crepaldi e Valim, 1998), pois muitos parâmetros da síntese podem ser controlados durante o processo de precipitação, tais como: temperatura do reator, pH do meio da reação, concentração dos sais metálicos, concentração alcalina da solução, vazão e as espécies aniônicas (Olfs *et al.*, 2009).

O interesse atual nos HDL é fundado sobre suas propriedades intrínsecas. Os HDL são materiais básicos, o que pode levar a óxidos mistos com maior basicidade por decomposição térmica. Destaca-se também nesses materiais a possibilidade do efeito memória, ou seja, a capacidade de recuperar a sua camada original depois de um processo de calcinação (Kwon e Pinnavaia, 1989). Além disso, os HDL mostram moderada capacidade de troca iônica. A grande versatilidade dos HDL conduz a estes materiais na forma de HDL ou de óxidos mistos a opção de ser utilizados em diversos campos, como a descontaminação de água, devido à capacidade das hidrotalcitas em adsorver ânions poluidores presentes em águas contaminadas, na ciência dos materiais, principalmente como aditivo para polímero orgânico para melhorar as propriedades mecânicas, até mesmo como catalisadores devido ao comportamento básico na área de catálise heterogênea ou na medicina devido à intercalação de moléculas biologicamente ativas.

As sílicas mesoporosas do tipo SBA 15 estão inseridas em outra classe de materiais extensivamente estudadas. Os trabalhos com adsorventes mesoporosos a base

de sílica começaram a ter maior destaque a partir da década de 90 com a síntese das sílicas mesoporosas da família M41S pelo grupo de cientistas da *Mobil Oil Corporation* (Beck *et al.*, 1992). Esses materiais se destacavam pelo grande volume de poros, elevada área superficial e diâmetro de poros entre 3 e 10 nm (Beck *et al.*, 1992). Desde então, inúmeras sínteses foram propostas na literatura, sendo as sílicas mesoporosas, denominadas SBA 15, sintetizadas por Zhao e colaboradores (1998) que apresentaram maior relevância. Esse material (SBA 15) apresentou estrutura similar a MCM 41 (pertencente à família M41S) com arranjo hexagonal (Beck *et al.*, 1992) diferenciando-se pelos modelos de síntese. Materiais M41S são sintetizados a partir de uma interação iônica entre, a carga positiva do surfactante (base molecular) com a carga negativa da fonte de sílica em meio básico.

Por outro lado, as SBA 15 têm sido sintetizadas pela utilização de surfactantes (com base polimérica) que interagem por meio de uma reação indireta com o molde de carga positiva da fonte de sílica em meio ácido (Meynen *et al.*, 2009). As principais diferenças apresentadas nas SBA 15 em relação à MCM 41 foram: o diâmetro de poro ajustável até 30 nm (Zhao *et al.*, 1998; Diao *et al.*, 2010), e a presença de microporos conectados com os mesoporos (Zhao *et al.*, 1998). Além disso, esse material se destaca pela elevada área superficial, ser um material inerte, não tóxico, apresentando alta biocompatibilidade (Zhao *et al.*, 2005; Meynen *et al.*, 2009) e estabilidade térmica e hidrotérmica (Zhao *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005; Erdem *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). O elevado diâmetro de partícula se deve a possibilidade da utilização de um agente expensor de poros, normalmente o 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), na síntese.

As SBA 15 despertam elevado interesse na adsorção de biomoléculas grandes, por exemplo, a proteína BSA, cujas dimensões são 4,0 x 4,0 e 14 nm (Tarasevich, 2001; Diao *et al.*, 2010). No estudo de adsorção de proteínas em materiais mesoporosos, o diâmetro de partícula pode ser fator limitante na adsorção, visto que algumas proteínas podem não conseguir penetrar em poros de diâmetro pequeno (Katiyar *et al.*, 2005; Diao *et al.*, 2010). As SBA 15, por apresentarem diâmetro de poro ajustável, aparecem como alternativa eficiente para esse possível problema. Pois há a possibilidade de sintetizar materiais com diâmetro de poro acima de 15 nm, tamanho este suficiente para acomodar macromoléculas de grandes dimensões. Essas vantagens destacadas das SBA 15 fazem deste um adsorvente indicado para adsorção de diversas proteínas. Além da possibilidade em utilizar SBA 15 para adsorção (Katiyar *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2006; Miyahara *et al.*, 2006; Diao *et al.*, 2010; Salis *et al.*, 2010;

Kim *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2013; Steri *et al.*, 2013), esses materiais são indicados também em outras áreas, tais como: catálises (Wang *et al.*, 2005; Quintella *et al.*, 2012), liberação controlada de fármacos (Zhu *et al.*, 2009; Carriazo *et al.*, 2010), imobilização de enzimas (Li *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2012), e separações por técnicas cromatográficas, como HPLC (Zhao *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009; Yasmin e Müller, 2011).

A última matriz cromatográfica estudada foi à base de quitosana modificada quimicamente, utilizando ligantes pseudobioespecíficos (Reativo Vermelho 120 – RV120 e Procion Red MX5B – PR-MX) imobilizados, visando a purificação de IgG humana por cromatografia de pseudoafinidade.

Normalmente, as matrizes utilizadas como fases estacionárias para cromatografia de afinidade são resinas comerciais especialmente preparadas para tal finalidade. Muitas destas resinas utilizam ligantes bioespecíficos e, desta forma, elevando o seu custo de aquisição. Entretanto, matrizes à base de quitosana podem vir a ser uma alternativa devido a sua disponibilidade e facilidade de obtenção, como apresentado nos trabalhos de Gondim e colaboradores (2012 e 2014). Pode ser citado como vantagem desses materiais, o fato que a quitosana é um polissacarídeo biodegradável, hidrofílico e biocompatível, obtido pela desacetilação da quitina, e a possibilidade de interações específicas e não específicas por efeito de permutação de cátions, como se deve aos efeitos de interações hidrofóbicas ou de ligações de hidrogênio entre a biomolécula e os anéis aromáticos do corante. Os corantes Procion Red MX-5B (PRMX) e o Reativo Vermelho 120 (RV 120) possuem em suas estruturas grupos sulfônicos (SO^{3-}), os quais são os prováveis meios de ligação dos corantes à matriz através de substituição nucleofílica.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo geral investigar o uso dessas três matrizes cromatográficas visando a purificação ou pré-purificação de IgG humana. Para atingir tais objetivos foram empregadas técnicas cromatográficas, como a técnica por troca iônica e por pseudoafinidade. Além disso, ensaios em batelada e experimentos cromatográficos, em sistema cromatográfico simples e em sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph), foram importantes para obter parâmetros que possibilitem uma comparação real entre esses adsorventes na purificação de IgG humana a partir de amostras de soluções binárias, contendo HSA e IgG, e a partir de amostras diluídas do soro humano obtido da SIGMA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas em Geral

2.1.1 Soro e Plasma humano

As proteínas podem ser facilmente encontradas no plasma ou no soro humano. Ambos, plasma e soro, são obtidos a partir da centrifugação do sangue humano. Quando a centrifugação ocorre sem a presença do anticoagulante e ao longo do processo ocorre o consumo de fibrinogênio temos a obtenção do soro. Em contrapartida, ao centrifugar o sangue com anticoagulante há a obtenção do plasma. Logo, a principal diferença entre soro e plasma se dá na presença ou não do fibrinogênio. Enquanto no soro não há a presença do fibrinogênio, pois o mesmo ter sido utilizado para a formação da fibrina, o plasma possui fibrinogênio em sua constituição. O plasma humano apresenta inúmeras proteínas, dentre elas a albumina do soro humano (Human Serum Albumin - HSA) (50% m/m), imunoglobulinas (12% m/m), fibrinogênio (4% m/m) além de outras proteínas (Travis *et al.*, 1976). Cada proteína apresenta funções bem definidas no sistema humano. A seguir uma breve descrição sobre as principais proteínas do sistema imunológico.

2.1.2 Imunoglobulinas Humana (Ig)

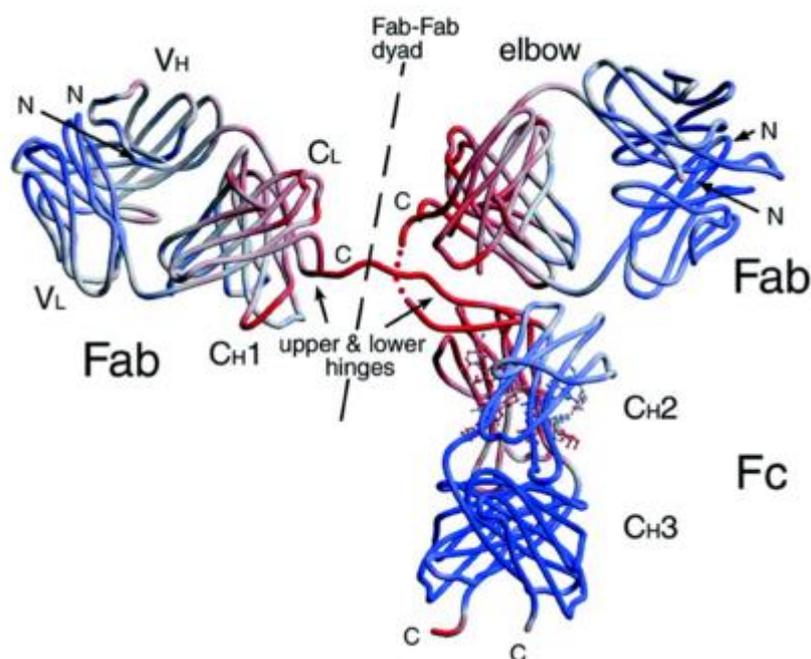
As imunoglobulinas são proteínas do sistema imunológico, consideradas anticorpos de todos os animais, sendo responsável pelo principal mecanismo de defesa contra corpos estranhos (antígeno) e são produzidas pelos plasmócitos (linfócitos B ativados) (Ayyar *et al.*, 2012). Essas células dos linfócitos B estão presentes no sangue, e em sua superfície há a presença de milhares de proteínas do tipo imunoglobulinas.

A produção de imunoglobulinas se faz necessária a partir do momento em que um corpo estranho (antígeno) entra no sistema humano, pois rapidamente células do linfócito B se ligarão ao antígeno. A partir desse momento as células do linfócito B se ativarão e sofrerão clonagem e diferenciação. Os linfócitos B ativados, agora chamados de plasmócitos, serão responsáveis em multiplicar essas células para combater de forma rápida e eficaz esse antígeno. Após a ligação antígeno-anticorpo, os fagócitos entrarão

em ação a fim de eliminar todo o antígeno (vírus, bactéria, ou outro) do corpo humano (Abbas *et al.*, 2012).

As imunoglobulinas possuem estrutura em forma de Y, conforme pode ser observado na Figura 2.1. Essas proteínas apresentam dois domínios de cadeia pesada (H) e dois domínios de cadeia leve (L) (siglas H e L do inglês da denominação de pesada “Heavy” e leve “Light”). Essas quatro cadeias são mantidas juntas por ligações dissulfídicas e pela Figura 2.1 nota-se a presença de partes variáveis (V_L e V_H) e constantes (C_L , CH_1 , CH_2 e CH_3) das cadeias leves e pesadas, sendo que as IgM e IgE possuem um domínio constante extra (CH_4) (Abbas *et al.*, 2012). Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves (V_H e V_L) constituem os sítios ligantes de antígeno. Nas extremidades das cadeias leves e pesadas há os terminais amino “ NH_2 ” e carboxílico “ $COOH$ ” (Abbas *et al.*, 2012; Ayyar *et al.*, 2012).

Figura 2.1 - Estrutura das Imunoglobulinas



Fonte: Saphire *et al.*, 2001

As pontes de dissulfeto que ligam as cadeias pesadas e leves estão localizadas na região flexível da cadeia pesada, conhecida como “HINGE” uma região de aproximadamente 12 aminoácidos que está exposta a uma clivagem química. As enzimas proteolíticas papaína e pepsina clivam as imunoglobulinas em diferentes fragmentos: F_{ab} ou $F_{(ab)2}$ e F_c ou pF_c . (Abbas *et al.*, 2012; Ayyar *et al.*, 2012).

Devido à possibilidade de diferenciação da cadeia pesada H, as imunoglobulinas possuem cinco diferentes tipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Belov *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2004; Ayyar *et al.*, 2012). Dentre os cinco possíveis tipos das imunoglobulinas, as do isotipo G (IgG) são as que mais se destacam e representam cerca de 75% das imunoglobulinas séricas (Salmon e Smith, 1970; Larson *et al.*, 1980; Ayyar *et al.*, 2012). As IgG são indicadas para o tratamento de diversas doenças, como câncer, doenças infecciosas e deficiências seletivas de anticorpos (Burnouf e Radosevich, 2001; Burnouf, 2007). IgG é formada por um grupo de glicoproteínas e é composta por quatro subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) (Yavuz *et al.*, 2006; Bresolin *et al.*, 2010), possuem um ponto isoelétrico (pI) variável entre 6,3 à 9,0 e massa molecular de 170 kDa com dimensões aproximadas de 14,5 nm x 8,5 nm x 4,0 nm (Tan *et al.*, 2008).

As imunoglobulinas são as principais proteínas do sistema imunológico, logo são comumente chamadas de anticorpos. Os anticorpos podem ser de três tipos: anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais e anticorpos recombinantes (fragmentos de anticorpos) (Ayyar *et al.*, 2012).

2.1.2.1 Anticorpos Monoclonais

A produção e aplicação de anticorpos têm sido desenvolvidas muito significativamente nas últimas décadas. Em particular, a descoberta dos anticorpos monoclonais derivados do desenvolvimento da tecnologia de hibridoma e os subsequentes avanços na biologia molecular e nos métodos de engenharia genética (Boschetti, 2001; Brichta *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2007).

O anticorpo monoclonal é específico para um único epítopo de um antígeno, sendo o produto de um único clone de linfócito B (Pohanka, 2009). Em geral, anticorpos monoclonais são imunoglobulinas secretadas por clones de linfócitos B, normais, tumorais ou obtido pela tecnologia de hibridomas por Kohler e Milstein (1975). Através dessa tecnologia de hibridomas, anticorpos monoclonais podem ser obtidos de duas formas: injetando hibridomas na cavidade intraperitoneal de um animal histocompatível “*in vivo*” ou cultivando hibridomas em meios sintéticos acrescidos de soro fetal bovino “*in vitro*” (Bresolin, 2006).

2.1.2.2 Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais são produzidos por diferentes linhas de linfócitos B. A produção desses anticorpos ocorre em um hospedeiro, rapidamente após a imunização, sendo caracterizada por uma mistura heterogênea de anticorpos, com diferentes anticorpos reconhecendo diferentes epítomos no antígeno (Pohanka, 2009). O soro é uma ótima fonte de anticorpos policlonais, sendo frequentemente utilizado em técnicas imunoquímicas (Healthcare, 2014).

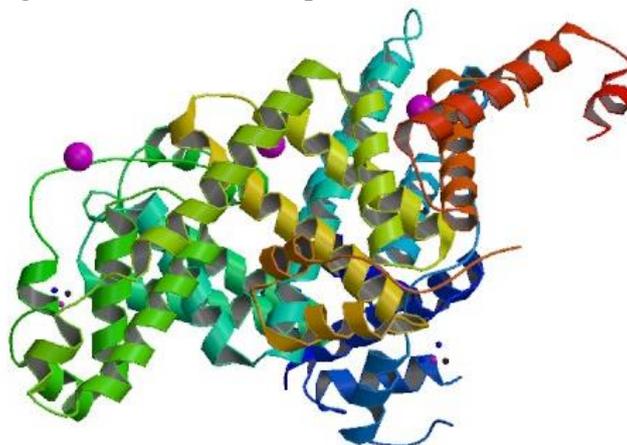
2.1.2.3 Anticorpos recombinantes (*Fragmentos de anticorpos*)

Esses anticorpos recombinantes são o terceiro tipo de anticorpos, podendo ser anticorpos ou fragmentos de anticorpos gerados em laboratórios utilizando técnicas moleculares e podem ser produzidos de vários formatos (Albrecht e Denardo, 2006; Carter, 2006; Kontermann, 2010).

2.1.3 Albumina do Soro Humano (HSA – “*Human Serum Albumin*”)

Albumina do Soro Humano (HSA) é outra importante proteína e representa, aproximadamente, 50% das proteínas encontradas no plasma humano (Faser e Chamberlain, 1999; Indest *et al.*, 2010) com alta concentração no sangue, em torno de, 35-52 g/L (Indest *et al.*, 2010). HSA é uma proteína globular, responsável pela regulação da pressão osmótica, transporte de reagentes hidrofóbicos e inatividade de metabólitos tóxicos (Peters Jr, 1985; Carter e Ho, 1994; Peters Jr, 1995; Dąbkowska *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2015). Essa proteína consiste de uma única cadeia de polipeptídeo, a qual contém 585 resíduos de aminoácidos contendo 17 pares de pontes de dissulfetos e uma cisteína livre, e massa molecular de 66,4 kDa (Peters Jr, 1985; Carter e Ho, 1994; Dąbkowska *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015). A molécula da HSA consiste de três estruturas similares divididas em dois domínios. Essas séries de seis subdomínios helicoidais montados formam uma molécula, conforme a Figura 2.2, em forma de “coração” (Berman *et al.*, 200R; Norde, 1986; Dąbkowska *et al.*, 2013) possuindo ponto isoelétrico (pI) 4,8 e dimensões de 9,5 nm x 5,0 nm x 5,0 nm (Dąbkowska *et al.*, 2013).

Figura 2.2. Estrutura da proteína HSA



Fonte: Berman *et al.*, 2000

2.2 Mercado Nacional dos Hemoderivados

Ao entrar no assunto sobre hemoderivados no mercado nacional, inicialmente faz-se necessário, abordar a definição de hemoderivados e sua relevância. Portanto, hemoderivados são produtos industrializados a partir do plasma sanguíneo com o propósito de tratar milhões de pessoas que apresentam graves doenças, como: hemofilias, cânceres, imunodeficiência primária e AIDS. Para ter noção do quão relevante são esses hemoderivados, simplesmente observe quais tipos de doenças esses produtos são indicados e o quanto as redes públicas e privadas de saúde gastam anualmente, em torno de 800 milhões de reais em importações (Hemobrás, 2013).

Hoje, vinte e dois países no mundo participam na produção de hemoderivados, totalizando setenta fábricas, sendo que a maior parte dessas fábricas está localizada na China. O Brasil ainda está engatinhando para se tornar um desses países de excelência especializados na produção de hemoderivados. No Brasil, existem três empresas que se propõem para a produção de hemoderivados, Instituto Butantan, Fundação Hemope e Hemobrás (Hemobrás, 2013).

O Instituto Butantan localiza-se no estado de São Paulo e foi fundado no ano de 1991 com o antigo nome de Instituto Seruniterápico do Estado de São Paulo. Atualmente se destaca como principal produtor de imunobiológicos do Brasil, responsável por grande porcentagem da produção nacional de soros hiperimunes. O Instituto Butantan está em processo de desenvolvimento de uma metodologia moderna de purificação de proteínas, exclusivamente por processos cromatográficos, a partir do

plasma. Tal meta visa investigar a produção de novos biofármacos, também a partir do plasma. Estima-se que, inicialmente, a planta de fracionamento produzirá imunoglobulinas para uso intravenoso (IGIV). Entretanto, outros produtos deverão ser isolados, como fator VIII, fator IX, complexo protrombínico e albumina (Instituto Butantan, 2016).

A Fundação Hemope é uma fundação que presta serviços nas áreas de hematologia e hemoterapia, fundada em 1977 e está vinculada à Secretaria de Saúde do Governo do Estado de Pernambuco. A Fundação Hemope, desde a década de 80, produz o hemoderivado albumina humana a 20% utilizando o plasma oriundo de hemocentros públicos do país (Hemope, 2016).

Devido à demanda nacional por hemoderivados e a carência de empresas voltadas exclusivamente para a produção de diversos hemoderivados, foi fundada em 2004 a Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás) com a proposta de ampliar o acesso à população a saúde pública de qualidade. A Hemobrás é uma estatal vinculada ao Ministério da Saúde que trabalha para reduzir a dependência externa do Brasil no setor de derivados do sangue e biofármacos. Localizada em Goiana, a 63 quilômetros do Recife, será a primeira fábrica do Brasil e a maior da América Latina com esta complexidade e terá como meta, a capacidade de processamento de 500 mil litros. Devido a pouca experiência no Brasil no ramo da produção desses hemoderivados, a Hemobrás firmou parceria com o Laboratório Frances de Biotecnologia (LFB). Através desse acordo haverá intercâmbio dessa tecnologia voltada para a produção de hemoderivados. A princípio, em quanto a Hemobrás não finaliza as obras totais para a construção da fábrica, o LFB é responsável em receber os plasmas coletados no Brasil e devolver em produtos hemoderivados (Hemobrás, 2013).

Todos os hemoderivados obtidos a partir dessa parceria com o LFB são destinados à população brasileira diretamente ao SUS (Serviço Único de Saúde) sem nenhuma comercialização permitida por parte desses produtos. Essa parceria prevê o envio anual de 150.000 L de plasma, por parte do Brasil, para fabricação de albumina, imunoglobulina, fator VIII e fator IX de coagulação. Albumina humana e a imunoglobulina humana são os principais produtos da Hemobrás obtidas através dessa parceria com o LFB. A albumina é utilizada em pessoas com cirrose, queimaduras, em pacientes sob terapia intensiva e outros. Já as imunoglobulinas são usadas no tratamento

em pessoas com AIDS, deficiências imunológicas, doenças autoimunes e infecciosas (Hemobrás, 2013).

A tecnologia adotada pelo LFB para a produção de hemoderivados e posterior envio para a Hemobrás se baseia no método do fracionamento etanólico de Cohn (Cohn *et al.*, 1946). Tecnologia bem antiga, porém muito utilizada nas fábricas especializadas para a produção de hemoderivados. Em resumo, as proteínas do plasma são precipitadas após o adicionamento crescente de etanol ao plasma. Com a diminuição da solubilidade ocorre a precipitação das proteínas. Esse procedimento está associado a técnicas cromatográficas, inativação viral e nanofiltração (Cohn *et al.*, 1946; Yokoyama *et al.*, 2004; Bertolini *et al.*, 2012).

O Brasil gasta em torno de 800 milhões à 1 bilhão de reais com importação de hemoderivados para fornecer as redes públicas e privadas. Em relação ao custo da fábrica da Hemobrás especula-se que 855 milhões de reais serão gastos ao todo. As previsões mais otimistas se baseiam que, em no máximo quatro anos, o Brasil reduzirá a dependência desses tipos de medicamentos, de acordo com o então ministro da saúde Alexandre Padilha (Hemobrás, 2013).

Observa-se que a maioria das plantas de fábricas para produção de hemoderivados se baseiam em processos mistos de purificação por precipitação, de acordo com o método de Cohn (Cohn *et al.*, 1946), e por métodos cromatográficos. O Instituto Butantan, como mencionado anteriormente, está com a proposta de utilizar apenas técnicas cromatográficas para a produção de hemoderivados. Logo, surge o questionamento “Por que as demais fábricas não adotam exclusivamente processos cromatográficos para a purificação de proteínas?” Seria devido a possível inviabilidade econômica, porém se for por esse motivo, então por qual razão o Instituto Butantan tem intensificado pesquisas nessa área? A verdade é que muito se tem estudado na literatura sobre técnicas cromatográficas voltadas para a purificação de proteínas, porém pouco se tem implementado em grandes fábricas de produção de hemoderivados.

A seguir, serão abordadas as principais técnicas cromatográficas utilizadas para adsorção/purificação de proteínas do soro humano, bem como abordado sobre trabalhos voltados para essa área de pesquisa, evidenciando o alto grau de importância no uso de técnicas cromatográficas para esse fim, a nível acadêmico.

2.3 Importância da Cromatografia na Purificação de Proteínas

Na literatura facilmente é encontrado inúmeros trabalhos publicados com a proposta de purificação de proteínas do soro humano (Odabaşı e Denizli, 2004; Bayramoğlu *et al.*, 2005; Bayramoğlu *et al.*, 2006; Yavuz, Akgol, *et al.*, 2006; Bayramoğlu *et al.*, 2007a; Bayramoğlu *et al.*, 2007b; Wongchuphan *et al.*, 2009; Gondim *et al.*, 2012; Gondim *et al.*, 2014). 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.

2.3.1 Cromatografia por Troca Iônica (CTI)

A cromatografia por troca iônica está relacionada com as interações do tipo reversível entre as cargas da superfície da matriz cromatográfica com cargas superficiais opostas da proteína alvo. As resinas trocadoras de íons podem ser catiônicas ou aniônicas, dependendo do grupo funcional principal da resina. Resinas catiônicas apresentam cargas negativas em sua superfície, normalmente devido à presença de grupos sulfônicos, logo possuem preferência por biomoléculas que estejam carregados positivamente. As resinas aniônicas, por sua vez, apresentam cargas positivas em sua superfície, normalmente devido à presença de grupos aminos, logo, possui preferência por biomoléculas que estejam carregadas negativamente (Cunico *et al.*, 1998; Healthcare, 2004).

As resinas trocadoras de íons podem ser classificadas em forte ou fraca, tal classificação não se refere à intensidade em que os grupos funcionais da resina se ligam as proteínas e sim com relação a sua facilidade em manter sua capacidade com alteração do pH. Por exemplo, resinas de troca iônica forte não apresentam variação da sua capacidade devido a variações do pH, logo não há ganho nem perda de prótons. Em contra partida, as resinas de troca iônica fraca são suscetíveis a perda ou ganho de prótons devido a variação do pH, logo variando sua capacidade (Healthcare, 2004).

Existem muitas resinas comerciais específicas para purificação de proteínas, tanto catiônicas como aniônicas. As resinas Hitrap Capto S e Hitrap Q FF são comercializadas pela empresa Ge Healthcare e são bons exemplos de resina catiônica forte e aniônica fraca, respectivamente.

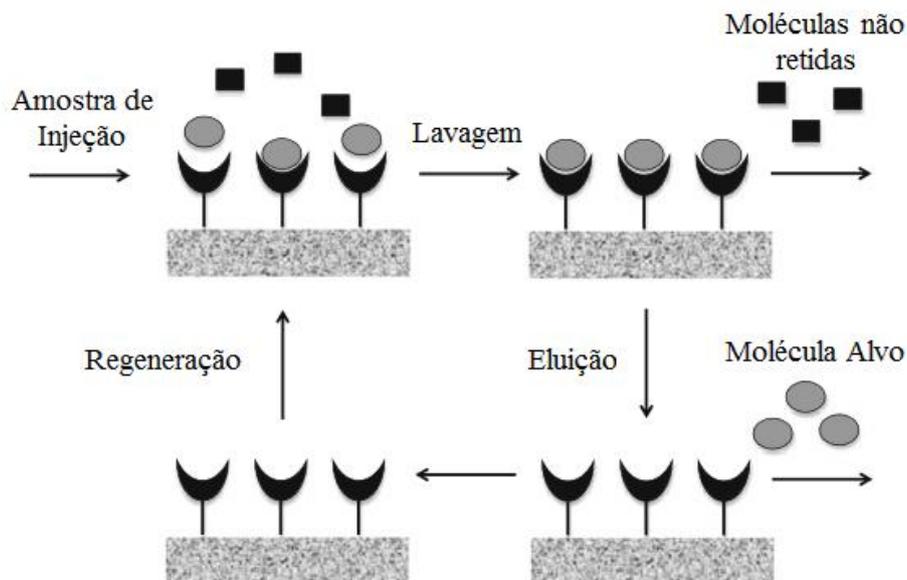
As proteínas, biomoléculas de maior interesse de purificação, podem apresentar carga líquida aparente positiva ou negativa a depender do ponto isoelétrico (pI) desta proteína e da solução de pH a qual esta dissolvida. O ponto isoelétrico de uma proteína corresponde ao pH da mesma onde não há predominância de cargas, portanto a proteína assume carga líquida zero. Todavia, quando se trabalha em pH abaixo do pI da referida proteína, a mesma terá em sua superfície cargas predominantemente positivas e portanto maior interação com resinas catiônicas. Logo, quando as proteínas estão diluídas em pH acima do seu pI, ela apresentará cargas predominantemente negativas e portanto interações mais significativas com resinas aniônicas.

Diversos adsorventes podem ser utilizados como resinas trocadoras de íons, dos quais se destacam como trocadores moderados de íons os hidróxidos duplos lamelares (HDL). Outro material que também se caracteriza por interagir com biomoléculas por interações iônica são as sílicas mesoporosas do tipo SBA 15. Grande diferença entre esses dois materiais citados é que a SBA 15 se caracteriza por apresentar elevadas áreas superficiais e diâmetro médio de poro, logo além das interações do tipo iônicas presente na adsorção de proteínas, há a capacidade de esses materiais adsorverem biomoléculas em sua superfície devido a essas características.

2.3.2 Cromatografia de Afinidade

Cromatografia de afinidade é uma técnica de separação bioquímica que proporciona uma interação reversível entre o ligante e a proteína de interesse, conforme pode ser observado pela Figura 2.3. Essa alta especificidade de ligação proporcionada pelo ligante é explorada para adsorção seletiva de proteínas alvo em uma mistura complexa de proteínas a qual pode ser eluída utilizando competidores análogos, agentes desnaturantes ou simplesmente ajustando alguns fatores, como pH, força iônica ou polaridade (Denizli e Pişkin, 2001; Wu *et al.*, 2006; Ayyar *et al.*, 2012).

Figura 2.3 Esquema simplificado para a cromatografia de Afinidade



Fonte: adaptado com modificações de Pfaunmiller e colaboradores (2013)

A cromatografia de afinidade oferece significativa vantagem para a purificação de anticorpos e fragmentos de anticorpos, para qualquer fonte de proteínas (Ayyar *et al.*, 2012; Healthcare, 2014). Quando há uma interação imuno-específica, a cromatografia de afinidade é frequentemente a primeira e muitas vezes o único método necessário (Healthcare, 2014).

A cromatografia de afinidade possibilita alta seletividade, e usualmente, alta capacidade para com a proteína alvo (Healthcare, 2014). Alguns fatores são extremamente importantes para obtenção de elevados níveis de produtividade e pureza, os quais podem citar: o tipo de ligante empregado e a matriz utilizada (Ayyar *et al.*, 2012).

2.3.2.1 Matrizes Cromatográficas

Em cromatografia de afinidade uma adequada matriz é fundamental, pois esta atua como suporte para o ligante de afinidade. Portanto, as características a seguir são indicadas para uma boa matriz: ser uniforme, macroporosa, hidrofílica, mecânica e quimicamente estável, seletiva, insolúvel no solvente utilizado na purificação e fornecer grande área superficial para o ligante (Ayyar *et al.*, 2012).

As matrizes cromatográficas frequentemente utilizadas em cromatografia de afinidade podem ser divididas em: naturais, sintéticas e inorgânicas. Esferas de agarose, dextrose e celulose são consideradas matrizes naturais e fornecem a maioria das características mencionadas anteriormente para uma boa matriz cromatográfica. Acrilamida (Verdoliva *et al.*, 2002), poliestireno (Staak *et al.*, 1996) e derivados de polimetacrilatos (Roberts *et al.*, 2009) são exemplos de matrizes sintéticas. Enquanto que as sílicas porosas (Xi e Wu, 2004) podem ser exemplos de matrizes inorgânicas.

2.3.2.2 Ligantes de Afinidade

Na cromatografia de afinidade há a necessidade da utilização de ligantes que possibilitem certa estabilidade e interação específica com a proteína de interesse (Ayyar *et al.*, 2012). O crescente interesse no estudo de purificação de proteínas tem intensificado consideravelmente nas últimas décadas, conseqüentemente, inúmeros tipos de ligantes são frequentemente mencionados nas mais diferentes matrizes cromatográficas. Uma grande variedade de moléculas funcionais, incluindo enzimas, coenzimas, cofatores, anticorpos, proteínas e ácidos nucleicos podem ser utilizados como ligantes na concepção de novos adsorventes (Denizli e Pişkin, 2001). Os ligantes de afinidade, em geral, apresentam certas características como: afinidade pela biomolécula alvo, especificidade, viabilidade para imobilização, proporcionar certa estabilidade em condições drásticas nas etapas de lavagem e eluição, além de manter sua capacidade de ligação com a biomolécula alvo após sua imobilização (Ayyar *et al.*, 2012). Os ligantes podem ser classificados em ligantes bioespecíficos, ligantes pseudobioespecíficos.

2.3.2.2.1 Ligantes Bioespecíficos

Ligantes bioespecíficos apresentam como vantagem sua elevada afinidade pela biomolécula alvo, sendo esses os principais ligantes utilizados na cromatografia de afinidade. Entretanto, sua principal desvantagem se deve a necessidade de condições drásticas na etapa da eluição, possibilitando possíveis contaminações da proteína eluída (Vijayalakshmi, 1989)

Ligantes bioespecíficos tais como as proteínas A, G e L tem sido investigados devido a sua elevada afinidade por domínios específicos da IgG e os primeiros trabalhos reportados foram na década de 70 (Marchalonis *et al.*, 1978). Esses ligantes são frequentemente utilizados em cromatografia de afinidade e tais ligantes são isolados das paredes das bactérias *Staphylococcal protein A* (SpA), *Streptococcal protein G* (SpG) e *Peptostreptococcus magnus*, respectivamente, identificados como proteínas A, G e L.

As lectinas, antígenos, anti-anticorpos são outros tipos de ligantes de bioafinidade empregados na cromatografia de afinidade, normalmente, quando as proteínas A, G e L não são eficientes (Ayyar *et al.*, 2012).

2.3.2.2.2 Principais ligantes pseudobioespecíficos

Por outro lado, os ligantes pseudobioespecíficos (íons metálicos quelatados, ligantes tiofílicos, corantes, aminoácidos), apresentam normalmente média afinidade para proteínas do soro e têm se mostrado seletivo para a purificação de albumina e imunoglobulina humanas (Vijayalakshmi, 1989).

Os ligantes pseudobioespecíficos possuem como grande vantagem condições mais amenas nas etapas de eluição, por a interação entre proteína-ligante ser com menor intensidade comparada aos ligantes bioespecíficos. Logo, o produto eluído com a proteína alvo tem menor possibilidade de contaminação. Em muitos casos esse tipo de ligante é recomendado para purificação de proteínas, não apenas pelas condições mais amenas na eluição, como também pelo seu menor custo, quando comparado aos ligantes bioespecíficos (Denizli e Pişkin, 2001; Ayyar *et al.*, 2012).

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; Yavuz, Akgol, *et al.*, 2006). Vários trabalhos são reportados na literatura utilizando ligantes corantes em cromatografia de afinidade com matrizes a base de quitosana, resinas, alguns tipos de polímeros metacrilatos, como poderá ser observado a seguir.

Odabasi e Denizli (2004) estudaram a adsorção de albumina do soro humano (HSA) utilizando esferas de hidroxietil metacrilato (mPHEMA) com o corante Cibacron Blue F3GA imobilizado. Foi observado que no pH 5,0, próximo ao ponto

isoeletrico (pI) da HSA, ocorreu maior adsorção. Os autores observaram o ganho de capacidade de adsorção ao utilizar o ligante acoplado a matriz, com um aumento da capacidade de adsorção de 1,8 mg HSA/g para 94,5 mg HSA/g. Tais resultados mostraram que o corante Cibacron Blue F3GA pode atuar de forma eficiente na adsorção de HSA e que as condições do meio, pH, tampão, concentração salina, são parâmetros essenciais a serem definidos. Para os resultados de adsorção com amostras do soro humano verificou-se capacidade de adsorção de 138,3 mg/g para albumina e para as proteínas fibrinogênio e g-globulina foram de 2,8 e 6,5 mg/g, respectivamente. Os autores verificaram que a dessorção de HSA foi elevada, em torno de 98% da HSA adsorvida.

Outro estudo interessante, porém para adsorção de IgG e suas subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄), foram realizados por Yavuz e colaboradores (2006), onde os autores utilizaram como adsorvente, o polímero hidroxipropil metacrilato (poli(HPMA)) com o corante reativo verde 5 imobilizado. Esses autores observaram a grande vantagem de se utilizar o reativo verde 5 como ligante, pois ao comparar a adsorção de IgG com e sem corante imobilizado ao poli(HPMA) obteve-se um aumento de 0,5 mg/g (sem corante) para 71 mg/g (com corante) de IgG adsorvida. Foi estudado o efeito do pH do tampão fosfato na adsorção e verificou-se que ocorreu adsorção em toda a faixa de pH estudado, porém o pH de maior adsorção foi 7,0, ainda no interior da faixa de pI da IgG. Esses autores argumentaram que a afinidade entre as moléculas de IgG e o corante foram devido as interações hidrofóbicas e eletrostáticas. O aumento da concentração do sal no meio não favorece a adsorção de IgG. Os autores observaram certa preferência desse adsorvente por IgG do isotipo 2 (IgG₂) em relação as outras subclasses. A capacidade do reuso desse adsorvente também foi avaliada e observou-se que após 10 ciclos de adsorção-dessorção a redução da capacidade foi de 11%, com relação a quantidade de IgG adsorvida no primeiro ciclo.

No trabalho de Bayramoglu e colaboradores (2007a), os autores estudaram a adsorção de IgG utilizando a matriz de membranas do polímero hidroxietil metacrilato com o corante reativo verde 5 imobilizado em sua superfície. Os autores avaliaram os efeitos da variação do pH, da força iônica, da concentração inicial de IgG em função da temperatura e estimaram os parâmetros no equilíbrio da adsorção por modelos matemáticos. O pH que proporcionou maiores quantidades adsorvidas de IgG foi o 6,0 devido as interações eletrostáticas entre cargas positivas de IgG e cargas negativas da matriz com o ligante. Em relação à influência da concentração salina, os autores

observaram que o aumento da concentração salina não favoreceu a adsorção, possivelmente devido a forte concorrência do sal com a IgG pelos sítios livres do adsorvente e pela diminuição das forças eletrostáticas entre a IgG e a matriz com corante imobilizado. Os autores constataram que com o aumento da temperatura, a adsorção de IgG nesse material é favorecida e que as interações hidrofóbicas são mais efetivas para adsorção de IgG. Na literatura é mencionado que se a interação entre a proteína e o ligante envolver uma interação hidrofóbica significativa, a área superficial de contato entre a proteína e o adsorvente é aumentada em altas temperaturas, resultando em uma maior afinidade da proteína pelo adsorvente. Os modelos de Langmuir e Freundlich correlacionaram satisfatoriamente com os dados experimentais. Para ambos os modelos o parâmetro da constante de dissociação (K_D), ao qual mensura a estabilidade do complexo entre a proteína e o adsorvente, indicou que o adsorvente possui média afinidade pela proteína e pode ser classificado como corante ligante devido a sua ordem de grandeza de 10^{-6} M. Nesse trabalho foram realizados estudos da purificação de IgG a partir do soro humano em sistemas de batelada e determinou-se por HPLC a pureza e a quantidade de IgG adsorvida. A pureza determinada na eluição foi de 81% com recuperação de 67%. Notou-se que possivelmente ocorreu repulsão de cargas entre a proteína HSA (pI 4,9) e o adsorvente, pois ambos estão carregados negativamente no pH 6,0.

Wongchuphan e colaboradores (2009) realizaram um estudo para adsorção de IgG de coelho por cromatografia de afinidade com quatro ligantes corantes (Reativos Marrom 10, Vermelho 120 e Verde 5, além do Cibacron Blue F3GA) diferentes imobilizados na matriz da resina comercial *Streamline*. Essa resina *Streamline* é uma linha de adsorventes aplicada para cromatografia de adsorção em leito expandido. O adsorvente com reativo verde 5 imobilizado apresentou capacidade de adsorção de IgG de coelho superior em relação aos outros três corantes ligantes imobilizados na resina. Os autores realizaram um estudo do efeito da variação do pH na adsorção de BSA e IgG de coelho. Para BSA, o pH de maior adsorção foi 4,0 e para IgG de coelho foi 6,0, porém nesse pH 6,0 ocorre considerável adsorção de BSA. Por isso os autores escolheram trabalhar no pH 7,0 (baixa adsorção de BSA) e no pH 9,0 (adsorção praticamente nula de BSA). O efeito da temperatura na adsorção de IgG de coelho não foi muito conclusivo, pois não apresentou variações consideráveis na adsorção. Na temperatura de 25 °C, a adsorção de IgG de coelho foi um pouco superior as demais temperaturas (5, 15 e 37 °C). Na literatura é mencionado que para adsorção de proteínas

as interações hidrofóbicas são mais efetivas em temperaturas altas. A adsorção de IgG de coelho diminuiu com o aumento da concentração do sal. Os autores argumentaram que as interações eletrostáticas entre as moléculas de IgG de coelho e as cargas negativas das esferas devem estar influenciando no comportamento do adsorvente desfavorecendo a adsorção de IgG de coelho com o aumento da concentração do sal. Foram utilizados três modelos de isothermas de adsorção (Langmuir, Langmuir-Freundlich e Freundlich) e o modelo de Langmuir não foi adequado para representar os dados experimentais devido a suas restrições para sistemas de adsorção homogêneos. A constante de dissociação foi baixa (K_D de 0,9 pelo modelo de Langmuir-Freundlich) demonstrando a alta afinidade do adsorvente por IgG de coelho. Esses autores também apresentaram resultados dessa resina com Reativo Verde 5 imobilizado, em solução de IgG e BSA, e constataram que 64% das proteínas adsorvidas foram IgG de coelho.

Outros trabalhos podem ser encontrados na literatura com o uso de corantes como ligantes pseudobiospecíficos para purificação de imunoglobulinas humanas. Gondim e colaboradores (2012) 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. Os autores evidenciaram que o ligante mostrou significativa seletividade por IgG e através de análises de eletroforese, após a dessorção, foi evidenciado que as amostras da eluição apresentaram predominantemente IgG, porém traços de HSA também foi observado. Outros autores já relataram que esse corante pode apresentar afinidade tanto por IgG como por HSA e a escolha das condições seria determinante para aumentar a seletividade por uma dessas proteínas. Mais recentemente, Gondim e colaboradores (2014) realizaram um novo estudo visando a purificação de IgG humana, a partir de amostras do soro humano, 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.

2.3.2.2.3 Outros ligantes pseudobiospecíficos

Um pequeno grupo de peptídeos composto por histidina no terminal-N seguido de aminoácidos aromáticos carregados positivamente têm apresentado alta afinidade por IgG (Yang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2009; Lund *et al.*, 2012). Esses

ligantes apresentam alta especificidade, estabilidade e baixo custo, logo, podem ser outra possível alternativa frente aos ligantes bioespecíficos para purificação de anticorpos (Huang e Carbonell, 1999; Wang e Carbonell, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Um grupo de ligantes denominados biomiméticos foi gerado para simular ligantes naturais com principal propósito na purificação de proteínas. Fassina e colaboradores (1996) procuraram selecionar, através de uma biblioteca de dados de peptídeos, uma composição de peptídeos que fornecesse capacidade de reconhecer a parte Fc das imunoglobulinas, tal como a proteína A possui.

Zhao e colaboradores (2014a) desenvolveram uma estratégia para o desenho biomimético de ligantes peptídicos para utilização na cromatografia de afinidade. Os autores utilizaram como modelo, o complexo formado pela interação proteína A e IgG, e a partir daí, através de acoplamento molecular, construíram um banco de dados com quinze possíveis ligantes peptídicos candidatos para purificação de IgG. Através de simulações moleculares confirmaram que 14 dos quinze peptídeos selecionados apresentaram alta afinidade por IgG. Então, selecionaram dois peptídeos para realização de dados experimentais e confirmaram que o tipo de ligação foi por interações eletrostáticas incluindo pontes de hidrogênio. Um desses dois peptídeos selecionados, nomeado de FYWHCLDE, apresentou capacidade de 56,1 mg de IgG/g peptídeo, com constante de dissociação na ordem de 10^{-6} M. Por fim, mostraram que tal ligante pode ser utilizado na purificação de IgG, a partir de amostras do soro humano, em uma única etapa com pureza de 90% e produtividade e recuperação de 87%.

No mesmo período de 2014, Zhao e colaboradores (2014b) utilizaram o mesmo ligante peptídico (FYWHCLDE), identificado no trabalho anterior (2014a), acoplado ao gel de sepharose em quatro densidades distintas. Compararam a adsorção de BSA e IgG por essa resina (FYWHCLDE-sepharose) e constataram que essa resina apresentou de 30-40 vezes capacidade superior de IgG frente BSA nos experimentos em batelada. Os autores afirmaram que o gel FYWHCLDE-sepharose obtido pode ser usado para purificação de IgG a partir do soro humano ou de anticorpos monoclonais de culturas de células sobrenadante com alto grau de pureza e em uma única etapa de purificação. Ainda em 2014, Zhao e colaboradores (2014c) identificaram mais dois octapeptídeos e acoplaram ao gel de sepharose, em seguida realizaram uma ampla investigação das melhores condições para adsorção de IgG. Essas resinas formadas apresentaram elevada seletividade por fragmentos Fc com sítios de ligação similares aos obtidos quando usado Proteína A, como ligante de afinidade. Os autores afirmaram que

essas resinas estudadas podem ser utilizadas para captura e purificação de anticorpos policlonais e monoclonais de soro humano com elevado grau de pureza, próximo de 95%.

Como continuidade aos trabalhos de Zhao supracitados, Xue e colaboradores (2016) investigaram os peptídicos que não haviam sido estudados, no total de onze, para continuar a procura por mais ligantes peptídeos que proporcionassem alta afinidade por IgG. Os autores prepararam géis peptídicos com sepharose e realizaram ensaios cromatográficos em coluna conectada ao sistema AKTA purifier. A afinidade dessas resinas foram investigadas em um ampla faixa de pH, onde duas dessas resinas se destacaram (FYCHWQDE e FYCHNQDE) apresentando alta afinidade por IgG, sendo estas promissoras na aplicação em purificação e separação de IgG de amostras do soro humano.

