



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

DIEGO ROMÃO GONDIM

QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADO COM CORANTES IMOBILIZADOS
COMO POTENCIAL FASE ESTACIONÁRIA PARA PURIFICAÇÃO DE IgG DO
SORO HUMANO

FORTALEZA – CE

2012

DIEGO ROMÃO GONDIM

**QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADO COM CORANTES IMOBILIZADOS
COMO POTENCIAL FASE ESTACIONÁRIA PARA PURIFICAÇÃO DE IgG DO
SORO HUMANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano

FORTALEZA – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

-
- G635q Gondim, Diego Romão.
 Quitosana/alginato epoxilado com corantes imobilizados como potencial fase estacionária para purificação de IgG do soro humano. / Diego Romão Gondim – 2012.
 100 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2012.
 Área de Concentração: Processos químicos e bioquímicos.
 Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.
 Coorientação: Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano.
1. Engenharia química. 2. Imunoglobulinas. 3. Análise Cromatográfica. I. Título.

DIEGO ROMÃO GONDIM

QUITOSANA/ALGINATO EPOXILADO COM CORANTES IMOBILIZADOS COMO
POTENCIAL FASE ESTACIONÁRIA PARA PURIFICAÇÃO DE IgG DO SORO
HUMANO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química, do Centro de Tecnologia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química. Área de Concentração:
Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em 27/ 07/2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ivanildo Jose da Silva Jr. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano (Coorientador)
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



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



Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura
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 este título.

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

Ao 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.

Ao prof. Dr. Wellington Sabino Adriano, por ter aceitado esse desafio em trabalhar nessa linha de pesquisa que não tínhamos certeza se obteríamos bons resultados.

Ao prof. Dr. Igor Tadeu Lazzaroto Bresolin, que participou intensamente em todas as etapas desse trabalho. Sempre com suas importantes opiniões sobre o assunto.

A minha amiga do GpBio, Cristiane, que em muitas vezes dedicou parte do seu tempo e de sua experiência nessa área de pesquisa e me ajudou inúmeras vezes.

Aos meus amigos da turma do mestrado, Adriano, Eurânio, Flávio, Carol, Ana Cristina, Anne Kamilly, Alaídes, Ana Alice, Leandro e Ronnes.

Aos colegas de IC do laboratório LP1, em especial a Bruninha, que me ajudou muito. A Luana, por ter sido minha bolsista. Aos colegas de Pós do LP1, em especial, ao Eurânio grande amigo que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto durante esse final de mestrado. A Sandrinha que é a alegria desse laboratório.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

As imunoglobulinas são proteínas do soro humano que despertam maior interesse em sua utilização devido às inúmeras funções diagnósticas e terapêuticas. Pesquisas nessa área contemplam assuntos de âmbito técnico científico, beneficiando setores carentes no nosso país no quesito da saúde humana. Nesse contexto, o presente trabalho teve por finalidade avaliar o potencial da matriz quitosana/alginato epoxilado (QAE) com corantes reativos imobilizados, na purificação de IgG humana utilizando a técnica por cromatografia de afinidade. Os corantes Cibacron Blue F3GA, Reativo Verde 5 (Procion HE-4G) e o Reativo Azul 4 (Procion Blue MX-R) foram imobilizados nas partículas de quitosana/alginato epoxilada e não foi observado desprendimentos desses corantes nos ensaios cromatográficos. A matriz de QAE com e sem corantes imobilizados foram caracterizados por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) visando verificar os grupos específicos dos corantes na superfície da matriz. Foi investigado a influência do tipo de tampão e pH na adsorção de IgG de alta pureza. Os materiais apresentaram elevada capacidade de adsorção para diferentes sistemas tamponantes: MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfônico), MES (4 – ácido morfolinoetanosulfônico) e FS (Fosfato de Sódio). As isotermas de adsorção foram obtidas em sistemas em batelada e os dados experimentais foram bem correlacionados pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich. O adsorvente quitosana/alginato epoxilado com corante Reativo Azul 4 imobilizado apresentou quantidade máxima de adsorção de IgG superior a 180 mg/g, superando os outros materiais. Os três adsorventes apresentaram constantes de dissociação (K_D e K_{DLF}) entre 10^{-5} e 10^{-6} mol/L. Os ensaios cromatográficos foram realizados com IgG de alta pureza e soro humano diluído 10 vezes e realizaram-se balanços de massas, análises de eletroforeses e quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford. Nos ensaios em leito fixo com soro humano necessitou-se de 15,0 mL de soro diluído para a saturação do leito e as amostras coletadas das frações cromatográficas indicaram a purificação de IgG do soro humano através da eletroforese. Entre os três ligantes pseudobiespecíficos (corantes) estudados no presente trabalho, o corante Cibacron Blue F3GA apresentou maior potencial para purificar IgG do soro humano em todos os três tampões analisados, devido a maior seletividade deste por IgG comparado aos demais corantes imobilizados.

Palavras chave: Cromatografia, Quitosana, Corantes, Imunoglobulinas, Soro Humano

ABSTRACT

Immunoglobulins are proteins of human serum that have larger interest in their use because of the numerous diagnostics and therapeutic functions. Researches in this area include the technical scientific issues, benefiting underprivileged sectors in our country in the question of human health. In this context, the present work was to evaluate the potential of matrix chitosan/alginate epoxylated (QAE) with immobilized reactive dyes, on purification of human IgG by chromatography affinity. Cibacron Blue F3GA, Reactive Green 5 (Procion H-4G) and Reactive Blue 4 (Procion Blue MX-R) dyes were immobilized on chitosan/alginate epoxylated particles and was not observed detachments of dyes in chromatography essays. The matrixes QAE with and without immobilized dyes were characterized by *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) in order to observe the specific dyes groups on matrix surface. The influences of buffer systems was investigated such as pH on IgG adsorption. The adsorbents showed high adsorption capacity with different buffer systems: MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid), HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), MES (4-Morpholineethanesulfonic acid) and FS (sodium phosphate). The adsorption isotherms were obtained in bath systems and experimental data were well fitted by Langmuir and Langmuir-Freundlich. The matrix with reactive blue dye immobilized showed a maximum IgG adsorption than 180 mg/g, overcoming other adsorbents. The three adsorbents analyzed showed dissociation constants (K_D and K_{DLF}) between 10^{-5} and 10^{-6} mol/L. Fixed bed experiments were performed with high purity IgG and human serum diluted 10 times and was performed mass balances, electrophoresis analysis and total protein quantification by Bradford methods. It was necessary 15.0 mL of human serum diluted to saturate the column and the collected samples indicated purification of human IgG from human serum, by electrophoresis. Between three pseudobiespecífico ligand (dyes) studied in this work, the Cibacron Blue F3GA present a more potential to purified IgG from human serum diluted in all buffer solution, due to more selective this one for IgG than the others dyes immobilized.

Keywords: Chromatography, Chitosan, Dyes, Immunoglobulins, Human Serum

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da imunoglobulina G e seus fragmentos Fab e Fc.....	21
Figura 2. Princípio da cromatografia de afinidade.....	25
Figura 3. Estrutura química do corante Procion Brilliant Blue RS.....	27
Figura 4. Estrutura molecular do corante Reativo Vermelho 120.....	29
Figura 5. Estrutura molecular do corante Reativo marrom 10	30
Figura 6. Estrutura molecular do corante Reativo Verde 5.....	30
Figura 7. Estrutura molecular do corante Reativo Azul 4.....	31
Figura 8. Estrutura molecular do corante Reativo Cibacron Blue F3GA.....	32
Figura 9. Estrutura química da quitosana.....	34
Figura 10. Procedimento de preparação do compósito de quitosana/alginato epoxilado proposto por Fangkangwanwong, Yorksan e Chirachanchai (2006) adaptada por Adriano <i>et al.</i> (2008) com adição de alginato.....	38
Figura 11. Sistema de agitação rotatório.....	40
Figura 12. Sistema cromatográfico para ensaios de adsorção de proteínas por cromatografia de afinidade em leito fixo. Reservatório de alimentação (1), Bomba peristáltica (2), Coluna cromatográfica (3), Coletor de frações (4) e Espectrofotômetro (5).....	42
Figura 13. Coluna para ensaios cromatográficos (C 10/10 da Ge Healthcare) empacotada com esferas do adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Cibacron	