2.3.3 Outras técnicas cromatográficas por afinidade

A partir da cromatografia de afinidade, outras técnicas baseadas no mesmo princípio, podem ser utilizadas para purificação de proteínas: Cromatografia Negativa, Cromatografia de Afinidade com Íons Metálicos Imobilizados (IMAC), Cromatografia de Afinidade com Monólitos, Cromatografia com Hidroxiapatitas, Cromatografia com Criogéis, dentre outras.

2.4 Purificação de Proteínas em Sistemas Contínuos

Até o presente momento foi dado ênfase aos processos de purificação de proteínas em sistema cromatográfico simples com utilização apenas de uma coluna cromatográfica. Entretanto, há a possibilidade de realizar estudos de purificação em sistema contínuo possibilitando maximizar os parâmetros de produtividade, rendimento e consumo de solvente. Recentemente, o grupo de pesquisa do prof. Dr. Massimo Morbidelli na ETH Zurich desenvolveu um sistema cromatográfico em operação contínua com até duas colunas cromatográficas. Esse sistema foi denominado de “Contichrom” comercializado pela empresa alemã Knauer. O grupo do professor Massimo Morbidelli é um dos únicos grupos de pesquisa que tem publicado recentemente trabalhos com esse sistema (Ströhlein *et al.*, 2006; Morbidelli, 2009; Voitl *et al.*, 2010; Krättli *et al.*, 2011; Müller-Spáth *et al.*, 2011; Angarita *et al.*, 2015; Guélat

et al., 2016; Pfister *et al.*, 2016; Steinebach *et al.*, 2016) visando purificação de proteínas do soro humano.

O Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção (GPSA), recentemente adquiriu esse sistema através de um projeto vinculado a Universidade Federal do Ceará. Este complexo sistema está possibilitando grandes avanços na área de pesquisa associada à purificação de proteínas em sistema contínuo e acredita-se que em um curto período de tempo publicações de alto impacto na comunidade acadêmica serão observados. A Figura 2.4 apresenta uma visão geral do sistema Contichrom instalado nas dependências de um dos laboratórios do GPSA.

Figura 2.4 - Visualização do sistema Contichrom instalado no GPSA (Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção)



Fonte: Próprio autor

Esse sistema é composto por: dois detectores UV, 6 válvulas, 3 bombas, sendo que uma delas é específica para o gradiente de eluição, conforme pode ser observado na Figura 2.5. Além disso, possui um coletor de fração, um degaseificador, um condutivímetro e leitor de pH e um computador com o software “ChromIQ” instalado. Este software possui diferentes métodos de operação disponíveis e será abordado no próximo tópico.

Figura 2.5 - Composição principal do sistema Contichrom



Fonte: Manual do Contichrom

O monitoramento do Contichrom se dá através do programa ChromIQ. Nesse programa há quatro métodos disponíveis: “Batch Wizard, MCSGP (do inglês, *Multi-Column Solvent Gradient Purification*), CaptureSMB e N-Rich”. Exceto o método “Batch Wizard”, todos os demais são específicos para operação do sistema em modo contínuo. A complexidade da sua amostra de estudo e o tipo de método cromatográfico escolhido a ser utilizado serão fatores determinantes para a correta escolha do método a ser selecionados.

O método “Batch Wizard” é o método mais simples e indicado principalmente para investigar a capacidade dinâmica da coluna a ser utilizada. Nesse método há a necessidade do uso de apenas uma única coluna. Através desse método facilmente pode realizar ensaios cromatográficos com as mais diversas resinas cromatográficas. É imprescindível a realização de ensaios utilizando esse método antes da utilização dos métodos de operação contínua.

O método “MCSGP” é para um processo cromatográfico contínuo capaz de proporcionar simultaneamente, um produto com elevada pureza e produtividade (Aumann e Morbidelli, 2007; Morbidelli, 2009). Essa vantagem se deve ao fato do processo possibilitar uma etapa de reciclagem de frações que apresentam parcialmente o produto de interesse. Esse método é indicado para soluções de injeção que apresentem no mínimo três biomoléculas com interações distintas para com a resina. MCSGP apresenta resultados satisfatórios aplicados em vários processos utilizando resinas trocadoras de íons, como na purificação de peptídeos (Aumann e Morbidelli, 2007; Aumann *et al.*, 2007), separação de anticorpos monoclonais (Muller-Spath *et al.*, 2008) e purificação de anticorpo monoclonal de culturas de células de sobrenadante (Muller-Spath *et al.*, 2010).

O método “CaptureSMB” é para um processo contínuo que utiliza uma configuração com duas colunas que alterna a alimentação e eluição entre as colunas. Assim, todo o produto a partir de uma corrente de alimentação contínua é capturado e toda a resina de afinidade disponível é utilizada de forma eficiente.

O método N-Rich é recomendado para processos em modo contínuo quando a biomolécula de interesse está presente em baixas concentrações na amostra de injeção. Portanto, esse é um método que tem por finalidade concentrar a biomolécula alvo. É um processo de descoberta e desenvolvimento de produto, não destinado à produção rotineira. O componente alvo é reciclado internamente até ter uma concentração satisfatória enquanto a concentração de outros componentes é diminuída.

3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES CROMATOGRÁFICAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR CTI

3.1 Objetivos

Os objetivos deste tópico foram:

Sintetizar os HDL contendo Al^{3+} , como cátion trivalente, e Mg^{2+} ou Zn^{2+} , como cátions divalentes com razões molares Mg/Al e Zn/Al de 3 e 2, respectivamente, sendo o carbonato (CO_3^{2-}) o ânion interlamelar.

Sintetizar as sílicas mesoporosas do tipo SBA 15 sem e com modificação pela incorporação de átomos de zircônio na síntese, fornecendo materiais com diferentes razões molares de Si/Zr (5, 10 e 20).

Realizar a caracterização dos adsorventes, antes e após a adsorção, por: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios X (DR-X) e isotermas de N_2 à $-196\text{ }^\circ\text{C}$. Além disso, determinar a distribuição dos tamanhos de partículas e o ponto de carga zero (pH_{ZPC}) dos materiais estudados.

Realizar ensaios em batelada com esses adsorventes para adsorção das proteínas modelos IgG e HSA, a fim de averiguar a influência do pH, cinética e isotermas de adsorção.

Realizar ensaios em bateladas com misturas das proteínas IgG e HSA em diferentes proporções e com o soro humano a fim de avaliar o real potencial destes materiais na purificação de IgG humana.

Analisar por eletroforese SDS-PAGE as amostras coletadas, antes e após a adsorção, a fim de identificar e avaliar o potencial desses adsorventes na purificação dessas proteínas.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Reagentes

O soro humano do tipo AB, os padrões de proteínas de alta pureza (IgG humana e HSA), e os reagentes ácido morfolinopropano sulfônico (MOPS), ácido hidroxietilpiperazina etano sulfônico (HEPES), Trizma-base (TRIS), Coomassie Brilliant Blue, 1,3,5-Trimetilbenzeno (TMB), tetraetilortosilicato (TEOS), copolímero tribloco Plurônio P123 (PEO20PPO70PEO20) e HCl foram adquiridos da Sigma-Aldrich, USA. Albumina do soro bovino (BSA) foi obtida da Inlab, os reagentes $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, $(Al(NO_3)_3) \cdot 9H_2O$, $NaHCO_3$ e o NH_4F da Vetec, Brasil. O marcador de alta massa molar contendo as seguintes proteínas: miosina 212 kDa, α_2 -macroglobulina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica 53 kDa, foi adquirido da GE Healthcare (EUA). Os outros reagentes utilizados foram todos de grau analítico e para a preparação de todas as soluções utilizou-se a água ultrapura Mili-Q (Millipore, EUA).

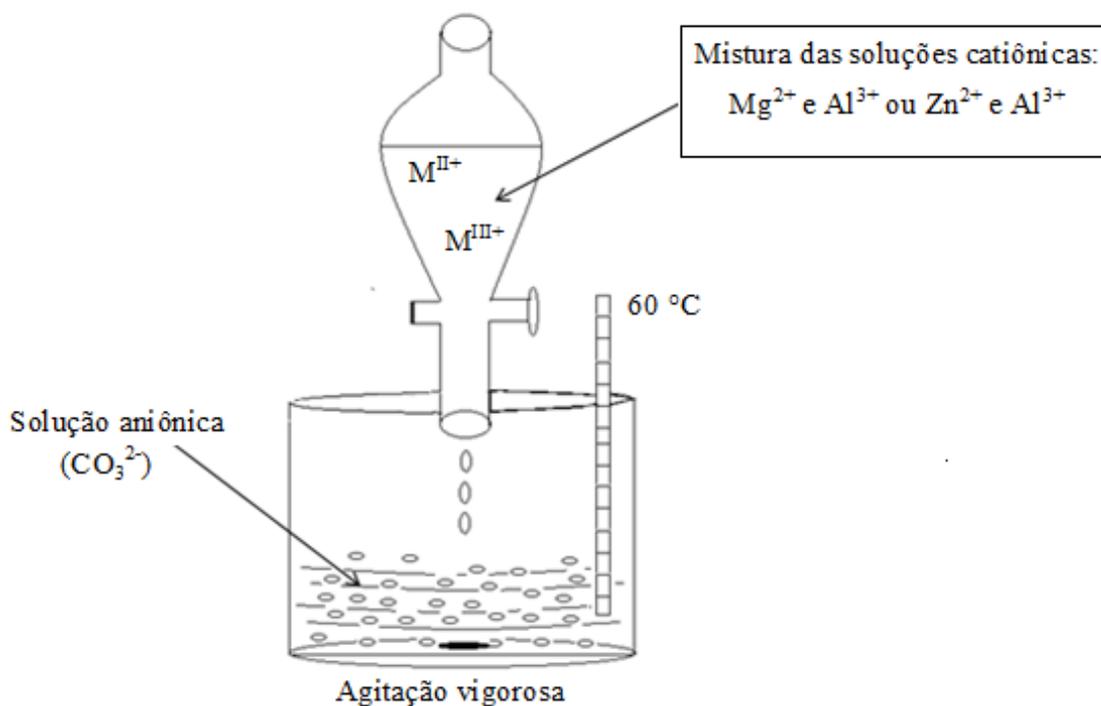
3.2.2 Sínteses dos Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL)

Síntese do HDL por coprecipitação a pH variável: os HDL foram preparados pelo método de coprecipitação de acordo com a metodologia de Cavani e colaboradores (1991) e adaptada por Aguiar e colaboradores (2013). A Figura 3.1 apresenta um desenho esquemático do aparato experimental utilizado para mistura e agitação dos reagentes.

Síntese do Mg/Al-HDL (razão molar Mg/Al de 3:1): para a síntese do Mg/Al-HDL, inicialmente, o nitrato de magnésio $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,0996 mol) e o nitrato de alumínio $(Al(NO_3)_3) \cdot 9H_2O$ (0,0332 mol) foram dissolvidos em 100 mL de água ultrapura e adicionado gota a gota a 100 mL de solução contendo 0,249 mol/L de $NaHCO_3$ a 60 °C, sob agitação vigorosa. Em seguida, a solução foi mantida a 80 °C durante 4 dias e, posteriormente, agitada à temperatura ambiente durante 12 h. O precipitado de HDL foi filtrado e lavado com água deionizada até pH 7. Finalmente, o material foi seco a 80 °C durante 24 h e estocado a temperatura ambiente.

Síntese do Zn/Al-HDL (razão molar Zn/Al de 2:1): a síntese do Zn/Al-HDL foi realizada de forma similar ao Mg/Al-HDL. Inicialmente, o cloreto de zinco $ZnCl_2$ (0,0614 mol) e o nitrato de alumínio $(Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O)$ (0,0307 mol) foram dissolvidos em 100 mL de água ultrapura e adicionado gota a gota a 100 mL de solução contendo 0,153 mol/L de $NaHCO_3$ a 60 °C, sob agitação vigorosa. Em seguida, a solução foi mantida a 80 °C durante 4 dias e, posteriormente, agitada à temperatura ambiente durante 12 h. O precipitado de HDL foi filtrado e lavado com água deionizada até pH 7. Finalmente, o material foi seco a 80 °C durante 24 h e estocado a temperatura ambiente.

Figura 3.1 – Aparato experimental da síntese de HDL



Fonte: elaborada pelo autor

3.2.3 Síntese das sílicas mesoporosas SBA 15

Foram sintetizadas SBA 15 com fluoreto e 1,3,5-trimetilbenzeno (TMB), denominadas de SBA 15-FTMB. Além dessa, foram sintetizadas SBA 15 modificadas com zircônio. Três razões molares (5, 10 e 20) de silício e zircônio (Si/Zr) foram utilizadas na síntese e os materiais foram chamados de: SBA 15-Zr5, SBA 15-Zr10 e SBA 15-Zr20.

A síntese hidrotérmica das sílicas mesoporosas do tipo SBA 15 foram realizadas conforme metodologia descrita por Fulvio e colaboradores (2005), com algumas

modificações. Inicialmente, o plurônio (P123) foi dissolvido em HCl (aq.) 1,7 M sob agitação magnética até dissolução completa do P123. Em seguida, o TMB foi adicionado, como agente expensor, para aumentar o tamanho dos poros. Após 30 minutos de agitação, foi incorporada a fonte de sílica (TEOS) gota a gota. O processo manteve-se sob agitação durante 24 h a 40 °C. Para o tratamento hidrotérmico, os materiais foram transferidos para um autoclave e aquecidos a 100 °C durante 72 h. No final do processo realizou-se a calcinação do material sob a temperatura de 550 °C por 6 h com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min.

A síntese hidrotérmica das SBA 15 com incorporação de átomos de zircônio foram realizadas conforme metodologia descrita por Fulvio e colaboradores (2005), com algumas modificações. Inicialmente, o plurônio (P123) foi dissolvido em HCl (aq.) 1,7 M sob agitação magnética até dissolução completa do P123. Em seguida, TMB foi adicionado, como agente expensor, para aumentar o tamanho do poro. Após 30 minutos de agitação, foi incorporada a fonte de sílica (TEOS) e de zircônio (propóxido de zircônio, $Zr(OCH_2CH_2CH_3)_4$, 70% em peso em solução em 1 propanol) gota a gota. O material foi preparado variando a razão molar de Si/Zr (5, 10 e 20). O processo manteve-se sob agitação durante 24 h a 40 °C. Para o tratamento hidrotérmico, os materiais foram transferidos para um autoclave e aquecidos a 100 °C durante 72 h. No final do processo realizou-se a calcinação do material sob a temperatura de 550 °C por 6 h com uma taxa de aquecimento de 1 °C/min.

3.2.4 Caracterizações químicas e estruturais dos materiais

Difração de Raio-X (DR-X): padrões de difração em pó foram coletados no difratômetro automatizado Philips X'Pert Pro MPD equipado com Ge (1 1 1) monocromador primário, estritamente monocromática $CuK\alpha$ ($\lambda = 0,1542$ nm) e um detector X'Celerator, operando a uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 40 mA. Para realização das análises, os pós foram colocados na cavidade de um suporte utilizado como porta amostra. Os espectros obtidos varreram as faixas de 1 a 70 °. A velocidade de varredura foi de 0,5 ° por minuto. O tamanho dos cristais dos materiais e os parâmetros da estrutura foram estimados usando o método Williamson-Hall para ajustar o perfil de difração. Parâmetros cristalográficos foram obtidos a partir do método de Rietveld usando o software X'Pert HighScore Plus.

Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR): os espectros de FTIR foram obtidos com o FTIR 8400S Shimadzu com detector de mid-IV DTGS padrão. Todos os espectros foram obtidos na faixa de 400-4000 cm^{-1} utilizando um espectro de KBr como branco.

Isoterma de N₂ a -196 °C: a caracterização estrutural foi realizada por isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a -196 °C com um sistema automático ASAP 2000. Antes das medições, as amostras foram desgaseificadas a 200 °C e 10⁻⁴ mbar durante a noite. A área superficial específica foi calculada usando a equação de Brunauer-Emmet-Teller (BET) e uma seção transversal da molécula de nitrogênio de 16,2 Å (Brunauer *et al.*, 1938). O tamanho médio dos poros foi calculado pelo método BJH utilizando as isotermas de dessorção (Barrett *et al.*, 1951). O volume total dos poros foi calculado como o volume de nitrogênio adsorvido em $P/P_0 = 0,999$ (Rouquerol *et al.*, 1999).

Distribuição do Tamanho de Partículas: o tamanho das partículas foi determinado por difração a laser com o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK), utilizando água para dispersar as partículas.

Ponto de Carga Zero (pH_{ZPC}): inicialmente preparou-se 500 mL de uma solução de NaCl (0,01N), em seguida distribui-se essa solução em 10 beakers, cada um contendo o mesmo volume (50 mL) e pH aferido na faixa de 2 à 11. Posteriormente, foram pesadas 0,15 g de amostras de cada material e colocadas em contato com as soluções de NaCl e mantidas por 48 h. Após o período de 48 h em repouso foi realizado a medição dos pHs e plotado o gráfico da diferença entre $pH_{\text{inicial}} - pH_{\text{final}}$ vs pH_{inicial} (Ip *et al.*, 2010).

Potencial Zeta (ZPC): inicialmente colocou-se o adsorvente em contato em água ou em soluções tampões nas mesmas condições dos ensaios de adsorção. Os pH da água foram na faixa de 4,0 à 12,0, sendo ajustado com ácido (HCl) e base (NaOH) fracas quando necessário. Para cada 15 mg de HDL, 3 mL de solução (água ou tampão) foi submetida ao contato em um agitador rotatório por 2 h. Após 40 min de repouso, retirou-se o sobrenadante para verificar o pH final e em seguida analisar no equipamento Zeta Sizer da Malvern à fim de identificar a intensidade das cargas presentes no sobrenadante.

3.2.5 Experimentos de adsorção em batelada

Experimentos em batelada foram realizados em duplicata a 22 °C, a fim de determinar o efeito do pH, utilizando diferentes soluções tampões (Acetato de sódio (ACETATO), Fosfato de sódio (FOSFATO), MOPS, HEPES e TRIS-HCl), e as curvas de cinética e isotermas de adsorção com IgG e HSA nos materiais estudados. Para realizar tais ensaios, foi pesado uma massa de 15 mg de adsorvente e colocado em contato com 3,0 mL da solução de proteína em tubos de acrílico. Os tubos foram agitados em agitador orbital (Tecnal TE-165, Brasil) durante o tempo necessário para atingir o equilíbrio. Ao final de cada

experimento as amostras foram coletadas e centrifugadas em microcentrífuga refrigerada (CT-15000R CIENTEC) por 10 min com rotação igual a 10000 g e, em seguida, a absorbância de cada amostra foi lida. A concentração de cada proteína na fase líquida (sobrenadante) foi determinada por absorbância no UV-Vis da luz no comprimento de onda de 280 nm (UV-Vis Biomate 3, ThermoScientific, EUA).

A massa da proteína adsorvida por massa de adsorvente (mg/g), no estado do equilíbrio foi calculada usando o balanço de massa descrito pela equação 1:

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

em que C_0 e C_{eq} (mg/mL) são as concentrações iniciais e no equilíbrio na fase líquida, q (mg/g) é a quantidade de proteína adsorvida na fase sólida, m_{ads} (g) é a massa de adsorvente e V (mL) é o volume de solução da amostra.

Efeito do pH na adsorção de proteínas: soluções contendo IgG ou HSA foram preparadas por dissolução destas proteínas em soluções de tampão a 25 mM de forma a alcançar as seguintes faixas de pH: 4,0-5,6 para ACETATO; 6,0-8,0 para o FOSFATO; 6,5-7,9 para MOPS; 6,8-8,0 para o HEPES e 7,2-9,0 para o TRIS-HCl. Esses ensaios ocorreram sob agitação constante de 18 rpm.

Cinética e isoterma de adsorção: para os ensaios de cinética de adsorção foram preparadas soluções de proteínas (HSA ou IgG) com concentração de 1,0 mg/mL nos tampões estudados. Os ensaios de cinética de adsorção foram necessários para determinar o tempo necessário para ser alcançado o equilíbrio entre proteína-adsorvente. Os ensaios de isoterma de adsorção foram realizados com as proteínas cuja concentração inicial variou de 0,5 à 8,0 mg/mL. O tempo necessário para alcançar o equilíbrio para ambos os materiais foram variáveis.

Os modelos de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Henry, descritos pelas equações (2), (3) e (4), respectivamente, foram usados para ajustar aos dados experimentais usando o programa Origin®, Microcal, USA.

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

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

$$q = k_H C_{eq} \quad (4)$$

em que q_{\max} (mg/g) é a quantidade máxima de adsorção, C_{eq} (mg/mL) é a concentração de proteína em solução no equilíbrio, k_L , k_{LF} e k_H são as constantes de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Henry, respectivamente, a qual relacionam a interação entre a proteína e adsorvente, n é o coeficiente para o modelo de Langmuir-Freundlich, relacionado a heterogeneidade da superfície do adsorvente.

3.2.6 Ensaios de purificação com misturas de proteínas

A seguir serão detalhados três distintos casos de mistura de proteínas, a fim de avaliar possíveis seletividades da IgG frente a HSA ou vice-versa em processos em batelada. Observe que foi escolhido trabalhar com uma proporção de IgG superior a HSA (Caso III), bem como uma proporção de HSA superior a IgG (Caso I), esse caso seria mais próximo da proporção existente no soro humano, se desprezásemos as outras proteínas que compõe o soro. Além desses dois casos, outra proporção de mistura, caso II, também foi estudada. Esses três casos escolhidos foram similar aos estudados no trabalho de Dahrma e Jayasuriya (2013), onde os autores avaliaram a adsorção das proteínas albumina bovina (BSA) e hemoglobina bovina (BHb).

3.2.6.1 Preparo das soluções binárias (IgG e HSA)

Soluções binárias contendo as proteínas IgG e HSA em diferentes proporções de mistura (IgG/HSA) foram preparadas em três casos distintos definidos a seguir:

- *Caso I:* Soluções da mistura de proteínas contendo 25% de IgG e 75% de HSA.
- *Caso II:* Soluções da mistura de proteínas contendo 50% de IgG e 50% de HSA.
- *Caso III:* Soluções da mistura de proteínas contendo 75% de IgG e 25% de HSA.

Foram preparadas seis concentrações distintas da mistura de IgG e HSA para cada um dos três casos acima citado. A seguir, a Tabela 3.1 apresentará todas as soluções que

foram preparadas para os ensaios em batelada com os potenciais adsorventes para purificação de IgG humana. O tampão utilizado em todas as diluições foi o Tris/HCl nos pH 7,2 (Zn/Al-HDL) e 9,0 (SBA-15 FTMB). As soluções das misturas finais foram obtidos após a mistura das soluções monocomponentes de IgG e HSA, com mesmo volume, e concentração conforme a Tabela 3.1. Observe que para a concentração da mistura de 0,5 mg/mL do caso I foi necessário misturar uma solução de IgG (0,25 mg/mL) com a solução de HSA (0,75 mg/mL). Devido à soma dos volumes das soluções monocomponentes, a concentração final da mistura foi à metade do somatório das concentrações individuais.

Tabela 3.1 – Concentrações das soluções binárias de cada caso estudado

	CASO I		CASO II		CASO III	
	IgG	HSA	IgG	HSA	IgG	HSA
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	25	75	50	50	75	25

Concentração Mistura (mg/mL)	Concentração de IgG ou HSA (mg/mL)					
	IgG	HSA	IgG	HSA	IgG	HSA
0,5	0,25	0,75	0,50	0,50	0,75	0,25
1,0	0,50	1,5	1,0	1,0	1,5	0,50
2,0	1,0	3,0	2,0	2,0	3,0	1,0
4,0	2,0	6,0	4,0	4,0	6,0	2,0
5,0	2,5	7,5	5,0	5,0	7,5	2,5
6,0	3,0	9,0	6,0	6,0	9,0	3,0

Fonte: elaborada pelo autor

3.2.6.2 Determinação de proteínas no sistema binário

Primeiramente, preparou-se as soluções de IgG e HSA, conforme a Tabela 3.1. A concentração de cada solução (IgG ou HSA) foi quantificada a partir das leituras de absorvância no UV-Vis da luz no comprimento de onda de 280 nm (UV-Vis Biomate 3, ThermoScientific, EUA). Em seguida, misturou-se 5,0 mL de IgG com 5,0 mL de HSA totalizando 10,0 mL da mistura da solução final, conforme a Tabela acima. Devido IgG e HSA apresentar curvas de calibração distintas, houve a necessidade de realizar novas curvas de calibração, agora para as misturas preparadas de cada um dos casos estudados. Portanto, ao

final do preparo dessas soluções, três curvas de calibração foram preparadas e utilizadas para quantificar cada uma das soluções de mistura.

3.2.7 Ensaios de purificação com soro humano diluídas em Tris-HCl

As amostras de soro humano adquiridas da SIGMA apresentaram concentração próxima de 50 mg/mL e portanto, necessitaram ser diluídas em tampão (Tris/HCl) para obter as concentrações desejadas para os ensaios com concentrações de 1 à 6 mg/mL. A quantificação de proteínas do soro humano foi conforme metodologia descrita por Bradford (Bradford, 1976).

3.2.7.1 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais nas frações com soro humano foram determinadas de acordo com a metodologia de Bradford e utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) para a construção da curva analítica para este método, conforme reportado na metodologia descrita por Bradford (Bradford, 1976).

Primeiramente, preparou-se o reagente de Bradford dissolvendo-se 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol e a esta solução em agitação, adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico 85% e deixou em agitação por 2 h para em seguida completar o volume para 1,0 L com água ultrapura. Em seguida, deixou a solução sob agitação (mínimo de 6 h) e filtrou-se o reagente em frasco coberto com papel alumínio. O reagente de Bradford foi conservado em geladeira. Posteriormente, foi utilizada a proteína BSA para a obtenção da curva de calibração. Após o preparo do reagente de Bradford e da curva de calibração, deu início a quantificação das amostras dos ensaios de adsorção antes e após o contato. Logo, para cada 0,1 mL de amostra deixou-se em contato com 1,0 mL do reagente de Bradford por aproximadamente 10 min em cubetas de poliestireno em ambiente que proporcionasse ausência de luz. Após esse período, as leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, foram obtidos os valores de concentração de proteínas totais com a curva de calibração anteriormente estabelecida.

3.2.8 Eletroforese SDS-PAGE

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE) foi utilizada para determinação da análise das frações proteicas obtidas nos ensaios com a solução binária e com o soro humano, antes e após a adsorção. As análises foram realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando o gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida), conforme protocolo apresentado por Laemmli (1970), na concentração de 7,5%. As frações cromatográficas de cada etapa foram aquecidas a 100 °C por 10 min e alíquotas de 10 à 15 µL de cada amostra foram aplicadas aos géis. Os géis foram submetidos a uma voltagem de 150 V, em cubas verticais e a coloração foi realizada com o corante comassie brilhante blue.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

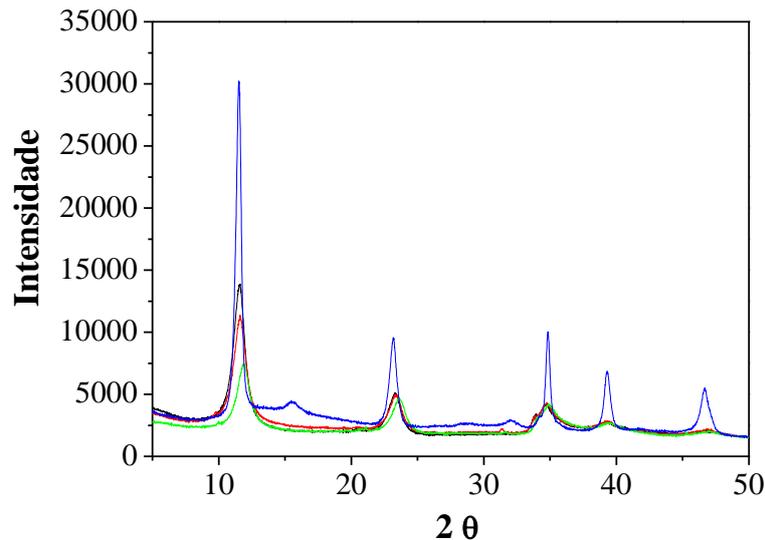
3.3.1 Caracterização dos HDL

Difração de Raio-X: os difratogramas de raios X foram usados para identificar as fases cristalinas presentes após a síntese dos HDL (Mg/Al e Zn/Al). A Figura 3.2 apresenta os perfis para os dois HDL estudados depois de sintetizados e após a adsorção (com Zn/Al-HDL). O perfil apresentado para a hidrotalcita (Mg/Al-HDL) revela a presença de picos de difração bem definidos localizados em $2\Theta = 11,6, 23,3, 34,9, 39,3$ e $46,8^\circ$, que foram atribuídos a presença de hidrotalcita na forma de $Mg_4Al_2(CO_3)(OH)_{12} \cdot 3(H_2O)$ (ICSD: 98-008-1963), conforme observado na literatura (Mills *et al.*, 2012). Além disso, outros picos foram detectados, com menor intensidade do que os atribuídos a hidrotalcita, localizado em $2\Theta = 15,6$ e $32,0^\circ$. Eles podem ser devido à formação do mineral com fórmula molecular: $NaAl(CO_3) \cdot (OH)_2$ (ICSD: 98-008-1963).

Com relação às condições de síntese do Mg/Al-HDL, tem sido relatado na literatura a formação de uma super célula com uma razão molar de $Mg/Al = 2$, o que corresponde à substituição máxima observada de magnésio por alumínio (Brindley e Kikkawa, 1979). A incorporação de um teor de alumínio mais elevado ($Mg/Al > 2$) pode levar à segregação de espécies de $Al(OH)_3$. Da mesma forma, com razão molar de $Mg/Al < 4$, as espécies de magnésio tendem a adotar morfologia do tipo brucita (Cavani *et al.*, 1991). No caso da síntese do Mg/Al-HDL do presente trabalho, onde a razão molar Mg/Al foi igual a 3, parte do magnésio está envolvido na formação da hidrotalcita, no entanto, uma pequena

fração das espécies de alumínio não foi acomodado na estrutura da hidrotalcita, levando a formação de $\text{NaAl}(\text{CO}_3) \cdot (\text{OH})_2$ (Cavani *et al.*, 1991).

Figura 3.2 – Difratomogramas de raios X obtidas para: Zn/Al-HDL (linha preta), Zn/Al-HDL+IgG (linha vermelha), Zn/Al-HDL+HSA (linha verde) e Mg/Al-HDL (linha azul)



Fonte: elaborada pelo autor

Utilizando o método de Williamson-Hall, o tamanho de cristal do HDL foi estimado como sendo 19 nm. Em relação ao tamanho das partículas do Mg/Al-HDL, verificou-se estar compreendido entre 0,5 μm e 100 μm , com um tamanho médio de partícula de 20,7 μm , o que sugere a ausência de uma forma de partícula bem definido.

Analisando o DR-X do Zn/Al-HDL foram verificadas reflexões de material do tipo hidrotalcita, similar ao observado para o Mg/Al-HDL, com uma série de picos de intensidade característicos de material cristalino como reportado na literatura (Mandal e Mayadevi, 2008; Seftel *et al.*, 2008). Os principais picos que evidenciam o material ser do tipo hidrotalcitas são os dois primeiros, com valores de 2θ próximos de 10 e 20 $^\circ$. Nos demais picos apresentados nos difratogramas após o processo de adsorção de IgG em Zn/AL-HDL foi possível observar um alargamento representativo nas intensidades devido a possível assimilação das biomoléculas. O tamanho de cristal do Zn/Al-HDL foi estimado de 9,8 nm (utilizando o método de Williamson-Hall). Em relação ao tamanho das partículas do Zn/Al-HDL, verificou-se um tamanho médio de partícula cerca de 27,8 μm .

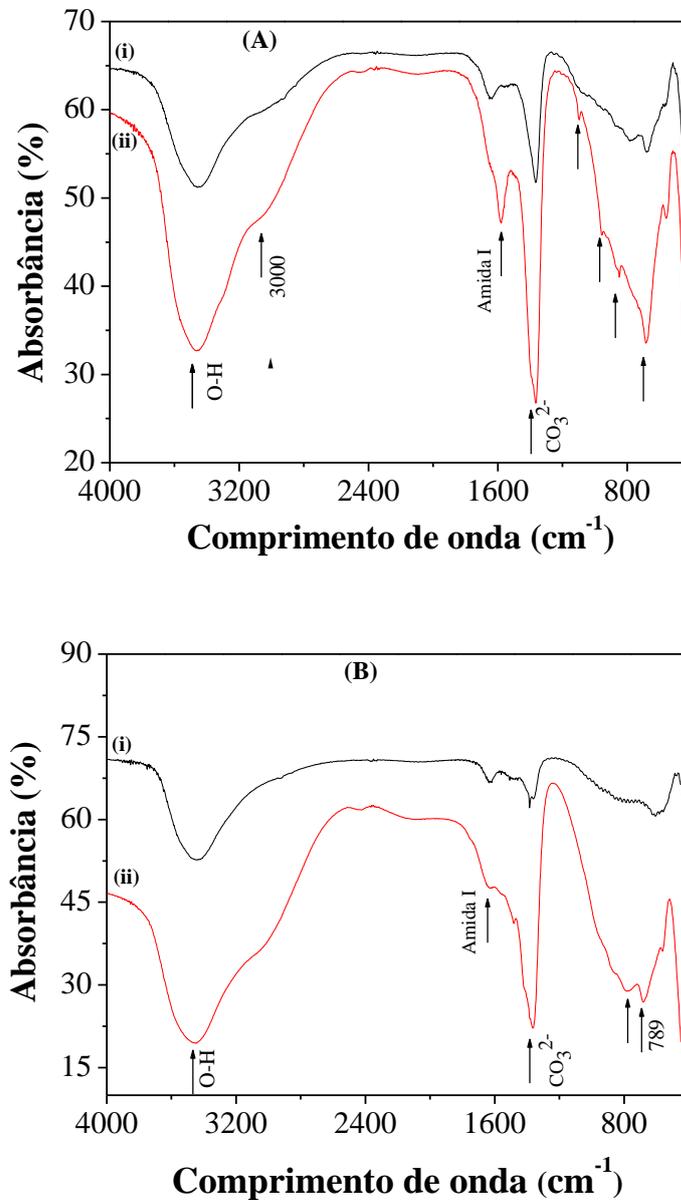
De acordo com padrões de difração de raios X dos HDL podemos confirmar que os HDL possuem picos característicos de compostos do tipo hidrotalcitas de acordo com dados da literatura (Mandal e Mayadevi, 2008; Seftel *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2013; Lucrédio *et al.*, 2014; Mallakpour e Dinari, 2015), confirmando a eficiência do método de síntese para ambos os materiais.

Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier: os espectros de FTIR, antes e após a adsorção de proteínas, para o Mg/Al-HDL e para o Zn/Al-HDL são mostrados na Figura 3.3 A e Figura 3.3 B, respectivamente. Resultados similares aos desse estudo podem ser observados na literatura (Olf *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2012).

O espectro do FTIR apresentado na Figura 3.3 apresenta uma banda de absorção forte e ampla entre 3600 e 3200 cm^{-1} associadas com o estiramento dos grupos hidroxilas (OH^-) (Mandal e Mayadevi, 2008; Seftel *et al.*, 2008; Olf *et al.*, 2009), além de grupos aminas. Tem sido relatado na literatura que o estiramento de O-H e frequências da flexão aumentam com a razão $\text{M}^{2+}/\text{M}^{3+}$ devido à modificação do espaço no domínio interlamelar (Cavani *et al.*, 1991). O ombro cerca de 3000 cm^{-1} é atribuído à ligação de hidrogênio entre H_2O e o ânion carbonato no espaço interlamelar, enquanto que o sinal localizado próximo de 1640 cm^{-1} é atribuído às vibrações de dobragem de moléculas H_2O (Cavani *et al.*, 1991; Jin *et al.*, 2012). O ânion carbonato num ambiente simétrico é caracterizado por uma simetria planar D_{3h} , com três bandas de absorção ativa observadas em 1350-1380 cm^{-1} (ν_3), 850-880 cm^{-1} (ν_2) e 670-690 cm^{-1} (ν_4). A alta simetria leva à ausência de ν_1 localizada cerca de 1050 cm^{-1} (Cavani, *et al.* 1991). As bandas localizadas abaixo de 600 cm^{-1} , são atribuídas a translação do Mg/Al-OH, translação Al-OH e deformação Al-OH, respectivamente, de acordo com outros estudos (Olf *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2012).

Para o Zn/Al-HDL, os espectros de FTIR das amostras Zn/Al-HDL e Zn/Al-HDL-IgG são apresentados na Figura 3.3 B. Pode-se observar uma banda intensa em cerca de 3451 cm^{-1} o que foi atribuída ao grupamento OH^- que ocorre devido a vibração de estiramento de tais grupos moleculares e pela junção dos grupos hidroxilo e água característicos de camadas da brucita (Mandal e Mayadevi, 2008; Seftel *et al.*, 2008; Olf *et al.*, 2009). O ombro em torno de 3000 cm^{-1} foi atribuído a ligações de hidrogênio entre água interlamelar e CO_3^{2-} . A sequência de vibração na faixa da região 1480 à 1363 refere-se ao alongamento do grupo molecular CO_3^{2-} , seguido pela absorção a 1318 e 955 cm^{-1} que corresponde ao modo de deformação assimétrica de Al-OH e Zn-OH, respectivamente.

Figura 3.3 – FTIR dos HDL: Mg/Al (A) e Zn/Al (B). Linha preta (HDL sem proteína, i) e Linha vermelha (HDL com IgG, ii)



Fonte: elaborada pelo autor

Na Figura 3.3 B, duas bandas em cerca de 551 e 766 cm^{-1} foram atribuídos ao modo de translação de Al-OH. Estas bandas confirmam a formação da rede do HDL característico, enquanto que aquelas a 430 cm^{-1} foram devida ao modo de deformação de Al-OH e Zn-OH, seguido por outras vibrações de menor intensidade.

A fim de confirmar a adsorção das proteínas nos HDL estudados, espectros de FTIR foram realizados após o processo de adsorção. A alta intensidade das bandas localizadas próximo de 3400-3600 cm^{-1} associadas a grupos ligados a hidrogênio pela presença de grupos

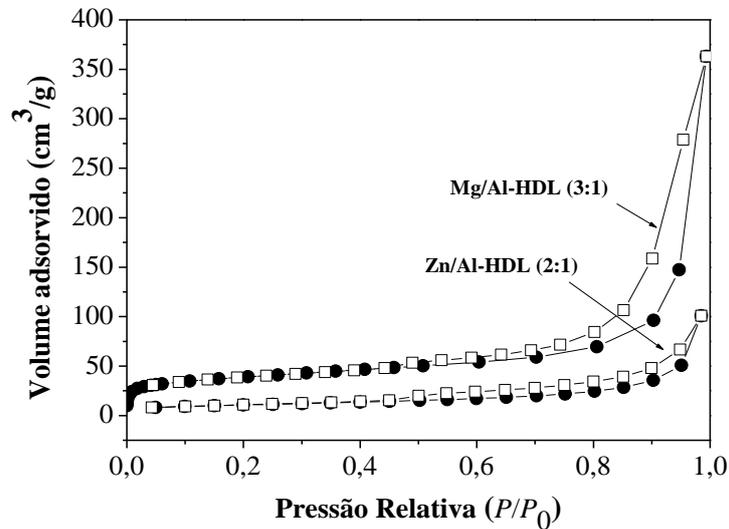
hidróxidos no domínio lamelar e a presença de água no domínio interlamelar podem mascarar a presença de bandas a 3340 cm^{-1} atribuídos a vibrações de N-H e O-H e também mascarar possível banda próximo de 2900 cm^{-1} atribuído a extensão de C-H. A presença de duas bandas localizadas em 1650 cm^{-1} e principalmente em 1560 cm^{-1} , atribuída a grupos amidas (Giacomelli *et al.*, 1999), confirmam a presença de biomoléculas sobre a superfície dos HDL. Uma interação da molécula da proteína pode ter ocorrido, quando se observa uma alteração na transmitância dos materiais a 1400 e 900 cm^{-1} após o processo de adsorção da biomolécula. Isso ocorre devido principalmente à presença de uma grande quantidade de ânions carbonato e moléculas de água no interior das lamelas que pode interagir por ligações de hidrogênio.

Isoterma de N₂ à -196 °C: os HDL, normalmente, são materiais que possuem área superficial inferior a $100\text{ m}^2/\text{g}$ (Crepaldi e Valim, 1998). Vários fatores podem influenciar a área superficial dos HDL, desde o método de síntese utilizado, como o tempo de tratamento, a velocidade de adição dos metais e a concentração das soluções iniciais. Todos esses fatores afetam a coagulação, forma e porosidade das partículas formadas (Crepaldi e Valim, 1998). A calcinação dos HDL pode vir a ser um método a fim de aumentar a área superficial como abordado no trabalho de Mandal e Mayadevi (2008), entretanto, perderá as propriedades típicas de um HDL, tornando-o um óxido misto.

A Figura 3.4 apresenta as isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a -196 °C para o Mg/Al-HDL (Figura 3.4 B) e o Zn/Al-HDL (Figura 3.4 B) desse estudo que foram classificadas do tipo II, de acordo com a classificação da IUPAC (Rouquerol *et al.*, 1999). As amostras apresentaram um ciclo de histerese H3, que é característica de sólidos constituídos por agregados de partículas em forma de placa com poros em forma de fenda (Angelescu *et al.*, 2008; García-Sancho *et al.*, 2011). Além disso, a isoterma e a distribuição do tamanho de poro revelaram a presença de uma vasta gama de mesoporos para o Mg/Al-HDL e para o Zn/Al-HDL. O aumento do volume absorvido em pressões mais elevadas é atribuído a condensação de N₂ nos vazios nas inter-partículas (Jin *et al.*, 2012; Zaghouane-Boudiaf *et al.*, 2012).

A Tabela 3.2 apresenta os valores da área superficial (S_{BET}), diâmetro de partícula (D_p) e volume total de poros (V_p), obtidos a partir dos dados experimentais das curvas de adsorção-dessorção para ambos os materiais. Os valores da área superficial foram 74 e $57\text{ m}^2/\text{g}$, respectivamente para o Mg/Al-HDL e Zn/Al-HDL. Os valores da área superficial, diâmetro de poros e volume de poros obtidos nesse trabalho foram similares aos reportados na literatura.

Figura 3.4 – Isotermas de adsorção-dessorção de N₂ nos HDL: Mg/Al e Zn/Al. Pontos experimentais de adsorção (●) e dessorção (□)



Fonte: elaborada pelo autor

Ponto de carga zero (pH_{ZPC}): a Figura 3.5 revela que o pH_{ZPC} do Mg/Al-HDL é ligeiramente acima de 8,0 e o pH_{ZPC} do Zn/Al-HDL é aproximadamente 6,0. Para valores de pH abaixo do pH_{ZPC} , o HDL apresentará carga superficial positiva, conduzindo a uma maior afinidade para os grupos aniônicos. Da mesma forma, quando o pH é superior ao pH_{ZPC} , a superfície do HDL possuirá carga superficial negativa e, portanto, maior afinidade para grupos catiônicos. A presença de um elevado teor de grupos hidroxilas na superfície do HDL favorece a protonação ou desprotonação em função do pH. A desprotonação dos grupos hidroxilas e de espécies gasosas localizados no espaço interlamelar geralmente leva à predominância da basicidade de Lewis e uma maior incidência de cargas negativas na superfície do HDL.

Cada proteína possui pI próprio, e nesse pH específico não há predominância de cargas exposta da proteína, logo, no pI a proteína apresentará carga aparente neutra. As imunoglobulinas (Ig) presentes no soro humano. As IgG por possuírem quatro subclasses (IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄) apresentam um pI variável que compreende a faixa do pH de 6,3 à 9,0 (Bresolin *et al.*, 2009). Diferentemente das IgG, a HSA apresenta um pI fixo no pH 4,8. Assim, os valores de pI e pH_{ZPC} podem definir ou dar indícios do tipo de interação entre adsorvente e adsorbato a um dado pH.

Tabela 3.2 – Propriedades texturais para os HDL: Mg/Al e Zn/Al

S_{BET} (m^2/g)	V_P (cm^3/g)	D_P (Å)	HDL	Referências
74	0,45	24,0	Mg/Al	Neste trabalho
57	0,19	-	Zn/Al	Neste trabalho
52	0,025	19,0	Zn/Al	(Mandal e Mayadevi, 2008)
49	0,14	-	Zn/Al	(Seftel <i>et al.</i> , 2008)
61	0,48	24,6	Mg/Al	(Ralla <i>et al.</i> , 2011)
105	0,56	17,9	Mg/Al	(Aguiar <i>et al.</i> , 2013)
123	0,82	26,6	Mg/Al	(Auxilio <i>et al.</i> , 2009)
100	0,50	30,0	Mg/Al	(Lazaridis <i>et al.</i> , 2003)

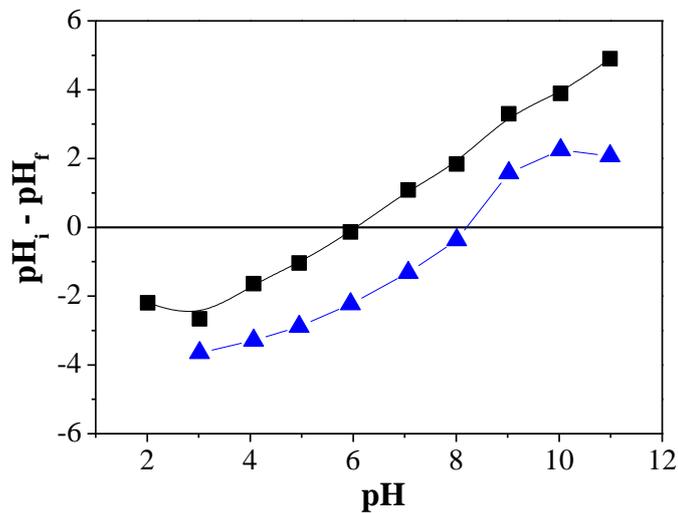
S_{BET} – Área superficial específica

V_P – Volume total de poros

D_P – Diâmetro total de poros

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 3.5 – Ponto de Carga Zero (pH_{ZPC}) para o Zn/Al-HDL (-■-) e para o Mg/Al-HDL (-▲-)



Fonte: elaborada pelo autor

A fim de avaliar o comportamento da adsorção tanto no pI da HSA como na faixa de pI das IgG foram escolhidos cinco tampões biológicos distintos (ACETATO, FOSFATO,

MOPS, HEPES e TRIS-HCl) e os experimentos foram realizados na faixa de pH entre 4.0 - 9.0.

A Tabela 3.3 apresenta a carga superficial que os HDL e as proteínas apresentam em função do pH. Observou-se que a superfície do Mg/Al-HDL possui carga superficial positiva em praticamente toda a faixa de pH delimitada, enquanto que o Zn/Al-HDL apresenta carga positiva em pH inferior a 6,0 e carga negativa para pH superior a 6,0. Essa mesma abordagem pode ser feita para as proteínas, onde HSA possui carga positiva em pH inferior à 4,8 e carga negativa para pH superior à 4,8.

Tabela 3.3 – Carga superficial aparente dos HDL e das proteínas em função do pH

	Faixa de pH						
	4,0 – 4,7	4,8	4,9 – 5,9	6,0	6,1 – 7,9	8,0-8,2	8,2 – 9,0
Mg/Al-HDL	+	+	+	+	+	N	-
Zn/Al-HDL	+	+	+	N	-	-	-
HSA (4,8)	+	N	-	-	-	-	-

(+) Positiva

(-) Negativa

(N) Neutra

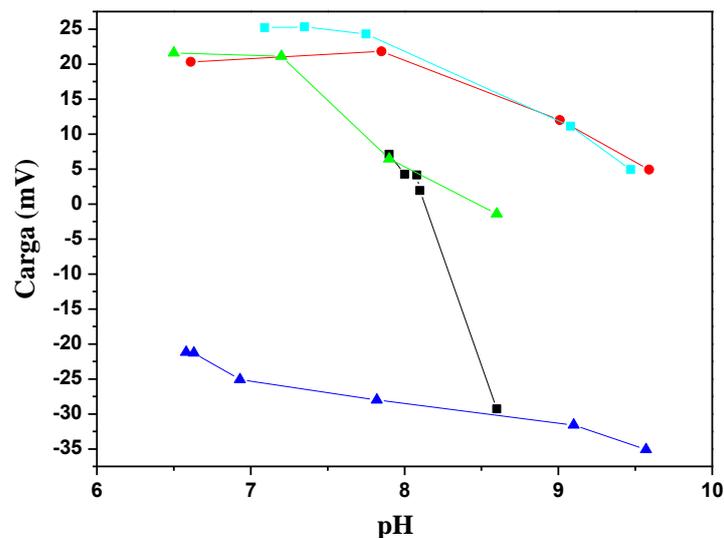
Fonte: elaborada pelo autor

As IgG por apresentarem subclasses (IgG₁₋₄) e pI variável, não podem ser delimitado com exatidão qual carga específica terá de acordo com o pH. Pois, dentro faixa de pI da IgG há a possibilidade de algumas IgG estarem carregadas positivamente, negativamente ou estarem neutras.

Potencial Zeta (ZPC): com o propósito de avaliar a influência de diferentes sistemas tamponantes no processo de adsorção foi mensurado o potencial zeta dos HDL. O ZPC avalia as cargas presentes no material quando este possui íons em sua estrutura. Na presença de uma solução aquosa contendo eletrólitos, estes materiais apresentam a formação de uma dupla camada elétrica na sua superfície. A primeira camada é devido aos íons adsorvidos por diferentes interações químicas superficiais, tais como forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e força de Van der Waals. A segunda camada é geralmente associada a interações fracas de forças eletrostáticas entre os íons livres presentes no fluido e a superfície do material sob a influência da atração elétrica e do movimento térmico. O ZPC é fortemente dependente da natureza química da solução de medição, em água ou tampões biológicos. Portanto, os fatores que mais influenciam o ZPC são o pH e a força iônica da solução (Ralla *et al.*, 2011).

A Figura 3.6 apresenta o ZPC para o Mg/Al-HDL em presença de água e dos tampões (MOPS, HEPES, TRIS-HCl e FOSFATO). O pH que determina a densidade de carga elétrica igual a zero pode ser chamado de ponto de carga zero (pH_{ZPC}). De acordo com a Figura 3.6, o pH_{ZPC} para o Mg/Al-HDL foi aproximadamente no pH 8,3, muito próximo ao obtido experimentalmente pela análise anterior, vide Figura 3.5. O ZPC do Mg/Al-HDL em água começou com carga positiva (+ 5 mV a pH 8,0) e terminou com uma carga negativa (- 29,3 mV a pH 8,6). No trabalho de Ralla e colaboradores (2011) foi observado um pH_{ZPC} no pH 11,0 para a hidrotalcita comercial (Syntal 696) e foi observada uma influência mais forte pelo pH. Os autores concluíram que Syntal poderia servir como uma resina de "troca aniônica fraca" devido ao alto potencial zeta para este adsorvente.

Figura 3.6 – Potencial Zeta (ZPC) para o Mg/Al-HDL quando em contato com água (-■-) e os tampões MOPS (-●-), HEPES (-■-), TRIS-HCl (-▲-) e FOSFATO (-▲-)



Fonte: elaborada pelo autor

O Mg/Al-HDL apresentou influência considerável no pH final da solução com a água, fazendo com que a curva delimitasse uma faixa de pH final inferior à faixa de pH inicial da solução. Observa-se claramente aumento da carga na superfície deste HDL na presença dos tampões HEPES, MOPS e Tris-HCl. No intervalo de pH de 6,5 à 8,0 foi observado a presença de cargas positivas (entre + 20 e + 25 mV) para os tampões mencionados, tornando o HDL altamente carregado. Portanto, este material deve ser capaz de ligar biomoléculas carregadas negativamente nesta faixa de pH.

3.3.2 Adsorção de proteínas em HDL

Existem alguns parâmetros externos de importante relevância que podem influenciar a adsorção de proteínas, dentre os quais se destacam: temperatura, pH do meio, força iônica e composição do tampão (Rabe *et al.*, 2011).

Normalmente, observa-se um aumento da adsorção em temperaturas elevadas (Koutsoukos *et al.*, 1983). A temperatura influencia tanto no estado de equilíbrio como na cinética de adsorção. O aumento da adsorção pode ser devido a uma aceleração na difusividade das proteínas na superfície sólida (Rabe *et al.*, 2011). A principal força motriz na adsorção de proteínas é o ganho de entropia devido à liberação na superfície adsorvida de moléculas de água e dos íons dos sais, além de rearranjos estruturais no interior da proteína (Norde, 1986; Haynes e Norde, 1994; Malmsten, 1998; Norde, 1998).

Outro parâmetro que controla o processo de adsorção de proteínas é a concentração de íons dissolvidos expressados em termos da força iônica. Quanto maior a força iônica menor será a interação eletrostática entre as entidades de cargas. Além disso, elevada condição de força iônica aumenta a tendência da agregação de proteínas (Vendruscolo e Dobson, 2007).

Em relação ao parâmetro de pH, nota-se que, este determina o estado eletrostático da proteína. Podem ser observadas altas taxas de adsorção quando proteína e adsorvente carregam cargas opostas, uma vez que a atração eletrostática acelera a migração para a superfície (Bremer *et al.*, 2004; Demanèche *et al.*, 2009).

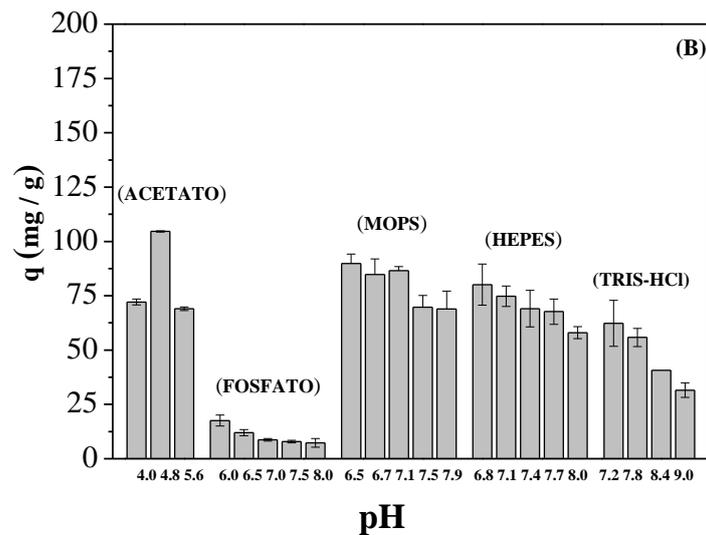
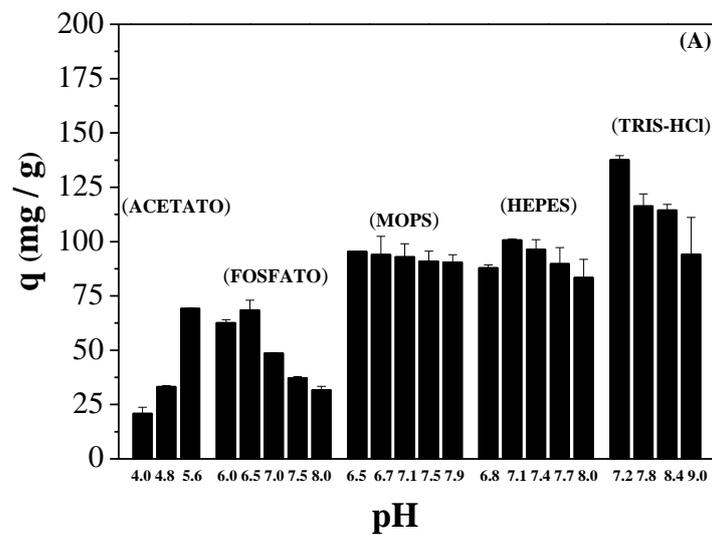
No presente estudo, os parâmetros de força iônica (25 mM) e temperatura (22 °C) foram fixados, e foi investigado o parâmetro pH, analisando uma extensa faixa de pH utilizando diferentes tampões biológicos, passando tanto no pI da IgG, como no pI da HSA.

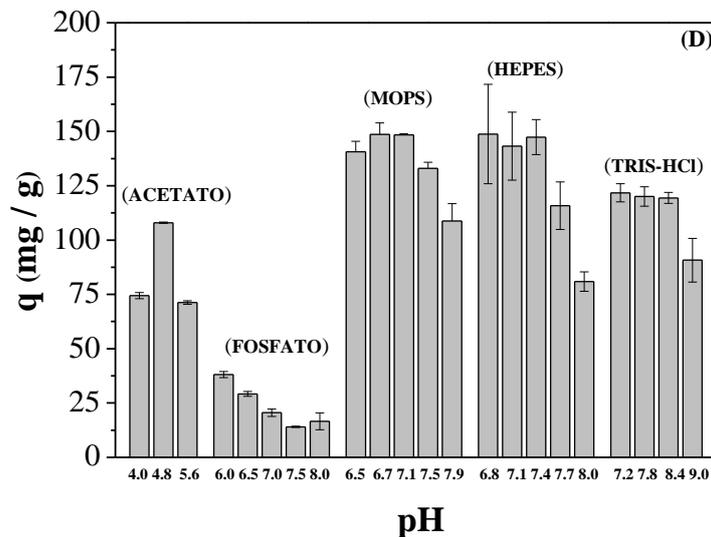
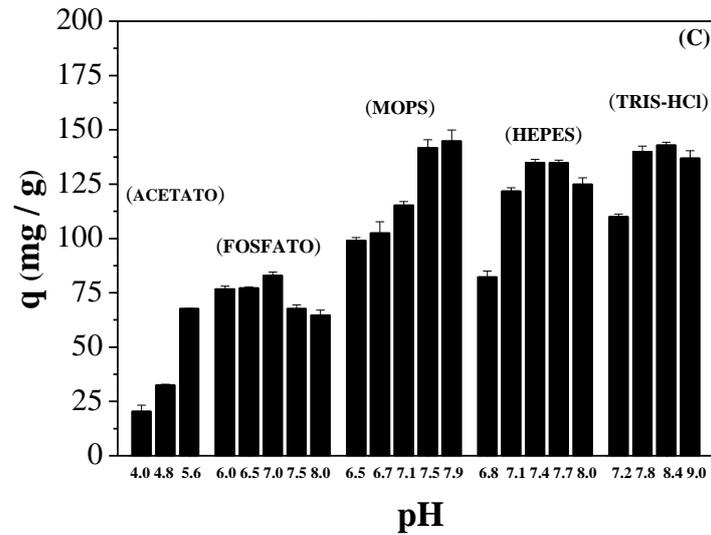
Efeito do pH e do tampão na adsorção de IgG e HSA: a Figura 3.7 apresenta os resultados da adsorção das proteínas IgG e HSA em Mg/Al-HDL e Zn/Al-HDL nos diferentes tampões biológicos.

Foi constatado, conforme Figura 3.5, que o pH_{ZPC} dos HDL foram: próximo de 8,0 para o Mg/Al-HDL e 6,0 para o Zn/Al-HDL. Logo, valores de pH abaixo do pH_{ZPC} , o HDL possui predominâncias de cargas positivas e pode interagir, por exemplo, com cargas negativas da proteína HSA, quando a mesma encontra-se acima do seu pI (4,8). Normalmente a adsorção é significativa no pI da proteína, em certos casos a medida que o pH se afasta do pI da proteína, a adsorção é afetada. Tal fato pode ser observado ao analisar os resultados obtidos com tampão ACETATO (Figura 3.7). Comportamento similar foi relatado por Ralla e

colaboradores (Ralla *et al.*, 2011) para adsorção de hemoglobina (HG) e HSA utilizando uma hidrotalcita comercial (Syntal 696) como adsorvente.

Figura 3.7 – Efeito do pH em diferentes tampões biológicos na adsorção de IgG e HSA (concentração inicial de 1,0 mg/mL) em HDL: (A) Mg/Al-HDL e IgG; (B) Mg/Al-HDL e HSA; (C) Zn/Al-HDL e IgG; (D) Zn/Al-HDL e HSA. Faixa de pH para cada tampão: ACETATO (4,0-5,6) FOSFATO (6,0-8,0) MOPS (6,5-7,9) HEPES (6,8-8,0) TRIS (7,2-9,0)





Fonte: elaborada pelo autor

Em relação aos outros tampões estudados, todos se concentram em valores de pH acima ao pI da HSA e a medida que o pH aumenta a quantidade adsorvida de HSA é ligeiramente inferior. Nota-se que a quantidade de HSA adsorvida é relativamente distinta em cada um dos tampões estudados, isso se deve ao fato do diferente comportamento das cargas dos HDL nos tampões estudados que será abordado a seguir.

Com o auxílio dos dados do ZPC do Mg/Al-HDL (Figura 3.6) foi possível observar coerentes justificativas para o entendimento desse comportamento de adsorção das proteínas IgG e HSA em HDL.

O pI da IgG situa-se entre 6,3 e 9,0 devido as quatro subclasses que a constituem, portanto nessa faixa de pH há a possibilidade de IgG carregadas positivamente, negativamente e neutras. Por essa razão, a repulsão eletrostática entre as cargas de mesmo sinal da proteína são minimizadas (Duarte-Silva *et al.*, 2014) e a adsorção de proteínas é favorecida no pI (Barral *et al.*, 2008). Esse fato pôde ser evidenciado nesse trabalho com a proteína IgG quando adsorvida em ambos os HDL (Figura 3.7 A e C). Visto que as quantidades de IgG adsorvidas nos HDL (Mg/Al e Zn/Al) foram próximas ou ligeiramente acima de 100 mg/g quando se trabalhou com os tampões MOPS, HEPES e TRIS-HCl, tampões estes que possuem faixa tamponante de pH entre 6,5 e 9,0, similar a faixa de pH do pI da IgG.

Entretanto, ao se trabalhar com o tampão ACETATO, único tampão que não compreendeu o pI da IgG, a adsorção dessa proteína foi relativamente baixa (de 20 à 70 mg/g). O ZPC do Mg/Al-HDL pode contribuir nas possíveis explicações para o fato dos tampões biológicos proporcionarem maiores quantidades adsorvidas de IgG nessa faixa de pH mencionada, pois o Mg/Al-HDL apresenta forte caráter positivo de cargas em sua superfície, conforme mencionado na discussão do ZPC deste material. Logo, as cargas positivas na superfície do HDL associado ao fato de estarem na região do pI da proteína foram as principais justificativas para a considerável adsorção de IgG nessa região.

Os sistemas com os tampões, MOPS, HEPES, TRIS-HCl, foram os que proporcionaram maiores quantidades adsorvidas de IgG, em ambos os HDL, com destaque ao sistema (proteína-adsorvente-tampão) composto pela proteína IgG, o Zn/Al-HDL, e o tampão MOPS (pH 7,9), com quantidade adsorvida de 144,88 mg/g. A faixa tamponante de pH do tampão FOSFATO é compreendida entre os pH 6,0 e 8,0, representando quase que em sua totalidade a faixa de pI da IgG, porém não foi evidenciado valores elevados de IgG adsorvida, quando comparado aos resultados obtidos com os tampões: MOPS, HEPES e TRIS-HCl. Recorrendo novamente aos resultados obtidos do ZPC do Mg/Al-HDL foi possível constatar que na presença do tampão FOSFATO, o HDL apresentou predominantemente cargas negativas na superfície, portanto cargas opostas aos evidenciados pelo HDL na presença dos tampões MOPS, HEPES e TRIS-HCl, e todavia, menor quantidade de IgG adsorvida em relação aos outros tampões.

De acordo com a Figura 3.7 (B e D), às quantidades adsorvidas de HSA utilizando o tampão ACETATO (pH 4,8) nos HDL foram elevadas, com valores de 104,60 e 107,99 mg/g, respectivamente com Mg/Al-HDL e Zn/Al-HDL. Valores esses compreensíveis, devido a adsorção ter ocorrido no pI da HSA (pH 4,8), porém a adsorção de HSA em valores de pH acima do pI também foram elevados em alguns tampões. No presente estudo pode ser

observado que a adsorção de HSA em HDL foi superior no pI da HSA, porém inferior em pH acima do pI, entretanto relativamente alta. Isso pode estar associado as cargas positivas da superfície do HDL favorecendo possíveis interações com as cargas negativas da HSA, quando na presença dos tampões MOPS, HEPES e TRIS-HCl. O HDL pode estar atuando como resina de “troca aniônica fraca”, conforme relatado por Ralla e colaboradores (2011). Em contrapartida a adsorção de HSA na presença do tampão FOSFATO foi muito inferior aos demais tampões. Muito provavelmente influenciada ao elevado caráter negativo de cargas na superfície do HDL na presença desse tampão.

Com o tampão FOSFATO, os valores de HSA adsorvida em ambos os HDL foram inferiores a 100 mg/g. O sistema (proteína-adsorvente-tampão) que apresentou maior quantidade adsorvida de HSA foi composto pela proteína HSA, o Zn/Al-HDL e o tampão MOPS (pH 6,7), com quantidade adsorvida de 148,57 mg/g.

Informações pertinentes relacionados a possíveis interferências da presença de tampões no processo de adsorção podem ser observado na literatura (Koerner *et al.*, 2011), onde se relata que a estrutura dos íons dos tampões ACETATO, TRIS-HCl e FOSFATO exibem uma ou mais cargas de mesmo sinal, somente positiva ou somente negativa, enquanto que os tampões MOPS e HEPES são considerados tampões zwitteriônico com duas cargas de sinais opostos. A utilização de tampão zwitteriônico não afetou claramente a capacidade de adsorção de IgG provavelmente devido a faixa operacional do tampão ser compreendida no pI, enquanto que para a HSA, a capacidade de adsorção parece aumentar quando o pH se aproxima do pI. No caso dos tampões com mesma carga, isto é, ACETATO, FOSFATO e TRIS-HCl, a capacidade de adsorção diminui, na maioria dos casos, quando o pH se afasta do pI da HSA e IgG.

A Tabela 3.4 apresenta os valores de quantidades adsorvidas de IgG e HSA em HDL nos diferentes sistemas tamponantes utilizados. Foram selecionados um pH de cada tampão estudado, onde os critérios de escolha se basearam na quantidade adsorvida, proximidade com o pH do sangue humano (entre 7,0 à 7,4) e maior seletividade por IgG. Portanto, foram destacados os pH 6,5 (FOSFATO), 6,7 (MOPS), 7,1 (HEPES) e 7,2 (TRIS-HCl).

Vale ainda destacar na Tabela 3.4 que, trabalhar com o tampão FOSFATO pode vir a ser muito interessante, pois ao compararmos as quantidades adsorvidas de IgG e HSA nos dois HDL, nos confrontamos com valores bem distintos. As quantidades de IgG adsorvidas utilizando o tampão FOSFATO (pH 6,5) foram: 68,56 mg/g (Mg/Al-HDL) e 77,22 mg/g (Zn/Al-HDL). Em contrapartida, as quantidades de HSA adsorvidas utilizando o mesmo

tampão e pH foram consideravelmente inferiores, com valores de 12,04 mg/g (5,69 vezes inferior) com Mg/Al-HDL e 29,20 mg/g (2,64 vezes inferior) com Zn/Al-HDL. Portanto, com relação a seletividade de IgG frente a HSA, esse tampão e o Mg/Al-HDL é o conjunto mais indicado a ser utilizado. Os próximos ensaios (cinética e isoterma de adsorção) serão realizados nos tampões e pH mostrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Quantidade adsorvida de IgG e HSA, após 2,0 h de contato, em Mg/Al-HDL e Zn/Al-HDL com diferentes tampões

TAMPÃO	Quantidade de proteína adsorvida (mg/g)				
	pH	Mg/Al-HDL		Zn/Al-HDL	
		IgG	HSA	IgG	HSA
25 mM FOSFATO	6,5	68,6	12,0	77,22	29,2
MOPS	6,7	94,1	84,8	102,5	148,6
HEPES	7,1	100,8	71,4	121,8	143,2
TRIS-HCl	7,2	137,7	62,3	110,0	121,7

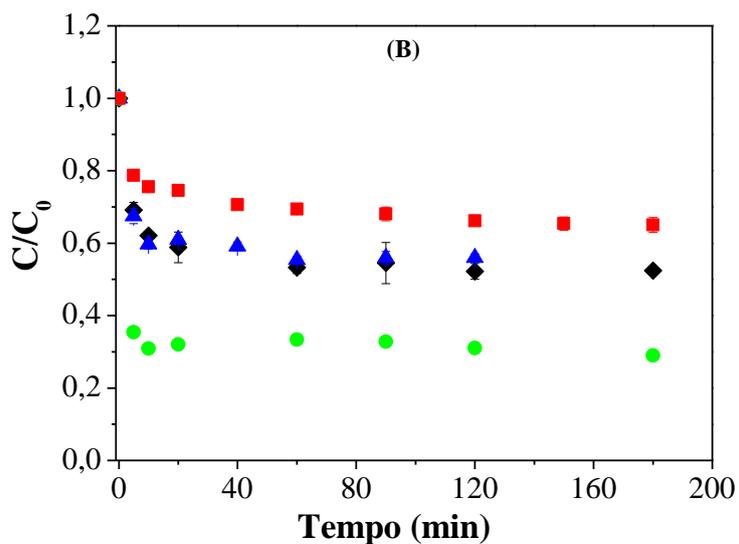
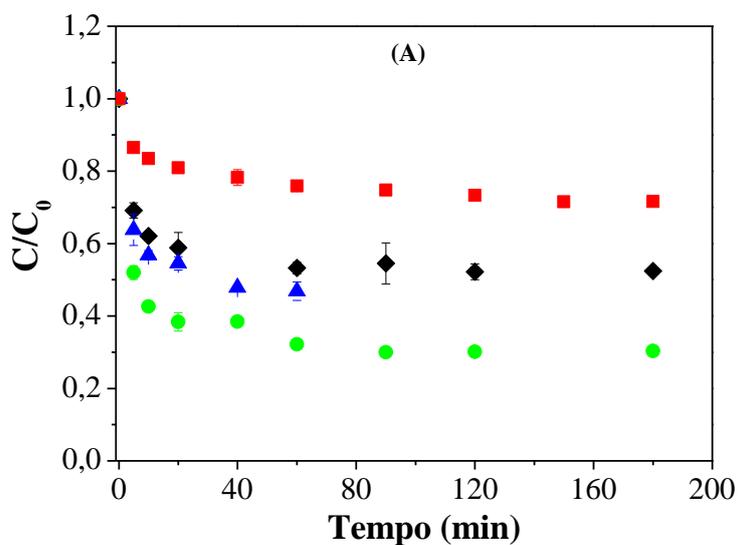
Fonte: elaborada pelo autor

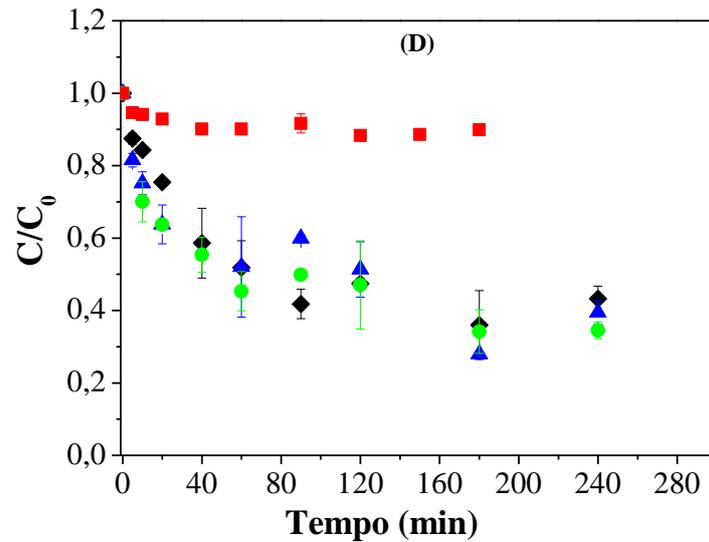
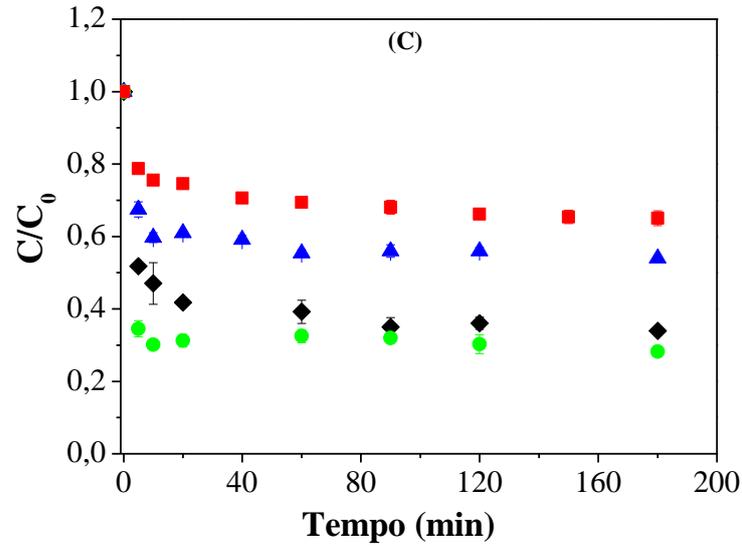
Efeito do tempo de contato: os perfis cinéticos de adsorção de IgG e HSA em Mg/Al-HDL e Zn/Al-HDL foram realizados com os seguintes tampões: FOSFATO, MOPS, HEPES e TRIS-HCl. De acordo com a Figura 3.8 foi possível acompanhar os perfis cinéticos das proteínas IgG (Figura 3.8 A e C) e HSA (Figura 3.8 B e D) nos HDL (Mg/Al e Zn/Al). Nota-se um decaimento rápido na primeira hora de ensaio e nas duas horas seguintes as concentrações alcançam rapidamente o equilíbrio evidenciando uma considerável taxa de adsorção nos adsorventes.

Foi notória a desvantagem na adsorção de ambas as proteínas nos dois HDL quando se utilizou o tampão FOSFATO. Tais resultados foram esperados, todavia os ensaios da avaliação do efeito do pH já indicam que este tampão não proporcionaria elevadas quantidades adsorptivas, provavelmente devido a predominância de cargas negativas na superfície do HDL na presença desse tampão. Porém, esse tampão (FOSFATO) foi o único que possibilitou grandes diferenças em relação à quantidade adsorvida de IgG frente a HSA. Todos os perfis apresentados demonstraram condição mais favorável para adsorção com o tampão TRIS-HCl. O equilíbrio de adsorção foi estabelecido em torno de 180 minutos. Estes resultados estão em conformidade com o que foi discutido anteriormente no tópico sobre a

influência dos tampões na adsorção de proteínas, onde já se esperava esse comportamento com os tampões TRIS-HCl e FOSFATO.

Figura 3.8 – Perfis cinéticos de adsorção de IgG e HSA (concentração inicial de 1,0 mg/mL) em HDL usando os tampões MOPS (◆), HEPES (▲), TRIS-HCl (●) e FOSFATO (■): (A) Mg/Al-HDL e IgG; (B) Mg/Al-HDL e HSA; (C) Zn/Al-HDL e IgG; (D) Zn/Al-HDL e HSA



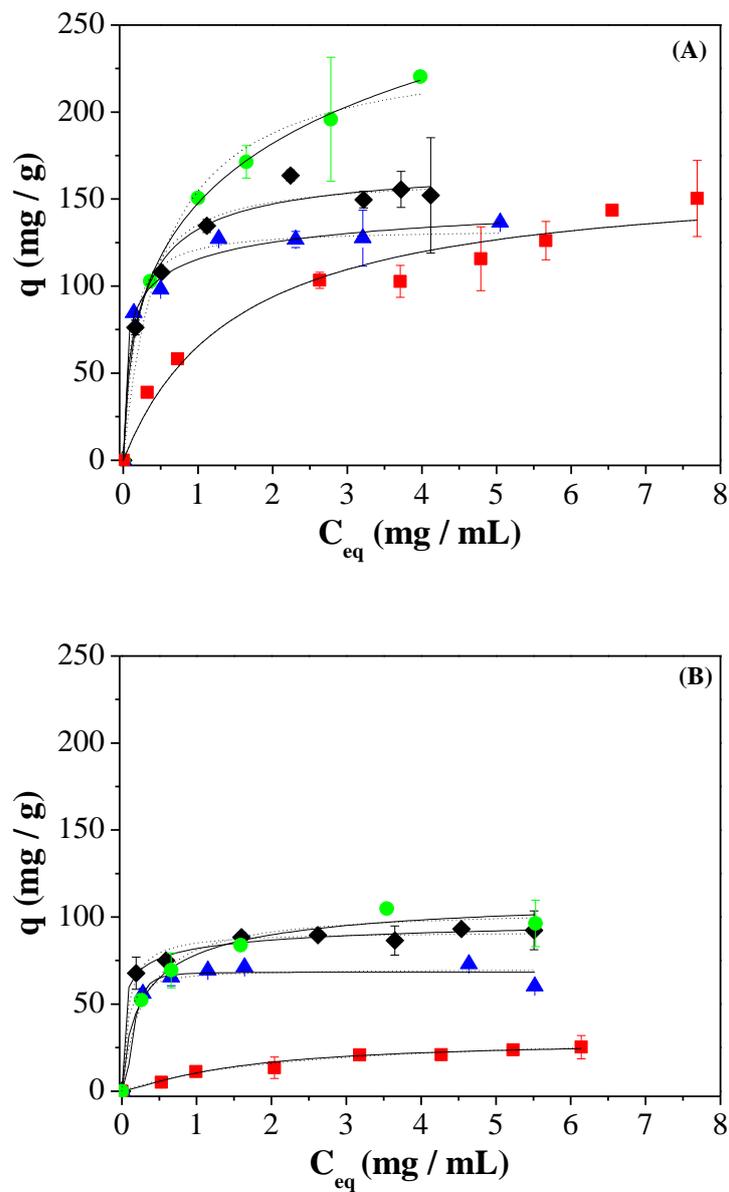


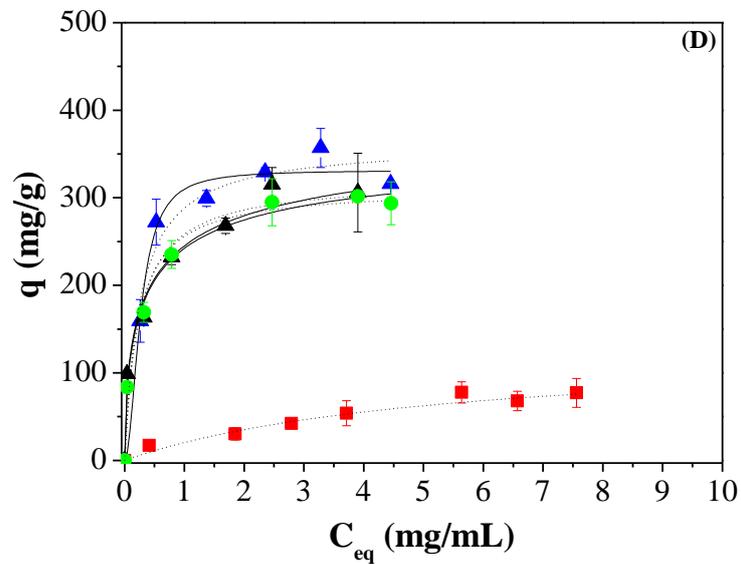
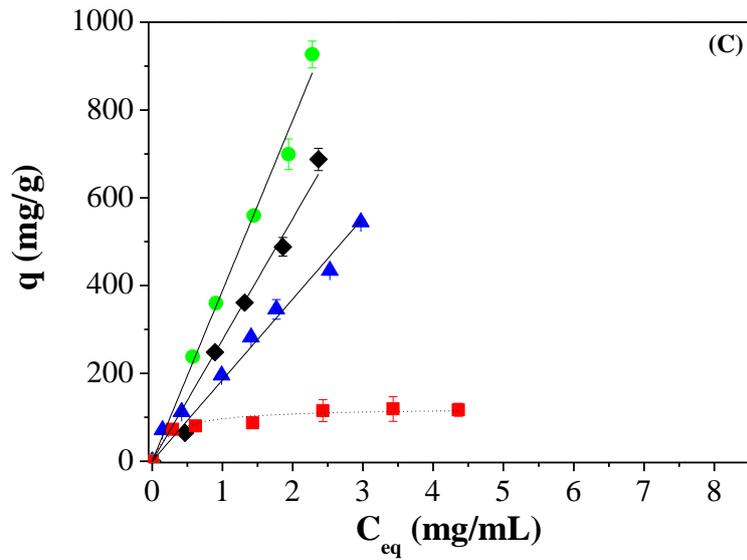
Fonte: Elaborada pelo autor

Isotermas de adsorção: As isotermas de adsorção de IgG e HSA (Figura 3.9) foram obtidas com os mesmos tampões utilizados nos testes cinéticos com o tempo de equilíbrio de 180 min. Analisando os resultados experimentais com Mg/Al-HDL foram observados perfis de isotermas favoráveis, isto é, isotermas do tipo Langmuir. Em baixas concentrações de proteínas disponíveis no meio, elevada quantidade adsorvida foi obtida e para concentrações mais altas atingiu-se um platô. Como já esperado, os maiores valores de IgG adsorvida foram obtidos utilizando o tampão TRIS-HCl (Figura 3.9 A e C). A proteína

HSA foi sensivelmente adsorvida em todos os tampões, sendo que ao utilizar o tampão FOSFATO os resultados foram ainda menores que os obtidos com os outros tampões.

Figura 3.9 Isotermas de adsorção com IgG e HSA em HDL usando os tampões MOPS (\blacklozenge), HEPES (\blacktriangle), TRIS-HCl (\bullet) e FOSFATO (\blacksquare): (A) Mg/Al-HDL e IgG; (B) Mg/Al-HDL e HSA; (C) Zn/Al-HDL e IgG; (D) Zn/Al-HDL e HSA. Modelos de ajustes de Langmuir (linha tracejada) e Langmuir-Freundlich (linha contínua)





Fonte: elaborada pelo autor

Os parâmetros de Langmuir e Langmuir-Freundlich para adsorção de IgG em Mg/Al-HDL (Tabela 3.6) mostraram que a maior capacidade de adsorção foi atingida quando utilizou o tampão TRIS-HCl ($q_{m\acute{a}x} = 239,2$ mg/g) e a menor com o tampão HEPES ($q_{m\acute{a}x} = 132,9$ mg/g). No caso do uso dos tampões FOSFATO e MOPS, em ambos, a quantidade máxima de adsorção foi similar, com valores de 165,2 e 163,7 mg/g, respectivamente.

Com relação às constantes k_L e k_{LF} , a qual definem a intensidade da ligação entre proteína e adsorvente, foi observado que o uso dos tampões MOPS e HEPES apresentaram altos valores em comparação com o TRIS-HCl e o FOSFATO. De acordo com a Tabela 3.5, os parâmetros obtidos através dos modelos de ajuste de Langmuir e Langmuir-Freundlich para adsorção de HSA em Mg/Al-HDL mostraram valores de quantidade adsorvida inferior aos obtidas com a proteína IgG, principalmente utilizando o tampão FOSFATO ($q_{m\acute{a}x} = 36,2$ mg/g). No caso da constante k_L , os tampões MOPS e HEPES proporcionaram valores superiores aos obtidos com os tampões FOSFATO e TRIS-HCl.

Como mencionado anteriormente, tanto FOSFATO como o TRIS-HCl exibem uma ou mais cargas de mesmo sinal, enquanto que os tampões MOPS e HEPES são zwitteriônicos. Logo, a partir dos resultados das Tabelas 3.5-3.6 e das Figuras 3.9A-B, foi observado que os tampões zwitteriônicos (MOPS e HEPES) favoreceram a afinidade entre adsorbato e adsorvente, fornecendo altos valores de quantidade de HSA adsorvida (acima de 70 mg/g). Embora, a quantidade de HSA adsorvida utilizando o tampão TRIS-HCl ainda foi levemente superior ($q_{m\acute{a}x} = 104,9$ mg/g).

Em relação ao Zn/Al-HDL foram observadas significativas quantidades de IgG adsorvidas nos sistemas com os tampões MOPS, HEPES e TRIS-HCl. Os perfis de isotermas de adsorção com IgG nos tampões MOPS, HEPES e TRIS-HCl foram ajustados pelo modelo de Henry (Tabela 3.8). E os valores de IgG adsorvida (Figura 3.9 C) foram na ordem de 600,0; 700,0 e 900,0 mg/g, respectivamente utilizando os tampões HEPES, MOPS e TRIS-HCl. Esses valores obtidos com Zn/Al-HDL foram muito superiores aos obtidos com o Mg/Al-HDL e se equiparam aos materiais mesoporosos, como as SBA 15, na adsorção de outras proteínas (CEL, BSA, LIS).

Recentemente, Dos Santos e colaboradores (2013) utilizaram sílicas mesoporosas do tipo SBA 15 com elevada área superficial (acima de 600 m²/g) e obtiveram quantidades máximas de celulase (CEL) e lisozima (LIS) acima de 600 mg/g para cada proteína. As sílicas mesoporosas possuem a grande vantagem de apresentarem normalmente elevadas áreas superficiais. Logo, a adsorção de proteínas em HDL pode não ser tão dependente da área superficial, como as SBA 15, como observado no presente estudo com o adsorvente Zn/Al-HDL.

Tabela 3.5 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em Mg/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos

Parâmetros	FOSFATO		MOPS		HEPES		TRIS-HCl	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{máx}$ (mg/g)	36,20	40,30	91,60	106,60	70,10	71,10	104,90	115,00
	$\pm 3,52$	$\pm 1,23$	$\pm 1,71$	$\pm 3,52$	$\pm 3,09$	$\pm 3,81$	$\pm 4,57$	$\pm 3,21$
k_L (mL/mg)	0,36	-	12,91	-	$16,94 \pm 1,02$	-	3,38	-
	$\pm 0,08$		$\pm 0,29$				$\pm 0,72$	
k_{LF} (mL/mg)	-	0,28	-	19,38	-	19,92	-	2,87
		$\pm 0,2$		$\pm 0,45$		$\pm 1,06$		$\pm 0,15$
R^2	0,99	0,98	0,99	0,99	0,97	0,97	0,97	0,98
n	-	0,91	-	0,40	-	0,75	-	0,72
		$\pm 0,02$		$\pm 0,03$		$\pm 0,06$		$\pm 0,08$

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3.6 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de IgG em Mg/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos

Parâmetros	FOSFATO		MOPS		HEPES		TRIS-HCl	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{máx}$ (mg/g)	165,20	169,30	163,70	171,80	132,90	141,10	239,20	246,10
	± 3,51	± 4,41	± 3,23	± 3,06	± 5,01	± 2,24	± 2,17	± 4,69
k_L (mL/mg)	0,66	-	4,76	-	10,30	-	1,83	-
	± 0,05		± 0,24		± 0,67		± 0,11	
k_{LF} (mL/mg)	-	0,68	-	4,44	-	11,30	-	1,77
		± 0,07		± 0,17		± 0,430		± 0,11
R^2	0,97	0,97	0,98	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99
n	-	0,81	-	0,82	-	0,67	-	0,88
		± 0,11		± 0,09		± 0,08		± 0,07

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3.7 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em Zn/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos

Parâmetros	FOSFATO		MOPS		HEPES		TRIS-HCl	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{máx}$ (mg/g)	129,40	142,10	320,40	400,00	361,95	331,43	311,43	386,60
	± 18,74	± 21,10	± 24,50	± 25,30	± 17,32	± 12,18	± 13,70	± 13,14
k_L (mL/mg)	0,18	-	4,16	-	3,90	-	4,60	-
	± 0,05		± 0,95		± 0,99		± 0,74	
k_{LF} (mL/mg)	-	0,16	-	2,30	-	3,75	-	2,91
		± 0,01		± 0,75		± 0,42		± 0,59
R^2	0,98	0,95	0,95	0,99	0,97	0,98	0,98	0,99
n	-	0,93	-	0,55	-	2,01	-	0,61
		± 0,13		± 0,14		± 0,63		± 0,11

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3.8 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L), Langmuir-Freundlich (LF) e Henry (H) para adsorção de IgG em Zn/Al-HDL utilizando diferentes tampões biológicos

Parâmetros	FOSFATO		MOPS	HEPES	TRIS-HCl
	L	LF	H	H	H
$q_{máx}$ (mg/g)	121,66 ± 7,13	128,20 ± 1,43	-	-	-
k_L (mL/mg)	3,84 ± 1,23	-	-	-	-
k_{LF} (mL/mg)	-	7,21 ± 0,95	-	-	-
k_H (mL/mg)	-	-	277,21 ± 7,2	186,06 ± 4,60	387,91 ± 7,80
R^2	0,95	0,98	0,98	0,98	0,99
N	-	0,35 ± 0,04	-	-	-

L-Langmuir

LF-Langmuir-Freundlich

H-Henry

Fonte: elaborada pelo autor

Na literatura observa-se com certa frequência o uso de resinas de trocas iônicas para a adsorção de proteínas. Yu e Sun (1999) utilizaram um polímero macroporoso, como matriz de troca iônica, denominado poly(glycidyl methacrylate–triallyl isocyanurate–divinylbenzene) para adsorção de BSA. Os resultados mostraram uma capacidade máxima de adsorção de 22,8 mg de BSA/g de resina úmida utilizando tampão TRIS/HCl a pH 7,0. Os autores também observaram que a matriz teve pouca adsorção não específica para BSA antes de introduzir os grupos de troca iônica. A matriz apresentou resultados satisfatórios para a purificação de proteínas por cromatografia. Lu e colaboradores (2012) estudaram isotermas de adsorção de BSA e HSA em uma série de resinas de troca iônica de dietilaminoetil (DEAE), com diferentes tamanhos de poros e densidades. A capacidade máxima de adsorção (ajustada pelo modelo de Langmuir), tanto para BSA quanto para HSA, foi cerca de 80-120 mg/g utilizando tampão FOSFATO e pH 7,0. Zhang e Zun (2001) utilizaram outro polímero macroporoso denominado poli poly(glycidyl methacrylate–divinylbenzene–triallylisocyanurate) como resina de troca iônica para a adsorção de proteínas. A isoterma de adsorção obtida em leito fixo com BSA (com ajuste pelo modelo de Langmuir) foi de 76,0 mg/g de resina utilizando tampão TRIS/HCl a pH 7,6. Os autores utilizaram sistema de HPLC para isolar três proteínas (lisozima, hemoglobina e BSA) e observaram que a vazão da fase móvel não afetou muito o sistema e 5 min (a 902,5 cm/h) foi o tempo necessário separar as proteínas. Pode notar-se que a capacidade máxima de adsorção para as resinas de troca iônicas citadas não foram superior as obtidos no presente trabalho.