Blue F3GA imobilizado.....	43
Figura 14. Esquema ilustrativos indicando cada etapa do ensaio de adsorção/dessorção em leito fixo com QAE com corantes imobilizados.....	44
Figura 15. Adsorvente a base de quitosana/alginate epoxilado (a) e QAE com os corantes Cibacron Blue F3GA (b), Reativo Verde 5 (c) e Reativo Azul 4 (d) imobilizados.....	47
Figura 16. Espectros de QAE (a), QAEc (b) e Cibacron Blue F3GA (c).....	49
Figura 17. Espectros de QAE (a), Reativo Verde 5 (b) e QAEv (c).....	50
Figura 18. Espectros de QAE (a), QAEa (b) e Reativo Azul 4 (c).....	51
Figura 19. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão FS 25 mM (6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) para o QAEc, QAEa e QAEv.....	52
Figura 20. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão HEPES (6,8; 7,5 e 8,2) para os materiais QAEc, QAEa e QAEv.....	53
Figura 21. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão MOPS (6,5; 7,2 e 7,9) para o adsorvente com QAEc, QAEa e QAEv.....	54
Figura 22. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão MES (5,5; 6,1 e 6,7) para o adsorvente com QAEc, QAEa e QAEv.....	55
Figura 23. Isoterma de adsorção de IgG para o adsorvente QAEc ajustadas pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich com os tampões FS (a), MOPS (b) e HEPES (c).....	58
Figura 24. Isoterma de adsorção de IgG para o adsorvente QAEv ajustadas pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich com os tampões FS (a), MOPS (b) e	

HEPES (c).....	61
----------------	----

Figura 25. Isoterma de adsorção de IgG para o adsorvente QAEa ajustadas pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich com os tampões FS (a), MOPS (b) e HEPES (c).....	65
---	----

Figura 26. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,7) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de IgG com QAEc. Condições: Vazão de 0,8 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.....	69
---	----

Figura 27. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de IgG com QAEv. Condições: Vazão de 0,8 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.....	71
---	----

Figura 28. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de IgG com QAEa. Condições: Vazão de 0,8 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.....	73
---	----

Figura 29. Perfil da concentração de proteínas totais em função do tempo de ensaio com os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa com soro humano (15,0 mL) diluído 10 vezes em tampão MOPS pH 6,5. As etapas dos ensaios foram: Injeção (I), Lavagem (L), Eluição (E) e Regeneração (R).....	75
--	----

Figura 30. Eletroforeses das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão FS 25 mM com os adsorvenntes QAEc(a), QAEv(b), QAEa(c): Indicador de peso molar (PM), injeção (15,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG).....	77
--	----

Figura 31. Perfil da concentração de proteínas totais em função do tempo de ensaio com os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa com soro humano (15,0 mL) diluído 10 vezes em tampão MOPS pH 6,5. As etapas dos ensaios foram: Injeção (I), Lavagem (L), Eluição (E) e Regeneração (R).....	79
--	----

Figura 32. Eletroforese das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão MOPS 25 mM com os adsorvenntes QAEc(1), QAEv(2), QAEa(3): Indicador de peso molar (PM), injeção (15,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG)..... **80**

Figura 33. Perfil da concentração de proteínas totais em função do tempo de ensaio com o adsorvente QAEc, QAEv e QAEa e soro humano (15,0 mL) diluído 10 vezes em tampão HEPES pH 6,8. As etapas dos ensaios foram: Injeção (I), Lavagem (L), Eluição (E) e Regeneração (R)..... **82**

Figura 34. Eletroforese das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão HEPES 25 mM com os adsorventes QAEc(1), QAEv(2), QAEa(3): Indicador de peso molar (PM), injeção (15,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG)..... **83**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos relatados na literatura em purificação de enzimas e proteínas com corantes imobilizados em matrizes diversas.....	28
Tabela 2. Resultados de maiores quantidade adsorvidas de IgG no pH ideal para cada tampão.....	56
Tabela 3. Parâmetros encontrados pelo modelo de Langmuir ajustados aos dados experimentais com o adsorvente QAEc nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (6,8) à temperatura de 22 °C.....	60
Tabela 4. Parâmetros encontrados pelo modelo de Langmuir ajustados aos dados experimentais com o adsorvente QAEv nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (6,8) à temperatura de 22 °C.....	64
Tabela 5. Parâmetros encontrados pelo modelo de Langmuir ajustados aos dados experimentais com o adsorvente QAEa nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (6,8) à temperatura de 22 °C.....	67
Tabela 6. Balanço de massa de IgG na coluna com QAEc obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões fosfato de sódio, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).....	70
Tabela 7. Balanço de massa de IgG na coluna com QAEv obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões fosfato de sódio, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).....	72
Tabela 8. Balanço de massa de IgG na coluna com QAEa obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões fosfato de sódio, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de	

proteínas recuperadas (REC).....	74
----------------------------------	----

Tabela 9. Balanço de massa na coluna com QAEc, QAEv e QAEa nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão MOPS 25 mM e pH 6,5 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).....	78
---	----

Tabela 10. Balanço de massa na coluna com QAEc, QAEv e QAEa nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão MOPS 25 mM e pH 6,5 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).....	81
--	----

Tabela 11. Balanço de massa na coluna com QAEc, QAEv e QAEa nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão MOPS 25 mM e pH 6,5 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).....	84
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de Soro Bovino)
FS	Fosfato de Sódio
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazino-N'-2-Etanossulfônico
HSA	Human Serum Albumin (Albumina de Soro Humano)
IgG	Imunoglobulinas do Isotipo G
MES	Ácido Morfolinoetanossulfônico
MOPS	Ácido Morfolinopropanossulfônico
PT	Proteína Total (mg) no balanço de massa em leito fixo
pI	Ponto Isoelétrico
QAE	Quitossana/Alginato Epoxilado
QAEa	Quitossana/Alginato Epoxilado imobilizado com corante Reativo Azul 4
QAEc	Quitossana/Alginato Epoxilado imobilizado com corante Cibacron Blue F3GA
QAEv	Quitossana/Alginato Epoxilado imobilizado com corante Reativo Verde 5
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SH	Soro Humano
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TWEEN	Monooleato de Sorbitan Etoxilado 20 EO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Imunoglobulinas	20
2.2 Técnicas de purificação de IgG	23
2.2.1 Precipitação por etanol à frio (método de Cohn)	23
2.2.2 Cromatografia Negativa	23
2.2.3 Cromatografia por afinidade	24
2.3 Corantes Reativos	26
2.4 Quitosana	33
2.5 Alginato de Sódio	35
2.6 Imobilização de corantes	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Materiais	37
3.1.1 Reagentes	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Preparação do compósito quitosana/alginato epoxilado	37
3.2.2 Procedimento de imobilização dos corantes: Cibacron Blue F3GA, Reativo Azul 4 e Reativo Verde 5	39
3.2.3 Caracterização dos adsorventes por FTIR	39
3.2.4 Ensaio em batelada	40
3.2.4.1 Estudo do efeito do pH na adsorção de proteínas	40
3.2.4.2 Isotermas de adsorção	41
3.2.5 Ensaio em leito fixo	42
3.2.5.1 Ensaio com IgG e Soro Humano (SH)	43
3.2.5.2 Determinação de proteínas totais	44
3.2.5.3 Eletrofose (SDS-PAGE)	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Preparação e caracterização dos adsorventes	46
4.1.1 Caracterização dos adsorventes por Espectroscopia de Infravermelho (<i>Fourier Transform Infrared</i> – FTIR)	47
4.2 Ensaio de adsorção em tanque agitado	51

4.2.1 Efeito da natureza do tampão e do pH na adsorção de IgG	51
4.2.2 Isotermas de adsorção	56
4.2.2.1 Isoterma de IgG com o adsorvente QAEc	57
4.2.2.2 Isoterma de IgG com o adsorvente QAEv	61
4.2.2.3 Isoterma de IgG com o adsorvente QAEa	65
4.3 Ensaios em leito fixo com a proteína IgG de alta pureza	68
4.3.1 Ensaios com IgG e o adsorvente QAEc	68
4.3.2 Ensaios com IgG e o adsorvente QAEc	70
4.3.3 Ensaios com IgG e o adsorvente QAEa	72
4.4 Ensaios em leito fixo com Soro Humano (SH)	74
4.4.1 Ensaios em leito fixo com FS 25 mM	75
4.4.2 Ensaios em leito fixo com MOPS 25 mM	79
4.4.3 Ensaios em leito fixo com HEPES 25 mM	81
5 CONCLUSÕES	84
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	98

1 INTRODUÇÃO

A produção de hemoderivados pelo fracionamento do plasma humano pelo sistema de precipitação do plasma com etanol teve início nos Estados Unidos na década de 40, (HEMODERIVADOS, 2006). Essa técnica foi desenvolvida pelo químico norte americano Edwin Joseph Cohn e colaboradores (COHN *et al.*, 1946) apresentando como produto principal, um concentrado rico em albumina. A partir daí, diversas empresas norte americanas começaram a produzir albumina pelo método de Cohn.

Na década de 70, surgiu a possibilidade da obtenção de um concentrado essencial na coagulação sanguínea, denominado Fator VIII, purificado a partir do plasma humano. Este produto e os concentrados de fatores de coagulação dependentes da vitamina K, ao qual se inclui o Fator IX, foram importantes para o tratamento de pacientes hemofílicos. Contudo, na década de 80, com o surgimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi constatado que muitos desses pacientes hemofílicos começaram a ser contaminados em transfusões de sangue. Por isso, as indústrias de hemoderivados, já bem numerosas nos EUA e na Europa passaram a implantar métodos para inativação viral destes hemoderivados (HEMODERIVADOS, 2006).

No mundo, estima-se que 50 milhões de litros de plasma humano são coletados para fracionamento, dos quais a albumina do soro humano, os fatores VIII e IX e as imunoglobulinas são os principais produtos extraídos (SCHÄRER, 2010).

No século XXI, as imunoglobulinas assumem o papel preponderante dentre todos os hemoderivados, transformando o Fator VIII e a albumina quase que em subprodutos do fracionamento do plasma. Desta forma, os estudos na purificação das imunoglobulinas aumentaram de maneira significativa nas indústrias de processamento de plasma humano (HEMODERIVADOS, 2006 e SOUZA, 2009). Apesar de desatualizado, mas a título de informação, no ano de 2003, o mercado mundial de hemoderivados faturou o correspondente a 8 bilhões de dólares, sendo 28% correspondendo às imunoglobulinas (HAHN, 2004; HEMODERIVADOS, 2006).

A dependência atual do Brasil com os hemoderivados gira em torno de 25,5 ton em albumina, 8,5 ton de imunoglobulinas e 782 milhões de UI para os fatores VIII e IX. E apenas a planta piloto HEMOPE, localizada em Recife, abastece o país com a produção

exclusiva de albumina. Essa produção atende somente 6 % da demanda nacional por albumina (HEMODERIVADOS, 2006).

Este cenário tende a mudar no Brasil com a criação de plantas industriais no Instituto Butantan e da Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRAS). A HEMOBRAS é uma estatal vinculada ao Ministério da Saúde, criada pela Lei 10.972, de 02/12/2004, com finalidade em diminuir a dependência de importação dos hemoderivados. A previsão para início de funcionamento desta estatal é em 2014 e terá capacidade para processar 500 mil litros de plasma por ano (HEMODERIVADOS, 2006). Já no Instituto Butantan (São Paulo/SP), há uma planta-piloto em operação e outra de maior escala está sendo construída pelo Governo do Estado de São Paulo com investimentos de R\$ 60 milhões em uma área total de 10000 m² para processar 150 mil litros de plasma anualmente (JINZENJI, 2008).

As imunoglobulinas, dentre todos os hemoderivados, vem tendo a maior utilização em todo o mundo com um consumo *per capita* de 70 g por mil habitantes em países como Canadá e EUA (BURNOUNF E RADOSEVICH, 2001; HEMODERIVADOS, 2006). As imunoglobulinas possuem quatro classes (IgA, IgD, IgE, IgM e IgG) com funções específicas. E as IgG's são indicadas para o tratamento de imunodeficiências congênitas ou adquiridas, em doenças infecciosas, deficiências seletivas de anticorpos e no tratamento de alguns tipos de câncer, necessitando assim de IgG com alto grau de pureza (BURNOUNF; RADOSEVICH, 2001 e SOUZA, 2009)

As imunoglobulinas, produtos de alto valor medicinal, podem ser fracionadas ou purificadas a partir do soro humano por técnicas cromatográficas, como por exemplo, cromatografia de afinidade e negativa, interações hidrofóbicas e por troca iônica.

A técnica conhecida por cromatografia de afinidade é essencialmente um método cromatográfico que explora o reconhecimento entre um ligante imobilizado e a molécula a ser separada (VIJAYALAKSHMI, 1989). E é considerada uma das técnicas de maior importância na recuperação e purificação de proteínas e vem sendo bastante estudada nessas últimas décadas (DENIZLI; PIŞKIN, 2001; OZKARA *et al.*, 2004; WU; ZHU; JIA, 2006; YAVUZ *et al.*, 2006).

A cromatografia de afinidade com ligantes imobilizados tem sido empregada como uma alternativa ao método de Cohn. Os ligantes podem ser bioespecíficos, tais como as proteínas A, G e L, e que possuem elevada afinidade por domínios específicos da IgG. Ou utilizam-se os ligantes pseudobioespecíficos (metais quelatados, ligantes tiofílicos, corantes,

aminoácidos) que apresentam baixa afinidade para as proteínas do soro e, portanto, tem se mostrado seletivos para a purificação de IgG e HSA do soro ou plasma humano (BRESOLIN; SOUZA; BUENO, 2010). A desvantagem dos ligantes bioespecíficos se deve as drásticas condições necessárias na etapa da dessorção e aos elevados custos. Enquanto que os ligantes pseudobioespecíficos, além de apresentar baixo valor comercial, proporcionam considerável afinidade por proteínas.

No Brasil não existem muitos estudos dedicados a purificação de anticorpos, especialmente as IgG's. O único grupo de pesquisa que tem apresentado contribuição relevante sobre esse tema é o grupo da profa. Dra Sônia Maria Alves Bueno da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Esse grupo trabalha com processos de purificação de biomoléculas, especificamente o caso das imunoglobulinas, empregando a técnica de cromatografia de afinidade com aminas e íons metálicos imobilizadas em geis de agarose e, mais recentemente, a cromatografia negativa (BRESOLIN, SOUZA e BUENO, 2010; SOUZA, BRESOLIN e BUENO, 2010).

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. Na literatura especializada são encontrados diversos trabalhos que utilizam resinas comerciais (por exemplo, resinas da classe *Streamline* da GE Healthcare) e esferas magnéticas de diversos metacrilatos (Aldrich), bem como géis a base de agarose (Sigma).

Matrizes à base de quitosana podem vir a ser uma alternativa devido a sua disponibilidade e facilidade de obtenção, entretanto são escassos os trabalhos empregando materiais a base de quitosana visando a purificação de IgG. Zeng e Ruckenstein (1996) e Ruckenstein e Zeng (1998) reportaram a utilização de membranas de quitosana com o corante Cibacron Blue F3GA imobilizado para purificação de proteínas por cromatografia de afinidade. Entretanto, não há registros na literatura visando a utilização deste material para purificação de IgG.

Recentemente, Rodrigues (2010) relatou o uso do adsorvente à base de quitosana/alginato modificada quimicamente na adsorção de BSA e celulase em sistema de leito fixo. Este autor verificou que o compósito de quitosana/alginato epoxilado mostrou ser capaz de adsorver estas biomoléculas com capacidade de adsorção moderada, quando comparado com materiais similares, além de boa estabilidade mecânica e química e regenerabilidade.

Pesquisas nessa área contemplam assuntos de âmbito técnico científico, beneficiando setores carentes no nosso país no quesito da saúde humana. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi averiguar a capacidade do compósito quitosana/alginato epoxilado (QAE) com corantes reativos imobilizados na purificação de IgG humana utilizando a técnica por cromatografia de afinidade.

Para atingir o objetivo proposto, este trabalho foi conduzido nas etapas descritas abaixo:

- Sintetize e caracterização do compósito quitosana/alginato epoxilado (QAE).
- Imobilização dos corantes Cibacron Blue F3GA, Reativo Verde 5 e Reativo Azul 4 ao compósito QAE.
- Avaliação da influência do pH dos tampões fosfato de sódio (FS), ácido morfolinoetanosulfônico (MES), ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) e ácido N-2-hidroxoetilpiperazino-N'-2-etanosulfônico (HEPES) na adsorção de IgG e HSA de alta pureza em sistema batelada.
- Obtenção das isotermas de adsorção em sistema em batelada
- Determinação da capacidade de adsorção do compósito QAE com os corantes Cibacron Blue F3GA, Reativo Verde 5 e Reativo Azul 4 imobilizados na adsorção das proteínas IgG e HSA no leito fixo em diferentes sistemas tamponantes (FS, MOPS, HEPES).
- Realização dos experimentos cromatográficos com o soro humano em leito fixo com o adsorvente QAE com corantes imobilizados, além de verificar pela eletroforese (SDS) a afinidade destes materiais em adsorver a proteína IgG.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

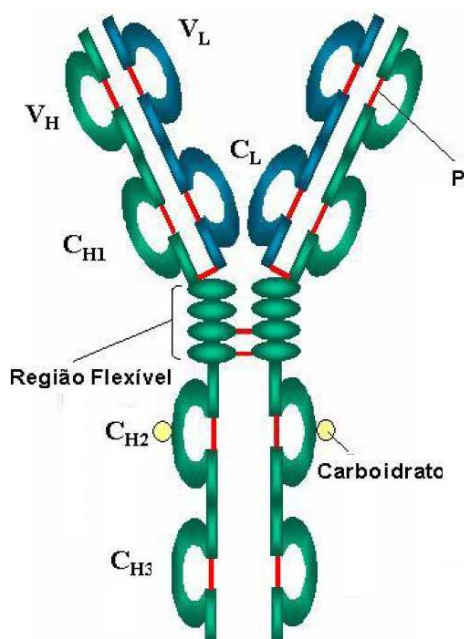
2.1 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas ou gamaglobulinas, presentes no sistema humano, são responsáveis diretas pela defesa imunológica do sistema sanguíneo, atuando no reconhecimento de antígenos (ROQUE *et al.*, 2004).