Em relação aos resultados com o Zn/Al-HDL desse trabalho, observou-se quantidades de IgG adsorvidas surpreendentes, principalmente quando comparadas com essas resinas anteriormente citadas. Cabe agora apresentar possíveis explicações para tais resultados tão surpreendentes. Comparando as quantidades adsorvidas entre os HDL estudados no presente estudo, notou-se também considerável diferença de quantidade adsorvida. A fim de explicar essa diferença entre os dois HDL, precisamos analisar com mais peculiaridade cada um dos HDL sintetizados nesse trabalho. Uma das diferenças entre os dois HDL está no cátion divalente intercalado, um sintetizado com Mg^{2+} e o outro com Zn^{2+} . Segundo o princípio dos ácidos e bases duros e moles (HSAB – *Hard and Soft Acids and Bases*) há três tipos principais de ácidos e de bases: duros, intermediários e moles (Pearson, 1968). Os íons metálicos Mg^{2+} e Zn^{2+} são classificados como ácidos duros e intermediários, respectivamente. Esses conceitos são muito utilizados em cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) para adsorção de proteínas. Onde, os íons metálicos mais utilizados para interagir com as proteínas são: Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{2+} , Ca^{2+} , por apresentarem

caráter de ácido intermediário formando ligações de coordenação estáveis com bases intermediárias (átomos de N₂ aromático) e bases moles (átomos de enxofre) (Bresolin *et al.*, 2009). Portanto, além de interações iônicas e forças eletrostáticas presentes na adsorção dessas proteínas, devem ser mencionadas as ligações de coordenação. Essas ligações de coordenação são caracterizadas por ligações do tipo reversíveis, onde são muito estudadas em IMAC. Em condições de IMAC pura, isto é, tampão de adsorção contendo NaCl, a tendência é que majoritariamente ocorra a predominância de ligações de coordenação, uma vez que o sal causa um enfraquecimento das ligações iônicas. As condições de adsorção no presente estudo foram com ausência de sal, portanto tornando possível a existência mútua de ambas as contribuições.

Quantidades de HSA adsorvida em Zn/Al-HDL foram elevadas, na ordem de 300 mg/g, quando utilizados os tampões MOPS, HEPES e TRIS/HCl porém inferior as quantidades adsorvidas com a proteína IgG nesse mesmo HDL. Novamente foi observada quantidade adsorvida inferior no sistema com a presença do tampão FOSFATO, em relação aos outros adsorventes estudados.

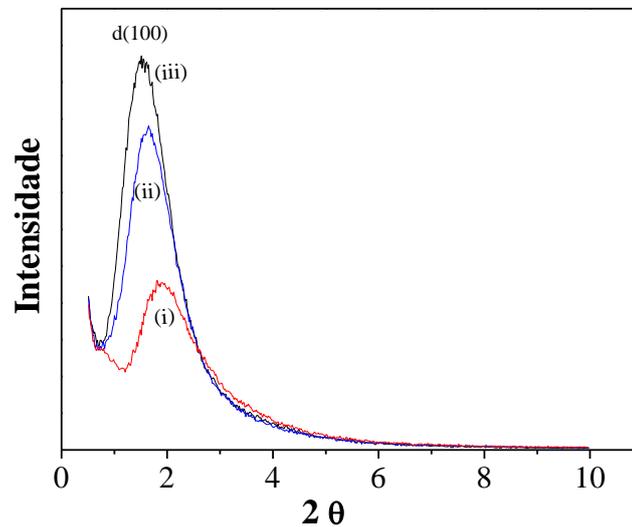
Diante dos resultados apresentados observou-se que o Zn/Al-HDL apresentou as maiores quantidades adsorvidas de IgG, porém alta quantidade adsorvida de HSA. Portanto, para os ensaios de purificação em batelada com soluções contendo mistura de proteínas e soluções com soro humano diluído, o sistema composto por Zn/Al-HDL e tampão TRIS-HCl foi o escolhido para ser um adsorvente na purificação ou pré-purificação de IgG.

3.3.3 Caracterização das SBA 15

Os materiais mesoporosos do tipo SBA 15 foram à segunda classe de materiais estudados no presente trabalho. Foram sintetizados quatro SBA 15, na presença e na ausência do heteroátomo de zircônio. HDL e SBA 15 são materiais bem distintos, porém com grande capacidade em interagir com biomoléculas, como as proteínas.

A Figura 3.10 apresenta os padrões de baixo ângulo de difração de raios-X em 2 θ entre 0,5 e 10 ° as SBA 15 sintetizadas com zircônio (SBA 15-Si/Zr5, SBA 15-Si/Zr10 e SBA 15-Si/Zr20). Uma típica SBA 15 preparada com o copolímero tribloco P123 (PEO20PPO70PEO20) apresenta um intenso pico d(100) e outros dois picos de menor intensidade d(110) e d(200), essas reflexões estão associadas à simetria hexagonal p6mm (Zhao *et al.*, 1998; Lei *et al.*, 2004; Diao *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2013; Vilarrasa-García *et al.*, 2014).

Figura 3.10 – Difratomogramas de raios X obtidas para: SBA 15-FTMB, SBA 15-Si/Zr5 (linha preta, iii), SBA 15-Si/Zr10 (linha azul, ii), SBA 15-Si/Zr20 (linha vermelha, i)

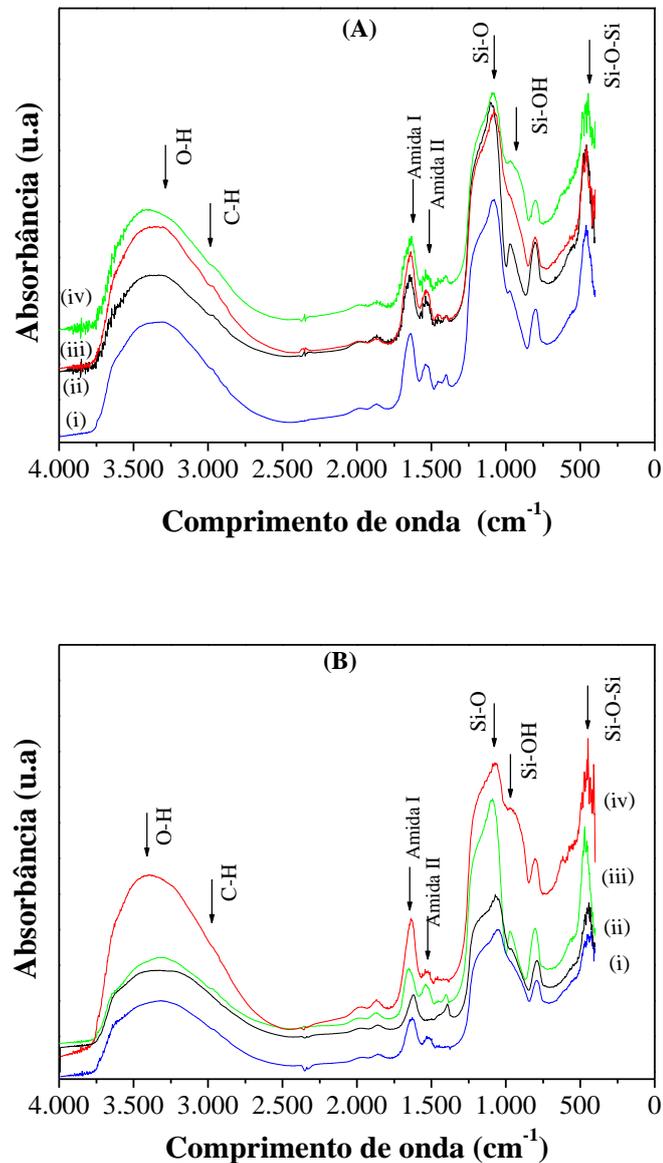


Fonte: O próprio autor

As amostras de SBA 15 com zircônio (Figura 3.10) apresentaram apenas um pico bem definido em $d(100)$, as ausências dos outros picos característicos denotam que esses materiais não apresentaram simetria hexagonal $p6mm$. Salienta-se ainda que não foi detectado nenhuma fase cristalina de dióxido de zircônio nos padrões de alto ângulo de DR-X, o que pode sugerir que o zircônio foi bem incorporado na matriz de sílica (Fuxiang *et al.*, 2007; Do *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012). Os resultados obtidos mostraram o baixo ordenamento da estrutura dessas SBA 15 com zircônio provavelmente devido ao processo de expansão de poros e a inserção de átomos de zircônio. De acordo com Nguyen e colaboradores (2008) a interação entre o TMB e o copolímero tribloco resulta na expansão do tamanho do poro da SBA 15 e, conseqüentemente, no aumento do volume do molde hidrofóbico resultando em uma estrutura com menor grau de ordenamento de longo alcance. Em relação às SBA 15 com zircônio verificou-se que esse heteroátomo aparentemente também interfere na condensação da fase orgânica sobre a micela do surfactante, como também observado por Dos Santos (2013).

A Figura 3.11 apresenta os espectros de FTIR das SBA 15-FTMB e SBA 15-Si/Zr com as proteínas IgG e HSA adsorvidas.

Figura 3.11 – FTIR das SBA 15 sintetizadas com IgG (A) e com HSA (B). SBA 15-FTMB (linha preta, ii), SBA 15-Si/Zr5 (linha verde, iv), SBA 15-Si/Zr10 (linha azul, i), SBA 15-Si/Zr20 (linha vermelha, iii)



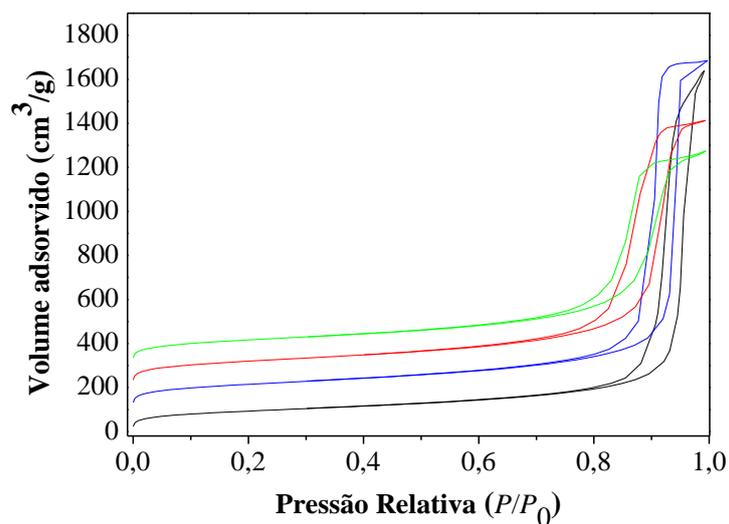
Fonte: elaborada pelo autor

De acordo com os espectros da SBA 15-FTMB (Figura 3.11) pode-se observar uma forte vibração correspondente ao estiramento de grupos O-H em 3330 cm⁻¹ e outra vibração em 960 cm⁻¹ correspondente ao estiramento Si-OH de grupos silanóis. A presença de um fraco pico em 2937 cm⁻¹ corresponde ao estiramento C-H, conforme relatado na literatura (Li *et al.*, 2006; Phan e Jones, 2006; Nguyen *et al.*, 2008). Observou-se o pico em 1080 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de Si-O e um pico de menor intensidade em 460 cm⁻¹ devido à

flexão de Si-O-Si (Nguyen *et al.*, 2008). Em relação às SBA 15-Si/Zr não fica evidente a aparição do pico correspondente a Zr-OH, próximo de 3660 cm^{-1} , como relatado por Tang e colaboradores (2012), possivelmente devido a forte vibração do estiramento O-H que se sobrepõe. Porém, nota-se claramente a diminuição da banda dos grupos silanóis (Si-OH) em 960 cm^{-1} nas SBA 15-Si/Zr. O sucesso da adsorção pode ser evidenciado pela ocorrência dos picos característicos da amida I e amida II em 1647 e 1541 cm^{-1} , respectivamente (Salis *et al.*, 2010; Steri *et al.*, 2013).

A Figura 3.12 apresenta as isotermas de adsorção/dessorção de N_2 das quatro SBA 15 sintetizadas. A curva de isoterma de N_2 para SBA 15 normalmente fornece isotermas de adsorção-dessorção do tipo IV com um “loop” de histerese ocorrendo em elevadas pressões relativas, fato esse observado em todas as SBA 15 analisadas. As amostras possuem canais muito regulares, apesar do seu grande tamanho dos poros, o que pode vir a ser evidenciado pela distribuição de tamanho de poro Gaussiana estreita centrada em seu diâmetro médio de poro, como relatado por Fuxiang e colaboradores (2007).

Figura 3.12 – Isotermas de adsorção-dessorção de N_2 nos SBA 15: FTMB (linha preta), Si/Zr20 (linha azul), Si/Zr10 (linha vermelha) e Si/Zr5 (linha verde)



Fonte: elaborada pelo autor

A Tabela 3.9 apresenta as propriedades texturais das SBA 15, obtidas pela aplicação dos modelos de BET e BJH do presente trabalho e de outros trabalhos da literatura.

Todas as amostras analisadas apresentaram elevada área superficial (337-432 m²/g) e grande volume total de poros (1,51-2,54 cm³/g). A SBA 15-FTMB apresentou menor área superficial, em relação às outras SBA 15, entretanto observa-se elevado diâmetro médio de poros (30,1 nm) e volumes de médio de poros (2,54 cm³/g). Esses valores estão em concordância com as modificações realizadas nas SBA 15, à medida que aumentou a proporção de zircônio na síntese de SBA 15, diminuiu tanto o diâmetro médio dos poros como o volume médio dos poros. Esses valores são coerentes, visto que o zircônio pode ocupar certos espaços disponíveis da SBA 15 precursora (SBA 15-FTMB) e conseqüentemente diminuirá seu o diâmetro de poro e volume total de poro.

Tabela 3.9 – Propriedades texturais para os SBA 15 sintetizadas e da literatura

S_{BET} (m²/g)	V_P (cm³/g)	D_P (nm)	SBA 15	Agente Expansor	Referências
337	2,54	30,10	FTMB	TMB	Neste trabalho
416	2,38	25,80	Si/Zr20	TMB	Neste trabalho
432	1,80	17,40	Si/Zr10	TMB	Neste trabalho
420	1,51	11,90	Si/Zr5	TMB	Neste trabalho
727	1,03	9,47	SBA-15		(Fuxiang <i>et al.</i>, 2007)
524	0,53	7,68	Zr/Si0,38		(Fuxiang <i>et al.</i>, 2007)
474	0,52	7,66	Zr/Si0,68		(Fuxiang <i>et al.</i>, 2007)
666	0,74	3,46	S.1	-	(Nguyen <i>et al.</i>, 2008)
718	1,23	6,50	SBA-15	-	(Salis <i>et al.</i>, 2010)
912	1,26	10,60	SBA-15/24	-	(Fulvio <i>et al.</i>, 2005)
910	2,20	26,00	SBA-15	TMB	(Zhao <i>et al.</i>, 1998)
609	1,65	16,70	SBA-15-HD	Octano	(Dos Santos <i>et al.</i>, 2013)
710	1,30	7,00	HTT10	n-heptano	(Vilarrasa-García <i>et al.</i>, 2014)
912	1,16	7,73	SBA-15-2	-	(Katiyar <i>et al.</i>, 2005)
570	2,28	24,0	SBA-15-3	TMB	(Katiyar <i>et al.</i>, 2005)

S_{BET} – Área superficial específica;

V_P – Volume total de poros;

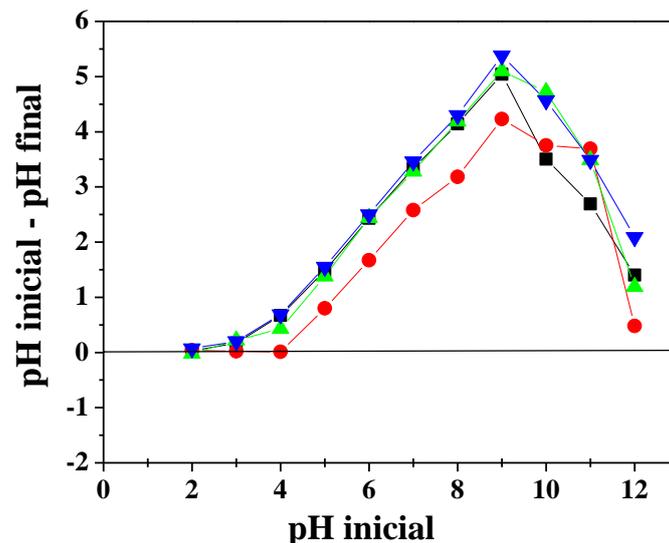
D_P – Diâmetro total de poros

Fonte: elaborada pelo autor

Fuxiang e colaboradores (2007) observaram resultados similares, onde à medida que foi aumentada a proporção de zircônio na síntese às amostras de SBA 15 reduziram simultaneamente a área superficial, volume total de poros e o diâmetro de partícula. De acordo com a Tabela 3.9, o volume total de poros da SBA 15-FTMB foi de 2,54 cm³/g, enquanto que às SBA-Si/Zr apresentaram valores de 2,38; 1,80 e 1,51 cm³/g, respectivamente para: SBA 15-Si/Zr20, SBA 15-Si/Zr10 e SBA 15-Si/Zr5. O diâmetro de poro foi elevado (30,1 nm) para SBA 15-FTMB, um pouco inferior para a SBA 15-Si/Zr20 e cerca de duas e três vezes superiores que as SBA 15-Si/Zr10 e SBA 15-Si/Zr5

Ponto de carga zero (pH_{ZPC}): pela Figura 3.13 pode ser observado que o pH_{ZPC} das SBA 15 foram similares, compreendendo uma faixa de pH ácido (pH de 2,0 à 4,0) devido a presença de grupos hidroxilas de superfícies considerados como ácidos fracos (Song, Hidajat e Kawi, 2005). Resultados similares podem ser observados na literatura (Song *et al.*, 2005; Salis *et al.*, 2010; Dos Santos, 2013). Importante destacar que para valores de pH acima dessa faixa, as SBA 15 apresentam predominância de cargas negativas e, portanto, maior afinidade para grupos catiônicos, por exemplo das biomoléculas.

Figura 3.13 – Ponto de Carga Zero (pH_{ZPC}) dos adsorventes: SBA 15-FTMB (■), SBA 15-Si/Zr5 (●), SBA 15-Si/Zr10 (▲), SBA 15-Si/Zr20 (▼)



Fonte: elaborada pelo autor

A Tabela 3.10 apresenta as cargas de superfícies das SBA 15 e das proteínas em função do pH. A faixa de pH trabalhada nos ensaios em batelada foi de 4,0 à 9,0, logo as SBA 15 apresentam carga negativa em praticamente toda faixa de pH estudada. As forças

eletrostáticas possivelmente serão mais atuantes na adsorção da proteína IgG, visto que a mesma apresenta carga positiva (abaixo do pH 6,3) e carga neutra (no pI). Única condição favorável a adsorção de HSA será em pH menor ou igual a 4,8, pois em pH acima de 4,8, a HSA apresenta mesma carga (negativa) das SBA 15 e, portanto, as forças de repulsão eletrostáticas tendem a ser mais atuantes desfavorecendo a adsorção dessa proteína. Salienta-se que a adsorção em sílicas mesoporosas não se restringe a apenas interações eletrostáticas entre cargas opostas da SBA 15 e da proteína, essa representam uma pequena contribuição na interação entre SBA 15 e proteína. Devido a grande disponibilidade da área superficial da maioria das SBA 15 e do seu diâmetro do poro, onde as proteínas podem se acomodar.

Tabela 3.10 – Carga superficial aparente das SBA 15 e das proteínas em função do pH

Adsorvente	Faixa de pH				
	2,0	2,1 - 4,0	4,1 – 4,7	4,8	4,9 -9,0
SBA 15 FTMB	N	-	-	-	-
SBA 15-Si/Zr20	N	-	-	-	-
SBA 15-Si/Zr10	N	-	-	-	-
SBA 15-Si/Zr5	N	N	-	-	-
HSA (pI 4,8)	+	+	+	N	-

(+) *Positiva*

(-) *Negativa*

(N) *Neutra*

Fonte: elaborada pelo autor

Ao longo das últimas duas décadas, adsorção de proteínas em materiais mesoporosos tem sido extensivamente estudada, e muitas aplicações técnicas foram investigadas. Algumas proteínas, quando imobilizadas em sílicas mesoporosas, apresentam uma melhor estabilidade tanto química como térmica, além de reter ou aumentar sua atividade eletroquímica mesmo quando submetida a condições de desnaturação (Washmon-Kriel *et al.*, 2000). As vantagens em se trabalhar com esses materiais possibilitam uma ampla aplicação bioquímica, como por exemplo, na área promissora de utilização de materiais porosos como novos dispositivos para a liberação controlada de fármaco “*in vivo*” (Moerz e Huber, 2014)

A adsorção de proteínas pode ser não específica e portanto, reversível sob determinadas condições. Curiosamente, apesar da vasta quantidade de pesquisas neste âmbito, não há até hoje consenso na literatura sobre o tipo de interação que domina a adsorção de biomoléculas em superfícies inorgânicas (Moerz e Huber, 2014). A seguir serão apresentados

os resultados de adsorção em batelada com as proteínas modelos IgG e HSA em sílicas mesoporosas do tipo SBA 15.

3.3.4 Adsorção de proteínas em SBA 15

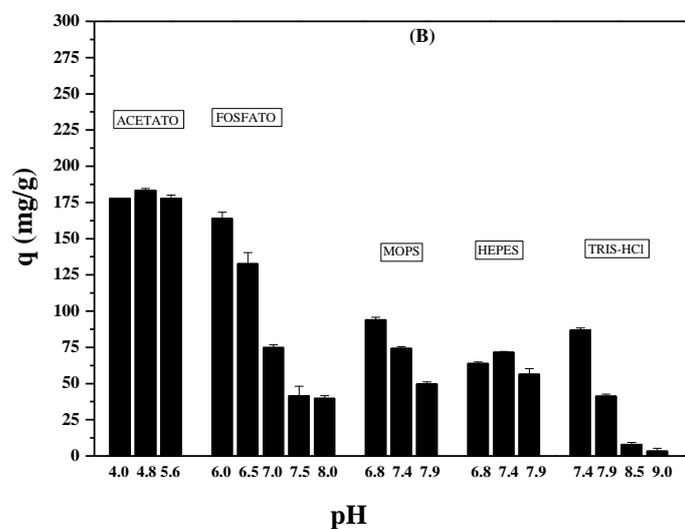
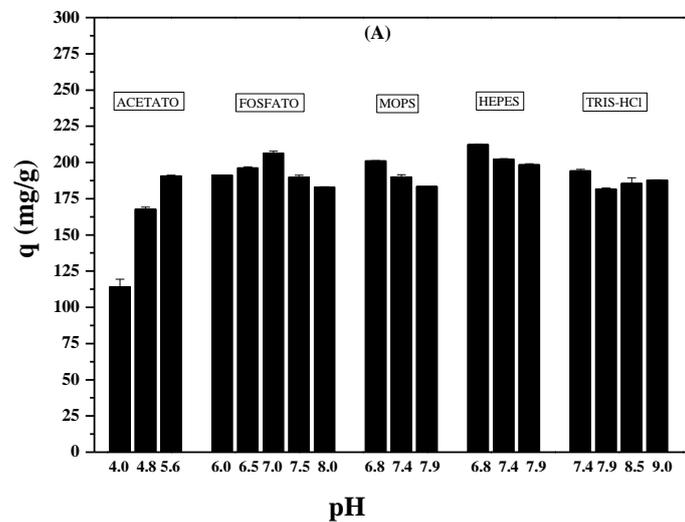
Efeito do pH e do tampão na adsorção de proteínas: em inúmeros estudos de adsorção de proteínas em SBA 15, a adsorção ocorre exatamente no pI ou em valores de pH muito próximo ao pI da proteína. Isto é muitas vezes interpretado em termos de um equilíbrio entre uma interação atrativa proteína-superfície e uma interação repulsiva proteína-proteína (Hartmann, 2005; Miyahara *et al.*, 2006). A baixa repulsão eletrostática entre as moléculas no seu pI facilita o empacotamento denso observado das moléculas adsorventes. Enquanto que a carga total aparente da proteína desaparece no pI, a sua superfície ainda contém traços de resíduos de aminoácidos carregados positivamente e negativamente. Essas cargas remanescentes interagem por atração com a superfície negativamente carregada (Essa *et al.*, 2007; Hartvig *et al.*, 2011). Em valores de pH longe do ponto isoelétrico, as proteínas irão repelir umas às outras e, assim, causar uma densidade de empacotamento menos compacta na superfície de adsorção (Moerz e Huber, 2014).

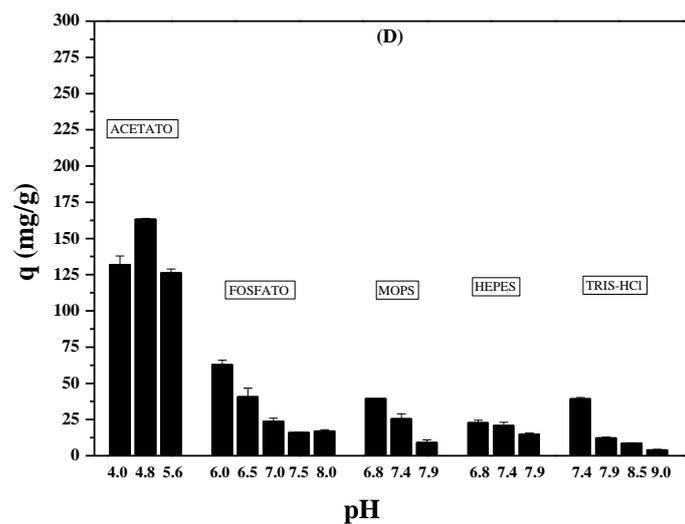
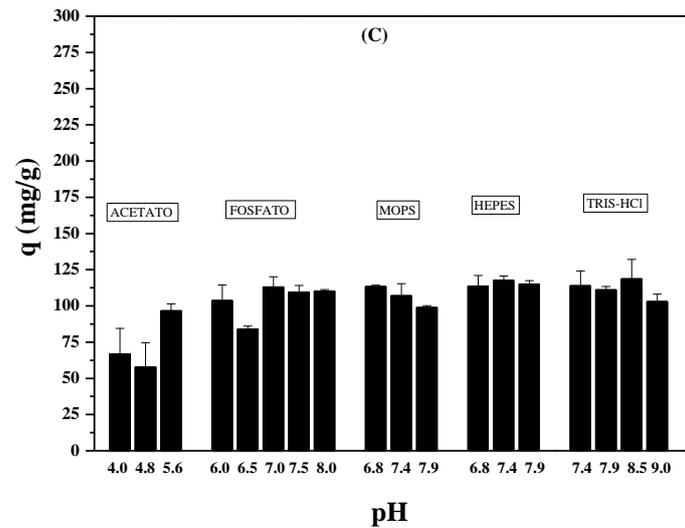
As sílicas mesoporosas do tipo SBA 15 são muito conhecidas e se caracterizam por serem materiais mesoporosos com elevada área superficial e facilidade de modificações. Tais materiais são muito utilizados na adsorção de várias biomoléculas, como por exemplo, BSA, lisozima, celulase, dentre outras. No presente trabalho foram utilizadas SBA 15 com fluoreto (F) e trimetilbenzeno (TMB) e mais três materiais, a partir desta SBA 15, com a inserção do heteroátomo de zircônio em três razões molares distintas de Si/Zr: 5, 10 e 20. Logo, o aumento da razão molar foi inversamente proporcional à quantidade inserida de zircônio. Portanto, a SBA 15 com maior quantidade de silício foi a SBA 15-Si/Zr5. O heteroátomo de zircônio tende a proporcionar: maior acidez e atividade catalítica, porém menor estabilidade térmica, além de diminuir as propriedades texturais das SBA 15 (Fuxiang *et al.*, 2007).

Os quatros adsorventes sintetizados (SBA 15-FTMB, SBA 15-Si/Zr5, SBA 15-Si/Zr10 e SBA 15-Si/Zr20), foram utilizados para investigar na adsorção das proteínas IgG e HSA em cinco tampões (ACETATO, FOSFATO, MOPS, HEPES e TRIS-HCl) distintos. A Figura 3.14 (A, B, C e D) apresenta os resultados de adsorção das proteínas com: SBA 15-FTMB (Figura 3.14 A e B) e SBA 15-Si/Zr5 (Figura 3.14 C e D). Note que os dois materiais selecionados foram exatamente: sem a presença de zircônio (SBA 15-FTMB) e com a maior

quantidade de zircônio na síntese (SBA 15-Si/Zr5). Portanto, será obtida a tendência do comportamento da adsorção em ambas as proteínas nos adsorventes com e sem a presença do heteroátomo de zircônio.

Figura 3.14 – Efeito do pH na adsorção de IgG e HSA (concentração inicial de 1,0 mg/mL). A) SBA 15-FTMB com IgG, B) SBA 15-FTMB com HSA, C) SBA 15-Si/Zr 5 com IgG e D) SBA 15-Si/Zr 5 com HSA. Faixa de pH para cada tampão: ACETATO (4,0-5,6) FOSFATO (6,0-8,0) MOPS (6,5-7,9) HEPES (6,8-8,0) TRIS (7,2-9,0)





Fonte: elaborada pelo autor

As proteínas HSA e IgG apresentam pI distintos, sendo 4,8 para HSA e 6,3 à 9,0 para a IgG. Em relação à adsorção da proteína IgG nas SBA 15 estudadas, constatou-se dependência do pI da mesma, visto que nos tampões FOSFATO, MOPS, HEPES e TRIS-HCl as quantidades adsortivas de IgG foram similares e aproximadamente 200 e 100 mg/g, respectivamente com SBA 15-FTMB e SBA 15-Si/Zr5. Todos os tampões utilizados compreenderam uma faixa de pH muito próxima do pI da IgG, exceto o tampão ACETATO, a qual é aconselhável trabalhar em uma faixa de pH mais ácido (4,0 à 5,6). Logo, a adsorção de IgG nas SBA 15 utilizando o tampão ACETATO foi aumentando a medida que o pH das soluções se tornava menos ácido, e conseqüentemente se aproximava do pI da IgG. Nota-se

também que o material com maior quantidade de zircônio apresentou menor quantidade de IgG adsorvida, cerca de duas vezes menor que o material sem zircônio (SBA 15-FTMB). Possíveis explicações para tais resultados seriam: o aumento do grau de acidez, ocasionado devido à inclusão do heteroátomo, e a diminuição gradativa do tamanho médio do poro dessas SBA 15 com zircônio.

A IgG, como todas as proteínas, tende a apresentar maior adsorção em pH próximos ao pI, nesse caso em pH neutro e/ou ligeiramente básico. Logo a SBA 15-Si/Zr5, por apresentarem um grau de acidez superior que a SBA 15-FTMB, tendem a proporcionar condições pouco propícias a adsorção de IgG. A adsorção é um fenômeno de superfície e quanto menor a área superficial específica e menor diâmetro médio do poro do material, menor as possibilidades de acomodação da biomolécula, principalmente as IgG que possuem dimensões relativamente altas: 14,5 nm x 8,5 nm x 4,0 nm (Tan *et al.*, 2008).

Em relação à adsorção de HSA nos dois materiais estudados foi observado comportamento similar ao discutido com a proteína IgG. A adsorção de HSA foi elevada no seu pI, possuindo valores de quantidade adsorvida de 183,4 e 163,31 mg/g, respectivamente com SBA 15-FTMB e SBA 15-Si/Zr5 utilizando o tampão ACETATO (pH 4,8). À medida que o pH se distanciou do pI da HSA a adsorção de HSA nas SBA foi desfavorecida. Logo, a adsorção utilizando os demais tampões foi inferior ao obtido com o tampão ACETATO. Analisando apenas o tampão ACETATO, nota-se que o aumento da acidez das SBA 15 não teve grande influência, visto que as quantidades adsorvidas no pH 4,8 (pI da HSA) foram próximas em ambos os materiais. Entretanto, o material com maior acidez (SBA 15-Si/Zr5) teve quantidade adsorvida, cerca de, 2,21 a 3,14 vezes menores que em relação à SBA 15-FTMB ao analisarmos os demais tampões (FOSFATO, MOPS, HEPES e TRIS-HCl). Esse fato ilustra bem a forte dependência da adsorção dessa proteína com o seu pI, visto que a adsorção de HSA no pI não teve grandes alterações devido ao material, porém ao se trabalhar longe do pI a adsorção teve decaimento expressivo. Outro fator a ser destacado para a baixa adsorção de HSA pode ser relacionado às repulsões eletrostáticas de cargas de mesmo sinal da proteína (negativa) e das SBA 15 (negativa), conforme apresentado na Tabela 3.10. Portanto, através desses resultados podemos concluir que o pI realmente foi fator determinante na adsorção dessas proteínas em SBA 15, o grau de acidez teve influência na adsorção de IgG, onde a SBA 15 sem o heteroátomo de zircônio foi a SBA mais indicada para adsorção dessa proteína. Além desses fatores, as forças de repulsão eletrostáticas, no caso da HSA com as SBA, contribuíram para uma baixa adsorção em pH neutro e ligeiramente básicos.

A Tabela 3.11 apresenta os valores de quantidades adsorvidas de IgG e HSA em SBA 15-FTMB e SBA 15-Si/Zr5 nos pH de maior destaque na adsorção de HSA (ACETATO) e de IgG (demais tampões). Todos os pH selecionados foram próximos de 7,0, exceto o pH do tampão ACETATO (único tampão favorável a adsorção de HSA).

Para os próximos ensaios foram escolhidos trabalhar com os quatro materiais sintetizados na adsorção de IgG e HSA utilizando os tampões ACETATO (pH 4,8) e FOSFATO (pH 7,0).

Tabela 3.11 – Quantidade adsorvida de IgG e HSA, após 2,0 h de contato, em SBA 15-FTMB e SBA 15-Si/Zr5 com diferentes tampões

TAMPÃO	Quantidade de proteína adsorvida (mg/g)				
	pH	SBA 15-FTMB		SBA 15-Si/Zr5	
		IgG	HSA	IgG	HSA
25 mM ACETATO	4,8	167,8	183,4	57,8	163,3
FOSFATO	7,0	206,6	75,0	113,1	23,9
MOPS	6,8	201,0	94,1	113,3	39,5
HEPES	6,8	212,3	63,9	113,7	22,8
TRIS-HCl	7,4	194,2	87,0	114,0	39,3

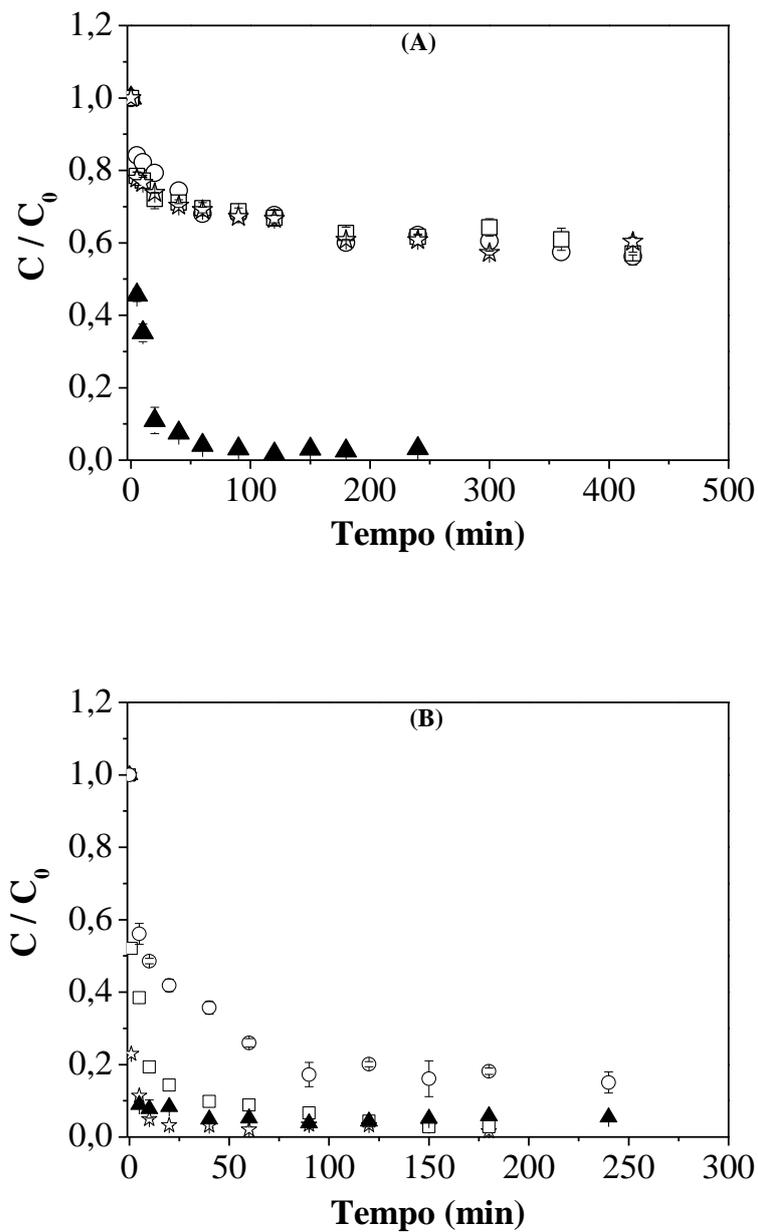
Fonte: elaborado pelo autor

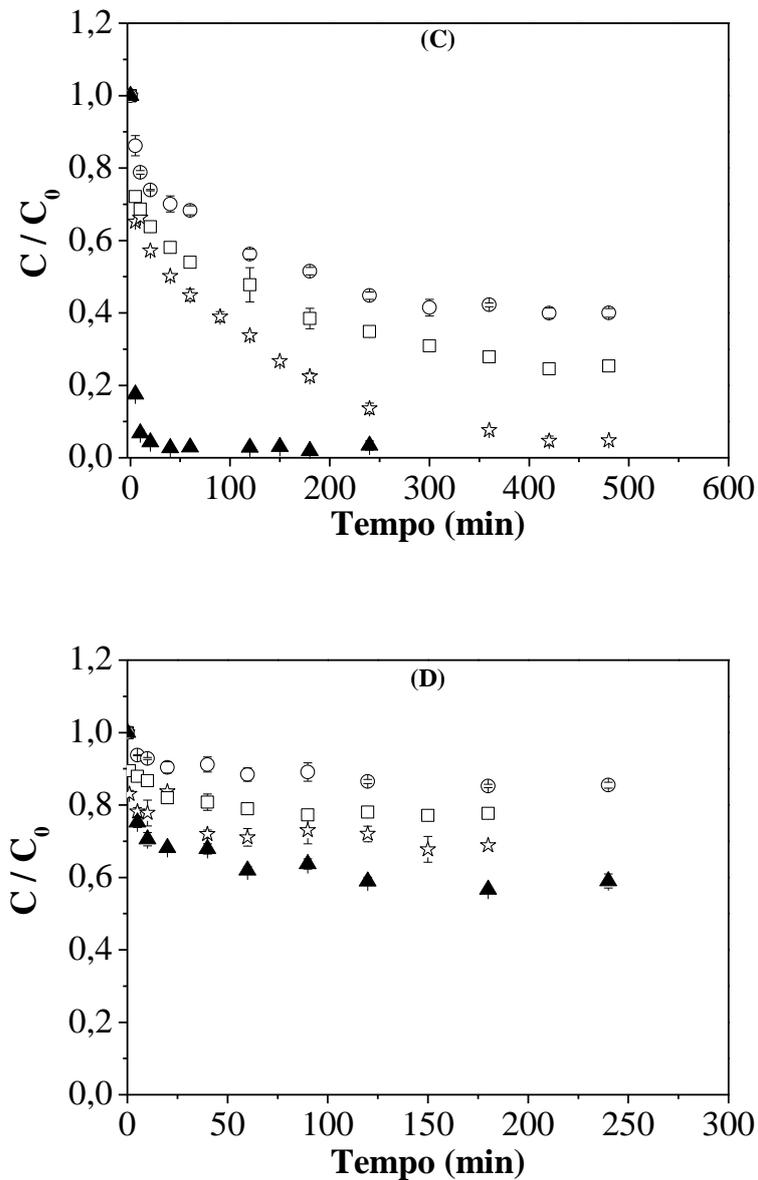
Efeito do tempo de contato: a fim de determinar a capacidade máxima de adsorção das SBA 15, primeiramente foram realizados ensaios em batelada com o propósito de determinar o tempo necessário para estabelecer o equilíbrio cinético de cada material. De todos os tampões testados no teste do pH decidiu-se em dar prosseguimentos aos ensaios de cinética e isoterma apenas com os tampões ACETATO e FOSFATO. Razões para essa escolha são simples, primeiro cada tampão estará favorecendo uma das duas proteínas por trabalhar no pI de cada e segundo devido a semelhança das quantidades adsorvidas observadas em todos os tampões. A Figura 3.15 apresenta os perfis cinéticos para a adsorção das proteínas IgG e HSA nas quatro SBA 15 sintetizadas utilizando os tampões ACETATO (Figura 3.15 A e B) e FOSFATO (Figura 3.15 C e D).

De acordo com a Figura 3.15 observou-se rápido decaimento na concentração de IgG com SBA 15-FTMB e tampão ACETATO, atingido o equilíbrio próximo de 120 min. Como mencionado anteriormente as SBA 15 com zircônio, por apresentarem maior acidez e

menor área superficial, não foram capazes de superar em valores de quantidade adsorvida de IgG frente a SBA 15-FTMB.

Figura 3.15 – Perfis cinéticos de adsorção de IgG (A e C) e HSA (B e D) em SBA (SBA 15-FTMB (▲), SBA 15-Si/Zr20 (*), SBA 15-Si/Zr10 (□) e SBA 15-Si/Zr5 (○)) utilizando os tampões ACETATO (A e B) com pH 4,8 e FOSFATO (C e D) com pH 7,0





Fonte: elaborado pelo autor

Destaca-se ainda que os três materiais com o heteroátomo de zircônio necessitaram de um tempo de contato superior para alcançar o equilíbrio, em torno de 180 min. A cinética de IgG utilizando tampão FOSFATO foi, mais uma vez, rápida com a SBA 15-FTMB e demorada com as SBA-15/Zr. Porém observou-se que a SBA 15-Si/Zr20 teve quantidade adsorvida de IgG comparável à SBA 15-FTMB, porém em um tempo de contato muito superior, em torno de 420 min. Esses resultados com o tampão FOSFATO foram mais expressivos (maior quantidade adsorvida), visto que esses ensaios foram realizados em pH 7,0, pH este que está na faixa do pI da IgG. Logo, o pI foi fator determinante para favorecer a adsorção dessa proteína, corroborando com o que foi mencionado anteriormente.

Em relação à adsorção de HSA, foi observado que todos os materiais conseguiram adsorver em sua totalidade a concentração disponível de HSA no meio (tampão ACETATO), exceto a SBA 15 com menor razão (ou maior quantidade de silício presente) de Si/Zr (SBA 15-Si/Zr5). Em todos os perfis cinéticos com o tampão ACETATO, o tempo médio de equilíbrio não excedeu 120 min. Os perfis de cinética da HSA adsorvidas nas SBA 15 com tampão FOSFATO demonstraram que o pH do meio não foi tão favorável para adsorção dessa proteína em nenhuma das SBA. Além disso, foi possível estabelecer certa preferência da proteína, pela SBA15-FTMB (SBA sem o heteroátomo de zircônio incorporado). Novamente, se torna necessário mencionar os três fatores relevantes na adsorção nesses adsorventes, o pI, a área superficial disponível e a acidez diferenciada dessas quatro SBA, sendo essas, as justificativas para o comportamento da adsorção dessas proteínas em SBA.

Isotermas de adsorção: a Figura 3.16 apresenta os perfis de isotermas de adsorção de IgG e HSA nas quatro SBA 15 utilizando os tampões ACETATO (A e B) e FOSFATO (C e D). Através das isotermas de IgG utilizando o tampão ACETATO, pode-se observar facilmente que as biomoléculas foram adsorvidas em maior quantidade em SBA 15-FTMB. Fatores determinantes para explicar tais resultados seriam: elevada área superficial, menor grau de acidez e as contribuições das forças eletrostáticas, ocasionadas pelas diferenças de cargas das SBA 15-FTMB (negativa) e da IgG (positiva).

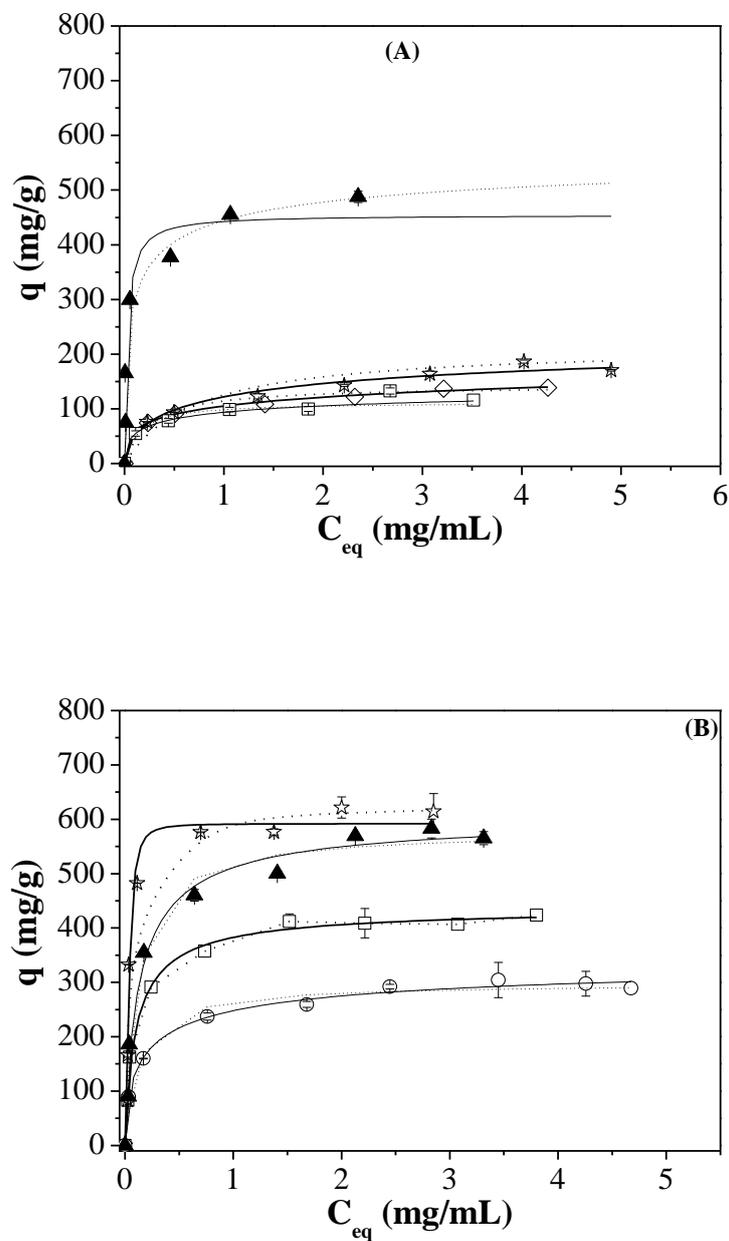
As SBA 15 por serem materiais mesoporosos e normalmente apresentarem elevada área superficial tendem a proporcionar significativos valores para quantidade adsorvidas, mesmo em pH fora do pI da proteína. No caso das IgG a quantidade adsorvida em SBA 15-FTMB foi, em torno de 500 mg/g (Figura 3.16 A). As SBA 15, com diferente teor de zircônio, não apresentaram elevadas quantidades adsorvidas de IgG, se limitando a 200 mg/g, valor este bem inferior aos obtidos pela SBA 15-FTMB.