Todas as imunoglobulinas são compostas de 82 a 96% de proteínas e de 4 a 18% de carboidratos. As moléculas de imunoglobulinas (Figura 1) são formadas por uma estrutura

no formato de “Y” com quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas leves e duas pesadas, sempre em pares idênticos (ABBAS; LICHTMAN, 1994). Essas cadeias leves (massa molar de 25 kDa) e pesadas (massa molar entre 50 à 70 kDa) ficam ligadas através de ligações covalentes de dissulfeto e por interações não covalentes. As classes e subclasses das imunoglobulinas se diferenciam pelas cadeias pesadas, enquanto que as cadeias leves são comuns a todas (HOLT *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura da imunoglobulina G e seus fragmentos Fab e Fc.



FONTE: Penha (2007) com adaptações pelo autor

Nas moléculas das imunoglobulinas as cadeias leves podem ser do tipo kappa (κ) e lambda (λ) e diferem entre suas estruturas pelas seqüências de aminoácidos das regiões constantes carboxiterminal (ABBAS *et al.*, 2000). São formadas por dois domínios, um variável (V_L) e outro constante (C_L) (VLUG; VAN REMORTEL, 1989). Todos os anticorpos têm sempre duas cadeias leves idênticas κ ou duas cadeias idênticas λ (ABBAS *et al.*, 2000).

As cadeias pesadas têm variações em seus pesos moleculares e são designadas pelas letras do alfabeto grego, gama (γ), alfa (α), mu (μ), delta (δ) e épsilon (ϵ) (ABBAS *et al.*, 2000). Cada uma dessas letras faz referência a uma específica classe de imunoglobulinas, IgG (γ), IgM (μ), IgA (α), IgD (δ) e IgE (ϵ) (VLUG e VAN REMORTEL, 1989) e

diferenciam-se pelas funções biológicas, antigênicas e estruturais da cadeia pesada (ALBERTS *et al.*, 1997). As cadeias pesadas possuem uma parte variável (V_H) e três partes constantes C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} , sendo que as IgM e IgE possuem um domínio constante extra (C_{H4}) (ABBAS; LICHTMAN, 1994).

Devido todas as moléculas possuírem no mínimo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, as moléculas das imunoglobulinas apresentam pelo menos dois sítios de ligação de antígenos, sendo formada por um par de domínios V_H e V_L (ABBAS *et al.*, 2000).

As imunoglobulinas do isotipo M (IgM) possuem massa molar de 900 kDa e representam cerca de 10 % do total de imunoglobulinas presente no soro humano. Possui estrutura molecular pentamérica, compostas de cinco unidades básicas ligadas entre si pelos fragmentos Fc (WORDELL, 1991). Em recém nascidos a IgM é a primeira classe de anticorpo produzida.

A IgA possui massa molar de 160 kDa e representa cerca de 10 à 15 % das imunoglobulinas do soro humano. Apresenta em maior concentração em secreções externas, tais como saliva, lágrimas, leite materno, dentre outros. Tem como principal função proteger o organismo contra ataques de microorganismos na membrana mucosa e esta normalmente na forma de dímero (GOODMAN, 1991).

A IgD esta presente em concentrações muito baixas, representando menos de 1 %, e possui massa molar de 180 kDa. Não possuem função bem definida e alguns autores a consideram como uma proteína vestigial de um sistema imune primitivo (GOODMAN, 1991). A IgD funcionam como receptores para antígenos nas superfícies dos linfócitos B.

A IgE possui massa molar de 190 kDa, apresenta na forma de monômero e dentre todas as classes de imunoglobulinas é a que representa menor percentual, cerca de 0,002 % e podem estar associadas as reações alérgicas (GOODMAN, 1991).

A IgG apresenta também na forma de monômero e possui massa molar de 150 kDa. Representam entre 75 à 80 % das imunoglobulinas e são consideradas os principais mecanismos de resposta de defesa contra antígenos. As imunoglobulinas do isotipo G (IgG) são compostos por quatro subclasses IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ (YAVUZ *et al.*, 2006). São indicadas para o tratamento de câncer, doenças infecciosas, deficiência seletivas de anticorpos, requerendo normalmente grandes quantidades de IgG com alto grau de pureza (BURNOUNF; RADOSEVICH, 2001). Existem vários métodos para purificação de IgG, sendo principalmente por precipitação e técnicas cromatográficas incluindo troca iônica, interações hidrofóbicas, e afinidade (OZKARA *et al.*, 2004; YAVUZ *et al.*, 2006).

2.2 Técnicas de purificação de IgG

2.2.1 Precipitação por etanol à frio (método de Cohn)

Na década de 40, Edwin Joseph Cohn, um químico norte-americano, chamado Cohn, desenvolveu um sistema de precipitação do plasma humano pelo etanol. Por esse método conseguiam-se frações protéicas rica em albumina, muito úteis nessa época para o tratamento de hemorragias agudas (HEMODERIVADOS, 2006).

O método de precipitação por etanol a frio proposto por Cohn *et al.* (1949) é baseado na mudança da solubilidade das proteínas. As variáveis principais do processo são: concentração em etanol, pH, força iônica e temperatura. Através da combinação destas variáveis obtêm-se precipitados e sobrenadantes. É descartado o precipitado e a partir de sucessivas precipitações com etanol no sobrenadante conseguem-se frações ricas em fator VIII e IX, além de concentrados de IgG e albumina (COHN *et al.*, 1946, MARTIN, 2006; SOUZA, 2009).

As imunoglobulinas do isotipo G (IgG) e albuminas de soro humano (HSA) são importantes proteínas do plasma humano proporcionando muitas aplicações terapêuticas e medicinais. Ainda nos dias atuais, tanto IgG como HSA continuam sendo purificadas pelo plasma humano pelo procedimento clássico de fracionamento industrial do plasma humano pelo método de Cohn (COHN *et al.*, 1949).

O método de Cohn é uma técnica bem antiga e que tem como produto principal um concentrado rico em albumina. A albumina era considerada um produto estratégico devido ao tratamento imediato de hemorragias agudas. Entretanto, nos dias atuais as técnicas cromatográficas aparecem com elevado potencial para a purificação de proteínas devido à alta pureza obtida nas frações cromatográficas.

2.2.2 Cromatografia Negativa

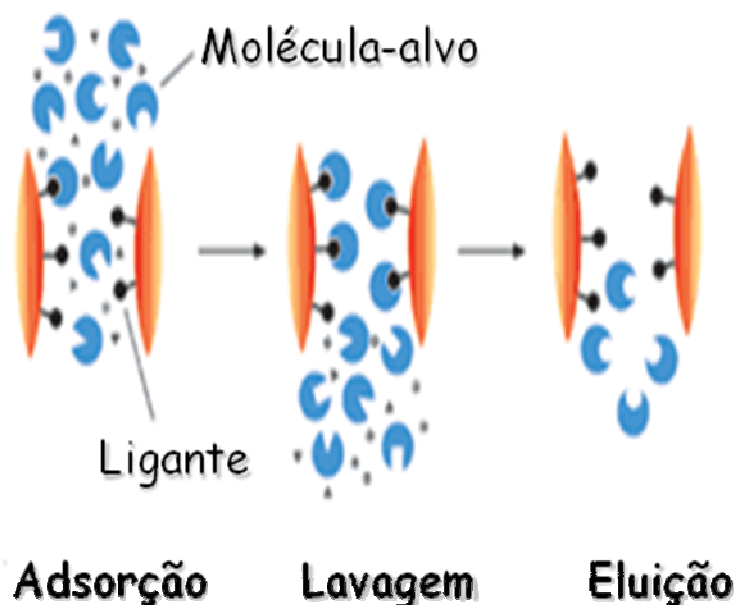
A cromatografia negativa se caracteriza pela adsorção das impurezas ou contaminantes pelo adsorvente e o produto de interesse é coletado nas frações das etapas de lavagem da coluna cromatográfica (SOUZA; BRESOLIN; BUENO, 2010).

Existem trabalhos na literatura em que utilizam esta técnica, pois apresenta a vantagem de baixo custo, menor contaminação da proteína alvo e é considerada de fácil escalonamento para purificação de IgG a partir do soro e plasma humano (SOUZA, 2009).

Souza, Bresolin e Bueno (2010) estudaram a purificação de IgG a partir do soro e plasma humano por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em geis de agarose ativada com CNBr e bisoxirano. Os autores obtiveram em uma única etapa, uma recuperação de 69-76 % da proteína IgG carregada nas frações não retidas para ambas as matrizes. O grau de pureza obtido foi superior para o gel ativado com bisoxirano. Estes autores mostraram que o ω -aminohexil-bisoxirano-agarose pode ser um adsorvente alternativo para purificar IgG humana.

2.2.3 Cromatografia por Afinidade

A cromatografia de afinidade é considerada um método bem estabelecido para identificação, purificação, e separação de macromoléculas (DENIZLI; PISKIN, 2001). Este método é baseado no reconhecimento molecular; a molécula com habilidade específica de reconhecimento (ligante) é imobilizada em um suporte insolúvel (matriz), no qual é usualmente um material polimérico na forma de esferas ou membrana. A molécula a ser isolada (analíto ou molécula-alvo) é capturada seletivamente pelo ligante imobilizado na matriz por uma simples passagem da solução contendo a molécula-alvo através do leito-fixado sob condições favoráveis. A molécula-alvo é eluída da coluna pela passagem de um eluente apropriado sob condições favoráveis a dessorção, pelo ajuste do pH ou da força iônica, utilizando solventes específicos ou ligantes livres competitivos, de modo que a interação entre o ligante e a molécula-alvo é rompida e a molécula-alvo é recuperada (Figura 2) (WU; ZHU; JIA, 2006; DENIZLI; PIŞKIN, 2001).

Figura 2. Princípio da cromatografia de afinidade

FONTE: Adaptada pelo autor.

A técnica cromatográfica por afinidade é essencialmente um método de adsorção a qual explora o reconhecimento entre o ligante imobilizado e a molécula a ser separada. A adsorção da proteína alvo para o ligante representa o primeiro passo para a separação, enquanto que a dessorção ou eluição representa o passo seguinte (VIJAYALAKSHMI, 1989). Essa técnica vem sendo aplicada desde o fim da década de 60 e é considerada a ferramenta mais poderosa para recuperação e purificação de enzimas e proteínas (WU; ZHU; JIA, 2006; DENIZLI; PIŞKIN, 2001).

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; PIŞKIN, 2001). Os ligantes bioespecíficos, apesar de amplamente utilizados na purificação de anticorpos devido a sua alta especificidade, possuem a desvantagem de terem custo elevado, baixa estabilidade e a possibilidade de desnaturação do ligante nas etapas de eluição e regeneração da coluna cromatográfica (DENIZLI; PIŞKIN, 2001; YAVUZ *et al.*, 2006).

Quando a IgG é a proteína de interesse (molécula-alvo), ligantes bioespecíficos tais como as proteínas A, G e L tem sido investigadas devido a sua elevada afinidade por domínios específicos da IgG. Por outro lado, ligantes pseudobioespecíficos (íon metálicos quelatados, ligantes tiofílicos, corantes, aminoácidos), podem apresentar uma baixa afinidade

para as proteínas do soro, e, portanto, tem se mostrado seletivo para a purificação de IgG e HSA do soro ou plasma humano (VIJAYALAKSHMI, 1989).

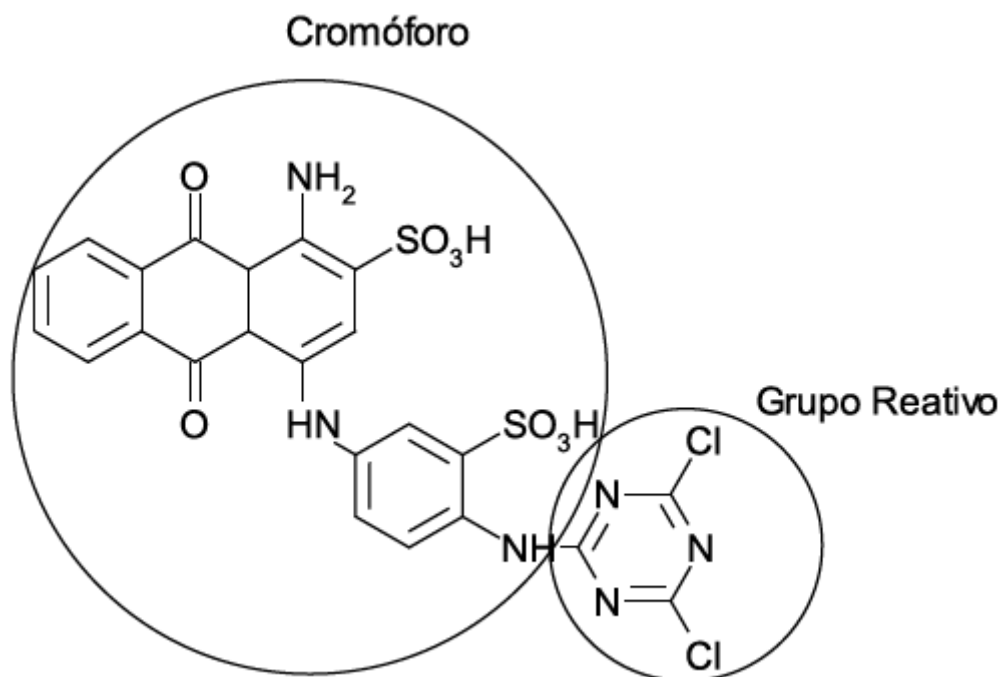
Os ligantes pseudobioespecíficos, utilizados em cromatografia de afinidade, apresentam a capacidade de se ligar às proteínas por meio de interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou de coordenação e vem sendo abordada na literatura e já é praticada em larga-escala (VIJAYALAKSHMI, 1989).

2.3 Corantes Reativos

Esses ligantes pseudobioespecíficos, em particular os corantes reativos, surgiram como opção aos ligantes bioespecíficos por serem moléculas de baixo custo, apresentar disponibilidade comercial e serem facilmente imobilizados principalmente em matrizes contendo grupo hidroxil. Além do fato de serem capazes de se ligar a diversos tipos de proteínas apresentando diferentes níveis de afinidade e especificidade (DENIZLI; PIŞKIN, 2001; YAVUZ *et al.*, 2006).

Existe uma variedade de corantes textéis, conhecidos como corantes reativos, aos quais têm sido utilizados como ligantes em cromatografia de afinidade para a purificação de proteínas (WONGCHUPLAN *et al.*, 2009 e; WU; ZHU; JIA, 2006; YAVUZ *et al.*, 2006), uma vez que eles se ligam a diversas proteínas de forma seletiva e reversível. A maioria dos corantes reativos utilizados nos sistemas de afinidade consiste de um cromóforo (corantes azo, antraquinona), ligado a um grupo reativo (normalmente um anel mono ou diclorotriazina) (DENIZLI; PIŞKIN, 2001). A Figura 3 apresenta a estrutura do Procion Brilliant Blue RS e neste exemplo, o grupo reativo é um anel di-clorotriazina e o cromóforo é constituído por um grupo antraquinona e um anel benzênico sulfonado.

Figura 3. Estrutura química do corante Procion Brilliant Blue RS.



Fonte: O próprio autor

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; PIŞKIN, 2001; YAVUZ *et al.*, 2006). Sob certas condições, todas as proteínas podem ser adsorvidas em matrizes com corantes imobilizados, o que significa que estes ligantes promovem numerosas oportunidades para outros tipos de interações com outras partes das proteínas. Entretanto, muitas proteínas se ligam de maneira não-específica por uma complexa combinação de interações eletrostática, hidrofóbica, ligações de hidrogênio, e transferência de carga, todas as quais são possíveis considerando a natureza estrutural dos corantes (DENIZLI; PIŞKIN, 2001).

A Tabela 1 apresenta alguns estudos em que foram utilizados corantes imobilizados para separação de enzimas e proteínas. Especificamente para os estudos citados na Tabela 1, no que se refere à purificação da IgG, os corantes imobilizados utilizados nestes trabalhos promoveram uma elevada capacidade de adsorção, variando de acordo com o tipo de corante e de matriz utilizada, como reportado por diversos autores (YAVUZ *et al.*, 2006,

BAYRAMOGLU; SENEL; ARICA, 2007a, WONGCHUPLAN *et al.*, 2009; WU; ZHU; JIA, 2006).

Tabela 1. Estudos relatados na literatura em purificação de enzimas e proteínas com corantes imobilizados em matrizes diversas.