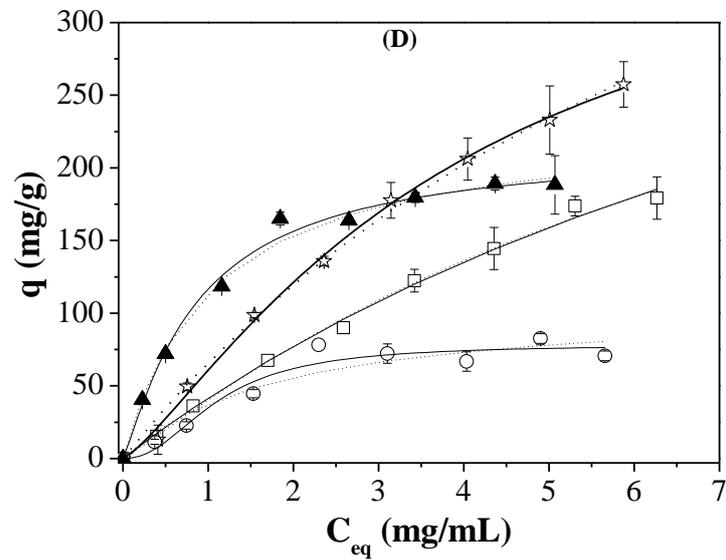
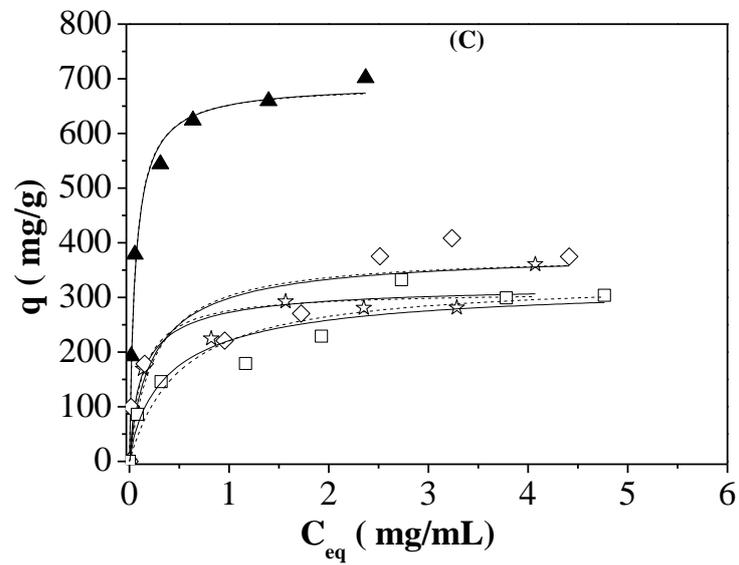
Ao mudar o pH (de 4,8 para 7,0) do ensaio e conseqüentemente de tampão, agora FOSFATO, nota-se considerável aumento na quantidade adsorvida de IgG em todas as SBA estudadas, conforme pode ser visto na Figura 3.16 C. Com SBA 15-FTMB a quantidade aumentou de 500,0 mg/g para 700,0 mg/g, enquanto que para as outras SBA 15 (com zircônio) o aumento foi de 200 mg/g para 250-350 mg/g. Portanto, podemos sugerir que o fato de os ensaios estarem sendo realizados na faixa de pI da IgG foi o responsável por esse aumento de quantidade adsorvida em todas as SBA 15 estudadas.

Os ensaios de adsorção no pI da HSA (Figura 3.16 B) forneceram duas informações interessantes. Primeiro, as isotermas apresentaram elevadas quantidades

adsorvidas de HSA e um perfil do tipo Langmuir, com rápida adsorção em baixas concentrações atingindo um platô em concentrações mais elevadas. Segunda informação relevante foi que a SBA 15 com menor teor de zircônio (SBA 15-Si/Zr20) apresentou quantidades adsorvidas de HSA superior às demais.

Figura 3.16 - Isotermas de adsorção de IgG (A e C) e HSA (B e D) em SBA (SBA 15-FTMB (▲), SBA 15-Si/Zr20 (*), SBA 15-Si/Zr10 (□) e SBA 15-Si/Zr5 (○)) utilizando os tampões ACETATO (A e B) com pH 4,8 e FOSFATO (C e D) com pH 7,0.





Fonte: elaborado pelo autor

Esses fatos mencionados anteriormente sugerem que, baixas quantidades de zircônio incorporadas em SBA 15 podem favorecer a adsorção dessa proteína. Porém, esse foi o único caso em que a presença de zircônio em SBA proporcionou superior quantidade adsorvida por proteínas, nesse caso HSA. A adsorção de HSA em SBA 15

utilizando o tampão FOSFATO não foi superior a 250 mg/g e não foi observado diferença significativa em relação as quatro SBA 15 estudadas. Alguns fatores podem ser elucidados para explicar essa redução de quantidade adsorvida, quando comparado aos resultados obtidos utilizando o tampão ACETATO. Primeiramente, a adsorção fora do pI da HSA é o principal fator a se considerar, além disso, temos a atuação de forças repulsivas de cargas de mesmo sinal das SBA 15 (negativas) com a HSA (negativa). Além dos fatores mencionados, temos a diferença de acidez entre as SBA 15. Interessante destacar que ao se trabalhar no pI da HSA, a SBA 15-Si/Zr20 foi a que apresentou maiores valores de HSA adsorvida, porém quando o pH foi distante do seu pI a SBA 15-Si/Zr proporcionou os menores valores de quantidade adsorvida. Possivelmente, uma soma de fatores seja a explicação para isso ter ocorrido. Menor diâmetro médio de poros, trabalhar distante do pI, diminuição das contribuições das forças eletrostáticas, todos esses fatores podem ser usados como justificativas para explicar tal resultado.

Ressalta-se ainda que, a adsorção de proteínas não depende apenas das propriedades da estrutura dos adsorventes como também das propriedades das proteínas. Relata-se na literatura 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).

As Tabelas 3.12-3.15 apresentam os parâmetros de ajustes para a adsorção de proteínas utilizando SBA 15, a partir dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich. Conforme pode ser observado na Tabela 3.12, a adsorção de proteínas em SBA 15 utilizando tampão ACETATO foi superior quando utilizado a SBA 15-FTMB, para adsorção de ambas as proteínas. No caso da adsorção de HSA, a SBA 15-Si/Zr20 proporcionou valores de quantidade máxima adsorvida ligeiramente superior às obtidas com a SBA 15-FTMB. Entretanto, as constantes de adsorção de Langmuir e Langmuir-Freundlich foram superiores para a SBA 15-FTMB indicando que este adsorvente proporcionou interação de ligação superior com a proteína HSA.

Tabela 3.12 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em SBA utilizando tampão ACETATO (pH 4,8)

Parâmetros	SBA 15-FTMB		SBA 15-Si/Zr20		SBA 15-Si/Zr10		SBA 15-Si/Zr5	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{m\acute{a}x}$ (mg/g)	578,70	607,20	628,10	591,90	423,50	507,20	298,10	355,00
	$\pm 16,40$	$\pm 40,30$	$\pm 34,40$	$\pm 17,10$	$\pm 8,40$	$\pm 40,30$	$\pm 8,90$	$\pm 29,00$
k_L (mL/mg)	11,60	-	5,47	-	9,33	-	12,90	-
	$\pm 2,00$		$\pm 1,40$		$\pm 1,10$		$\pm 2,70$	
k_{LF} (mL/mg)	-	18,90	-	1,60	-	14,90	-	43,60
		$\pm 2,10$		$\pm 0,40$		$\pm 5,10$		$\pm 14,30$
R^2	0,99	0,99	0,94	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99
N	-	0,84	-	$2,0 \pm 0,69$	-	$0,84 \pm 0,15$	-	$0,67 \pm 0,17$
		$\pm 0,15$						

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 3.13 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de IgG em SBA utilizando tampão ACETATO (pH 4,8)

Parâmetros	SBA 15-FTMB		SBA 15-Si/Zr20		SBA 15-Si/Zr10		SBA 15-Si/Zr5	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{máx}$ (mg/g)	454,70	594,90	215,10	252,60	140,40	192,50	107,10	111,70
	± 36,90	± 30,80	± 20,50	± 89,50	± 5,60	± 27,10	± 4,90	± 15,00
k_L (mL/mg)	36,05	-	1,40	-	3,90	-	8,50	-
	± 12,90		± 0,51		± 0,83		± 2,60	
k_{LF} (mL/mg)	-	4,60	-	0,93	-	0,56	-	8,20
		± 0,26		± 0,42		± 0,23		± 2,50
R^2	0,92	0,95	0,92	0,99	0,98	0,99	0,96	0,96
N	-	10,10	-	0,56	-	0,34	-	0,80
		± 3,30		± 0,22		± 0,18		± 0,17

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 3.14 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de HSA em SBA utilizando tampão FOSFATO (pH 7,0)

Parâmetros	SBA 15-FTMB		SBA 15-Si/Zr20		SBA 15-Si/Zr10		SBA 15-Si/Zr5	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{m\acute{a}x}$ (mg/g)	232,80	215,10	648,40	407,20	539,10	428,60	106,70	78,40
	± 8,90	± 14,50	± 73,30	± 50,40	± 57,10	± 155,00	± 18,60	± 12,21
k_L (mL/mg)	10,40	-	16,70	-	12,00	-	18,50	-
	± 2,40		± 3,70		± 2,54		± 8,70	
k_{LF} (mL/mg)	-	1,18	-	5,73	-	10,70	-	13,10
		± 0,24		± 0,73		± 3,10		± 3,30
R^2	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,91	0,95
N	-	1,17	-	1,28	-	1,10	-	2,20
		± 0,16		± 0,11		± 0,15		± 0,31

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 3.15 – Parâmetros de ajuste obtidos através dos modelos de Langmuir (L) e Langmuir-Freundlich (LF) para adsorção de IgG em SBA utilizando tampão FOSFATO (pH 7,0)

Parâmetros	SBA 15-FTMB		SBA 15-Si/Zr20		SBA 15-Si/Zr10		SBA 15-Si/Zr5	
	L	LF	L	LF	L	LF	L	LF
$q_{máx}$ (mg/g)	689,00	691,40	311,30	325,80	378,90	386,50	333,20	330,20
	± 20,90	± 29,40	± 29,40	± 7,30	± 44,20	± 31,50	± 36,5	± 21,50
k_L (mL/mg)	17,44	-	7,73	-	3,96	-	1,96	-
	± 2,70		± 4,40		± 1,81			
k_{LF} (mL/mg)	-	17,20	-	7,30	-	4,01	-	2,30
		± 4,00		± 3,91		± 2,21		± 0,75
R^2	0,98	0,98	0,83	0,88	0,83	0,87	0,89	0,90
N	-	0,98	-	0,83	-	0,88	-	0,83
		± 0,19		± 0,27		± 0,35		± 0,19

L-Langmuir

LF – Langmuir-Freundlich

Fonte: elaborado pelo autor

Em relação à adsorção de IgG utilizando o tampão ACETATO (Tabela 3.13), nota-se elevados valores das constantes de adsorção (k_L e k_{LF}) quando utilizado a SBA 15-FTMB em comparação aos outros adsorventes estudados. Tais constatações corroboram com os elevados valores de quantidades máximas adsorvidas de IgG ao utilizar a SBA 15-FTMB.

Os parâmetros de ajustes obtidos para adsorção de proteínas utilizando o tampão FOSFATO foram relativamente satisfatórios, no entanto alguns parâmetros são discutíveis quando comparados aos gráficos de isotermas da Figura 3.16 C-D. Principalmente, em relação às quantidades máximas ($q_{máx}$) adsorvidas previstas pelos modelos. De acordo com os parâmetros de ajuste, as $q_{máx}$ foram muito acima dos pontos experimentais dos gráficos de isoterma. Entretanto, observa-se facilmente que os dados experimentais com os adsorventes SBA 15-Si/Zr10-20 não alcançaram um platô e, portanto, ainda apresentam tendência a aumentar a quantidade máxima adsorvida. De fato, a quantidade adsorvida deverá ser maior, mas dificilmente alcançará os valores de quantidade adsorvida proporcionados com a SBA 15-FTMB na adsorção de IgG nesse mesmo tampão de estudo. As quantidades adsorvidas de IgG foram muito superiores aos demais adsorventes quando utilizou a SBA 15-FTMB. As constantes de adsorção (k_L e k_{LF}) de ambos os modelos foram superiores aos demais adsorventes, indicando alta interação pela biomolécula IgG.

3.3.5 Ensaios de purificação de IgG humana

Até o momento foi realizado uma discussão individual dos resultados de adsorção das proteínas modelos (IgG e HSA) com as duas classes de adsorventes utilizadas nesse trabalho. Tal proposta teve como principal meta delimitar o adsorvente com maior potencial para atuar na purificação ou pré-purificação de IgG humana, a partir de amostras de soluções binárias contendo IgG e HSA, além de amostras com soro humano.

Em relação aos HDL estudados foi surpreendente o resultado com o Zn/Al-HDL na adsorção de IgG diluída nos tampões MOPS, HEPES e TRIS-HCl. Tais resultados de proteínas adsorvidas foram acima de 550 mg/g, valores na mesma ordem de grandeza que sílicas mesoporosas SBA 15 normalmente apresentam para adsorção de inúmeras proteínas (Katiyar *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2006; Diao *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2013). Recorrendo a Figura 3.9-C, referente aos perfis de isotermas de

adsorção de IgG com Zn/Al-HDL, foi possível observar que a adsorção desta proteína diluída em tampão TRIS-HCl (pH 7,2) proporcionou os maiores valores de quantidade de IgG adsorvida (acima de 800 mg/g), quando comparado aos resultados na presença dos tampões MOPS e HEPES. Enquanto que a adsorção de HSA nessas mesmas condições (Figura 3.9-D) proporcionou quantidade adsorvida de HSA em valores absolutos menos da metade da quantidade adsorvida de IgG utilizando esse mesmo HDL. Portanto, o sistema escolhido para os testes de ensaios em batelada visando purificação de IgG humana ocorreu com o adsorvente Zn/Al-HDL e na presença do tampão TRIS/HCl (pH 7,2) para a diluição das proteínas.

Em relação à outra classe de materiais estudados, as sílicas mesoporosas do tipo SBA 15, sintetizadas na presença e na ausência de zircônio, foi observado que o heteroátomo de zircônio nas SBA 15 desfavoreceu a adsorção de IgG. Logo, escolheu-se a SBA 15 sem zircônio (SBA 15 FTMB) para os próximos ensaios visando a purificação de IgG humana. Foi possível observar que os tampões ACETATO e FOSFATO utilizados para a obtenção das isotermas de adsorção não proporcionaram condições com potencial seletividade para adsorção de IgG frente HSA, devido HSA ser adsorvida com quantidades relativamente altas. Portanto, para a escolha do tampão a ser utilizado foi necessário recorrer aos resultados do efeito do pH na adsorção das proteínas estudadas, vide Figura 3.14. A partir desses resultados, pôde ser observado que utilizando o tampão TRIS-HCl no pH 9,0 a adsorção de IgG foi próximo a 180 mg/g, extremamente superior a quantidade adsorvida de HSA (abaixo de 10 mg/g). Logo, nessas condições uma possível seletividade de IgG frente a HSA pode vir a ocorrer.

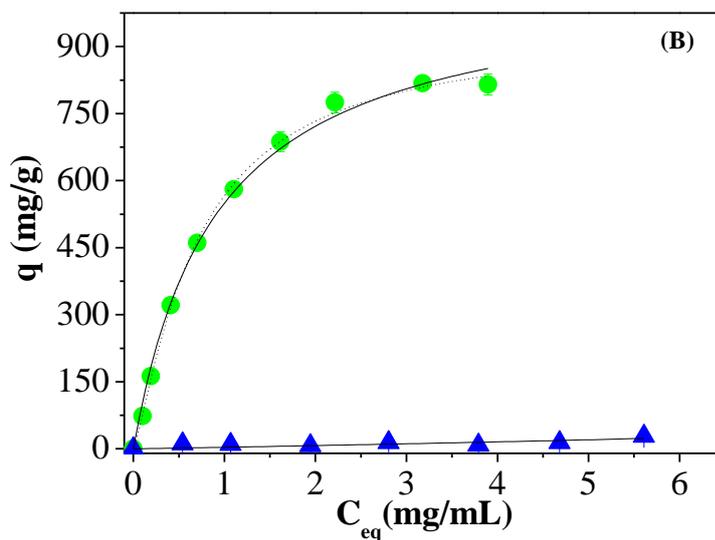
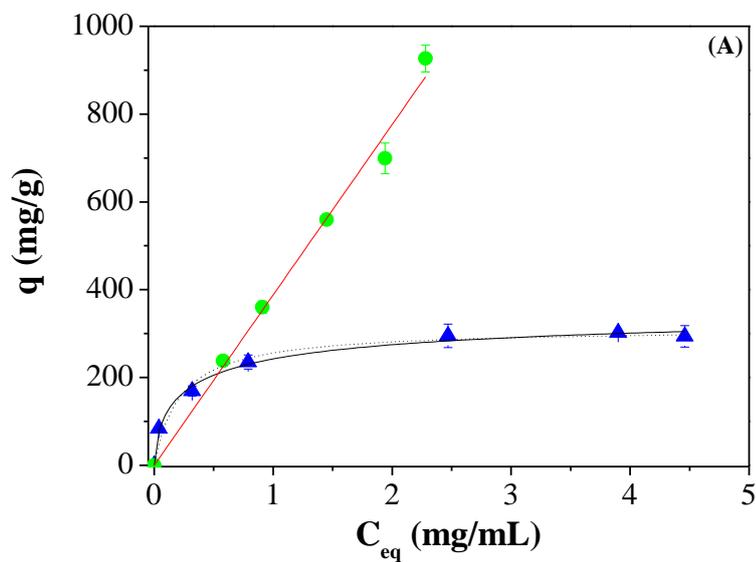
A seguir serão apresentados os resultados em batelada utilizando cada um dos sistemas (Adsorvente-tampão-proteína) definidos. Os próximos ensaios foram divididos em três novas etapas para acompanhar o desempenho desses adsorventes destinados a purificação de IgG humana. Inicialmente, foram comparados os resultados em cada um dos sistemas, apenas com as proteínas padrões (IgG ou HSA). Em seguida, ensaios com soluções contendo misturas binárias de proteínas e soluções com amostras de soro humano foram realizados objetivando a purificação ou pré-purificação de IgG humana. Eletroforese das amostras em mistura e com o soro humano foram realizados a fim de comprovar o possível potencial no uso desses adsorventes.

3.3.5.1 Ensaios com as proteínas IgG ou HSA

Nessa etapa foram realizados ensaios de isoterma de adsorção com SBA-15 FTMB e as proteínas modelos (IgG ou HSA) diluídas em TRIS-HCl para serem confrontados com os dados de isotermas de adsorção com o Zn/Al-HDL. Para facilitar a comparação foram plotados na Figura 3.17 os gráficos com esses resultados entre esses dois adsorventes escolhidos. Portanto, a Figura 3.17 apresenta as isotermas de adsorção com o Zn/Al-HDL e com SBA-15 FTMB utilizando o tampão TRIS-HCl. A princípio, a comparação entre esses dois adsorventes pode ser um tanto questionável, todavia para evidenciar a grande relevância no estudo comparativo desses dois adsorventes devem ser lembrados que esses materiais proporcionaram quantidades adsorvidas na mesma ordem de grandeza. E, além disso, alguns autores acreditam que tanto o HDL como a SBA 15 podem atuar como aparentes resinas de “trocadores iônicos fracos”, pois há a possibilidade de tornar a superfície de ambos os materiais carregados e dessa forma ocorrer interações do tipo eletrostáticas, entre cargas opostas da proteína alvo e do adsorvente. É fato que a SBA 15 atua com muito mais propriedade na adsorção de proteínas pelo aprisionamento das moléculas das proteínas no interior dos seus poros. Em contrapartida, o HDL normalmente apresenta baixas áreas superficiais e muitas vezes até insignificantes, porém apresenta grande facilidade na adsorção por interações eletrostáticas, ou até mesmo por pontes de hidrogênio, além das outras justificativas anteriormente comentadas com maiores detalhes.

Analisando a Figura 3.17 foi possível observar que o HDL apresentou quantidade relativamente superior a SBA-15 FTMB, porém a adsorção de HSA em Zn/Al-HDL foi consideravelmente alta, acima de 200,0 mg/g. As possíveis explicações quanto ao elevado desempenho deste HDL pelas proteínas IgG e HSA foi explicado no anteriormente. Resumidamente, o Zn/Al-HDL apresentou considerável quantidade de proteínas adsorvidas, possivelmente por apresentar em sua estrutura química a presença do componente químico zinco (Zn), que é classificado com um ácido intermediário que pode formar ligações de coordenação estáveis com bases intermediárias (átomos de N₂ aromático) e bases moles (átomos de enxofre) (Bresolin *et al.*, 2009). Portanto, além de interações iônicas, por pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas presentes na adsorção dessas proteínas, devem ser mencionados as ligações de coordenação. Essas ligações de coordenação são caracterizadas por ligações do tipo reversíveis.

Figura 3.17 - Isotermas de adsorção com IgG (●) e HSA (▲) em Zn/Al-HDL (A) e SBA 15-FTMB (B) utilizando o tampão TRIS-HCl nos pH 7,2 e 9,0, respectivamente para Zn/Al-HDL e SBA-15 FTMB. Modelos de ajustes de Langmuir (linha tracejada preta) e Langmuir-Freundlich (linha contínua preta) e o modelo de Henry (linha contínua vermelha) (linha contínua vermelha)



Fonte: elaborado pelo autor

Em relação à adsorção de IgG e HSA em SBA-15 FTMB utilizando o tampão TRIS-HCl 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. De acordo com a Tabela 3.11, referente às cargas da SBA 15-FTMB e da proteína HSA, observou-se que tanto HSA como a SBA 15-FTMB 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 SBA 15-FTMB está carregada negativamente. Estas justificativas apresentadas foram os principais argumentos para justificar a elevada adsorção de IgG, com valores próximos a 700 mg/g, em SBA-15 FTMB.

Conforme pode ser observado na Tabela 3.16, os modelos utilizados proporcionaram bons ajustes aos dados experimentais de adsorção das proteínas padrão em Zn/Al-HDL e SBA 15-FTMB, exceto os dados com HSA em SBA-15 FTMB, ao qual não obteve um ajuste bem definido. A quantidade máxima adsorvida de IgG em SBA 15-FTMB foi próximo de 1000 mg/g, enquanto que para adsorção de HSA foi muito inferior, abaixo de 10 mg/g. As constantes de Langmuir e Langmuir-Freundlich foram na mesma ordem de grandeza para todos os dados ajustados.

A partir dos resultados apresentados com ambos os adsorventes na adsorção individual de cada proteína nos adsorventes selecionados foi possível observar relativo potencial na adsorção dessas proteínas, com destaque para a SBA-15 FTMB que aparentemente apresentou maior seletividade por IgG. Logo, há a necessidade de avaliar o desempenho desses materiais nos ensaios de purificação de IgG a partir de soluções contendo apenas uma mistura binária de IgG e HSA e em seguida amostra com o soro humano.

Tabela 3.16 – Parâmetros de ajustes obtidos a partir dos modelos de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Henry com os dados de adsorção de IgG e HSA em Zn/Al-HDL e SBA-15 FTMB

Parâmetros	Zn/Al-HDL			SBA-15 FTMB			
	HSA		IgG	HSA		IgG	
	L	LF	H	L	LF	L	LF
q_{max} (mg/g)	311,43 ±13,70	386,6 ± 13,14	-	3,42 ± 2,10	-	1.153,9 ± 70,20	936,02 ± 26,20
k_L (mL/mg)	4,60 ± 0,74	-	-	0,032 ± 0,01	-	1,09 ± 0,15	-
k_{LF} (mL/mg)	-	2,91 ± 0,59	-	-	-	-	1,53 ± 0,15
k_H (mL/mg)	-	-	387,91 ± 7,80	-	-	-	-
R^2	0,98	0,99	0,99	0,52	-	0,99	0,99
N	-	0,61 ± 0,11	-	-	-	-	1,23 ± 0,065

L-Langmuir
LF-Langmuir-Freundlich
H-Henry

Fonte: elaborado pelo autor

3.3.5.2 Ensaios com mistura binária de IgG e HSA

Trabalhar com adsorção utilizando misturas de proteínas não é um estudo relativamente recente. Muitos autores já buscaram compreender as dificuldades em se trabalhar com esse sistema de tamanha complexidade, porém nenhum estudo conseguiu mostrar com elevado grau de confiabilidade o mecanismo real que ocorre na adsorção dessas biomoléculas em superfícies sólidas. A partir de vários desses estudos, comenta-se que há a possibilidade de ocorrer o “efeito de Vroman”. Esse efeito foi primeiramente observado nos trabalhos de Vroman e Adams (Vroman e Adams, 1969a; b) e trata-se de uma troca proteica que geralmente ocorre quando uma mistura de proteínas é adsorvida em uma superfície (Horbett, 1984) e essa troca é referida como o “efeito Vroman” (Brash e Ten Hove, 1984; Horbett, 1984; Scott, 1991). Apesar da ampla pesquisa sobre esse fenômeno há mais de 40 anos, ainda não é bem

compreendido e nenhum modelo existente para este mecanismo pôde explicar completamente (Ball *et al.*, 2003).

Resumidamente, moléculas em uma solução de mistura de proteínas se difundem para uma superfície em diferentes taxas. Proteínas com baixo peso molecular e mais concentradas são adsorvidas primeiramente na superfície, entretanto estas proteínas podem mais tarde ser deslocadas por outras proteínas, tipicamente de um peso molecular maior (Lassen e Malmsten, 1997). As proteínas que são capazes de deslocar as proteínas adsorvidas anteriores numa superfície, apresentam uma "afinidade superficial" mais elevada e são tipicamente grandes e conformacionalmente flexíveis, o que lhes permite aderir com maior força de fixação através de mais contatos superficiais (Lassen e Malmsten, 1997; Malmsten, 1998; Lee *et al.*, 2004). Contudo, o mecanismo através do qual estas proteínas de alta afinidade superficial deslocam as proteínas adsorvidas de baixo peso ainda não é compreendido (Ball *et al.*, 2003).

O propósito do estudo que será apresentado a seguir será uma abordagem quantitativa e qualitativa, a fim de definir se algum dos dois adsorventes delimitados para este estudo será eficiente para atuar como matriz cromatográfica visando uma pré-purificação de IgG humana. Devido à complexidade do fenômeno envolvido nesse tipo de análise e da falta de um modelo que compreenda bem as interações de proteínas em misturas, apenas as curvas de adsorção juntamente com as análises por eletroforeses serão os parâmetros principais avaliados nesse trabalho.

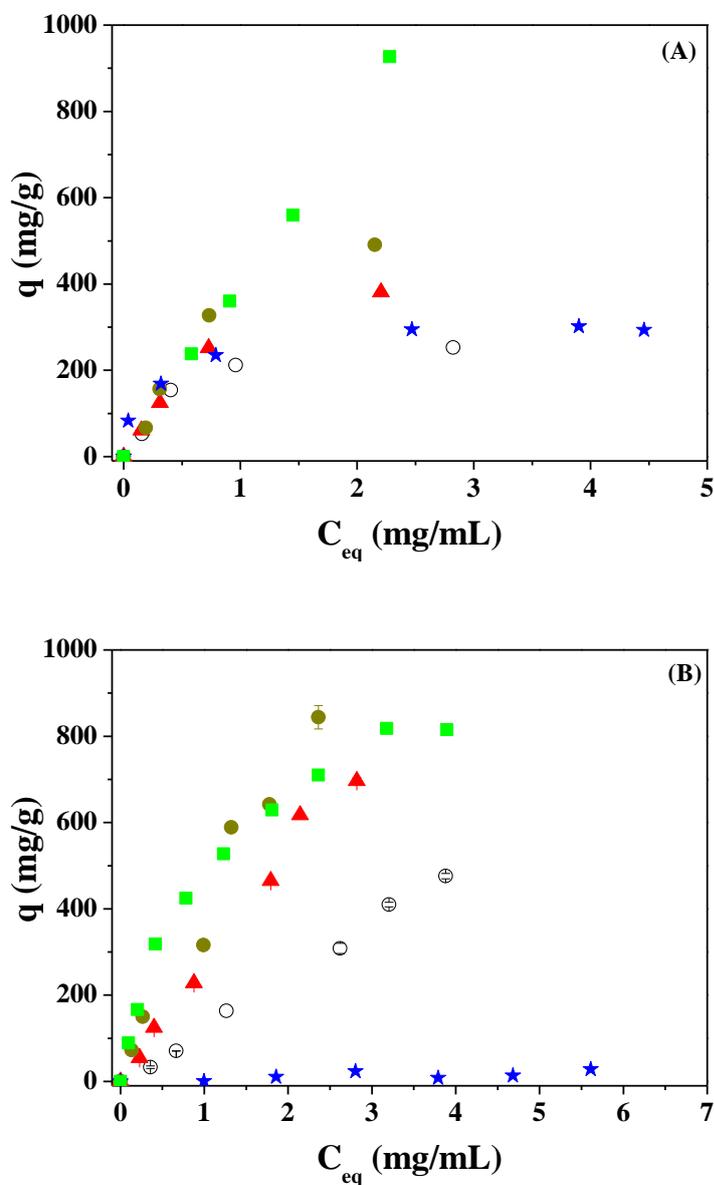
Os ensaios com misturas de proteínas do presente estudo foram realizados a partir de soluções em três razões distintas de mistura de proteínas (IgG/HSA), denominando-os de casos: I, II e III. Onde, caso I representou soluções contendo HSA em maior razão, caso III composta por soluções contendo IgG em maior razão e no caso II, ambas as proteínas apresentavam mesma concentração em solução.

Na literatura é possível observar estudos nessa linha de pesquisa e normalmente os autores quantificam as proteínas por análises cromatográficas utilizando HPLC, ou simplesmente por análises de absorbâncias quando as proteínas apresentam diferentes comprimentos de ondas como no trabalho de Dahman e colaboradores (2013).

A Figura 3.18 apresenta os perfis de adsorção avaliados para cada adsorvente, em cada um dos três casos de misturas binárias estudados e dos perfis monocomponentes contendo somente IgG ou HSA em solução, extraídos da Figura 3.17. Analisando o desempenho de ambos os adsorventes foi possível constatar

claramente que à medida que a proporção de IgG aumentou em solução a quantidade adsorvida foi aumentando consideravelmente. Tal constatação induz a afirmar que a proteína IgG ofereceu, nessas condições de ensaios, maior interação com os adsorventes.

Figura 3.18 – Ensaio de adsorção com misturas binárias de proteínas utilizando os adsorventes Zn/Al-HDL (A) e SBA 15-FTMB (B). Tempo de contato de 3 h, volume de injeção de 3,0 mL, massa do adsorvente de 15 mg. Caso I (○), Caso II (▲), Caso III (●), 100 % IgG (■) e 100 % HSA (*)



Fonte: elaborado pelo autor

Em relação aos resultados obtidos com Zn/Al-HDL na adsorção de IgG, vide Figura 3.18 A, observa-se que a presença de HSA na mistura ou nos ensaios em monocomponente proporcionaram curvas de adsorção com perfis com tendência à atingir um platô, enquanto que o perfil do ensaio de adsorção monocomponentes com IgG forneceu uma curva tipicamente linear. Essas observações evidenciam que a interação de IgG no Zn/Al-HDL é alta mostrando que o adsorvente apresentou maior interação por IgG. Nos HDL, a área superficial é fator pouco explorado na justificativa da adsorção de biomoléculas pelo fato que esses materiais normalmente apresentam baixas áreas superficiais e muitas vezes a área superficial pode ser superestimada devido à estrutura dos HDL e da presença do domínio interlamelar. No domínio interlamelar dos HDL dificilmente a biomolécula é alocada nesses espaços devido às dimensões desse domínio ser na ordem de 10 Å, enquanto que as dimensões das proteínas são na ordem de nanômetros. No caso da SBA 15-FTMB (Figura 3.18 B) uma provável competição pelos poros da SBA 15 deve estar ocorrendo, todavia IgG possivelmente está sendo adsorvida preferencialmente. Possivelmente devido às significantes repulsões eletrostáticas entre as cargas de mesmo sinal entre SBA 15 e HSA, pois ambas apresentaram carga superficial negativa.

Relata-se na literatura diferentes conformações da HSA com alteração do pH e portanto HSA não interagiu tão fortemente com a SBA 15. O menor tamanho molecular, em relação a IgG, poderia ser um fator positivo para a adsorção de HSA. Pois, enquanto HSA possui dimensões de 7,5 nm x 6,5 nm x 4,0 nm (Liu et al., 2015), a IgG possui dimensões de 14,5 nm x 8,5 nm x 4,0 nm (Tan et al., 2008).

Devido a essa diferença de tamanho molecular, HSA tende a entrar mais facilmente nos poros da SBA 15, entretanto acredita-se que esteja ocorrendo o inverso, visto que o tamanho da molécula não ter sido fator predominante. Nesse caso, pode ser corroborado com o estudo sobre o “efeito Vroman”, onde proteínas de baixo peso molecular, a princípio se ligam primeiramente a superfície do adsorvente, porém proteínas maiores, caso da IgG, tendem a expulsar parte dessas proteínas com peso molecular inferior e se ligar de modo mais estável com a superfície do adsorvente.

No trabalho de Dahman e colaboradores (2013), os autores realizaram um estudo, similar ao do presente trabalho, pois procuraram investigar o comportamento da adsorção das proteínas BSA (Albumina Bovina) e BHb (Hemoglobina Bovina) em uma solução binária, utilizando como adsorvente um poliestireno baseado em uma resina de

troca aniônica. Os referidos autores negligenciaram as interações proteína-proteína, visto que utilizaram baixas concentrações de proteínas. Inicialmente, observaram que as quantidades adsorvidas para cada proteína em solução monocomponente foram próximas. Todavia, ao analisarem os resultados em solução binária, seguindo a mesma proporção de mistura do presente trabalho, ou seja, nos mesmos casos I, II e III, observaram que uma proteína afeta a adsorção da outra. Esse efeito de impedimento estérico pode ser atribuído às possibilidades de interações moleculares na solução e na superfície do adsorvente. Tais efeitos também devem estar ocorrendo no presente estudo, devido à diferença de quantidades adsorvidas à medida que aumenta a proporção de uma proteína em relação à outra.

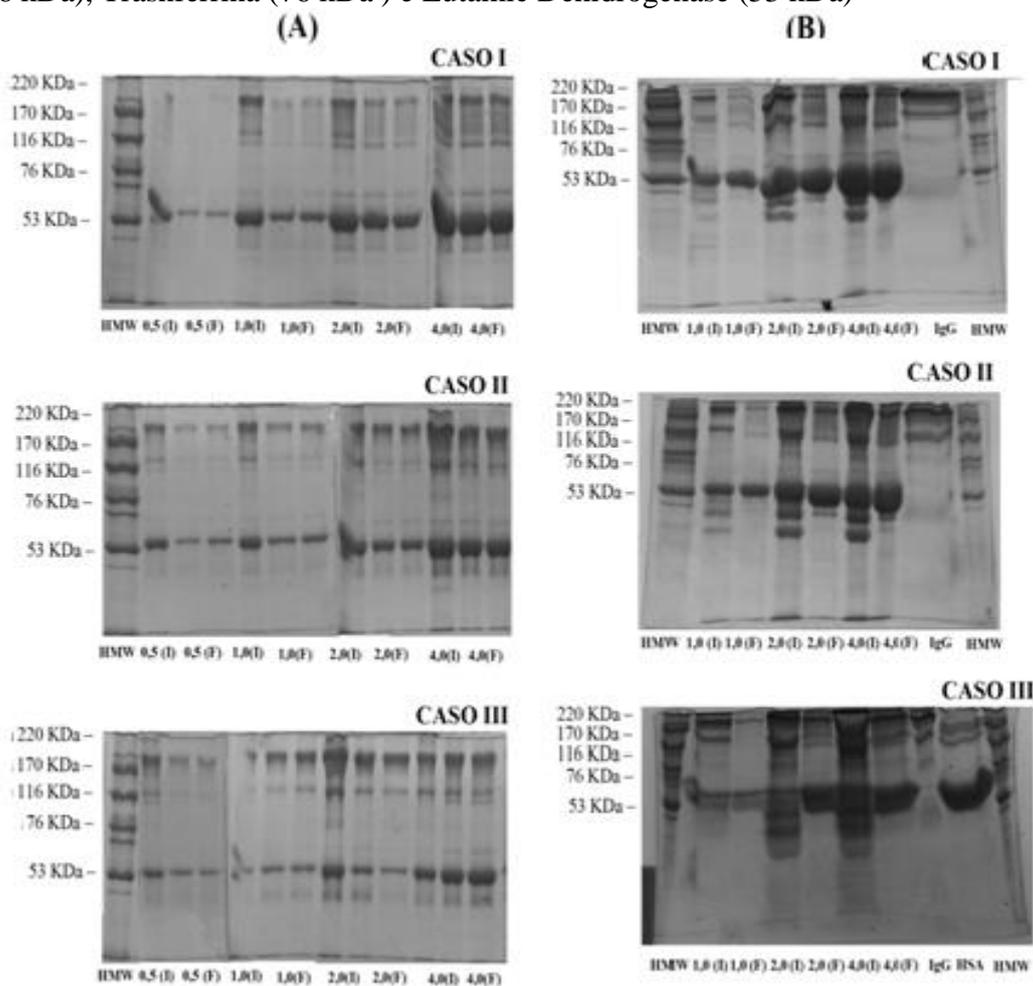
Ainda sobre o trabalho de Dahman e colaboradores (2013), os autores conseguiram obter as quantidades individuais de cada proteína, mesmo em mistura, através das medidas de absorvância em diferentes comprimentos de ondas. Os autores observaram que nos experimentos em mistura binária (50/50, em massa), a presença de uma proteína inibe a adsorção da outra quando comparado com os resultados utilizando a solução monocomponentes. BSA sofreu maior inibição, diminuindo sua quantidade adsorvida em 59%, enquanto que BHb diminuiu cerca de 29%. Essas diferenças significativas entre elas podem ser explicadas pela maior afinidade da BHb pela resina aniônica. Além disso, outra explicação refere-se às forças de repulsão entre as cargas da molécula de BSA possivelmente tenham causado um auto impedimento estérico. Os autores mencionaram que, aparentemente, a presença de ambas as proteínas causaram um efeito estérico na adsorção provavelmente devido à competição pela superfície do adsorvente e, além disso, as interações entre as moléculas da proteína em solução (Dahman e Jayasuriya, 2013).

Associando essa discussão com os resultados do presente trabalho, de fato, uma competição era esperada que ocorresse e isso pode vir a ser uma justificativa para essas diferenças de quantidade adsorvida, entre IgG e HSA. No presente trabalho foi possível observar que a mistura com maior proporção de HSA (caso I) não foi suficiente para proporcionar elevada quantidade de proteína total adsorvida em solução. Portanto, HSA sofre maior efeito estérico ocasionado pelas interações de caráter repulsivo entre cargas de mesmo sinal entre a superfície do adsorvente e a carga líquida da proteína.

Esses argumentos citados podem ser corroborados com os resultados das eletroforeses de cada ensaio realizado. Desta forma poderão ser concluídas quais proteínas estão sendo adsorvidas preferencialmente em cada adsorvente. Logo, a Figura

3.19 apresenta as eletroforeses das amostras obtidas dos ensaios em mistura para os três casos utilizando cada um dos adsorventes estudados.

Figura 3.19 – Eletroforese SDS page com revelador comassie brilhante blue dos ensaios com misturas de proteínas (IgG/HSA) nos três casos estudados utilizando Zn/Al-HDL (A) e SBA 15 FTMB (B). Proteínas diluídas em tampão TRIS/HCl 25 mM pH 7,2 (HDL) e 9,0 (SBA). Indicação dos poços: Padrão de Peso Molecular (HMW), Concentrações Iniciais (CI): 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0; e Concentrações Finais (CF): 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0; Padrão de IgG com alto grau de pureza (IgG). Proteínas do padrão HMW: Miosina (220 kDa), α -macroglobulina (170 kDa), β -Galactosidase (116 kDa), Transferrina (76 kDa) e Lutaminc Dehidrogenase (53 kDa)



Fonte: elaborado pelo autor

Foram analisadas treze amostras para as eletroforeses com Zn/AL-HDL e nove com o SBA-15 FTMB, conforme pode ser visualizado na Figura 3.19. Em ambas as eletroforeses, o primeiro poço foi selecionado para o padrão de proteínas obtida da Sigma (HMW), os poços seguintes foram das amostras dos ensaios de adsorção com as diferentes concentrações no início e no fim da adsorção, além dessas, foram utilizados nos últimos dois poços da eletroforese com SBA 15 FTMB, a proteína padrão IgG e o

padrão de proteínas (HMW). As amostras analisadas após a adsorção representaram as proteínas na fase líquida, e conseqüentemente, uma diminuição na banda de uma determinada proteína denotou que a mesma foi retida no adsorvente.

Analisando as eletroforeses a partir dos ensaios em mistura com Zn/Al-HDL observou-se que os poços representando as concentrações finais de cada concentração teve considerável diminuição na banda de IgG (canto superior de cada poço) indicando que a IgG foi adsorvida, em contrapartida a banda representante de HSA teve relativa diminuição. Tais constatações podem ser visualizadas pela comparação das amostras antes e após a adsorção. Observou-se também que à medida que aumenta a proporção de IgG na mistura (Caso I < Caso II < Caso III) a intensidade da banda de HSA sofreu pouquíssima alteração mostrando que a quantidade adsorvida total foi representada majoritariamente por quantidade de IgG retida no adsorvente, porém quantidade de HSA foi adsorvida. Entretanto, à medida que aumentou as concentrações iniciais em cada um dos três casos, a intensidade de ambas as bandas de cada proteína foi diminuída, porém com maior destaque para as bandas de IgG. O “efeito Vroman” deve estar ocorrendo nesses ensaios de adsorção com mistura, porém não impediu que parte das biomoléculas de menor peso molecular fosse adsorvida na superfície do adsorvente.

No caso das eletroforeses com o adsorvente SBA 15-FTMB (Figura 3.19 B) pode se observar nas concentrações da mistura de 1,0 e 2,0 mg/mL, que IgG foi a proteína com maior teor de adsorção, pois a diminuição significativa da intensidade da banda dessa proteína nos poços correspondentes a essas concentrações. Enquanto que, a intensidade da banda de albumina humana (HSA) apresentou leve diminuição. Tais constatações podem ser observadas nos três casos estudados, onde de fato, à medida que a proporção de IgG aumenta na mistura (Caso I > Caso II > Caso III) a intensidade da banda de IgG sempre diminuiu mostrando que a IgG realmente apresentou maior interação pelo adsorvente e foi a proteína mais representante na quantidade adsorvida total. De acordo com a literatura (Vroman e Adams, 1969a; b), o “efeito Vroman” é ocasionado com maior intensidade quando as concentrações de proteínas de baixo peso molecular são elevadas. Portanto, à medida que a concentração de HSA na mistura diminui, esse efeito é menos significativo, e mesmo assim a HSA ainda consegue ter considerável interação pelo adsorvente estudado.

Esses resultados com mistura de proteínas foram importantes para ter uma perspectiva desses dois adsorventes estudados na purificação ou simplesmente na pré-purificação de IgG humana, proteínas estas responsáveis pela defesa do sistema

imunológico. Confirmou-se através desses ensaios em mistura que ambos os adsorventes apresentaram elevada interação por IgG, entretanto considerável HSA foi adsorvida. Tais resultados mostraram que nessas condições estudadas ambos os adsorventes são mais indicados para ensaios com propósito de uma pré-purificação de IgG. Ou seja, esses adsorventes quando utilizados nessas condições operacionais, podem vir a serem bons adsorventes, como por exemplo, em etapas intermediárias na purificação de IgG.