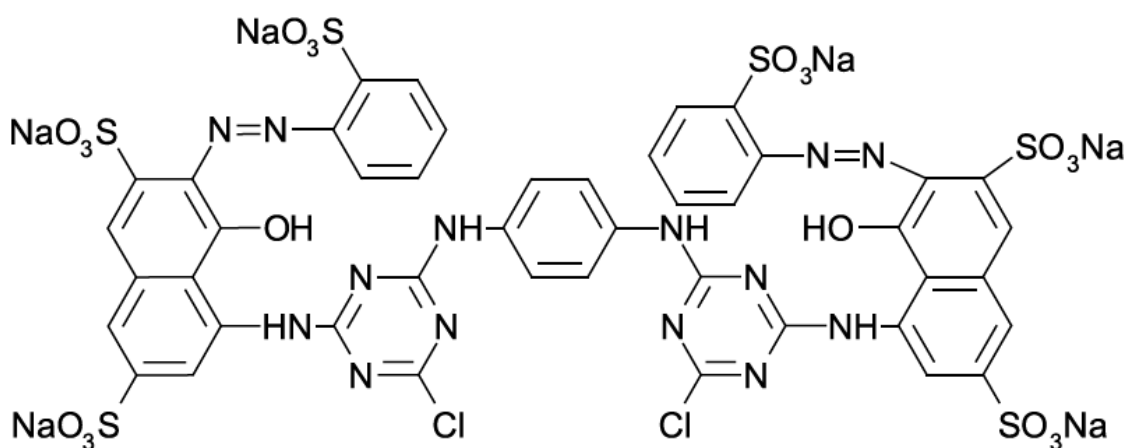
TIPO DE CORANTES	TIPO DE SUPORTE	ADSORBATO	REFERÊNCIA
Cibacron Blue F3GA	Membrana de quitosana	HSA	Zeng e Ruckenstein (1996)
Cibacron Blue F3GA, Procion Red HE-3B e Procion Blue MX-R	Membranas de quitosana e quitina	BSA e HSA	Ruckenstein e Zeng (1998)
Procion Blue MX-R	Esferas de poli(glicidilmetacrilato-co-etilenodimeacrilato)	Lisozima e BSA	Feyan <i>et al.</i> (2006)
Procion Red HE-3B e Procion 120	Membranas de poli (2-hidroxietil metacrilato)	HSA e IgG humana	Bayramoglu, Yaçin e Arica (2005)
Procion Green	Membranas de poli (2-hidroxietil metacrilato)	IgG humana	Bayramoglu, Oktem e Arica (2007b)
Procion Green H-4G, Procion Brow MX-5Br e Procion Red HE-3B	<i>Streamline</i> TM (matriz a base de agarose altamente reticulado contendo quartzo)	IgG de coelho	Wongchuphan <i>et al.</i> (2009)
Reactive Gree HE 4BD	Esferas de poli (hidropropil metacrilato)	IgG humana e suas subclasses	Yavuz <i>et al.</i> (2006)

Como exemplos de corantes empregados na cromatografia de afinidade, destacam-se o corante Reativo Vermelho 120 (Procion Red 120), corante Reativo Marrom 10 (Procion Brown 10), corante Reativo Verde 5 (Procion Green H-4G), corante Reativo Azul 4 (Procion Blue MXR) e o Cibacron Blue F3GA (WONGCHUPLAN *et al.*, 2009; WU, ZHU e JIA, 2006).

A estrutura dos corantes Reativos Vermelho 120, Marrom 10, Verde 5, Azul 4 e Cibacron Blue F3GA estão representadas nas Figuras 4 à 8. O corante Reativo Vermelho 120 (Figura 4) possui seis grupos ácidos sulfônicos, seis aminas secundárias, dois grupos hidroxilas, além de vários anéis aromáticos (BAYRAMOGLU; YAÇIN; ARICA, 2005).

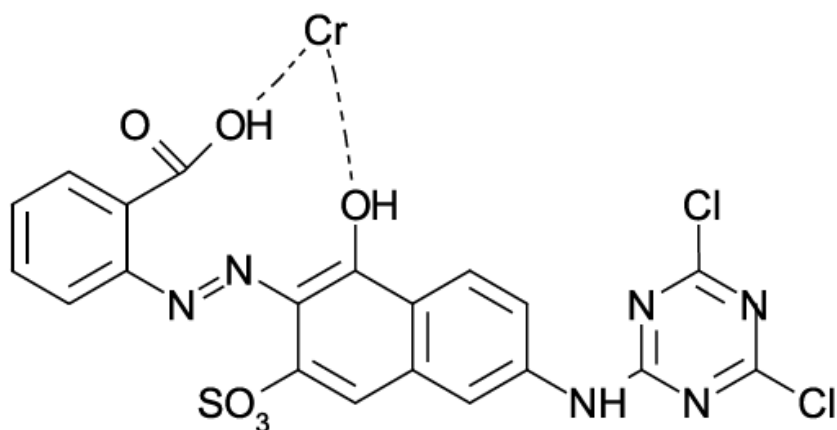
Wongchuphan *et al.* (2009) estudaram a purificação de IgG de coelho por cromatografia de afinidade em uma resina *Streamline* com os corantes Reativos Marrom 10, Vermelho 120 e Verde 5, além do Cibacron Blue F3GA imobilizados. A resina *Streamline* com o corante Reativo Verde 5 apresentou melhores resultados para adsorção de 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. Essa resina *Streamline* é uma linha de adsorventes aplicados para cromatografia de adsorção em leito expandido.

Figura 4. Estrutura molecular do corante Reativo Vermelho 120



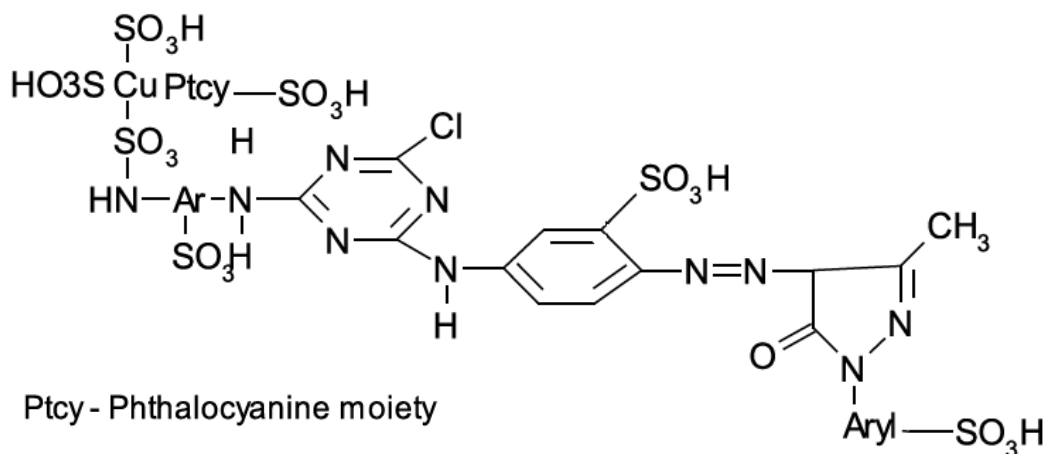
FONTE: O próprio autor

A Figura 5 apresenta o Reativo Marrom 10, a qual é considerado um corante triazina possuindo dois grupos ácidos (carboxílico e sulfônico) e dois grupos amina secundária, além de um grupo hidroxila e um íon quelatado de cromo (II).

Figura 5. Estrutura molecular do corante Reativo marrom 10

FONTE: O próprio autor

A Figura 6 mostra o Reativo Verde 5 a qual é também um exemplo de corante triazina possuindo sete grupos ácidos sulfônicos, três grupos de amina secundária, além do íon quelato de cobre (II). Este corante imobilizado em membranas foram estudados para adsorção de IgG de acordo com a literatura (BAYRAMOGLU; SENEL; ARICA, 2007a; WONGCHUPLAN *et al.*, 2009).

Figura 6. Estrutura molecular do corante Reativo Verde 5

FONTE: O próprio autor.

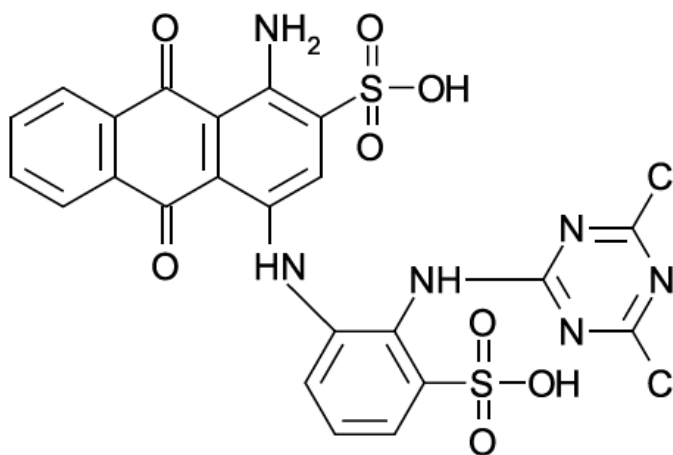
Bayramoglu, Oktem e Arica (2007b) utilizaram o Reativo Verde 5 imobilizado em membranas de poli (2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) e verificaram o aumento da quantidade adsorvida de de IgG em torno de 75 vezes superior ao adsorvente sem corante

imobilizado. Os autores afirmaram que o corante foi covalentemente imobilizado através de uma reação de substituição nucleofílica entre o grupo cloro da molécula do corante-ligante com o grupo hidroxila das membranas do pHEMA em condições alcalinas.

Yavuz *et al.* (2006) avaliaram a afinidade das subclasses de IgG em ensaios de adsorção com Reativo Verde HE 4BD imobilizado em esferas de poli (hidropropil metacrilato) (poliHPMA). Estes autores relataram que a adsorção de IgG aumentou de 0,5 mg/g (poliHPMA sem corante) para 71 mg/g (poliHPMA com Reativo Verde imobilizado) e que a quantidade de IgG₂ foi superior as demais subclasses. Foi também avaliado a capacidade deste adsorvente com corante imobilizado após 10 ciclos de adsorção-dessorção sendo verificado uma redução na capacidade de adsorção em torno de 11 % da quantidade adsorvida de IgG do primeiro ciclo.

O corante Reativo Azul 4 (Figura 7) é um corante triazina aromático e que contém os grupos ácidos sulfônico e carboxílico, além de uma hidroxila e dois grupos de amina secundárias.

Figura 7. Estrutura molecular do corante Reativo Azul 4.



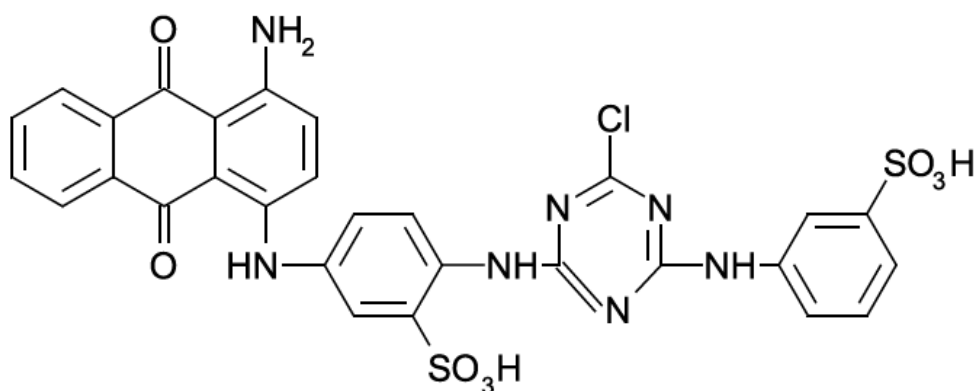
FONTE: O próprio autor

Wu, Zhu e Jia (2006) testaram partículas de polímeros (glicidilmetacrilato-etilenodimetacrilato) acrescidos de grupos epóxidos, advindos da epiclorigrina, com Reativo Azul 4 imobilizados nas superfícies dessas partículas para adsorção de proteínas. Os autores verificaram uma rápida adsorção, por afinidade, de lisozima e BSA, em torno de 10 min em colunas cromatográficas. Esses autores buscaram purificar lisozima de avos de galinha.

Cibacron Blue F3GA é um corante monoclorotriazina, e que contém três grupos de ácido sulfônico e quatro grupos aminas secundárias, de acordo com a Figura 8. A forte ligação do Cibacron Blue F3GA com as proteínas ocorre principalmente com os sítios de ligação para substratos, coenzimas e outros grupos protéticos (DENIZLI; DENIZLI; ARICA, 1999). A literatura relata que Cibacron Blue F3GA não tem nenhum efeito adverso sobre os sistemas bioquímicos (DENIZLI; DENIZLI; ARICA, 1999; ARICA; ALAEDDINOGLU; HASIRCI, 1995; GALAEV; GARG; MATTIASSON, 1994; LABROU; KARAGUNI; CLONIS, 1995).

Zeng e Ruckenstein (1996) utilizaram membranas de quitosana com o corante Cibacron Blue F3GA imobilizado para adsorção de HSA. Estes autores verificaram que a adsorção de HSA com a matriz e Cibacron Blue F3GA imobilizado no valor de 8,88 mg/cm³, enquanto que a matriz sem corante teve valor de 2,62 mg/g.

Figura 8. Estrutura molecular do corante Cibacron Blue F3GA



FONTE: O próprio autor

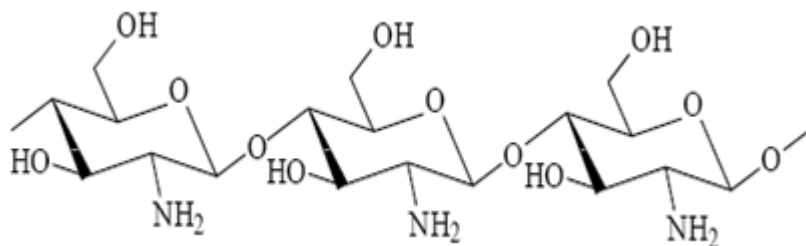
Odabasi e Denizli (2004) relataram que o corante Cibacron Blue F3GA imobilizado nas esferas de poli (2-hidroetil metacrilato) apresentaram resultados bem superiores para a quantidade adsorvida de HSA quando comparado a matriz sem corante. Os autores verificaram que a dessorção de HSA foi elevada, em torno de 98 % da HSA adsorvida.

2.4. Quitosana

Polissacarídeos, como a celulose, amido, quitina e lignina, representam a uma imensa família de polímeros naturais. E diversos pesquisadores têm voltado pesquisas em polímeros naturais a partir de recursos naturais (KRAJEWSKA, 2008; HOVEN *et al.*, 2007). Vários polissacarídeos comerciais possuem pH ácido ou neutro, mas a quitosana, um derivado da quitina, apresenta um pH básico atribuído a presença dos grupos aminas nas unidades repetidas. Propriedades tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade, além do caráter básico, fazem deste polímero, favorável para uso em vários setores industriais, tais como em formulações farmacêuticas e bioprodutos (ILLUM *et al.*, 2001; HOVEN *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2009). A quitosana é um produto natural e de baixo custo podendo ser obtido pelos resíduos provenientes do exoesqueleto (carapaças) de crustáceos. Esses resíduos são rejeitos da indústria pesqueira e pode ser encontrado em grande quantidade na região nordeste.

A quitosana possui muitas aplicações tecnológicas e é utilizada, por exemplo, no tratamento de efluentes industriais devido à sua facilidade de interagir com as partículas coloidais e devido, também, à presença de grupos amino em suas cadeias, o que confere a esse polímero um potencial de coagulação maior que o dos coagulantes usuais. Quitosana também é aplicada na área médica, na forma de um fio fino, biocompatível e resistente usado para suturas cirúrgicas (RODRIGUES, 2010). A quitosana também é utilizada para a adsorção de proteínas de interesse industrial, como por exemplo, a Albumina (RODRIGUES, 2010; CARTER; HO, 1994; TORRES; BEPPU; SANTANA, 2007).

Como apresentado pela Figura 9, a quitosana tem um grupo amino primário e dois grupos hidroxilas livres para cada unidade C_6 . A quitosana tem massa molar variando entre 3.800 e 2.000.000 Da e desacetilação de 66 a 95 % (KAS, 1997). Entre as características importantes da quitosana que influenciam as propriedades de formulações estão tamanhos de partícula, densidade, viscosidade, grau de desacetilação e massa molar (SINHA *et al.*, 2004).

Figura 9. Estrutura química da quitosana

FONTE: Rodrigues (2010)

Devido as suas propriedades químicas, físicas e biológicas, a quitosana e seus derivados têm aplicações em diversas áreas da indústria e agricultura. Além de ser biocompatível e biodegradável, a quitosana possui um grupo amino livre reativo que oferece possibilidades de modificações, para obtenção de derivados com novas propriedades e possibilidade de aplicações (LOPES e ARODI, 2007).

Apesar de matrizes a base de quitosana possuir potencial para estudos na área de purificação de proteínas, poucos trabalhos têm sido realizados.

No estudo realizado por Rodrigues (2010), foi reportado o emprego do compósito quitosana/alginato quimicamente modificado pela inserção de grupamentos epóxidos em sua estrutura, sob a forma de partículas, na adsorção em leito fixo da enzima celulase de *Aspergillus niger*. Este compósito mostrou ser capaz de adsorver a enzima com capacidade de adsorção de 11 mg/g, boa estabilidade e regenerabilidade.

Torres, Beppu e Santana (2007) utilizaram esferas de quitosana modificadas quimicamente por três rotas distintas, com glutaraldeído, com epícloridrina e via acetilação. Os autores investigaram a influência destes três materiais na adsorção das proteínas BSA e lisozima e para isso levantaram dados de isoterma com esses adsorventes. O adsorvente com quitosana modificada com glutaraldeído apresentou quantidades adsorptivas de BSA e lisozima superior aos demais, no valor de 9,24 e 4,03 mg/g, respectivamente para BSA e lisozima.

Apesar de poucos trabalhos relacionados a cromatografia de afinidade empregando matrizes a base de quitosana, este material um bom potencial para imobilização de ligantes pseudobiespecíficos propiciando bons resultados na adsorção de proteínas (ZENG; RUCKENSTEIN, 1996; RUCKENSTEIN; ZENG, 1998). Zeng e Ruckentein (1998) estudaram a adsorção de albumina de soro humano (HSA) e de soro bovino (BSA) em membranas de quitosana e quitina com Cibacron Blue, Reativo Vermelho e Reativo Azul

MXR imobilizados. Esses autores verificaram que essas membranas com corantes imobilizados foram quimicamente e mecanicamente estáveis e os adsorventes com corantes imobilizados apresentaram quantidade adsorvida para albumina superior a matriz sem corantes. A capacidade de adsorção de HSA nessas membranas seguiram a seguinte sequência: Cibacron Blue F3GA > Procion Blue MX-R > Procion Red HE-3B, ambos para as membranas de quitina e quitosana.