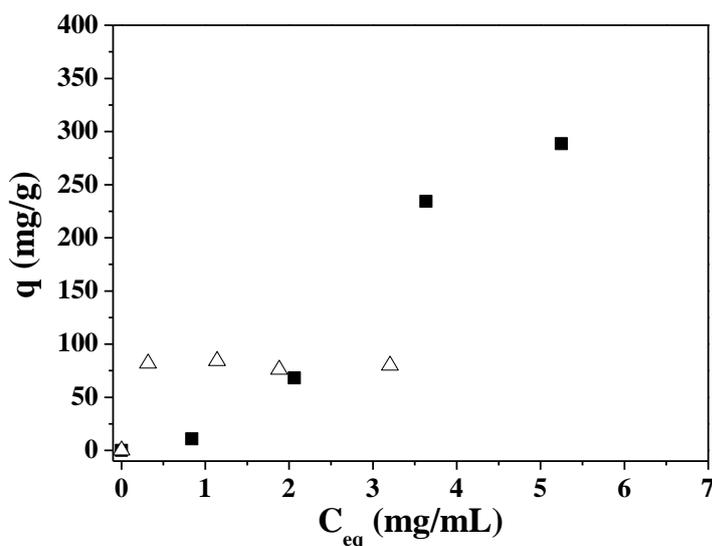
3.3.5.3 Ensaios com soro humano

A Figura 3.20 apresenta o perfil de adsorção de proteínas presente no soro humano que foram adsorvidas nos adsorvente Zn/Al-HDL e SBA 15-FTMB. As amostras de soro humano apresentam: HSA, em torno de 60%, em seguida IgG, transferrina e outras proteínas de diferentes pesos moleculares. Observou-se que SBA15-FTMB forneceu quantidade de proteínas adsorvidas bem superior ao Zn/Al-HDL. Enquanto que a quantidade de proteínas adsorvidas em SBA 15 foi próxima de 300 mg/g, a quantidade de proteínas adsorvidas no HDL foi, em torno de, 100 mg/g. Tais resultados podem vir a ser explicados devida a enorme diferença da área superficial entre esses dois materiais. Além disso, salienta-se que nas amostras de soro humano há uma variedade de proteínas diferentes de HSA e IgG, portanto maior competição deve estar ocorrendo. As análises de eletroforese podem fornecer uma confirmação de quais proteínas estão sendo adsorvidas em ambos os adsorventes.

A partir desses ensaios com soro humano observou-se que a quantidade total de proteínas adsorvidas diminuiu consideravelmente em ambos os adsorventes. Utilizando a SBA 15-FTMB a adsorção foi cerca de três vezes inferior ao comparar com os dados de adsorção monocomponentes contendo apenas IgG. Em relação à quantidade total de proteínas adsorvidas em Zn/Al-HDL observou-se diminuição ainda maior, cerca de dez vezes menor que os ensaios em monocomponentes. Essas destacadas diferenças de quantidades adsorvidas estão relacionadas a alguns fatores. Primeiro, o método de quantificação de proteínas para os ensaios com o soro humano foi realizado de acordo com a metodologia de Bradford (1976). Relata-se na literatura que há a possibilidade de erros significativos ao utilizar essa metodologia. Entretanto, essa metodologia é muito utilizada. Além disso, há a presença de inúmeras proteínas contidas no soro humano a

qual possibilita uma maior competição entre elas para interagir com a superfície do adsorvente.

Figura 3.20 – Experimentos em batelada com os adsorventes Zn/Al-HDL (Δ) e SBA 15-FTMB (\blacksquare) com amostras do soro humano diluído em tampão TRIS-HCl. Condições: Tempo de 4 h, massa de adsorvente de 15 mg e volume de amostra de 3,0 mL. Quantificação de proteínas totais a partir do método de Bradford (Bradford, 1976)



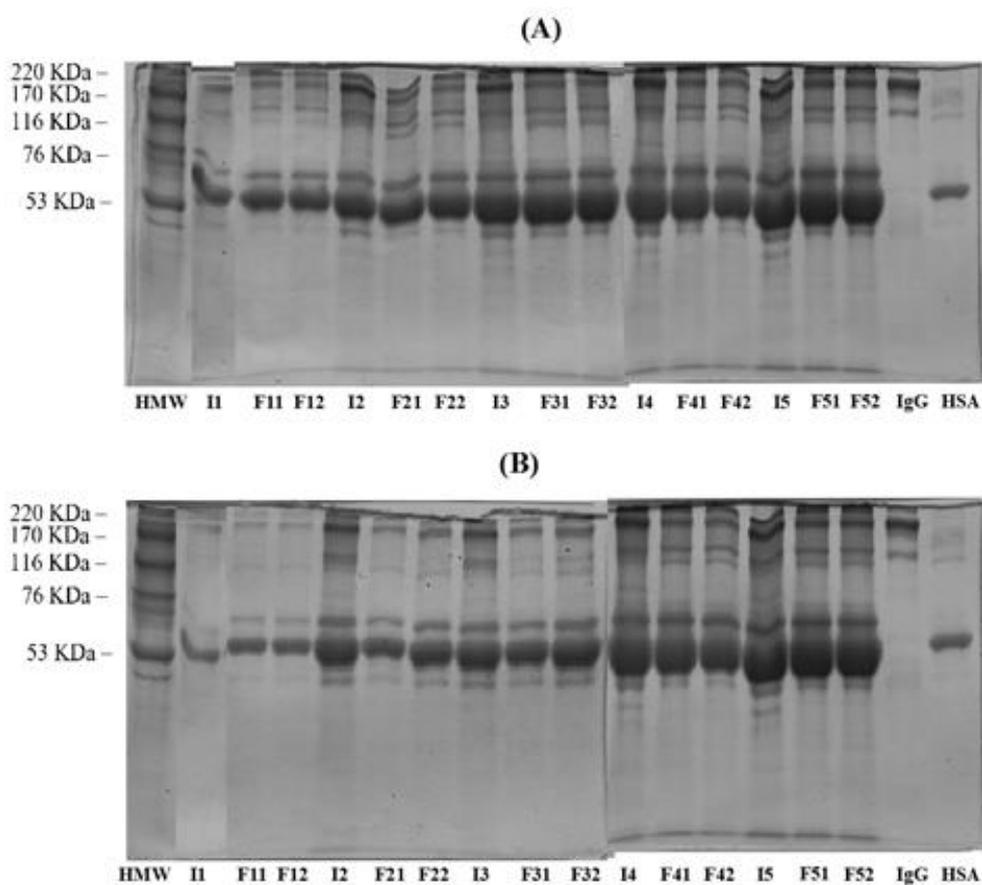
Fonte: elaborado pelo autor

Os adsorventes utilizados no presente estudo apresentaram diferenças significativas com relação às propriedades texturais, desse modo as SBA 15-FTMB, por possuírem maior área superficial, apresentam facilidade em acomodar maiores quantidades de biomoléculas presentes no soro humano. As amostras de eletroforese, conforme Figura 3.21, possibilitaram observar quais proteínas apresentaram maior concentração na fase líquida e conseqüentemente menor adsorção na superfície do adsorvente.

Note que a banda correspondente ao peso molecular da HSA (66 kDa) foi muito concentrada na maioria das amostras analisadas, indicando que a HSA foi de fato a proteína em maior quantidade no soro humano. No entanto, outras proteínas com menor concentração no soro humano e pesos moleculares próximos as da HSA podem

estar camufladas nessa região, portanto as alterações nessa mesma região não indicam que apenas HSA está sendo adsorvida.

Figura 3.21 – Eletroforese SDS page com revelador comassie brilhante blue dos ensaios com soro humano e os adsorventes SBA 15-FTMB (A) e Zn/Al-HDL (B). Proteínas diluídas em tampão TRIS/HCl 25 mM pH 7,2 (HDL) e 9,0 (SBA 15). Indicação dos poços: Padrão de Peso Molecular (HMW), Amostra Inicial (Ci) e Amostra Final (Fij), onde “i” variou-se de 1,0 a 7,0 mg/mL e “j” refere-se as amostras, em duplicatas, após a adsorção. Padrão de IgG (IgG) e Padrão de HSA (HSA). Proteínas do padrão HMW: Miosina (220 kDa), α -macroglobulina (170 kDa), β -Galactosidase (116 kDa), Transferrina (76 kDa) e Lutaminc Dehidrogenase (53 kDa)



Fonte: próprio autor.

Analisando a Figura 3.21 foi possível notar que a região correspondente a banda de IgG (massa molecular de 150 kDa) teve considerável diminuição em sua intensidade mostrando que a IgG foi uma das principais proteínas adsorvidas nos ensaios com o soro humano em ambos os adsorventes. As amostras antes e após a

adsorção com o adsorvente Zn/Al-HDL apresentou relativa diminuição nas bandas correspondentes ao peso molecular da HSA, em relação à SBA 15-FTMB.

Diante dos resultados apresentados pode-se confirmar que, ambos os adsorventes, apresentaram alta capacidade por adsorção de proteínas. Todavia, o fato de não apresentarem significativa seletividade pela proteína de interesse (IgG) faz desses adsorventes pouco propícios a serem utilizados como matrizes cromatográficas objetivando a purificação de IgG humana. Entretanto, desde os resultados em batelada, foi notório a elevada capacidade desses materiais por IgG, quando utilizada soluções monocomponentes. Portanto, ambos os materiais podem vir a ser utilizados como matrizes cromatográficas em etapas intermediárias visando a purificação de IgG. Ou nos casos em que o objetivo for apenas concentrar IgG a partir de uma solução contendo uma mistura de outras proteínas indesejáveis. De fato, mais análises devem ser realizados a fim de confirmar com maior grau de confiabilidade que IgG está sendo de fato adsorvida efetivamente.

3.4 Conclusão Parcial

Foram obtidos com êxito os Hidróxidos Duplos Lamelares e as sílicas mesoporosas do tipo SBA 15. Os HDL apresentaram área superficial muito inferior as SBA 15, cerca de quatro vezes, entretanto o Zn/Al-HDL proporcionou quantidades de IgG adsorvidas comparáveis as SBA 15. A ligação por coordenação proporcionada pelo metal Zn do Zn/Al-HDL foi a provável justificativa para a alta capacidade de ligação por IgG. Em contrapartida, a inserção do heteroátomo de zircônio nas SBA 15 não favoreceu a adsorção de IgG humana. O ponto isoelétrico (pI) das proteínas foi fator importante na justificativa das diferentes quantidades de proteínas adsorvidas com a mudança do pH do meio. Ambos adsorventes apresentaram maior interação pela proteína de interesse (IgG), entretanto as análises de eletroforese SDS-PAGE dos ensaios de purificação com misturas binárias e soro humano mostraram que essas matrizes cromatográficas são mais indicadas para uma pré-purificação de IgG humana ou concentração da mesma.

4 PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA POR CROMATOGRAFIA DE PSEUDOAFINIDADE

4.1 Objetivos Específicos

Os objetivos deste tópico foram:

Sintetizar o compósito de quitosana/alginato epoxidado com corantes (reativo vermelho 120 e procion red MX-5B) imobilizados para atuar como matrizes cromatográficas de pseudoafinidade.

Realizar experimentos em batelada para a investigação da influência do pH, do tempo de contato e das isoterms de adsorção.

Realizar ensaios cromatográficos preliminares com amostras de IgG de alta pureza e com o soro humano utilizando as matrizes de pseudoafinidade sintetizadas.

Realizar ensaios comparativos entre essas matrizes sintetizadas e duas matrizes comerciais de afinidade da linha Hitrap (Protein A HP e Blue HP) utilizando o sistema FPLC Contichrom. Ensaios com amostras de soluções monocomponentes das proteínas modelos IgG e HSA, soluções binárias (IgG/HSA) e soluções com o soro humano.

Analisar por eletroforese SDS-PAGE as amostras coletadas durante todos os experimentos com mistura e com o soro humano a fim de confirmar a seletividade das matrizes sintetizadas por IgG humana.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Reagentes

Os corantes, Reativo Vermelho 120 (RV120) e Procion Red MX-5B (PR-MX), o soro humano do tipo AB, os padrões de proteínas de alta pureza (IgG humana e HSA), os reagentes ácido morfolinopropano sulfônico (MOPS), ácido hidroxietilpiperazina etano sulfônico (HEPES), Trizma-base (TRIS), Coomassie Brilliant Blue, tetraetilortosilicato (TEOS), copolímero tribloco Plurônio P123 (PEO20PPO70PEO20) e HCl foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Albumina do soro bovino (BSA) foi obtida da Inlab, a quitosana em pó foi obtida da Polymar (Brasil), alginato de sódio da Vetec, Brasil, epiclorigrina e N-N-dimetilformamida da

Dinâmica, Brasil. O marcador de alta massa molar contendo as seguintes proteínas: miosina 212 kDa, α_2 -macroglobulina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, transferrina 76 kDa e desidrogenase glutâmica 53 kDa, foi adquirido da GE Healthcare (EUA). Os outros reagentes utilizados foram todos de grau analítico e para a preparação de todas as soluções utilizou-se a água ultrapura Mili-Q (Millipore, EUA).

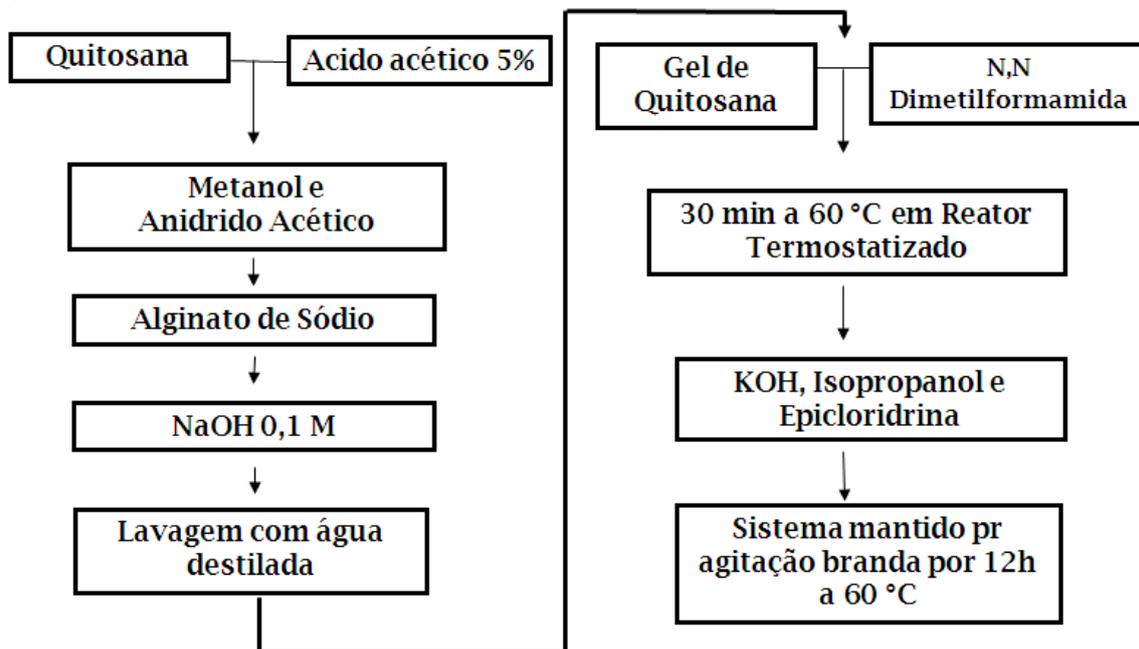
4.2.2 Sínteses do compósito de Quitosana/Alginato Epoxidado

A síntese da matriz a base de quitosana vem sendo realizada com sucesso em nosso grupo de pesquisa desde 2010, quando este material foi primeiramente utilizado na adsorção de proteínas.

O procedimento de preparação do compósito de quitosana baseou-se na metodologia de Fangkangwanwong e colaboradores (2006), adaptado por Adriano e colaboradores (2008) com a adição de alginato. O material foi preparado em duas etapas, sendo a primeira etapa para a formação do gel de quitosana/alginato, e a segunda etapa caracterizada pela modificação química. Inicialmente, 10 g de quitosana foram dissolvidas em 400 mL de solução de ácido acético 5% (v/v) e mantidos sob agitação mecânica (TECNAL, modelo TE-165, Brasil) até total solubilização, por aproximadamente 40 min. Em seguida, foram adicionados 40 mL de metanol e 4 mL de anidrido acético. Após 1 h, foram adicionados 10 g de alginato de sódio 2,5% (m/v) ao sistema e mantido sob agitação por 1 h. Esta solução foi adicionada a 3,6 L de solução de NaOH 0,1 M para a formação do gel e mantido sob agitação moderada por 4h, sendo depois lavado com água destilada, para retirar o excesso de NaOH.

A Figura 4.1 apresenta o procedimento para obtenção do compósito a base de quitosana. Para cada 10 g de gel obtido, foram adicionados 100 mL de N-N-dimetilformamida e mantido por 30 min a 60 °C em um reator termostatizado, sob constante agitação. Em seguida, foram adicionados 0,8 g de KOH dissolvido em 3 mL de isopropanol e, ao final, 10 mL de epícloridrina. Em seguida o sistema foi mantido sob agitação a 60 °C por 12 h.

Figura 4.1 – Procedimento de preparação do compósito de quitosana/alginate epoxidado proposto por Fangkangwanwong e colaboradores (2006) com a adição de alginate de sódio



Fonte: elaborado pelo autor.

4.2.3 Imobilização dos corantes (RV120 e PR-MX) em QAE

Os corantes, Reativo Vermelho 120 (RV120) e Procion Red MX-5B (PR-MX) foram imobilizados no compósito de quitosana/alginate epoxidado (QAE), de acordo com o procedimento descrito por Ruckenstein e Zeng (1998) com algumas modificações.

Primeiramente, foi adicionado 1,0 g do compósito de Quitosana/Alginate Epoxidado (QAE) em 100 mL da solução de corante (1 mg/mL) à temperatura de 60 °C por 1 h sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida, adicionou-se 5 mL da solução aquosa de NaCl (20% m/m) mantendo a agitação constante e temperatura 60 °C, a fim de assegurar a adsorção do corante. Após 30 min adicionou-se 2 mL da solução aquosa de Na₂CO₃ (25% m/m) com o objetivo de aumentar o pH para 10,5 e acelerar a reação química entre o corante e o compósito QAE. Esta solução foi mantida durante 4 h à temperatura de 60 °C. Após o término desta etapa, lavou-se o compósito com o corante imobilizado com água destilada quente, metanol, NaCl 2,0 M, Uréia 6,0 M, Tween 80 1%, água destilada, tampão de ensaio e finalmente com solução de HSA. Estas lavagens

foram necessárias para retirar corantes fracamente ligados à superfície do adsorvente e desta forma impedir futuras contaminações nos ensaios de adsorção.

Após a imobilização os materiais finais foram nomeados com a sigla do compósito de Quitosana/Alginato Epoxidado (QAE) acrescidos com as iniciais dos dois corantes, sendo assim denominados de: QAE-RV120 e QAE-PR-MX.

4.2.4 Experimentos de adsorção em batelada

Os experimentos em batelada foram realizados em duplicata a 22 °C, a fim de determinar o efeito do pH, utilizando diferentes soluções tamponantes (Fosfato de sódio (FOSFATO), MOPS, HEPES e TRIS-HCl), e as curvas de cinética e isoterma de adsorção de IgG com os adsorventes sintetizados. Para realizar tais ensaios, foi pesado uma massa de 15 mg de adsorvente e colocado em contato com 3,0 mL da solução de proteína em tubos de acrílico. Os tubos foram agitados em agitador orbital (Tecnal TE-165, Brasil) durante o tempo necessário para atingir o equilíbrio. Ao final de cada experimento as amostras foram coletadas e centrifugadas em microcentrífuga refrigerada (CT-15000R CIENTEC) por 10 min com rotação igual a 10000 *G* e, em seguida, a absorbância de cada amostra foi lida. A concentração de cada proteína na fase líquida (sobrenadante) foi determinada por absorbância no UV-Vis da luz no comprimento de onda de 280 nm (UV-Vis Biomate 3, ThermoScientific, EUA).

A massa da proteína adsorvida por massa de adsorvente (mg/g), no estado de equilíbrio foi calculada usando o balanço de massa descrito pela equação 1:

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

em que C_0 e C_{eq} (mg/mL) são as concentrações iniciais e no equilíbrio na fase líquida, q (mg/g) é a quantidade de proteína adsorvida na fase sólida, m_{ads} (g) é a massa de adsorvente e V (mL) é o volume de solução da amostra.

Efeito do pH na adsorção de proteínas: soluções contendo IgG foram preparadas por dissolução dessa proteína (1,0 mg/mL) em soluções tampões à 25 mM de forma a alcançar a faixa de pH de 6,0 – 8,2 utilizando os tampões: FOSFATO; MOPS; HEPES e TRIS-HCl. O tempo de contato foi de 2 h entre proteína e adsorvente sob agitação constante de 18 rpm.

Cinética e isoterma de adsorção: para a obtenção dos perfis cinéticos, foram realizados experimentos em batelada similar aos realizados no estudo do pH. Entretanto, o tempo de contato entre proteína e adsorvente foi variável, compreendendo a faixa de 5,0 a 360 minutos. Esses ensaios apresentaram como finalidade a obtenção do tempo necessário para alcançar o equilíbrio de adsorção. Com o tempo de equilíbrio estabelecido, foram levantados os perfis de isotermas de adsorção com a proteína modelo IgG. A faixa de concentração inicial utilizada foi de 0,5 a 6,0 mg/mL. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, descritos pelas equações (2) e (3), respectivamente, foram usados para ajustar aos dados experimentais usando o programa Origin®, Microcal, USA.

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

$$q = \frac{q_{\max} (k_{DLF} C_{eq})^n}{1 + (k_{DLF} C_{eq})^n} \quad (3)$$

em que q_{\max} (mg/g) é a quantidade máxima de adsorção, C_{eq} (mg/mL) é a concentração de proteína em solução no equilíbrio, K_D e K_{DLF} são as constantes de Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente, as quais relacionam a afinidade entre a proteína e adsorvente, n é o coeficiente para o modelo de Langmuir-Freundlich, relacionado a heterogeneidade da superfície do adsorvente.

4.2.5 Ensaios cromatográficos preliminares

Os ensaios cromatográficos preliminares foram realizados com a proteína IgG de alta pureza e com a solução diluída do soro humano. Após todos os ensaios cromatográficos realizou-se o balanço de massa para determinar a quantidade e o percentual mássico de cada etapa. O sistema foi constituído por: uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Modelo Q 400), uma coluna cromatográfica (C 10/10 da GE Healthcare), empacotada com a fase estacionária, um coletor de frações (Buchi, Modelo C-660) e um espectrofotômetro (Termocientific Biomat 3).

Os experimentos cromatográficos com a proteínas IgG de alta pureza foram realizados com a injeção de um pulso de 10 mL de solução de proteína com

concentração de 1,0 mg/mL, vazão de 0,8 mL/min e massa de adsorvente de 0,5 g, proporcionando um leito com 1,4 cm de altura. A solução de IgG foi preparada com o tampão TRIS-HCl 25 mM no pH 7,2.

As análises cromatográficas com amostras de soro humano apresentaram concentração inicial aproximadamente de 5,0 mg/mL e foi diluída no tampão TRIS-HCl pH 7,2. O volume injetado na coluna foi de 15 mL, volume este que proporcionou a saturação do leito, e todas as amostras foram coletadas para a realização do balanço de massa.

Os ensaios cromatográficos apresentaram quatro etapas distintas:

- I. Adsorção (A): etapa inicial de cada experimento cromatográfico caracterizando-se pela adsorção de proteínas após a injeção de amostras contendo IgG ou soro humano.
- II. Lavagem (L): etapa destinada a retirar as impurezas no sistema através da passagem de uma solução de lavagem (próprio tampão de adsorção). Nesse caso, as impurezas foram qualquer biomolécula que não interagiu ou interagiu fracamente com a fase estacionária.
- III. Eluição (E): etapa caracterizada pela eluição das biomoléculas que foram retidas na coluna. A solução de eluição foi composta pelo tampão de adsorção acrescido de NaCl 1,0 M.
- IV. Regeneração (R): a etapa da regeneração se caracterizou pela passagem de uma solução de NaOH 0,5 M a fim de retirar quaisquer resíduos de proteínas no sistema. Essa etapa foi essencial para tornar a coluna pronta para novos ensaios cromatográficos.

4.2.5.1 Determinação de proteínas totais

As concentrações de proteínas totais nas frações das amostras com soro humano foram determinadas de acordo com a metodologia de Bradford e utilizou-se albumina de soro bovino (BSA) para a construção da curva analítica para este método, conforme metodologia descrita por Bradford (1976) e descrita no tópico 2.7.1 do capítulo II.

4.2.5.2 Eletroforese (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE) foi utilizada para determinação da pureza das frações proteicas obtidas nos ensaios com a solução binária e com os ensaios com o soro humano, antes e após a adsorção. A descrição detalhada do procedimento pode ser verificado no tópico 2.8 do capítulo II.

4.2.6 Ensaios de purificação em FPLC

O sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatograph*) Contichrom da Knauer permite a realização de ensaios cromatográficos com colunas de afinidade e de troca iônica. Esse sistema oferece a possibilidade de trabalhar em sistema contínuo com a presença de até duas colunas cromatográficas simultaneamente com o propósito de aumentar a capacidade útil de cada coluna e do aumento da produtividade.

As condições de operação utilizadas nesse sistema foram às mesmas utilizadas nos ensaios preliminares, descritos anteriormente no item 2.5. Os ensaios de adsorção de IgG foram realizados utilizando as duas fases estacionária preparadas no presente trabalho e duas novas colunas de afinidade (Hitrap Protein A HP e Hitrap Blue HP). Essas colunas de afinidades comerciais são frequentemente utilizadas na purificação de proteínas possibilitando um ótimo parâmetro de comparação com as matrizes cromatográficas preparadas nesse estudo.

Amostras monocomponentes de IgG ou HSA, amostras binárias de IgG e HSA e amostras de soro humano diluído, foram as soluções de injeção no sistema Contichrom. As condições dos experimentos foram: volume de injeção (3,0 mL), vazão (0,8 mL/min), tampão de adsorção (TRIS-HCl 25 mM e pH 7,2), tampão de eluição (NaCl 1,0 M acrescido ao tampão de adsorção), concentrações de proteínas (1,0 mg/mL para as soluções binárias e entre 4,0–5,0 mg/mL para o soro humano). Todas as amostras dos picos das análises foram coletadas a fim de realizar a eletroforese e averiguar o potencial desses adsorventes na purificação de IgG humana.

Soluções binárias contendo as proteínas IgG e HSA foram determinadas por absorvância no UV-Vis da luz no comprimento de onda de 280 nm (UV-Vis Biomate 3, ThermoScientific, EUA). E as amostras de soro humano foram quantificadas de acordo com a metodologia de Bradford (1976).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Caracterização das matrizes cromatográfica de pseudoafinidade

A síntese do compósito de quitosana/alginate epoxidado (QAE) vem sendo realizado no nosso grupo de pesquisa há alguns anos, e dados de caracterização foram publicados recentemente nos trabalhos de Gondim e colaboradores (2012 e 2014) e Rodrigues e colaboradores (2013).

De acordo com as análises de FT-IR apresentadas no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2013), foi observado uma diminuição nas bandas dos grupos amino e um aumento nas bandas dos grupos epóxi indicando a modificação química que o gel de quitosana/alginate sofreu. As imagens de microscopia electrónica de varredura (MEV) revelaram que a superfície do material final apresentou uma estrutura mais porosa e rugosa do que o gel natural de quitosana/alginate. Os autores atribuíram essas diferenças as modificações químicas que ocorrem durante a síntese do compósito de quitosana/alginate epoxidado (QAE).

No trabalho publicado de Gondim e colaboradores (2014), os autores realizaram análises térmicas no compósito de QAE com o corante Cibacron Blue imobilizado (QAE-Cib) e também com a matriz QAE. A curva termogravimétrica indicou que o compósito QAE sem corante apresentou maior estabilidade térmica em comparação com o QAE-Cib. Quando sujeito a uma variação de temperatura de 30-900 °C foi observado uma perda de massa de 63% para QAE, enquanto que a perda de massa para QAE-Cib foi de 79%. Os autores também avaliaram a perda de massa através das curvas diferenciais (DTA) e observaram que a curva DTA da matriz QAE sob N₂ apresentou picos característicos de quatro estádios de perda de massa: desidratação (25-90 °C); desacetilação e despolimerização (250-400 °C); degradação dos resíduos finais (750 °C), de acordo com Chaves e colaboradores (Chaves *et al.*, 2009). A partir das curvas DSC, os autores observaram nitidamente a transição de primeira ordem e a formação de picos endotérmicos e exotérmicos. Observou a presença de um pico endotérmico em torno de 70 °C e um pico exotérmico a 250 °C, provavelmente devido à decomposição do alginate de sódio (Rajendran e Basu, 2009).

No tópico a seguir (4.3.2), serão apresentados dados fundamentais em batelada da adsorção da proteína IgG nas matrizes cromatográficas de afinidade, QAE-RV120 e QAE-PR-MX. Posteriormente, ensaios cromatográficos foram realizados a fim

de determinar o real potencial dessas matrizes de afinidade objetivando a purificação de IgG humana. Por fim, foram realizados ensaios comparativos entre as matrizes cromatográficas sintetizadas no presente trabalho e matrizes comerciais de afinidade da linha Hitrap (Protein A HP e Blue HP). Esses últimos ensaios foram realizados em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatograph) no “Sistema Contichrom”.

4.3.2 Experimentos em batelada com QAE-RV120 e QAE-PR-MX

Adsorção de proteínas é um tema de grande relevância que vem sendo muito estudado há décadas. A adsorção dessas biomoléculas pode ser influenciada por diferentes parâmetros, das quais podem ser citados: temperatura, pH e força iônica do meio, além da composição do tampão (Rabe *et al.*, 2011).

Adsorção de proteínas por cromatografia de afinidade é influenciada pelo ponto isoelétrico (pI) da proteína. Onde, o pI representa o 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. Todavia, o ligante de afinidade deve apresentar considerável interação específica pela proteína de interesse. Nesse trabalho foram utilizados corantes ligantes, a qual conferem normalmente matrizes cromatográficas de média afinidade pela biomolécula de interesse.

Os ligantes de alta afinidade, chamados de ligantes bioespecíficos, por exemplo, as proteínas A e L, se ligam com maior afinidade quando comparado aos ligantes pseudobioespecíficos (corantes). Fornecendo assim, matrizes de afinidade com elevado potencial na purificação de proteínas. No entanto, o elevado custo desses ligantes e as condições drásticas de eluição para esses sistemas, a qual pode acarretar em perda de atividade significativa das proteínas, tornam um processo caro. Em contrapartida, as condições de eluição, quando utilizados corantes como ligantes, são bem mais amenas, utilizando apenas sal (NaCl 1,0 M) acrescido ao tampão de adsorção.

Os trabalhos com cromatografia de afinidade com corantes imobilizados no composto QAE foi iniciado com o propósito de obter um adsorvente eficiente na purificação de IgG humana a partir de amostras típicas de soro humano. Recentemente foram publicados dois artigos (Gondim *et al.*, 2012; Gondim *et al.*, 2014) do nosso grupo de pesquisa para a investigação do uso do corante Cibacron blue F3GA imobilizado na matriz QAE objetivando a purificação de IgG humana. Os autores

observaram muitas vantagens na utilização desse ligante de afinidade para interação por domínios específicos da IgG. Além das condições amenas na eluição, a fácil síntese da matriz cromatográfica foi outra vantagem observada. Portanto, a partir desses satisfatórios resultados buscou-se na literatura novos corantes indicados a interagir de forma seletiva com a proteína de interesse. E os corantes, reativo vermelho 120 (RV120) e procion red MX-5B (PR-MX), foram os escolhidos para continuar esses estudos preliminares, com inicial propósito em superar os resultados obtidos com o corante cibacron blue F3GA.

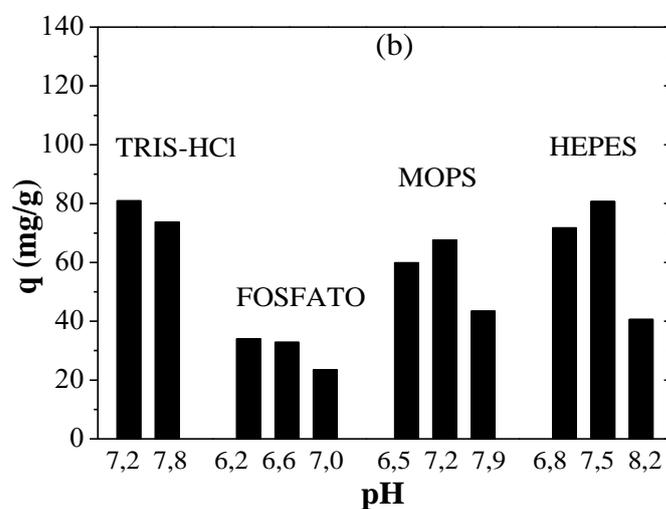
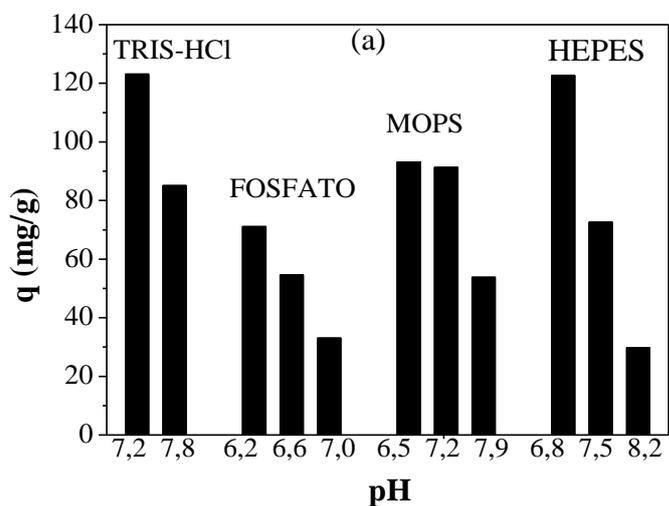
Efeito do pH na adsorção de IgG: a investigação do efeito do pH e do tampão foi o primeiro ensaio em batelada que teve como objetivo observar a dependência do pH na adsorção de IgG. Logo, diferentes tampões biológicos (FOSFATO, MOPS, HEPES e TRIS-HCl) e distintos pH foram utilizados, sempre respeitando a faixa operacional de cada tampão.

A Figura 4.2 apresenta os resultados de quantidade de IgG adsorvida nos adsorventes QAE-RV120 e QAE-PR-MX utilizando diferentes sistemas tamponantes. A faixa de pH estudada foi de 6,2 à 8,2 e todos tampões apresentaram força iônica de 25 mM. Salienta-se que a faixa estudada de pH correspondeu uma ampla faixa do pI da IgG. Relata-se na literatura (Bresolin *et al.*, 2010) que a proteína IgG, diferentemente de outras proteínas (ex. HSA, lisozima, BSA, hemoglobina), apresenta um pI variável entre 6,3 à 9,0 devido a presença das subclasses IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

Conforme Figura 4.2, observou-se que a quantidade de IgG adsorvida foi elevada no sistema em que a proteína IgG foi diluída com o tampão TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) proporcionando quantidades de IgG adsorvidas de 80,0 e 120,0 mg/g, respectivamente com QAE-RV120 e 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.

No primeiro trabalho publicado por Gondim e colaboradores (2012) os autores observaram que a adsorção de IgG com maior intensidade ocorreu no pH 6,0, com quantidade de IgG adsorvida de 43,34 mg/g. Todavia, os autores nesse trabalho investigaram apenas um único tampão (FOSFATO). Sabe-se inicialmente que em pH 6,0, a proteína IgG se encontra ligeiramente abaixo do pI e portanto, com carga aparente predominantemente positiva.

Figura 4.2 – Efeito do pH e do tipo de tampão na adsorção de IgG utilizando QAE-R120 (a) e QAE-PR-MX (b). Concentração de IgG: 1,0 mg/mL; Tempo de análise: 2,0 h; massa de adsorvente: 15 mg; volume de solução de proteína: 3,0 mL; agitação constante em orbital shaker: 18 rpm



Fonte: elaborado pelo autor.

Conforme relatado por Bayramoglu e colaboradores (2007a), a presença de grupos sulfonatos no corante ligante tem uma contribuição mais sensível para valores menores de pKa e, sob esta condição (pH 6,0), o ligante corante tende a estar carregado negativamente. Uma vez que o ponto isoelétrico da IgG está na faixa de 6,3-9,0, logo

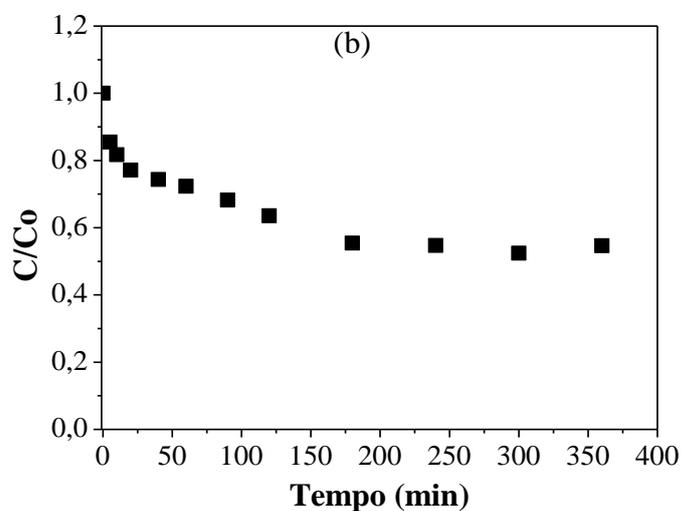
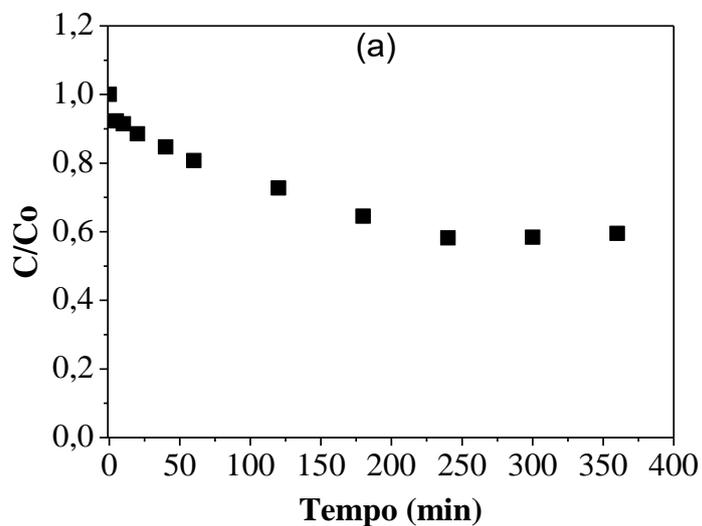
em pH 6,0, a IgG possui carga líquida total positiva e pode interagir principalmente com as cargas negativas do corante-ligante por interações eletrostáticas. Contudo, devido à ionização de vários grupos de IgG (cadeias laterais de aminoácidos) e do Cibacron Blue (grupos sulfonato, grupos amino e anéis hidrofóbicos), podem também estar presentes ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Wongchuphan e colaboradores (2009) estudaram adsorção de IgG de coelho (com alta pureza) utilizando a resina Streamline com ligantes imobilizados. Esses autores investigaram uma grande faixa de pH (entre 4,0 e 9,0, com três tampões diferentes) e encontraram a adsorção de IgG de coelho de 32,0 mg/mL também em pH 6,0.

No trabalho de Gondim e colaboradores (Gondim *et al.*, 2014) publicado recentemente, os autores concluíram o estudo com o corante cibacron blue F3GA ao investigarem a influência de diferentes sistemas tamponantes na adsorção de IgG. Os autores observaram que na presença do tampão HEPES (pH 6,8) a quantidade de IgG adsorvida foi aproximadamente 80 mg/g, valor ligeiramente superior ao obtido na presença do tampão TRIS-HCl 25 mM, pH 7,8 (70,0 mg/g). Essas mesmas observações foram verificadas no presente trabalho, visto que a adsorção mais significativa de IgG ter ocorrido na presença dos tampões TRIS-HCl (pH 7,2) e HEPES (pH 6,8).

Para os próximos ensaios foram investigados o comportamento da cinética de adsorção de IgG e a performance dos perfis de isoterma de adsorção com ambos os adsorventes. Para esses ensaios foi definido dar prosseguimentos com apenas o tampão TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2), por apresentar os resultados mais promissores para quantidade de IgG adsorvida.

Cinética e isoterma de adsorção de IgG: para interpretar como ocorre a adsorção em diferentes tempos de contato entre proteína-adsorvente foram necessárias obter as curvas de cinética de adsorção, onde se determinou o tempo de equilíbrio do sistema. A partir da Figura 4.3, foi observado um decaimento na concentração de IgG relativamente lento e o tempo de equilíbrio observado foi de 240 min (4,0 h) nas duas matrizes de afinidade estudadas. Portanto, com esse tempo de equilíbrio definido, os ensaios de isoterma de adsorção foram então iniciados a fim de obter as quantidades máximas de IgG adsorvida em cada um dos adsorventes analisados.

Figura 4.3 – Perfil da cinética de adsorção de IgG utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX (b). Tempo de análise: 0 à 360 min; concentração de IgG: 1,0 mg/mL; massa de adsorvente: 15 mg; volume de solução de proteína: 3,0 mL; tampão de diluição: TRIS-HCl 25 mM (pH7,2); agitação constante em orbital shaker: 18 rpm

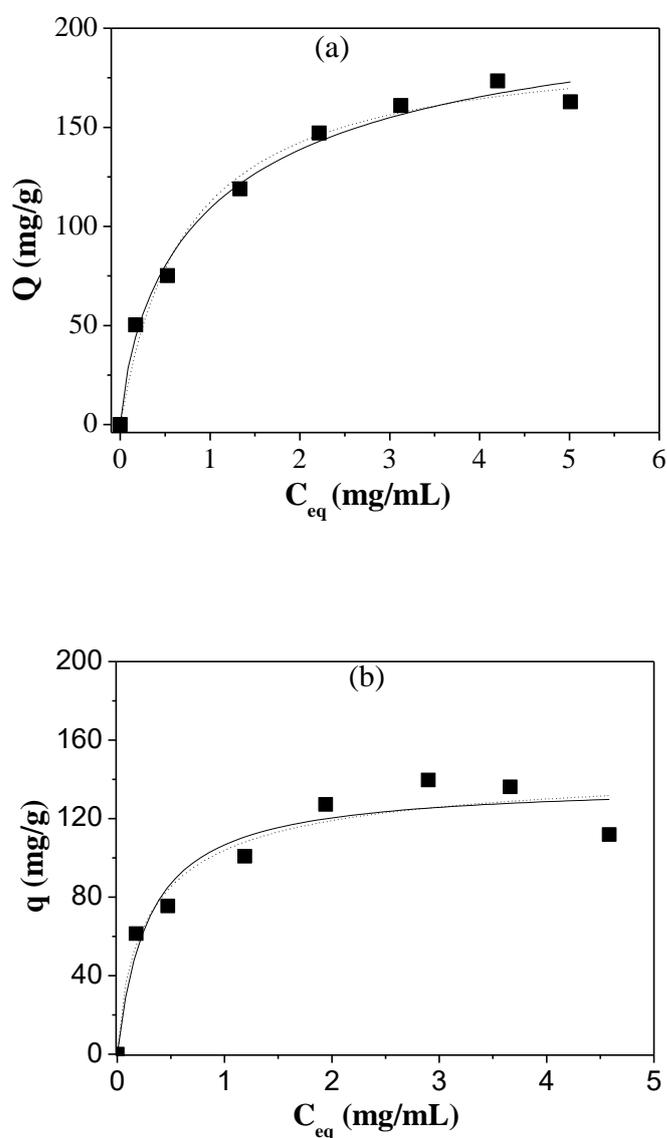


Fonte: elaborado pelo autor

Isotermas de adsorção: a Figura 4.4 apresenta os perfis de isotermas de adsorção de IgG em QAE-RV120 e QAE-PR-MX. Observam-se perfis do tipo favoráveis, isto é, isotermas do tipo Langmuir. Em baixas concentrações de proteínas

disponíveis no meio, elevada quantidade adsorvida de IgG e em concentrações mais altas foi atingido um platô.

Figura 4.4 – Perfis de isotermas de adsorção de IgG utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX (b). Tempo de análise: 240 min; massa de adsorvente: 15 mg; volume de solução de proteína: 3,0 mL; tampão de diluição: TRIS-HCl 25 mM (pH7,2); agitação constante em orbital shaker: 18 rpm. Modelos de ajustes de Langmuir (linha contínua) e Langmuir-Freundlich (linha tracejada)



Fonte: elaborado pelo autor

Nota-se que o perfil de isoterma com o ligante RV120 proporcionou quantidade de IgG adsorvida superior ao ligante PR-MX. Os resultados de quantidade de IgG adsorvida utilizando o tampão TRIS-HCl do presente estudo foram superiores aos obtidos por Gondim e colaboradores (2014), onde os autores observaram quantidades adsorvida de IgG próximas de 100 mg/g utilizando QAE-Cib. Enquanto que no presente estudo as quantidades de IgG adsorvida se aproximaram de 200,0 mg/g com o adsorvente QAE-RV120.

Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram aos dados experimentais fornecendo os parâmetros: quantidade máxima ($q_{m\acute{a}x}$) de IgG adsorvida, as constantes de dissociação de Langmuir e Langmuir-Freundlich (K_D e K_{DLF}) dentre outros, conforme pode ser observado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Parâmetros de ajuste obtidos a partir dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich ajustado aos dados experimentais na adsorção de IgG nas matrizes de afinidade QAE-RV120 e QAE-PR-MX

Parâmetros	QAE-RV120		QAE-PR-MX	
	L	LF	L	LF
$q_{m\acute{a}x}$ (mg/g)	194,47	229,42	138,11	149,54
	$\pm 8,70$	$\pm 44,30$	$\pm 9,10$	$\pm 41,45$
K_D (M)	$9,09 \times 10^{-6}$	-	$2,25 \times 10^{-5}$	-
K_{DLF} (M)	-	$7,35 \times 10^{-6}$	-	$2,92 \times 10^{-5}$
N	-	0,75	-	0,77
Chi ²	62,14	53,55	154,62	176,33
R	0,99	0,99	0,94	0,94

Fonte: elaborado pelo autor

Os valores de R^2 foram próximos da unidade, indicando boa aceitação dos dados experimentais aos modelos de ajustes. As constantes de dissociação (K_D e K_{DLF}) são parâmetros que avaliam o nível da ligação entre proteína-adsorvente e quanto menor esse parâmetro mais forte o ligante interagiu com a proteína. Os ligantes podem ser classificados de acordo com o valor dessas constantes em: ligantes de média afinidade (K_D ou K_{DLF} entre 10^{-4} a 10^{-8} M) ou ligantes de alta afinidade (K_D ou K_{DLF} entre 10^{-9} à 10^{-12} M).

Como mencionado anteriormente, as proteínas A e L (ligantes bioespecífico) são consideradas ligantes de elevada afinidade, enquanto que os ligantes

pseudobiespecíficos, como os corantes utilizados nesse trabalho, podem ser classificados como ligantes de média afinidade. De acordo com os K_D e K_{DLF} , a matriz de afinidade com o ligante RV120 possibilitou interação superior ao ligante PR-MX. Tais resultados corroboram com o parâmetro de $q_{m\acute{a}x}$, onde o ligante RV120 proporcionou superior quantidade de IgG adsorvida em relação ao PR-MX. Os parâmetros de quantidades máximas adsorvidas foram acima de 135 mg/g, representando valores elevados de IgG adsorvida. Esses resultados expostos foram superiores aos reportados na literatura com a utilização de ligantes corantes (Yavuz *et al.*, 2006; Wongchuphan *et al.*, 2009; Gondim *et al.*, 2012; Gondim *et al.*, 2014).

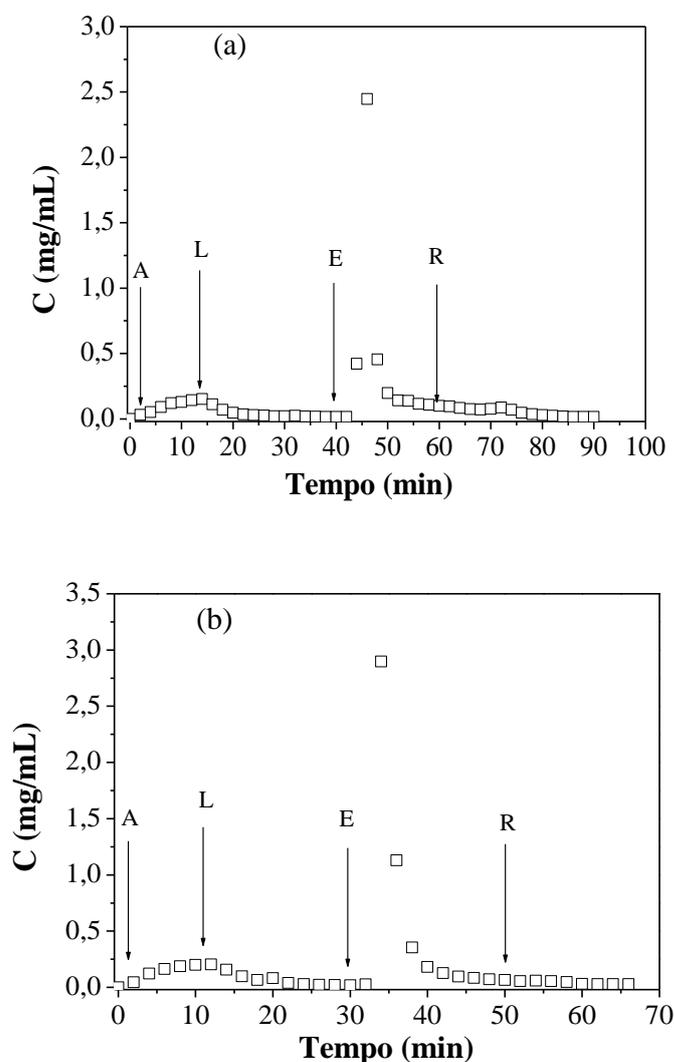
4.3.3 Ensaios Cromatográficos de purificação de IgG humana

Diante dos resultados discutidos em batelada, foi possível afirmar que ambos os materiais apresentaram considerável interação por afinidade por IgG de alta pureza. Todavia, para se confirmar o potencial desses adsorventes na purificação de IgG humana, novos ensaios, em sistema cromatográfico, foram necessários ser realizados.

Inicialmente, os ensaios cromatográficos foram conduzidos com a proteína IgG de alta pureza e em seguida com amostras de soro humano, com o propósito de investigar o potencial dessas matrizes cromatográficas de afinidade na adsorção seletiva de IgG humana.

A Figura 4.5 apresenta os perfis cromatográficos para a adsorção de IgG em com as fases estacionárias QAE-PR-MX e QAE-RV120. Em ambos os perfis cromatográficos foi possível observar a presença de dois picos: primeiro representou a quantidade de IgG não retida na fase estacionária, e o segundo representou a eluição de IgG. Observou-se nitidamente considerável afinidade do ligante 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. O elevado pico de eluição (pico 2) confirma que o ligante apresentou significativa afinidade por IgG. Conforme os dados da Tabela 4.2, cerca de 80% da massa total injetada na coluna foi adsorvida, em ambos os adsorventes. Observa-se que, a quantidade de IgG retida, em massa, foi de 7,33 e 7,54 mg, utilizando respectivamente os adsorventes QAE-RV120 e QAE-PR-MX. Esses ensaios cromatográficos confirmaram o potencial de adsorção de IgG pelas fases estacionárias estudadas, corroborando com as observações realizadas anteriormente nos ensaios em batelada.

Figura 4.5 – Perfis cromatográficos dos ensaios com IgG de alta pureza diluída em TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) utilizando os adsorventes: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX. Volume de injeção (I): 10 mL de IgG de alta pureza (1,0 mg/mL); massa de adsorvente: 0,5 g; vazão de operação: 0,8 mL/min. Etapas: Adsorção (A); Lavagem (L); Eluição (E); Regeneração (R)



Fonte: elaborado pelo autor

Nos trabalhos de Gondim e colaboradores (2012 e 2014), os autores relataram que a matriz QAE com o ligante cibacron imobilizado proporcionou, cerca de 5,0-6,0 mg, de IgG retida utilizando diferentes sistemas tamponantes. Esses valores representaram, em torno de 60% da massa total injetada na coluna. Portanto, os ligantes RV120 e PR-MX estudados no presente trabalho apresentaram resultados na adsorção de IgG superiores aos da literatura utilizando a mesma matriz de QAE.

Tabela 4.2 – Balanço de massa na adsorção de IgG diluída no tampão de adsorção TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) utilizando QAE-RV120 e QAE-PR-MX (0,50 g). Etapas dos ensaios cromatográficos para a injeção (I) de 10 mL de IgG (1,0 mg/mL): Adsorção (A), Lavagem (L), Eluição (E), Regeneração (R) e quantidade de proteína total (PT) de cada etapa obtida a partir de leituras a 280 nm em espectrofotômetro e a Recuperação (REC).

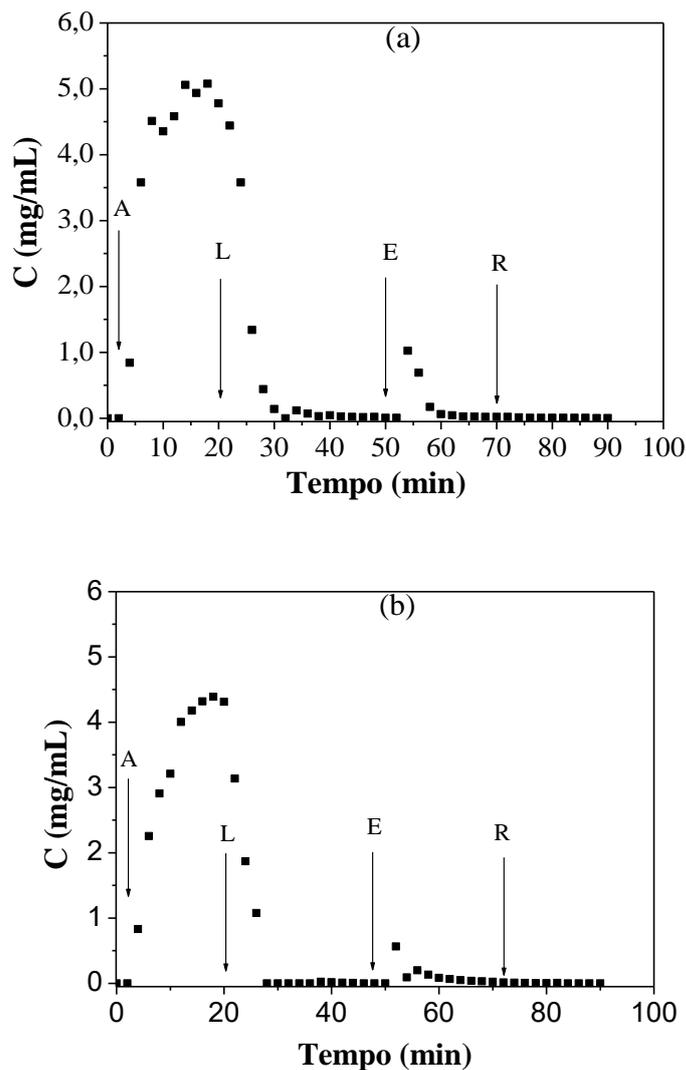
Etapas	QAE-RV120		QAE-PR-MX	
	PT (mg)	%	PT (mg)	%
I	9,17	100,00	9,38	100,00
A	0,85	9,27	1,02	10,87
L	0,87	9,52	1,00	10,67
E	6,08	66,31	6,98	74,38
R	1,28	14,00	0,56	5,97
REC	9,08	99,10	9,56	101,89

Fonte: elaborado pelo

A Figura 4.6 apresenta os perfis cromatográficos dos ensaios cromatográficos com amostras de soro humano diluído em TRIS-HCl (pH 7,2). O propósito desses experimentos foi avaliar o desempenho dessas fases estacionárias na adsorção de IgG humana. O volume de injeção definido foi de 15 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 4,0-5,0 mg/mL. Conforme a Figura 3.6 foi possível observar dois picos cromatográficos representando as proteínas que não foram adsorvidas (pico 1) e as proteínas dessorvidas na eluição (pico 2). Notou-se que ambas as matrizes cromatográficas reterem baixas quantidades de proteínas, entretanto apenas com as análises pela eletroforese poderá ser confirmado qual proteína foi retida em maior proporção.

Gondim e colaboradores (2014) relataram que a quantidade de proteínas totais adsorvida em QAE-Cib não excedeu a 3,5 mg. Ambos os ligantes, cibacron blue e os corantes vermelhos (RV120 e PR-MXR) são classificados de média afinidade e apresentaram quantidades próximas de proteínas retidas. Os ligantes utilizados no presente trabalho apresentaram ligeiramente vantagem ao ligante Cibacron blue.

Figura 4.6 – Perfis cromatográficos dos ensaios com soro humano (SH) diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2) utilizando os adsorventes: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX. Volume de injeção (I): 15 mL de SH (4,0-5,0 mg/mL); massa de adsorvente: 0,5 g; vazão de operação: 0,8 mL/min. Etapas: Adsorção (A): Lavagem (L); Eluição (E) e Regeneração (R)



Fonte: próprio autor.

A Tabela 4.3 apresenta o balanço de massa dos ensaios com o soro humano e a partir dessa tabela foi possível observar que 3,44 - 4,28% do total de massa injetada foram retidas nas fases estacionárias QAE-PR-MX e QAE-RV120, respectivamente. Esse baixo percentual de proteínas representou, em massa, 2,05 - 3,42 mg, entretanto salienta-se que o soro humano contém, além de HSA e IgG, inúmeras outras proteínas.

Portanto, essa baixa quantidade de proteínas retidas pode estar associada a apenas a IgG. Essa hipótese poderá ser confirmada com as análises da eletroforese das amostras desses picos. Caso se confirme que IgG foi a principal proteína adsorvida essas matrizes poderão ser propícias para adsorção seletiva de IgG do soro humano.

Tabela 4.3 – Balanço de massa dos ensaios cromatográficos com amostras do soro humano (SH), diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH 7,2), utilizando os adsorventes: QAE-RV120 e QAE-PR-MX. Etapas dos ensaios cromatográficos após a injeção (I) de 15 mL de SH (4,0 – 5,0 mg/mL): Adsorção (A), Lavagem (L), Eluição (E), Regeneração (R), quantidade de proteína total (PT) obtida para cada etapa a partir do método de Bradford e a Recuperação (REC).

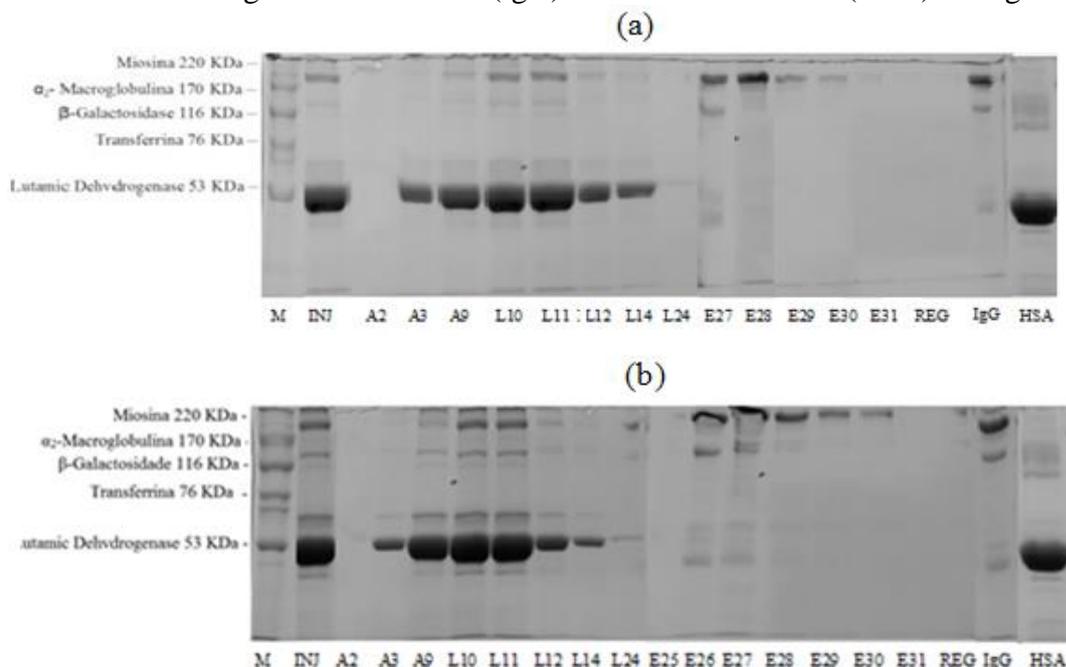
Etapas	QAE-RV120		QAE-PR-MX	
	PT (mg)	%	PT(mg)	%
I	79,86	100,00	59,77	100,00
A	52,06	65,18	40,71	68,11
L	23,82	29,83	16,84	28,18
E	3,31	4,14	1,99	3,33
R	0,11	0,14	0,06	0,11
REC	79,30	99,29	59,60	99,72

Fonte: elaborada pelo autor

Nos ensaios com o soro humano, o método de Bradford foi utilizado para a quantificação de proteínas. Esse método não possibilita identificação da proteína que foi adsorvida, apenas quantifica o total de proteínas presente nas amostras analisadas.

A Figura 4.7 apresenta as eletroforeses das amostras selecionadas dos ensaios cromatográficos realizados com injeção de soro humano. Essas análises são meramente qualitativas, entretanto possibilita, em alguns casos, determinar qual proteína apresentou interação pelas fases estacionárias estudadas. Nas amostras de injeção, de ambos os ensaios, foi possível confirmar a presença das principais proteínas contidas no soro humano, HSA e IgG, além de outras proteínas com menor percentual. A partir das amostras de adsorção foi possível observar a presença majoritária de HSA, indicando que está proteína não apresentou seletividade pelas matrizes cromatográficas utilizadas. As amostras “L10” e “L11”, quando comparadas às amostras de injeção, sugerem que ocorreu a saturação do leito.

Figura 4.7 – Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas dos ensaios cromatográficos com o soro humano diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH7,2) e utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (a) e QAE-PR-MX (b). Marcador de peso molecular (M); Amostra de Injeção (INJ); amostras da Lavagem (L), amostras da Eluição (E), Imunoglobulina Humana (IgG) e Albumina Humana (HSA) da Sigma



Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação às amostras da eluição para os ensaios com o QAE-RV120 (Figura 4.7a) foi possível observar que IgG foi a principal proteína adsorvida. Praticamente nada foi observado de impurezas (HSA) nessas amostras da eluição, visto que a HSA poderia estar presente próximo a faixa de 66 kDa, como se observou nitidamente nas bandas da adsorção (A3 e A9) e injeção (INJ). Logo, confirma-se que o adsorvente realmente apresentou considerável afinidade com a proteína IgG. Portanto, o corante RV120 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.

Analisando os resultados da eletroforese das amostras dos ensaios com a matriz QAE-PR-MX (Figura 4.7b), observou-se que nas cinco amostras da eluição analisadas há um aparecimento de pequenas impurezas nas duas primeiras amostras (E26 e E27), possivelmente HSA. Porém, nas amostras restantes da eluição (E28, E29 e E30) verificou-se presença essencialmente de IgG. Logo, possivelmente apenas com

algumas modificações na etapa da eluição poderão ser obtidas frações de amostras puras de IgG a partir do soro humano. Tais resultados corroboram com os dados em bateladas demonstrando que o adsorvente QAE-PR-MX apresentou considerada afinidade pela biomolécula alvo (IgG), sendo assim esse adsorvente, possivelmente pode ser indicado para purificar ou enriquecer IgG a partir de amostras do soro humano.

Pelas análises da eletroforese das amostras da eluição, de ambos os ensaios, foi possível observar significativa presença de IgG demonstrando que de todas as proteínas contidas no soro humano e injetadas na coluna, a proteína IgG foi preferencialmente adsorvida em ambas as matrizes com maior destaque para o QAE-RV120.

No trabalho de Gondim e colaboradores (2012), os autores observaram, a partir de análises de eletroforeses, presença de certas impurezas, dentre elas a HSA, nas frações de eluição. Contudo, eles reportaram que as frações de eluição foram enriquecidas em termos do teor de IgG em comparação com as bandas de proteína apresentadas na injeção. Então, concluíram que o adsorvente QAE-Cib apresentou potencial para ser utilizado na purificação de IgG humana sob condições otimizadas. Diferentemente, desta constatação, os ligantes utilizados no presente estudo apresentaram potencial para purificar IgG humana, a partir do soro humano, especialmente a fase estacionária com o ligante RV120.

4.3.4 Ensaios cromatográficos no sistema FPLC Contichrom

Nesta etapa, os ensaios cromatográficos foram realizados em “FPLC” (do inglês, Fast Protein Liquid Chromatograph) no sistema Contichrom utilizando as colunas C10/10 (GE) empacotadas com as matrizes de afinidade QAE-RV120 e QAE-PR-MX. Além dessas colunas, foram utilizadas colunas comerciais da linha Hitrap: Protein A HP e Cibacron Blue HP com mesmo volume de empacotamento (1,0 mL).

De acordo com o fabricante (GE Healthcare), a coluna Hitrap Protein A HP (HPA) contém o ligante de afinidade Proteína A acoplada a matriz de agarose altamente reticulada. Essa coluna é designada para purificação de IgG monoclonal e policlonal, a partir do soro e de culturas de células sobrenadantes (Hahn *et al.*, 2003; Ghose *et al.*, 2005; Ghose *et al.*, 2007; Angarita *et al.*, 2015). Hitrap Blue HP (HCB) possui Cibacron Blue, como ligante pseudobioespecífico, acoplado a matriz de agarose altamente

reticulada. Essa coluna pode interagir com inúmeras proteínas, incluindo albumina, interferon, uma ampla gama de enzimas e outras.

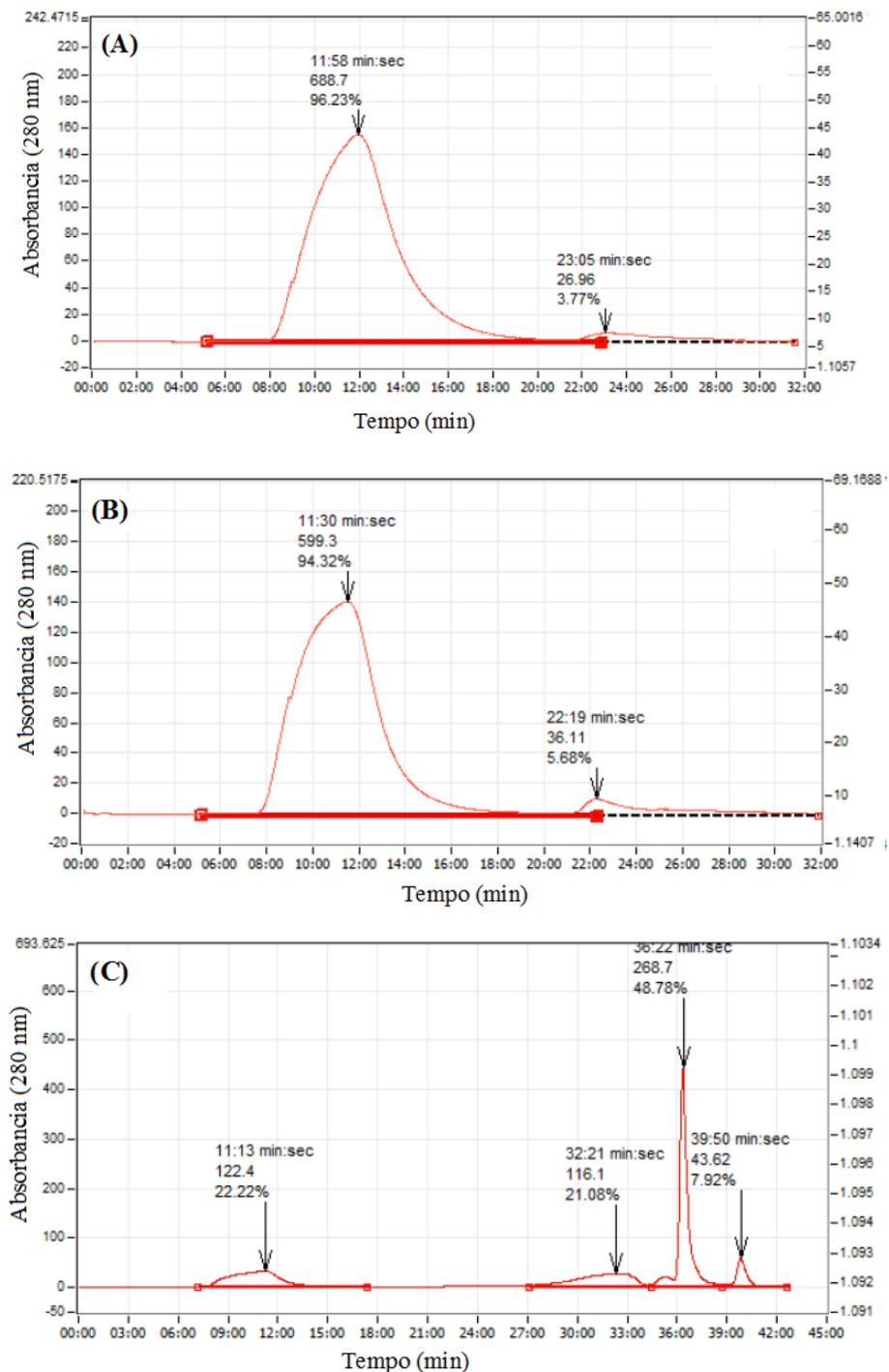
O sistema Contichrom caracteriza-se por ser um equipamento totalmente automatizado, de alta performance e que possibilita sua operação em modo contínuo com até duas colunas em série. É um sistema que oferece o monitoramento de alguns parâmetros, como: absorvância, pressão do sistema, vazão de operação, consumo de solvente, condutividade, dentre outros. Esse sistema também se destaca devido à possibilidade da utilização de até doze diferentes solventes, simultaneamente, além da opção do tipo de gradiente a ser utilizado na eluição (linear ou por degrau).

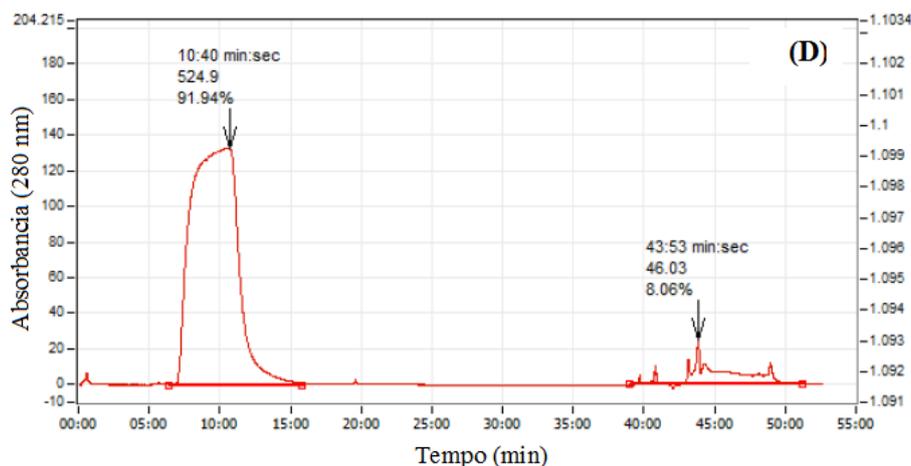
No presente trabalho não foram avaliados parâmetros essenciais, como produtividade, consumo de solvente e pureza do produto, parâmetros dos quais podem definir a viabilidade do sistema proposto, deixando estes para trabalhos futuros. Também não foi realizado nenhum ensaio de purificação de proteínas em modo contínuo utilizando o método CaptureSMB, método mais indicado para purificação de proteína por afinidade em modo contínuo disponível nesse sistema. Algumas variáveis foram cruciais para a não realização desse estudo, principalmente o tempo gasto com as dificuldades operacionais em se trabalhar com colunas C10/10 da GE, das quais não pertencem ao fabricante desse sistema. Portanto, os dados que serão apresentados foram uma simples avaliação do desempenho dessas matrizes de afinidade nas condições definidas nos testes em batelada. Esses novos ensaios foram realizados utilizando soluções monocomponentes (HSA ou IgG), soluções binárias (HSA/IgG) e soluções com soro humano. O principal objetivo a partir desses ensaios foi a confirmação do potencial dessas matrizes cromatográficas sintetizadas para obtenção de amostras de IgG com alto grau aparente de pureza, confirmado pelas análises de eletroforese. E as colunas comerciais serviram como fonte de comparação para com essas matrizes sintetizadas no presente estudo.

Importante informar que para os experimentos que serão discutidos a seguir, o tipo de gradiente de eluição (linear ou por degrau) não apresentou significativa influência nas frações das amostras da eluição (dados não apresentados). Portanto, para todos os ensaios foi utilizado o gradiente linear com a adição de NaCl (1,0 M) ao tampão de adsorção.

A Figura 4.8 apresenta os primeiros experimentos de adsorção a partir de soluções monocomponentes com HSA utilizando as quatro matrizes de afinidades (QAE-RV120, QAE-PR-MX, HCB e HPA).

Figura 4.8 – Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com a proteína HSA utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (A), QAE-PR-MX (B), HCB (C) e HPA (D). Condições de operação: vazão (0,8 mL/min), volume de injeção (3,0 mL), concentração de proteínas diluídas em TRIS-HCl 25 mM em pH 7,2 (1,0 mg/mL), eluição por gradiente linear com adição de NaCl 1,0 M ao tampão de adsorção e regeneração com NaOH 0,5 M





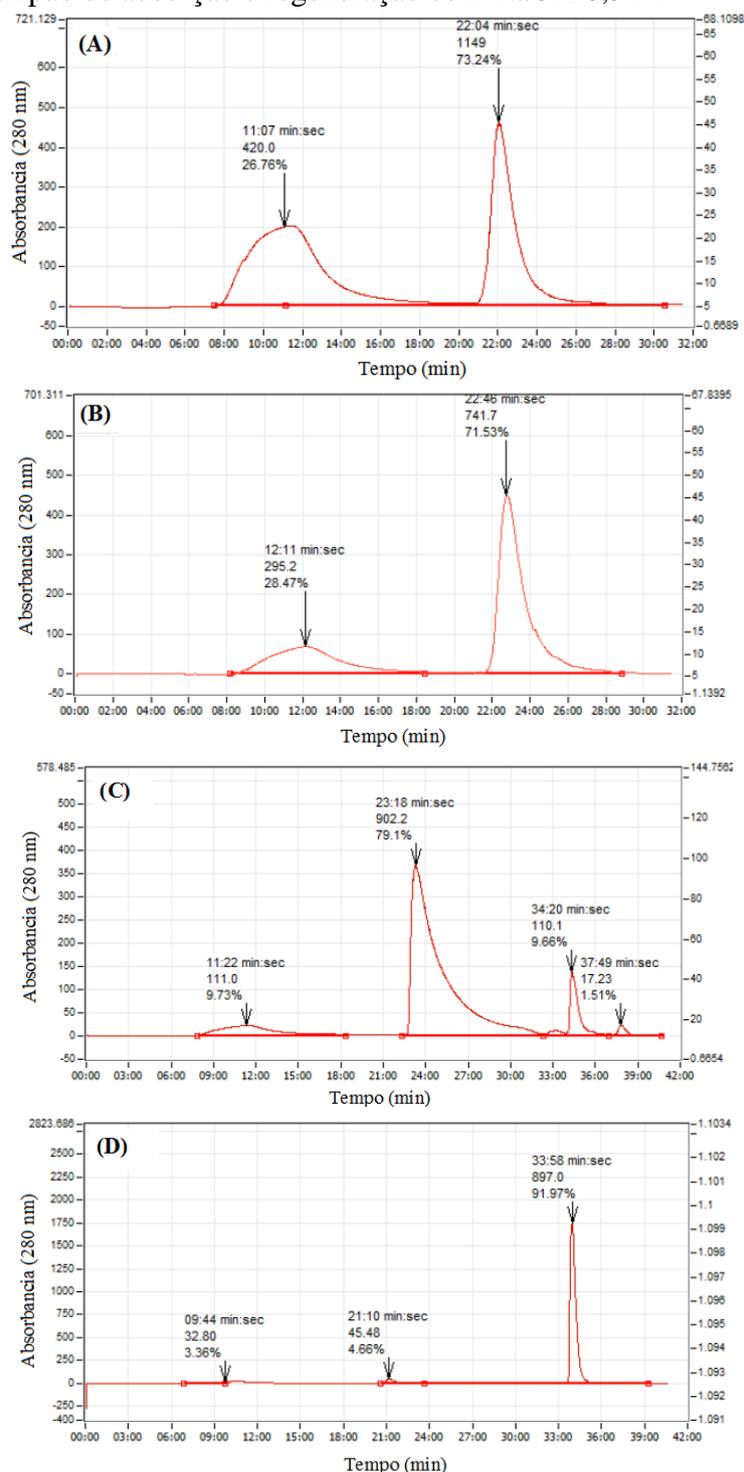
Fonte: elaborado pelo autor.

Observou-se, a partir da Figura 4.8, que HSA não interagiu fortemente com as matrizes de afinidade sintetizadas no presente trabalho (QAE-RV120 e QAE-PR-MX), visto que as quantidades de HSA desorvidas representaram menos de 6% do percentual mássico injetado na coluna. Tais resultados foram importantes para destacar a baixa afinidade dessas matrizes pela principal proteína contida no soro humano. Fazendo dessas, interessantes resinas para a adsorção não seletiva de HSA, por exemplo, quem sabe, a partir de amostras de soro humano.

Conforme a Figura 4.8-D, HPA demonstrou fraca afinidade pela proteína HSA, visto que somente 8,06% do percentual mássico injetado na coluna foi adsorvido. Esse resultado não foi surpreendente, pois de acordo com o fabricante, interage somente com domínios específicos da proteína IgG, fazendo desta resina uma excelente alternativa para a purificação de IgG humana. Em contrapartida, HSA foi consideravelmente adsorvida na resina HCB, como pode ser visto pela baixa quantidade de HSA na etapa de adsorção/lavagem (pico 1), vide gráfico C da Figura 3.8. Nesse caso, a interação entre HSA e Cibacron foi relativamente alta, pois somente observou-se a desorção de HSA na etapa da regeneração com NaOH (0,5 M). Esse resultado não foi inesperado, visto que essa resina pode interagir por algumas proteínas, dentre elas a HSA. Sabe-se que a interação entre a resina HCB e HSA é de uma forma menos específica, por interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas com o ligante aniônico aromático.

A Figura 4.9 apresenta os perfis cromatográficos para os ensaios de adsorção com soluções de IgG utilizando as quatro matrizes de afinidades.

Figura 4.9 – Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com a proteína IgG utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (A), QAE-PR-MX (B), HCB (C) e HPA (D). Condições de operação: vazão (0,8 mL/min), volume de injeção (3,0 mL), concentração de proteínas diluídas em TRIS-HCl 25 mM em pH 7,2 (1,0 mg/mL), eluição por gradiente linear com adição de NaCl 1,0 M ao tampão de adsorção e regeneração com NaOH 0,5 M



Fonte: elaborado pelo autor

Conforme Figura 4.9, a IgG foi a proteína de maior interesse durante todo esse estudo e, portanto, esses perfis cromatográficos foram importantes e necessários a fim de compreender a existência ou não de afinidade dessas matrizes por essa biomolécula. Observou-se que IgG foi adsorvida em grande quantidade em todas as colunas de afinidade. Entretanto, as resinas comerciais, como esperado, apresentaram forte interação com IgG, com maior destaque para a resina HPA. Facilmente verificou-se o potencial dessas resinas comerciais para adsorção de IgG, pois praticamente toda a carga de IgG injetada ter sido adsorvida em ambas.

Foi possível notar que, o ligante da resina HPA interagiu com extrema seletividade pela proteína IgG, pois mesmo sob condição de eluição com NaCl (1,0 M) praticamente nada de IgG foi dessorvida. Conforme relatado anteriormente, as resinas de afinidade com ligantes bioespecíficos, caso da HPA, necessitam de condições drásticas para a completa eluição da proteína adsorvida. Logo, a proteína IgG só foi dessorvida com a passagem da solução com NaOH (0,5 M). A proteína A é um ligante bioespecífico, a qual possui peso molecular de 42 kDa e consiste de seis diferentes regiões, cinco dessas apresentam forte ligação específica pela parte Fc da IgG, deixando os locais de ligação ao antígeno livres (Angarita *et al.*, 2015). Por isso, essa é uma das resinas comerciais utilizadas para a purificação de IgG humana.

Em contrapartida, a resina HCB sob condições amenas durante a eluição (presença de NaCl 1,0 M no tampão de adsorção) dessorveu grande quantidade de IgG que havia sido retida na coluna. A passagem de solução com hidróxido de sódio (NaOH 0,5 M) também foi necessária nos ensaios com HCB, pois, cerca de, 10% do percentual mássico de IgG injetado, precisou ser dessorvida da coluna. Esses resultados mostram que os ligantes Proteína A e Cibacron Blue interagem com IgG sob seletividades distintas.

As colunas com QAE-RV120 e QAE-PR-MX se destacaram na adsorção de IgG, pois foi adsorvido acima de 70% do percentual mássico injetado de IgG. Essas matrizes proporcionaram completa dessorção na etapa da eluição com a simples passagem de NaCl 1,0 M diluído no tampão de adsorção. Essa é uma das significantes vantagens em se trabalhar com essas fases estacionárias sintetizadas no presente estudo, dessa maneira diminui as chances de causar danos na proteína dessorvida.

Comparando os resultados da adsorção de HSA com os da adsorção de IgG nas matrizes sintetizadas, conforme Figuras 4.8 e 4.9 (A e B), notou-se que a adsorção de IgG foi muito superior a adsorção de HSA nessas mesmas condições. Enquanto que

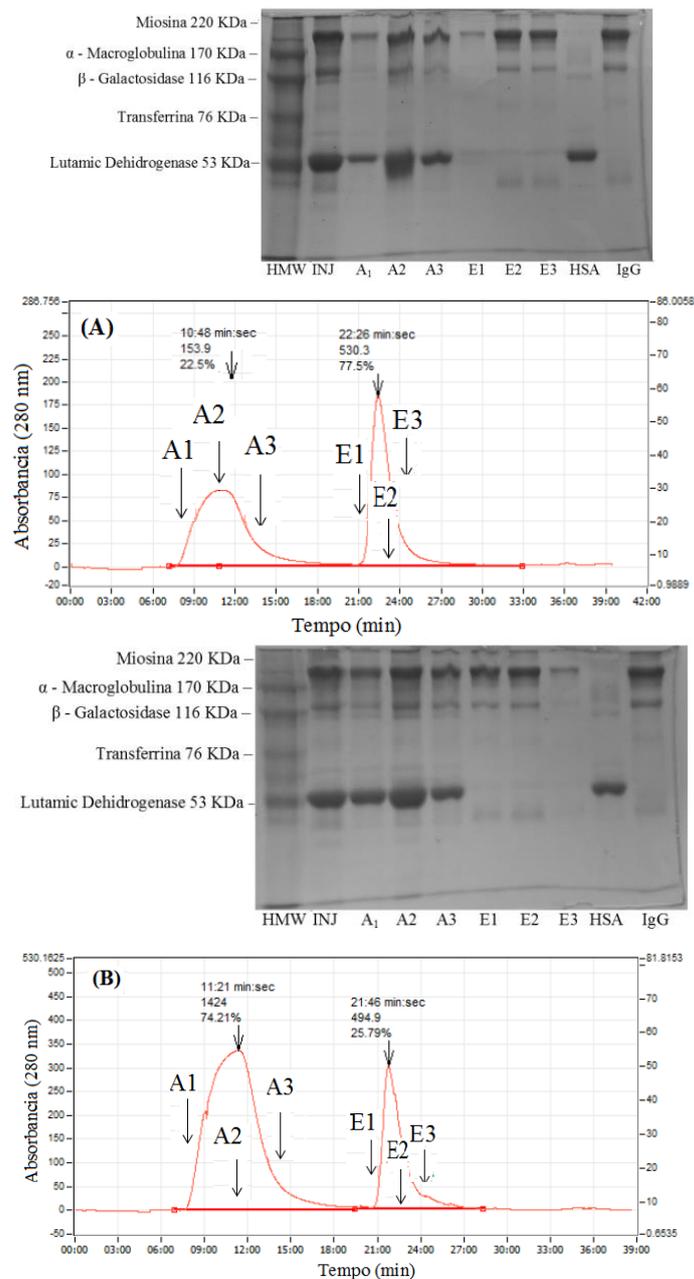
o percentual de IgG retida nos adsorventes representou cerca de 70% da massa injetada na coluna, o percentual de HSA foi abaixo de 6%. Esses resultados corroboram com o que foi discutido nos ensaios preliminares em batelada e em leito fixo com a proteína IgG demonstrando considerável afinidade por essas matrizes.

A Figura 4.10 apresenta os perfis cromatográficos dos ensaios de adsorção com solução binária (IgG/HSA) utilizando as fases estacionárias sintetizadas (QAE-RV120 e QAE-PR-MX). A partir dessa figura observaram-se também as análises da eletroforese de amostras da adsorção e da eluição dos dois ensaios. As principais proteínas presente no soro humano são HSA e IgG, logo esses ensaios foram importantes a fim de avaliar o desempenho dessas matrizes de afinidade a partir da solução contendo ambas as proteínas. Nas discussões anteriores foi evidenciado que tanto a QAE-RV120 quanto a QAE-PR-MX, apresentam considerável interação por IgG e fraca interação por HSA. Essas constatações podem ser justificadas pelas condições que a proteína está diluída. Em pH 7,2 a proteína HSA apresenta carga aparente negativa, enquanto que a IgG está exatamente em seu pI, logo com carga líquida aparente neutra. A partir das eletroforeses foi possível confirmar que a única proteína adsorvida foi a IgG, mais uma prova do potencial dessas fases estacionárias para adsorção seletiva da IgG. Entretanto, o soro humano contém inúmeras proteínas, além de HSA e IgG, logo IgG competirá com todas elas. A HSA, por ser a principal proteína constituinte do soro, provavelmente pode causar maior dificuldade na adsorção seletiva de IgG. Por isso, esse resultado foi tão importante a ser estudado.

A última etapa desses ensaios em FPLC ocorreu com soluções com soro humano diluído em TRIS-HCl 25 mM (pH7,2) e a partir da Figura 4.11 foi possível ser observado os perfis cromatográficos para uma injeção de 3 mL de soro humano (4,0-5,0 mg/mL) utilizando as quatro matrizes de afinidades disponíveis: QAE-RV120, QAE-PR-MX, HCB e HPA. Foram realizadas eletroforeses, a fim de identificar qual proteína foi adsorvida preferencialmente, apenas das amostras dos picos de adsorção e de eluição dos ensaios com os adsorventes sintetizados (QAE-RV120, QAE-PR-MX).

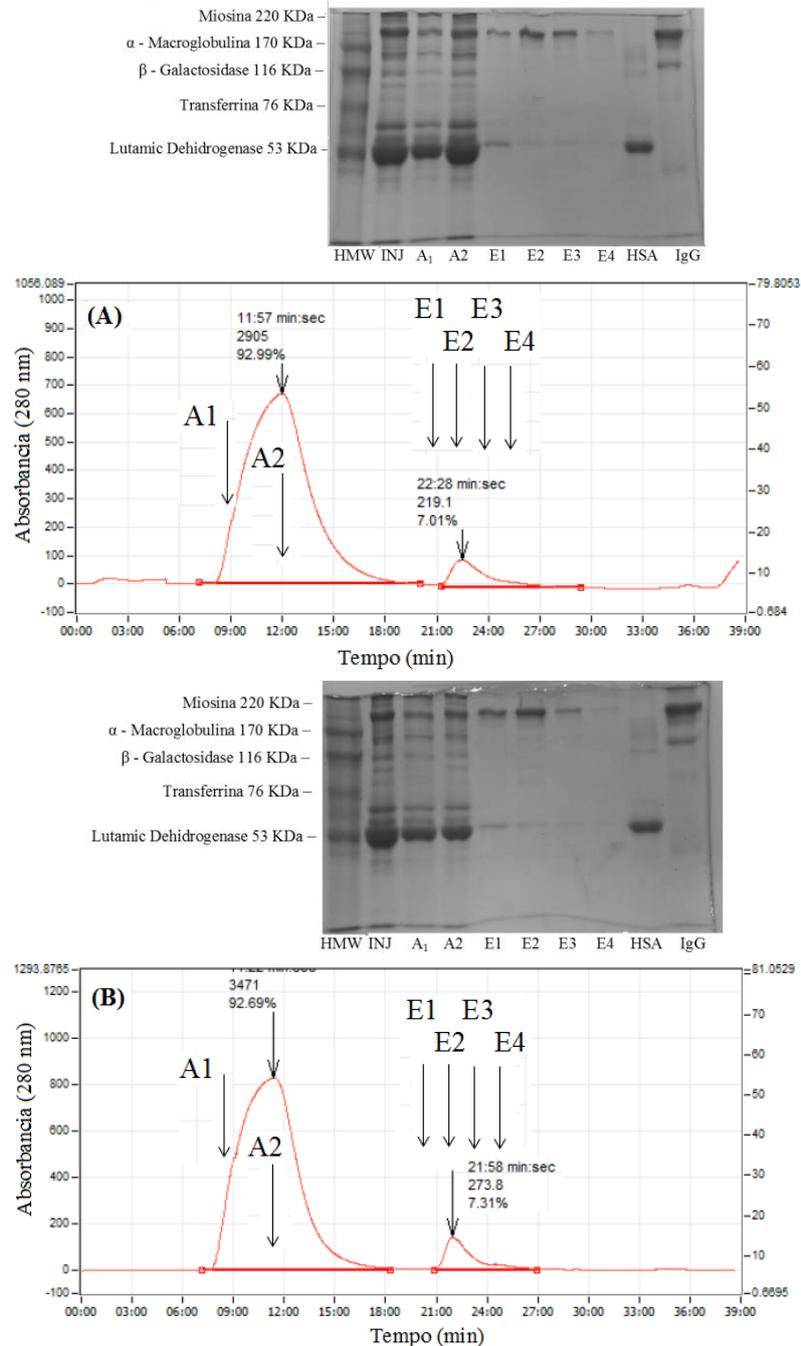
Esses ensaios de purificação de IgG humana, a partir de soluções de soro humano, foram uma reprodução dos testes cromatográficos preliminares nas mesmas condições de tampão e pH utilizadas anteriormente.

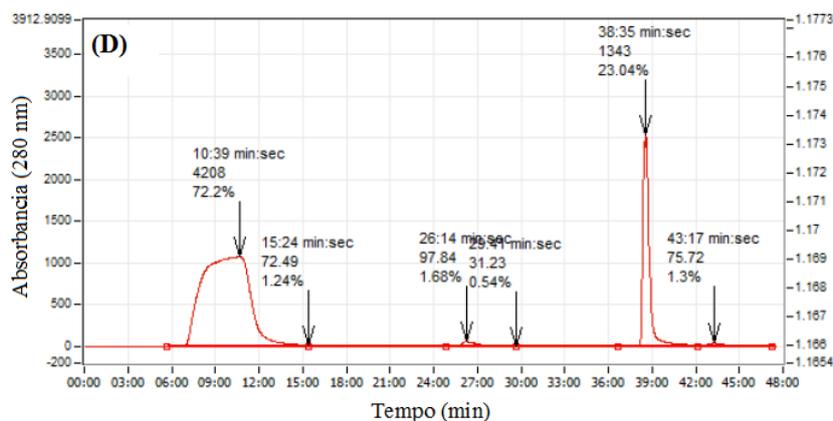
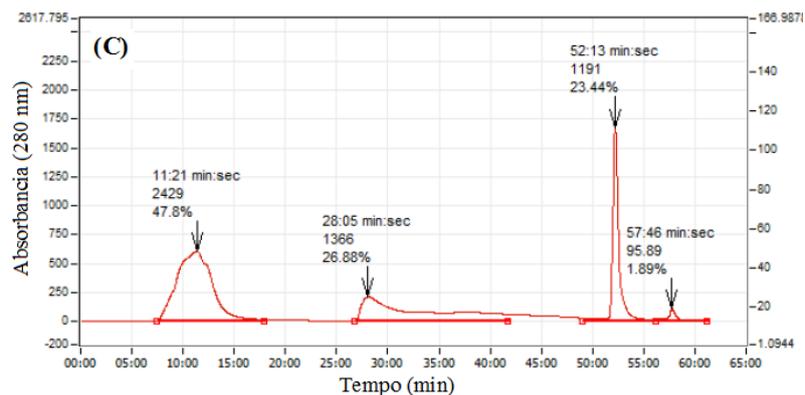
Figura 4.10 – Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com mistura binária de IgG/HSA (1,0 mg/mL) utilizando QAE-RV120 (A) e QAE-PR-MX (B). Condições de operação: vazão (0,8 mL/min), volume de injeção (3,0 mL), concentração de proteínas (1,0 mg/mL), eluição por gradiente linear com adição de NaCl 1,0 M ao tampão de adsorção e regeneração com NaOH 0,5 M. Eletroforese SDS-PAGE das amostras coletadas. Marcador de peso molecular (HMW); Amostra de Injeção (INJ); amostras da Adsorção (A1 e A2), amostras da Eluição (E1, E2, E3 e E4), Imunoglobulina Humana (IgG) e Albumina Humana (HSA) da Sigma



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 4.11 – Perfis cromatográficos dos ensaios em FPLC Contichrom com o soro humano utilizando as matrizes de afinidade: QAE-RV120 (A), QAE-PR-MX (B), HCB (C) e HPA (D). Eletroforese SDS-PAGE dos referentes aos perfis dos cromatográficos (A) e (B). Marcador de peso molecular (HMW); Amostra de Injeção (INJ); amostras da Adsorção (A1 e A2), amostras da Eluição (E1, E2, E3 e E4), Imunoglobulina Humana (IgG) e Albumina Humana (HSA) da Sigma





Fonte: elaborado pelo autor.

O sistema Contichrom se destaca devido automatização e praticidade em se alterar certos parâmetros com maior facilidade, como por exemplo, os tipos de gradiente de eluição. Enquanto que nos testes anteriores com o soro humano foi realizado um gradiente de eluição isocrático com NaCl (1,0 M), nesses novos ensaios foram testados diferentes gradientes para eluição de proteínas. Todavia, em todas as condições testadas com as matrizes de afinidade QAE-RV120 e QAE-PR-MX, a eluição das proteínas ocorreram sob baixas concentrações salinas e não houve distinção quanto ao tipo de gradiente.

Em relação ao percentual de proteínas retidas nas fases estacionárias, foi possível reparar que o QAE-RV120 e o QAE-PR-MX adsorveram uma pequena fração das proteínas injetadas, representando cerca de 7,0% do total de proteínas injetadas na coluna. Valor esse muito inferior ao obtido com a resina HCB, a qual adsorveu aproximadamente 50% da massa injetada no leito. Essa resina de fato possibilitou maior retenção de proteínas, entretanto, destaca-se que nessas condições ela proporcionou afinidade tanto por IgG, como por HSA nos ensaios com soluções monocomponentes. Logo, esse elevado valor de quantidades de proteínas adsorvidas, devem se referir tanto

a adsorção de IgG como de HSA e possivelmente de outras proteínas, visto que, essa resina apresenta afinidade por inúmeras proteínas.

Diferentemente da resina HCB, a resina HPA por possuir um ligante de bioafinidade (Proteína A) em sua matriz, tende a adsorver com maior seletividade a proteína IgG. Provavelmente por essa razão a quantidade de proteínas adsorvidas foi inferior à resina HCB. Salienta-se que a proteína HSA representa cerca de 60% das proteínas contidas no soro humano, logo foi coerente a quantidade de proteínas total adsorvida inferior à resina HCB. A resina HPA interage com elevada afinidade especificamente com domínios específicos da IgG, por isso, essa resina é muito utilizada para purificação de IgG humana.

Os resultados apresentados indicam que as matrizes de afinidade sintetizadas nesse trabalho, de fato, não superaram em quantidade adsorvida das duas resinas comerciais testadas. Entretanto, essas resinas apresentam grande potencial na pré ou purificação de IgG humana, devido aos resultados satisfatórios das eletroforeses. A partir das eletroforeses das frações da eluição foi possível constatar que, mesmo em solução com diferentes proteínas, a IgG foi adsorvida consideravelmente em ambas as resinas sintetizadas nesse trabalho. Todavia, traços de impurezas, possivelmente de HSA foram observados em algumas frações de eluição. Portanto, essas matrizes apresentam grande potencial para o principal objetivo, purificar IgG humana, com tanto há a precaução em otimizar as condições de ensaios a fim de evitar traços de impurezas nas frações de eluição.

4.4 Conclusão Parcial

Foram sintetizadas com êxito as matrizes cromatográficas a base de quitosana com os corantes reativos (RV-120 e PR-MX) imobilizados. O ponto isoelétrico (pI) das proteínas foi fator determinante para a escolha da faixa ideal de pH para adsorção seletiva de IgG humana. O uso da técnica por cromatografia de pseudoafinidade comprovou ser uma excelente alternativa para a purificação de IgG humana utilizando matrizes cromatográficas a base de quitosana com corantes imobilizados. Análises por eletroforese SDS-PAGE das amostras obtidas nos ensaios cromatográficos de purificação comprovaram que foi purificado IgG a partir de misturas binárias e do soro humano.

5 CONCLUSÃO GERAL

Diante de todos os resultados apresentados comprovou-se que o uso da técnica por cromatografia de pseudoafinidade se sobressai em relação à cromatografia por troca iônica. Portanto, a partir deste estudo, as matrizes cromatográficas a base de quitosana e corantes (RV-120 e PR-MX) imobilizados são os adsorventes mais indicados para a purificação de IgG humana a partir de amostras de solução binária (IgG e HSA) e do soro humano. Muitos processos industriais são baseados em mais de uma etapa para a purificação de uma determinada biomolécula, por isso salienta-se que os HDL e as SBA 15 podem vir a ser matrizes cromatográficas interessantes, caso o objetivo seja uma pré-purificação de IgG humana, visto que ambas apresentaram elevado potencial por IgG.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro, Elsevier, 7^o edição, 2012.
- ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170-9, 2008.
- AGUIAR, J. E.; BEZERRA, B. T. C.; BRAGA, B. M.; LIMA, P. D. S.; NOGUEIRA, R. E. F. Q.; DE LUCENA, S. M. P.; SILVA JR, I. J. Adsorption of Anionic and Cationic Dyes from Aqueous Solution on Non-Calcined Mg-Al Layered Double Hydroxide: Experimental and Theoretical Study. **Separation Science and Technology**, v. 48, n. 15, p. 2307-2316, 2013.
- AHMED, A. A. A.; TALIB, Z. A.; BIN HUSSEIN, M. Z.; ZAKARIA, A. Zn-Al layered double hydroxide prepared at different molar ratios: Preparation, characterization, optical and dielectric properties. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 191, p. 271-278, 2012.
- ALBRECHT, H.; DENARDO, S. J. Recombinant antibodies: from the laboratory to the clinic. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 21, n. 4, p. 285-304, 2006.
- ANDRADE, J. D.; HLADY, V.; WEI, A. P. Adsorption of complex proteins at interfaces. **Pure and Applied Chemistry**. 64: 1777-1781 p. 1992.
- ANGARITA, M.; MÜLLER-SPÄTH, T.; BAUR, D.; LIEVROUW, R.; LISSENS, G.; MORBIDELLI, M. Twin-column CaptureSMB: A novel cyclic process for protein A affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1389, p. 85-95, 2015.

ANGELESCU, E.; PAVEL, O. D.; BÎRJEGA, R.; FLOREA, M.; ZĂVOIANU, R. The impact of the “memory effect” on the catalytic activity of Mg/Al; Mg,Zn/Al; Mg/Al,Ga hydrotalcite-like compounds used as catalysts for cyclohexene epoxidation. **Applied Catalysis A: General**, v. 341, n. 1–2, p. 50-57, 2008.

ARNOLD, J. N., RADCLIFFE, C. M., WORMALD, M. R., ROYLE, L., HARVEY, D. J., CRISPIN, M., DWEK, R. A., SIM, R. B. & RUDD, P. M. The glycosylation of human serum IgD and IgE and the accessibility of identified oligomannose structures for interaction with mannan-binding lectin. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6831-40, 2004.

AUMANN, L.; MORBIDELLI, M. A continuous multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) process. **Biotechnol Bioeng**, v. 98, n. 5, p. 1043-55, 2007.

AUMANN, L.; STROEHLEIN, G.; MORBIDELLI, M. Parametric study of a 6-column countercurrent solvent gradient purification (MCSGP) unit. **Biotechnol Bioeng**, v. 98, n. 5, p. 1029-42, 2007.

AUXILIO, A. R.; ANDREWS, P. C.; JUNK, P. C. e SPICCIA, L. The adsorption behavior of C.I. Acid Blue 9 onto calcined Mg–Al layered double hydroxides. **Dyes and Pigments**, v. 81, n. 2, p. 103-112, 2009.

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.

BALL, V.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P. **Mechanism of Interfacial Exchange Phenomena for Proteins Adsorbed at Solid Liquid Interfaces**. 2 Ed. Boca Raton, CRC Press, 2003.

BARRAL, S.; VILLA-GARCÍA, M. A.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M., S. Interactions between whey proteins and kaolinite surfaces. **Acta Materialia**, v. 56, n. 12, p. 2784-2790, 2008.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 373-380, 1951.

BAYRAMOĞLU, G.; OKTEM, H. A.; ARICA, M. Y. A dye–ligand immobilized poly(2-hydroxyethylmethacrylate) membrane used for adsorption and isolation of immunoglobulin G. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 147-155, 2007a.

BAYRAMOĞLU, G.; SENEL, A. U.; ARICA, M. Y. Adsorption of IgG on spacer-arm and L-arginine ligand attached poly(GMA/MMA/EGDMA) beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 1, p. 672-679, 2007b.

BAYRAMOĞLU, G.; YALÇIN, E.; ARICA, M. Y. Adsorption of serum albumin and γ -globulin from single and binary mixture and characterization of pHEMA-based

affinity membrane surface by contact angle measurements. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 1, p. 12-21, 2005.

BAYRAMOĞLU, G.; ŞENEL, A. Ü.; YALÇIN, E.; ARICA, M. Y. Human serum albumin adsorption on poly[(glycidyl methacrylate)-co-(methyl methacrylate)] beads modified with a spacer-arm-attached L-histidine ligand. **Polymer International**, v. 55, n. 1, p. 40-48, 2006.

BECK, J. S.; VARTULI, J. C.; ROTH, W. J.; LEONOWICZ, M. E.; KRESGE, C. T.; SCHMITT, K. D.; CHU, C. T. W.; OLSON, D. H.; SHEPPARD, E. W.. A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10834-10843, 1992.

BELLEZZA, F.; ALBERANI, A.; POSATI, T.; TARPANI, L.; LATTERINI, L.; CIPICIANI, A. Protein interactions with nanosized hydrotalcites of different composition. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 134-142, 2012.

BELLEZZA, F.; CIPICIANI, A.; LATTERINI, L.; POSATI, T.; SASSI, P. Structure and Catalytic Behavior of Myoglobin Adsorbed onto Nanosized Hydrotalcites. **Langmuir**, v. 25, n. 18, p. 10918-10924, 2009.

BENITO, P., LABAJOS, F. M., ROCHA, J. & RIVES, V. Influence of microwave radiation on the textural properties of layered double hydroxides. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 94, n. 1-3, p. 148-158, 2006.

BELOV, K.; ZENGER, K. R.; HELLMAN, L.; COOPER, D. W. Echidna IgA supports mammalian unity and traditional Therian relationship. **Mamm Genome**, v. 13, n. 11, p. 656-63, 2002.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n 1, p. 235-242, 2000.

BERTOLINI, J.; GOSS, N.; CURLING, J. **Production of Plasma Proteins for Therapeutic use**. Canada, Wiley, 2012.

BHAKTA, S. A.; EVANS, E.; BENAVIDEZ, T. E.; GARCIA, C. D. Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 872, n. 0, p. 7-25, 2015.

BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: a review. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 361-389, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRASH, J. L.; TEN HOVE, P. Effect of plasma dilution on adsorption of fibrinogen to solid surfaces. **Thromb Haemost**, v. 51, n. 3, p. 326-30, 1984.

BREMER, M. G.E.G.; DUVAL, J.; NORDE, W.; LYKLEMA, J. Electrostatic interactions between immunoglobulin (IgG) molecules and a charged sorbent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, n. 1–3, p. 29-42, 2004.

BRESOLIN, I. T. L. **Purificação de anticorpos monoclonais utilizando IMAC em membranas de fibra oca de PEVA: comparação dos agentes quelantes IDA, CM-Asp e Tren**, SP. 2006. 129f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Biotecnológicos) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006

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 ω -aminodecyl-agarose. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 23, p. 2087-2093, 2010.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; A BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por Íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**. 32: 1288-1296 p. 2009.

BRICHTA, J.; HNILOVA, M.; VISKOVIC, T. Generation of hapten-specific recombinant antibodies: antibody phage display technology: a review. **Vet Med Czech**, v. 50, p. 231-252, 2005.

BRINDLEY, G. W.; KIKKAWA, S. A crystal-chemical study of Mg,Al and Ni,Al hydroxy-perchlorates and hydroxy-carbonates. **American Mineralogist**, v. 64, n. 7-8, p. 836-843, 1979.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

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

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1–3, p. 575-586, 2001.

CARRIAZO, D.; DEL ARCO, M.; MARTÍN, C.; RAMOS, C.; RIVES, V. Influence of the inorganic matrix nature on the sustained release of naproxen. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 130, n. 1–3, p. 229-238, 2010.

CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of Serum Albumin. **Advances in Protein Chemistry: Academic Press**, v. 45, p.153-203, 1994.

CARTER, P. J. Potent antibody therapeutics by design. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 5, p. 343-57, 2006.

CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACCARI, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catalysis Today**, v. 11, n. 2, p. 173-301, 1991.

CHAVES, J. A. P.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. D. S.; SANTANA, S. A. A. Caracterização e aplicação do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. **Caderno de Pesquisa**, v. 16, n. 2, 2009.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L.; MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J. N.; MELIN, M.; TAYLOR, H. L. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids^{1a,b,c,d}. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 3, p. 459-475, 1946.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações., **Química Nova**, v. 21, p. 300-311, 1998.

CUNICO, R. L.; KAREN, M. G.; WEHR, T. **Basic HPLC and CE of Biomolecules**. California, Richmond, 1998.

DAŃKOWSKA, M.; ADAMCZYK, Z.; KUJDA, M. Mechanism of HSA adsorption on mica determined by streaming potential, AFM and XPS measurements. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 442-449, 2013.

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.

DEMANÈCHE, S.; CHAPEL, J.-P.; MONROZIER, L. J.; QUIQUAMPOIX, H. Dissimilar pH-dependent adsorption features of bovine serum albumin and α -chymotrypsin on mica probed by AFM. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 70, n. 2, p. 226-231, 2009.

DENIZLI, F.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Affinity microspheres and their application to lysozyme adsorption: Cibacron Blue F3GA and Cu(II) with poly(HEMA-EGDMA). **Polymer International**, v. 48, n. 5, p. 360-366, 1999.

DENIZLI, A.; PIŞKIN, E. Dye-ligand affinity systems. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 391-416, 2001.

DE ROY, C. F., KHALID EL MALKI, JEAN-PIERRE BESSE. **Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry**. Boston, Springer US, 1992.

DIAO, X.; WANG, Y.; ZHAO, J.; ZHU, S. Effect of Pore-size of Mesoporous SBA-15 on Adsorption of Bovine Serum Albumin and Lysozyme Protein. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 493-499, 2010.

DO, D. M.; JAENICKE, S.; CHUAH, G.-K. Mesoporous Zr-SBA 15 as a green solid acid catalyst for the Prins reaction. **Catalysis Science Technology**, v. 2, p. 1417-1424, 2012.

DOS SANTOS, S. M. L. **Síntese e caracterização de sílicas mesoporosas para a adsorção de biomoléculas modelo (BSA, Lisozima e Celulase), CE.** 2013. 136f. Tese (Doutorado em Processos Bioquímicos) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013

DOS SANTOS, S. M. L.; NOGUEIRA, K. A. B.; DE SOUZA GAMA, M.; LIMA, J. D. F.; DA SILVA JÚNIOR, I. J.; DE AZEVEDO, D. C. S. Synthesis and characterization of ordered mesoporous silica (SBA-15 and SBA-16) for adsorption of biomolecules. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 180, n. 0, p. 284-292, 2013.

DUARTE-SILVA, R.; VILLA-GARCÍA, M. A.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Structural, textural and protein adsorption properties of kaolinite and surface modified kaolinite adsorbents. **Applied Clay Science**, v. 90, n. 0, p. 73-80, 2014.

ERDEM, B.; ERDEM, S.; ÖKSÜZOĞLU, R.; ÇITAK, A. High-surface-area SBA-15–SO₃H with enhanced catalytic activity by the addition of poly(ethylene glycol). **Journal of Porous Materials**, v. 20, n. 5, p. 1041-1049, 2013.

ESFAHANI, H.; PRABHAKARAN, M. P.; SALAHI, E.; TAYEBIFARD, A.; KEYANPOUR-RAD, M.; RAHIMPOUR, 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.

ESSA, H.; MAGNER, E.; COONEY, J.; HODNETT, B. K. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 49, n. 1-4, p. 61-68, 2007.

FANGKANGWANWONG, J.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Chitosan gel formation via the chitosan–epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. **Polymer**, v. 47, n. 18, p. 6438-6445, 2006.

FASER, W.; CHAMBERLAIN, J. C. **Blood and Transport Proteins.** Philadelphia, Medical Biochemistry-Mosby, 1999.

FASSINA, G.; VERDOLIVA, A.; ODIERNA, M. R.; RUVO, M.; CASSINI, G. Protein A mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies. **Journal of Molecular Recognit**, v. 9, n. 5-6, p. 564-9, 1996.

FENG, Z.; SHAO, Z.; YAO, J.; HUANG, Y.; CHEN, X. Protein adsorption and separation with chitosan-based amphoteric membranes. **Polymer**, v. 50, n. 5, p. 1257-1263, 2009.

FULVIO, P. F.; PIKUS, S.; JARONIEC, M. Tailoring properties of SBA-15 materials by controlling conditions of hydrothermal synthesis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 47, p. 5049-5053, 2005.

FUXIANG, L.; FENG, Y.; YONGLI, L.; RUIFENG, L.; KECHANG, X. Direct synthesis of Zr-SBA-15 mesoporous molecular sieves with high zirconium loading: Characterization and catalytic performance after sulfated. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 101, n. 1–2, p. 250-255, 2007.

GARCÍA-SANCHO, C.; MORENO-TOST, R.; MÉRIDA-ROBLES, J. M.; SANTAMARÍA-GONZÁLEZ, J.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, A.; TORRES, P. M. Etherification of glycerol to polyglycerols over MgAl mixed oxides. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 84-90, 2011.

GHOSE, S.; ALLEN, M.; HUBBARD, B.; BROOKS, C.; CRAMER, S. M. Antibody variable region interactions with Protein A: implications for the development of generic purification processes. **Biotechnol Bioeng**, v. 92, n. 6, p. 665-73, 2005.

GHOSE, S.; HUBBARD, B.; CRAMER, S. M. Binding capacity differences for antibodies and Fc-fusion proteins on protein A chromatographic materials. **Biotechnol Bioeng**, v. 96, n. 4, p. 768-79, 2007.

GIACOMELLI, C. E.; BREMER, M. G. E. G.; NORDE, W. ATR-FTIR Study of IgG Adsorbed on Different Silica Surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 220, n. 1, p. 13-23, 1999.

GONDIM, D. R.; LIMA, L. P.; DE SOUZA, M. C. M.; BRESOLIN, I. T. L.; ADRIANO, W. S.; AZEVEDO, D. C. S.; SILVA, I. Dye Ligand Epoxide Chitosan/Alginate: A Potential New Stationary Phase for Human IgG Purification. **Adsorption Science & Technology**, v. 30, n. 8, p. 701-712, 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-Journal of the International Adsorption Society**, v. 20, n. 8, p. 925-934, 2014.

GUÉLAT, B.; KHALAF, R.; LATTUADA, M.; COSTIOLI, M.; MORBIDELLI, M. Protein adsorption on ion exchange resins and monoclonal antibody charge variant modulation. **Journal of Chromatography A**, v. 1447, p. 82-91, 5/20/ 2016.

HAHN, R.; SCHLEGEL, R.; JUNGBAUER, A. Comparison of protein A affinity sorbents. **Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 790, n. 1-2, p. 35-51, 2003.

HARTMANN, M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 18, p. 4577-4593, 2005.

HARTVIG, R. A.; VAN DE WEERT, M.; OSTERGAARD, J.; JORGENSEN, L.; JENSEN, H. Protein adsorption at charged surfaces: the role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2634-43, 2011.

HAYNES, C. A.; NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, n. 6, p. 517-566, 1994.

HEALTHCARE, G. **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing**. GE USA, Amersham Place, Sigma, 2004.

HEALTHCARE, G. **Affinity Chromatography: Antibodies**. USA, Amersham Place, Sigma, 2014.

HEGYI, G., KARDOS, J., KOVÁCS, M., MÁLNÁSI-CSIZMADIA, A., NYITRAY, L., PÁL, G., RADNAI, L., REMÉNYI, A. & VENEKE, I. **Introduction to Practical Biochemistry**. Hungary, Ellite TTK, 2013.

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: 21 out 2016

HEMOPE. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco. **Produção de Hemoderivados**. Recife, 2016. Disponível em: < <http://www.hemope.pe.gov.br/fund-hemoderivados.php>>. Acesso em: 22 out 2016.

HORBETT, T. A. Mass action effects on competitive adsorption of fibrinogen from hemoglobin solutions and from plasma. **Thromb Haemost**, v. 51, n. 2, p. 174-81, 1984.

HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2291-2299, 2012.

HUANG, P. Y.; CARBONELL, R. G. Affinity chromatographic screening of soluble combinatorial peptide libraries. **Biotechnol Bioeng**, v. 63, n. 6, p. 633-41, 1999.

INDEST, T.; LAINE, J.; KLEINSCHEK, K. S.; ZEMLJIČ, L. F. Adsorption of human serum albumin (HSA) on modified PET films monitored by QCM-D, XPS and AFM. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 360, n. 1-3, p. 210-219, 2010.

INSTITUTO BUTANTAN. **Saude e Pesquisa**. São paulo, 2016. disponível em: <<http://www.butantan.gov.br/producao/desenvolvimento/paginas/desenvolvimento/Paginas/default.aspx>>Acesso em 21 nov 2016.

IP, A. W. M.; BARFORD, J. P.; MCKAY, G. A comparative study on the kinetics and mechanisms of removal of Reactive Black 5 by adsorption onto activated carbons and bone char. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, n. 2-3, p. 434-442, 2010.

JACKSON, A. J.; KARLE, E. M.; HAGE, D. S. Preparation of high-capacity supports containing protein G immobilized to porous silica. **Analytical Biochemistry**, v. 406, n. 2, p. 235-237, 2010.

JAIN, M.; KAMAL, N.; BATRA, S. K. Engineering antibodies for clinical applications. **Trends Biotechnol**, v. 25, n. 7, p. 307-16, 2007.

JIN, L.; HE, D.; LI, Z.; WEI, M. Protein adsorption on gold nanoparticles supported by a layered double hydroxide. **Materials Letters**, v. 77, n. 0, p. 67-70, 2012.

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.

KATIYAR, A.; JI, L.; SMIRNIOTIS, P.; PINTO, N. G. Protein adsorption on the mesoporous molecular sieve silicate SBA-15: effects of pH and pore size. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, n. 1, p. 119-126, 2005.

KATIYAR, A.; YADAV, S.; SMIRNIOTIS, P. G.; PINTO, N. G. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1122, n. 1-2, p. 13-20, 2006.

KHAMLICH, S.; SERRES, A.; MULLER, D.; JOZEFONVICZ, J.; BRASH, J. L. Interaction of IgG and albumin with functionalized silicas. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 4, n. 3, p. 165-172, 1995.

KHAMLICH, S.; SERRES, A.; MULLER, D.; JOZEFONVICZ, J.; BRASH, J. L. Energetics of lysozyme adsorption on mesostructured cellular foam silica: Effect of salt concentration. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6697-6704, 2011.

KOERNER, MEGAN M.; PALACIO, LUIS A.; WRIGHT, JOHNNIE W.; SCHWEITZER, KELLY S.; RAY, BRUCE D.; PETRACHE, HORIA I. Electrodynamics of Lipid Membrane Interactions in the Presence of Zwitterionic Buffers. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 2, p. 362-369, 2011.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KONTERMANN, R. E. Alternative antibody formats. **Curr Opin Mol Ther**, v. 12, n. 2, p. 176-83, 2010.

KOUTSOUKOS, P. G.; NORDE, W.; LYKLEMA, J. Protein adsorption on hematite (α -Fe₂O₃) surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 95, n. 2, p. 385-397, 1983.

KRÄTTLI, M.; STRÖHLEIN, G.; AUMANN, L.; MÜLLER-SPÄTH, T. & MORBIDELLI, M. Closed loop control of the multi-column solvent gradient purification process. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 50, p. 9028-9036, 2011

KWON, T.; PINNAVAIA, T. J. Pillaring of a layered double hydroxide by polyoxometalates with Keggin-ion structures. **Chemistry of Materials**, v. 1, n. 4, p. 381-383, 1989.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LARSON, B. L.; HEARY, H. L., JR.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. **Journal Dairy Sci**, v. 63, n. 4, p. 665-71, 1980.

LASSEN, B.; MALMSTEN, M. Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 186, n. 1, p. 9-16, 1997.

LAZARIDIS, N. K.; KARAPANTSIOS, T. D.; GEORGANTAS, D. Kinetic analysis for the removal of a reactive dye from aqueous solution onto hydrotalcite by adsorption. **Water Research**, v. 37, n. 12, p. 3023-3033, 2003..

LEE, W. K.; MCGUIRE, J.; BOTHWELL, M. K. Competitive adsorption of bacteriophage T4 lysozyme stability variants at hydrophilic glass surfaces. **Journal Colloid Interface Sci**, v. 269, n. 1, p. 251-4, 2004.

LEI, J.; FAN, J.; YU, C., ZHANG, L.; JIANG, S.; TU, B.; ZHAO, D. Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 73, n. 3, p. 121-128, 2004.

LI, N.; LI, X.; WANG, W.; GENG, W.; QIU, S. Blue-shifting photoluminescence of Tris (8-hydroxyquinoline) aluminium encapsulated in the channel of functionalized mesoporous silica SBA-15. **Materials Chemistry and Physics**, v. 100, n. 1, p. 128-131, 2006.

LI, S.; BAI, Z.; ZHAO, D. Characterization and friction performance of Zn/Mg/Al-CO₃ layered double hydroxides. **Applied Surface Science**, v. 284, p. 7-12, 2013.

LI, Y.; ZHOU, G.; LI, C.; QIN, D.; QIAO, W.; CHU, B. Adsorption and catalytic activity of Porcine pancreatic lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 341, n. 1-3, p. 79-85, 2009.

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

LIU, J.; YUE, Y.; WANG, J.; YAN, X.; LIU, R.; SUN, Y.; LI, X. Study of interaction between human serum albumin and three phenanthridine derivatives: fluorescence spectroscopy and computational approach. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 145, p. 473-81, 2015.

LIU, X.; LI, L.; DU, Y.; GUO, Z.; ONG, T. T.; CHEN, Y.; NG, S. C.; YANG, Y. Synthesis of large pore-diameter SBA-15 mesostructured spherical silica and its application in ultra-high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7767-7773, 2009.

LIU, X.; ZHU, L.; ZHAO, T.; LAN, J.; YAN, W.; ZHANG, H. Synthesis and characterization of sulfonic acid-functionalized SBA-15 for adsorption of biomolecules. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 142, n. 2-3, p. 614-620, 2011.

LU, H. L.; LIN, D. Q.; ZHU, M. M.; YAO, S. J. Protein adsorption on DEAE ion-exchange resins with different ligand densities and pore sizes. **Journal Separation of Science**, v. 35(22), p. 3084-3090, 2012.

LUCRÉDIO, A. F.; ASSAF, J. M.; ASSAF, E. M. Reforming of a model sulfur-free biogas on Ni catalysts supported on Mg(Al)O derived from hydrotalcite precursors: Effect of La and Rh addition. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, n. 0, p. 8-17, 2014.

LUND, L. N.; GUSTAVSSON, P. E.; MICHAEL, R.; LINDGREN, J.; NORSKOV-LAURITSEN, L.; LUND, M.; HOUE, G.; STABY, A.; ST HILAIRE, P. M. Novel peptide ligand with high binding capacity for antibody purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1225, p. 158-67, 2012.

LV, T.; MA, W.; XIN, G.; WANG, R.; XU, J.; LIU, D.; LIU, F.; PAN, D. Physicochemical characterization and sorption behavior of Mg–Ca–Al (NO₃) hydrotalcite-like compounds toward removal of fluoride from protein solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 237–238, n. 0, p. 121-132, 2012.

MALLAKPOUR, S.; DINARI, M. Intercalation of amino acid containing chiral dicarboxylic acid between Mg–Al layered double hydroxide. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, n. 2, p. 1123-1130, 2015.

MALMSTEN, M. Formation of Adsorbed Protein Layers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 207, n. 2, p. 186-199, 1998.

MANDAL, S.; MAYADEVI, S. Adsorption of fluoride ions by Zn–Al layered double hydroxides. **Applied Clay Science**, v. 40, n. 1–4, p. 54-62, 2008.

MARCHALONIS, J. J.; ATWELL, J. L.; GODING, J. W. 7S immunoglobulins of a monotreme, the Echidna *Tachyglossus aculeatus*: two distinct isotypes which bind A protein of *Staphylococcus aureus*. **Immunology**, v. 34, n. 1, p. 97-103, 1978.

MEYNEN, V.; COOL, P.; VANSANT, E. F. Verified syntheses of mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 125, n. 3, p. 170-223, 2009.

MILLS, S. J.; CHRISTY, A. G.; GÉNIN, J. M. R.; KAMEDA, T.; COLOMBO, F. Nomenclature of the hydrotalcite supergroup: natural layered double hydroxides. **Mineralogical Magazine**, v. 76, n. 5, p. 1289-1336, 2012.

MIYAHARA, M.; VINU, A.; HOSSAIN, K. Z.; NAKANISHI, T.; ARIGA, K. Adsorption study of heme proteins on SBA-15 mesoporous silica with pore-filling models. **Thin Solid Films**, v. 499, n. 1–2, p. 13-18, 2006.

MOERZ, S. T.; HUBER, P. Protein Adsorption into Mesopores: A Combination of Electrostatic Interaction, Counterion Release, and van der Waals Forces. **Langmuir**, v. 30, n. 10, p. 2729-2737, 2014.

- MORBIDELLI, M. Purification of monoclonal antibodies by continuous chromatography (MCSGP). **New Biotechnology**, v. 25, Supplement, p. S172-S173, 2009.
- MOREIRA, M. B.; FRANCISCATO, D. S.; TOLEDO, K. C. F.; DE SOUZA, J. R. B.; NAKATANI, H. S.; DE SOUZA, V. R. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, p. 227-232, 2015.
- MULLER-SPATH, T.; AUMANN, L.; MELTER, L.; STROHLEIN, G.; MORBIDELLI, M. Chromatographic separation of three monoclonal antibody variants using multicolumn countercurrent solvent gradient purification (MCSGP). **Biotechnol Bioeng**, v. 100, n. 6, p. 1166-77, 2008.
- MULLER-SPATH, T.; KRATTLI, M.; AUMANN, L.; STROHLEIN, G.; MORBIDELLI, M. Increasing the activity of monoclonal antibody therapeutics by continuous chromatography (MCSGP). **Biotechnol Bioeng**, v. 107, n. 4, p. 652-62, 2010.
- MÜLLER-SPÄTH, T.; STRÖHLEIN, G.; AUMANN, L.; KORNMANN, H.; VALAX, P.; DELEGRANGE, L.; CHARBAUT, E.; BAER, G.; LAMPROYE, A.; JÖHNCK, M.; SCHULTE, M.; MORBIDELLI, M. Model simulation and experimental verification of a cation-exchange IgG capture step in batch and continuous chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 31, p. 5195-5204, 2011.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica Ilustrada**. 27 ed, Porto Alegre, Artmed Editora, 2008.
- NAKANISHI, K.; TOMITA, M.; NAKAMURA, H.; KATO, K. Specific binding of immunoglobulin G to protein A-mesoporous silica composites for affinity column chromatography. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 45, p. 6321-6328, 2013.
- NGUYEN, T. P. B.; LEE, J.-W.; SHIM, W. G.; MOON, H. Synthesis of functionalized SBA-15 with ordered large pore size and its adsorption properties of BSA. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 110, n. 2-3, p. 560-569, 2008.
- NORDE, W. Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 25, p. 267-340, 1986.
- NORDE, W. Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. **Biopolymers at Interfaces**, v. 75, p. 27-54, 1998.
- NORDE, W. My voyage of discovery to proteins in flatland and beyond. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 1, p. 1-9, 2008.
- ODABAŞI, M.; DENIZLI, A. Cibacron Blue F3GA-attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption. **Polymer International**, v. 53, p. 332-338, 2004.

OLFS, H. W.; TORRES-DORANTE, L. O.; ECKELT, R.; KOSSLICK, H. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. **Applied Clay Science**, v. 43, n. 3–4, p. 459-464, 2009.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles. **Journal of Chemical Education**, v. 45, n. 9, p. 581, 1968.

PETERS JR, T. **Advances in Protein Chemistry: Serum Albumin**. New York, Elsevier, v. 37, p. 161-245, 1985.

PETERS JR, T. **The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties**. San Diego, Elsevier, p. 9-75, 1995.

PFAUNMILLER, E. L.; PAULEMOND, M. L.; DUPPER, C. M.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 7, p. 2133-2145, 2013.

PFISTER, D.; MORBIDELLI, M.; NICOUD, R. M. A continuum theory for multicomponent chromatography modeling. **Journal of Chromatography A**, v. 1446, p. 50-58, 2016.

POHANKA, M. Monoclonal and polyclonal antibodies production - preparation of potent biorecognition element. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 7, n. 3, p. 115-121, 2009.

PHAN, N. T. S.; JONES, C. W. Highly accessible catalytic sites on recyclable organosilane-functionalized magnetic nanoparticles: An alternative to functionalized porous silica catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 253, n. 1–2, p. 123-131, 2006.

QUINTELLA, S. A.; SABOYA, R. M. A.; SALMIN, D. C.; NOVAES, D. S.; ARAÚJO, A. S.; ALBUQUERQUE, M. C. G.; CAVALCANTE JR, C. L. Transesterification of soybean oil using ethanol and mesoporous silica catalyst. **Renewable Energy**, v. 38, n. 1, p. 136-140, 2012.

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.

RALLA, K., SOHLING, U., SUCK, K., SANDER, F., KASPER, C., RUF, F. & SCHEPER, T. Adsorption and separation of proteins by a synthetic hydrotalcite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 217-225, 2011.

RAJENDRAN, A.; BASU, S. K. Alginate-Chitosan Particulate System for Sustained Release of Nimodipine. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 433-440, 2009.

RIVES, V.; DEL ARCO, M.; MARTÍN, C. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. **Applied Clay Science**, v. 88–89, p. 239-269, 2014.

ROBERTS, M. W. H.; ONGKUDON, C. M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Versatility of polymethacrylate monoliths for chromatographic purification of biomolecules. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2485-2496, 2009.

RODRIGUES, E. C.; BEZERRA, B. T. C.; FARIAS, B. V.; ADRIANO, W. S.; VIEIRA, R. S.; AZEVEDO, D. C. S.; SILVA JR, I. J. Adsorption of Cellulase Isolated from *Aspergillus Niger* on Chitosan/Alginate Particles Functionalized with Epichlorohydrin. **Adsorption Science & Technology**, v. 31, p. 17-34, 2013.

ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. **Adsorption by Powders and Porous Solids**. London, Academic Press, p. 439-447, 1999.

RUCKENSTEIN, E.; ZENG, X. Albumin separation with Cibacron Blue carrying macroporous chitosan and chitin affinity membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 142, n. 1, p. 13-26, 1998.

SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M. Specific Ion Effects on Adsorption of Lysozyme on Functionalized SBA-15 Mesoporous Silica. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 23, p. 7996-8001, 2010.

SALMON, S. E.; SMITH, B. A. Immunoglobulin synthesis and total body tumor cell number in IgG multiple myeloma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 49, n. 6, p. 1114-1121, 1970.

SAPHIRE, E. O.; PARREN, P. W. H. I.; PANTOPHLET, R.; ZWICK, M. B.; MORRIS, G. M.; RUDD, P. M.; DWEK, R. A.; STANFIELD, R. L.; BURTON, D. R.; WILSON, I. A. Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1155-1159, 2001.

SCOTT, C. F. Mechanism of the participation of the contact system in the Vroman effect. Review and summary. **Journal Biomater Sci Polym Ed**, v. 2, n. 3, p. 173-81, 1991.

SEFTEL, E. M.; POPOVICI, E.; MERTENS, M.; WITTE, K. D.; TENDELOO, G. V.; COOL, P.; VANSANT, E. F. Zn–Al layered double hydroxides: Synthesis, characterization and photocatalytic application. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 113, n. 1–3, p. 296-304, 2008.

SONG, S. W.; HIDAJAT, K.; KAWI, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: Influence of surface properties on matrix-drug interactions. **Langmuir**, v. 21, n. 21, p. 9568-9575, 2005.

STAAK, C.; SALCHOW, F.; CLAUSEN, P. H.; LUGE, E. Polystyrene as an affinity chromatography matrix for the purification of antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 194, n. 2, p. 141-146, 1996.

STEINEBACH, F.; ANGARITA, M.; KARST, D. J.; MÜLLER-SPÄTH, T.; MORBIDELLI, M. Model based adaptive control of a continuous capture process for monoclonal antibodies production. **Journal of Chromatography A**, v. 1444, p. 50-56, 2016.

STERI, D.; MONDUZZI, M.; SALIS, A. Ionic strength affects lysozyme adsorption and release from SBA-15 mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 170, p. 164-172, 2013.

STRÖHLEIN, G.; AUMANN, L.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. A continuous, counter-current multi-column chromatographic process incorporating modifier gradients for ternary separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, n. 1-2, p. 338-346, 2006.

UN, Y., ZHOU, Y.; WANG, Z.; YE, X. Structural and morphological transformations of Zn-Al layered double hydroxides through hydrothermal treatment. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 12, p. 6372-6377, 2009.

SWAIN, S. K.; SARKAR, D. Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 286, n. 0, p. 99-103, 2013.

TAN, Y. H.; LIU, M.; NOLTING, B.; GO, J. G.; GERVAY-HAGUE, J.; LIU, G.-Y. A Nanoengineering Approach for Investigation and Regulation of Protein Immobilization. **ACS Nano**, v. 2, n. 11, p. 2374-2384, 2008.

TANG, Y.; ZONG, E.; WAN, H., XU, Z.; ZHENG, S.; ZHU, D. Zirconia functionalized SBA-15 as effective adsorbent for phosphate removal. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 155, p. 192-200, 2012.

TARASEVICH, Y. I. Interaction of globular albumins with the silica surface. **Theoretical and Experimental Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 98-102, 2001.

TORRES, M. A.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Characterization of chemically modified chitosan microspheres as adsorbents using standard Proteins (bovine serum albumin and lysozyme). **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 325-336, 2007.

TRAVIS, J.; BOWEN, J.; TEWKSBURY, D.; JOHNSON, D.; PANNELL, R. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. **Biochemical Journal**, v. 157, n. 2, p. 301-6, 1976.

VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C. M. **Chemical biology: More charges against aggregation**. England, Nature, v.449, p.555, 2007.

VERDOLIVA, A.; PANNONE, F.; ROSSI, M.; CATELLO, S.; MANFREDI, V. Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G. **Journal Immunol Methods**, v. 271, n. 1-2, p. 77-88, 2002.

VILARRASA-GARCÍA, E.; CECILIA, J. A.; SANTOS, S. M. L.; CAVALCANTE JR, C. L.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, J.; AZEVEDO, D. C. S.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E. CO₂ adsorption on APTES functionalized mesocellular foams obtained from mesoporous silicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 187, p. 125-134, 2014.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 71-76, 1989.

VOITL, A.; MÜLLER-SPÄTH, T.; MORBIDELLI, M. Application of mixed mode resins for the purification of antibodies. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 37, p. 5753-5760, 2010.

VROMAN, L.; ADAMS, A. L. Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. **Surface Science**, v. 16, p. 438-446, 1969a.

VROMAN, L.; ADAMS, A. L. Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces. **J Biomed Mater Res**, v. 3, n. 1, p. 43-67, 1969b.

WANG, J.; GE, H.; BAO, W. Synthesis and characteristics of SBA-15 with thick pore wall and high hydrothermal stability. **Materials Letters**, v. 145, p. 312-315, 2015.

WANG, X.; LIN, K. S. K.; CHAN, J. C. C.; CHENG, S. Direct Synthesis and Catalytic Applications of Ordered Large Pore Aminopropyl-Functionalized SBA-15 Mesoporous Materials. **Journal Physical Chemistry B**, v. 109, p. 1763-1769, 2005.

WASHMON-KRIEL, L.; JIMENEZ, V. L.; BALKUS JR, K. J. Cytochrome c immobilization into mesoporous molecular sieves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 5, p. 453-469, 2000.

WONGCHUPHAN, R.; TEY, B. T.; TAN, W. S.; TAIP, F. S.; KAMAL, S. M. M.; LING, T. C. Application of dye-ligands affinity adsorbent in capturing of rabbit immunoglobulin G. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 232-238, 2009.

WU, F.; ZHU, Y.; JIA, Z. Preparation of dye-ligand affinity chromatographic packings based on monodisperse poly (glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) beads and their chromatographic properties. **Journal of chromatography. A**. 1134: 45-50 p. 2006.

XI, F.; WU, J. Macroporous chitosan layer coated on non-porous silica gel as a support for metal chelate affinity chromatographic adsorbent. **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1-2, p. 41-47, 2004.

XUE, A.; Zhao, W.; Liu, X., Y. Affinity chromatography of human IgG with octapeptide ligands identified from eleven peptide-ligand candidates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 107, p. 18-25, 2016.

YANG, H.; GURGEL, P. V.; CARBONELL, R. G. Hexamer peptide affinity resins that bind the Fc region of human immunoglobulin G. **The Journal of Peptide Research**, v. 66, p. 120-137, 2005.

YANG, H.; GURGEL, P. V.; CARBONELL, R. G. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 6, p. 910-918, 2009.

YASMIN, T.; MÜLLER, K. Synthesis and characterization of surface modified SBA-15 silica materials and their application in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6464-6475, 2011.

YAVUZ, H.; AKGOL, S.; SAY, R.; DENIZLI, A. Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads. **International Journal Biological**, v. 39, n. 4-5, p. 303-9, 2006.

YOKOYAMA, T.; MURAI, K.; MUROZUKA, T.; WAKISAKA, A.; TANIFUJI, M.; FUJII, N.; TOMONO, T. Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration. **Vox Sang**, v. 86, n. 4, p. 225-9, 2004.

YU, Y.; SUN, Y. Macroporous poly(glycidyl methacrylate–triallyl isocyanurate–divinylbenzene) matrix as an anion-exchange resin for protein adsorption. **Journal of Chromatography A**, v. 855, n. 1, p. 129-136, 1999..

ZAGHOUANE-BOUDIAF, H.; BOUTAHALA, M.; ARAB, L. Removal of methyl orange from aqueous solution by uncalcined and calcined MgNiAl layered double hydroxides (LDHs). **Chemical Engineering Journal**, v. 187, n. 0, p. 142-149, 2012.

ZHANG, F.; YANG, H.; YANMENG, Y.; YU, C.; TU, B.; ZHAO, D. Understanding Effect of Wall Structure on the Hydrothermal Stability of Mesoporous Silica SBA-15. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 18, p. 8723-8732, 2005.

ZHANG, M.; SUN, Y. Poly(glycidyl methacrylate–divinylbenzene–triallylisocyanurate) continuous-bed protein chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 31-38, 2001.

ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G. H.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 548-552, 1998.

ZHAO, J.; GAO, F.; FU, Y.; JIN, W.; YANG, P.; ZHAO, D. Biomolecule separation using large pore mesoporous SBA-15 as a substrate in high performance liquid chromatography. **Chemical Communications**, n. 7, p. 752-753, 2002.

ZHAO, W.; GU, J.; ZHANG, L.; CHEN, H.; SHI, J. Fabrication of uniform magnetic nanocomposite spheres with a magnetic core/mesoporous silica shell structure. **Journal of the American Chemical Society**, p. 8916-8917, 2005.

ZHAO, W.-W.; LIU, F.-F.; SHI, Q.-H.; DONG, X.-Y.; SUN, Y. Biomimetic design of affinity peptide ligands for human IgG based on protein A-IgG complex. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 1-11, 2014a.

ZHAO, W.-W.; LIU, F.-F.; SHI, Q.-H.; SUN, Y. Octapeptide-based affinity chromatography of human immunoglobulin G: Comparisons of three different ligands. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 100-111, 2014b.

ZHAO, W.-W.; SHI, Q.-H.; SUN, Y. FYWHCLDE-based affinity chromatography of IgG: Effect of ligand density and purifications of human IgG and monoclonal antibody. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 107-114, 2014c.

ZHU, Y.; KASKEL, S.; IKOMA, T.; HANAGATA, N. Magnetic SBA-15/poly(N-isopropylacrylamide) composite: Preparation, characterization and temperature-responsive drug release property. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 123, n. 1-3, p. 107-112, 2009.

ZOU, B. *et al.* Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 1, p. 150-153, 2010.