2.5 Alginato de Sódio

O Alginato é um polissacarídeo extraído de águas marinhas, principalmente das algas marrons, podendo ser usado para imobilização e tecnologias de microencapsulamento (FUNDUENANU *et al.*, 1999; VELTEN; LAUE; SCHREZENMEIR, 1999). Características que o alginato possui na alga são: a facilidade de prevenir a dessecação, manter a integridade celular e prover força mecânica à célula (McLACHLAN, 1985; KENNEDY; GRITHS; ATKINS, 1984).

Quimicamente é um polissacarídeo aniônico formado por monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-glucurônico (G), ligados de forma linear por ligações glicosídicas (1-4) (ZHANG; CHENG; YING, 2006).

Ao longo dos últimos anos, as indústrias médicas e farmacêuticas têm mostrado um interesse crescente em biopolímeros, tais como os alginatos. A razão para este aumento do interesse é a sua utilidade em aplicações específicas, uma vez que melhora o tratamento eficiente do refluxo no esôfago, cria inúmeras fibras para o tratamento de feridas dermatológicas (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). O alginato oferece vantagens em relação a polímeros sintéticos, uma vez que formam hidrogéis em pH e temperatura, relativamente moderada. Normalmente, os alginatos são considerados como atóxico, biocompatível, biodegradável, mais barato e disponíveis em abundância na natureza. Todas estas vantagens fazem dos alginatos, materiais muito úteis para aplicações biomédicas e para a encapsulação de células (SREEJAYAN RAO, 1997).

2.6 Imobilização de corantes

Os métodos de imobilização do ligante ao suporte da matriz normalmente necessitam de várias etapas intermediárias (DENIZLI; PISKIN, 2001). Para a escolha e as condições do método de imobilização, tanto o tipo de matriz como o ligante a ser escolhido são fundamentais. A ligação entre a matriz e o ligante deverá se manter estável durante as etapas de adsorção e eluição para possíveis ciclos de reutilização desse adsorvente (DENIZLI; PISKIN, 2001).

Muitos corantes reativos são imobilizados na matriz por reações diretas entre os grupos reativos, principalmente os grupos hidroxilas, sobre a matriz e as moléculas do corante (através de átomos de cloro ou flúor) em grupos de triazina. Já os corantes não reativos podem ser imobilizados à matriz por meio dos processos de ativação habituais, e esse estudos tem sido bordados na literatura (CLONIS, *et al.*, 1987).

A imobilização direta dos reativos em matrizes que possuem grupos hidroxila é considerada um método simples, barato e seguro (BURTON *et al.*, 1988; CLONIS, 1986). A imobilização é realizada em condições alcalinas por substituição nucleofílica de grupos hidroxilas com o cloro das moléculas dos corantes reativos. Nucleófilos são gerados pelo pH elevado, o que promove a ionização dos grupos hidroxilas da matriz. Nota-se que o pH elevado (geralmente acima de 12) pode provocar a hidrólise dos compostos cloro-triazinas nas soluções aquosas, por isso valores de pH muito elevadas deve ser evitado. Para imobilizar os corantes reativos aos grupos hidroxilas da matriz, deve-se deixar em contato a matriz com a solução de corante (0,2%), entre os valores de pH de 10 à 11 (DENIZLI; PISKIN, 2001).

Denizli e Piskin (2001) relatam que a fim de remover qualquer corante não covalentemente ligado à matriz, após a imobilização dos corantes, os adsorventes são tratados primeiro com água destilada e em seguida com as seguintes soluções: NaCl (1 à 2 M), uréia 6 M em NaOH 0,5 M, uréia 8 M, dimetilsulfoxido, BSA (1 à 10 mg/cm³), etilenoglicol, etanol 20 % em água. É recomendado que o adsorvente seja estocado em solução de tampão de pH 8 à 9 em solução de azida de sódio (0,02%) para conservação desses materiais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

A acrilamida, bis-acrilamida e o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da BioRad (EUA). Os corantes Reativo Azul 4 e Reativo Verde 5, Epicloridrina (99%), MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfônico), MES (ácido morfolinoetanosulfônico), Albumina de Soro Humano (HSA) e IgG humana, usada como marcador em eletroforese e nos ensaios em batelada e leito fixo e o soro tipo AB de plasma humano foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O corante Cibacron Blue F3GA foi obtido da Polysciences (EUA). 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). A quitosana em pó utilizada foi da Polymar (Brasil) e a Albumina de Soro Bovino foi obtida da INLAB (Brasil). 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 Métodos

3.2.1 Preparação do compósito quitosana/alginato epoxilado (QAE)

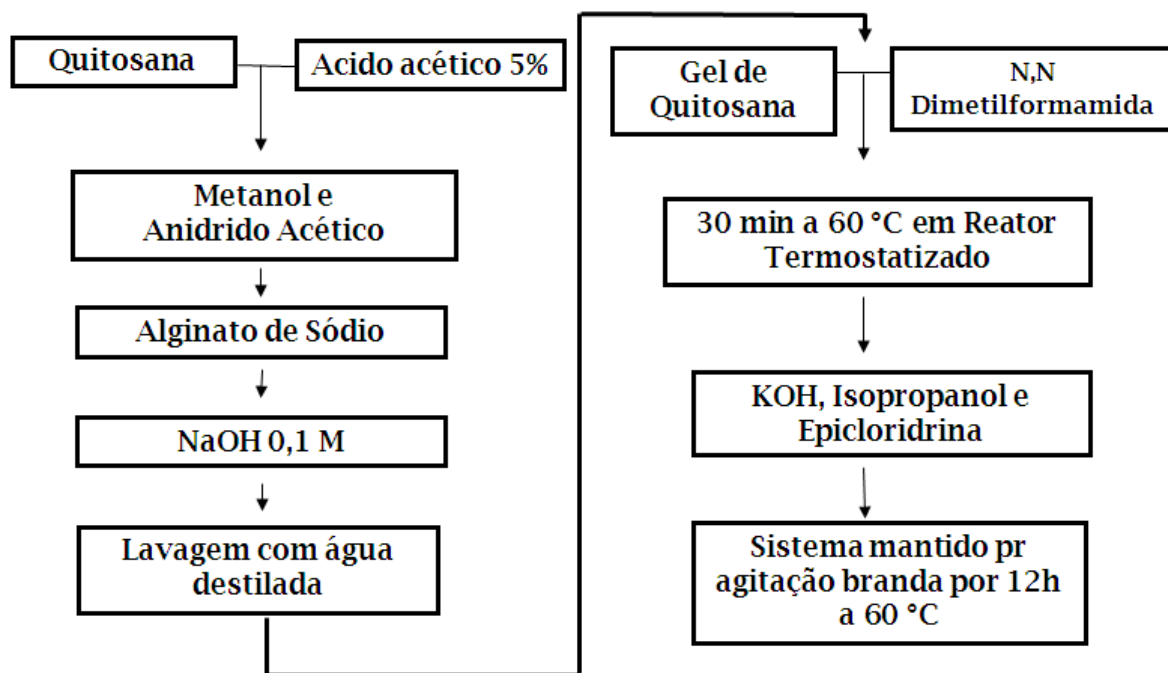
O procedimento de preparação do compósito de quitosana baseou-se na metodologia de Fangkangwanwong, Yorksan e Chirachanchai (2006) adaptada por Adriano *et al.* (2008) com a adição de alginato. O material foi preparado em duas etapas, sendo a primeira etapa para a formação do gel de quitosana/alginato, e a segunda etapa caracterizada pela modificação química.

Inicialmente, 10 g de quitosana foram dissolvidos em 400 mL de solução de ácido acético 5% (v/v) e mantidos sob agitação mecânica (TECNAL, Brasil, modelo TE-165) 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.

Mostra-se na Figura 10 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 reator termostatizado sob agitação constante. Em seguida, foram adicionados 0,8 g de KOH dissolvido em 3 mL de isopropanol e, ao final, 10 mL de epicloridrina. Em seguida o sistema foi mantido sob agitação a 60°C por 12 h..

Figura 10. Procedimento de preparação do compósito de quitosana/alginato epoxilado proposto por Fangkangwanwong, Yorksan e Chirachanchai (2006) adaptada por Adriano *et al.* (2008) com adição de alginato.



FONTE: Rodrigues (2010) adaptada pelo autor

3.2.2 Procedimento de imobilização dos corantes: Cibacron Blue F3GA, Reativo Azul 4 e Reativo Verde 5

Os corantes Cibacron Blue F3GA, Reativo Azul 4 e o Reativo Verde 5 foram imobilizados no compósito de quitosana/alginato epoxilado, de acordo com o procedimento descrito por Ruckenstein e Zeng (1998) com modificações.

Primeiramente, foram adicionados 1,0 g do compósito QAE em 100 mL da solução de corante (5 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 2M, Uréia 6M, Tween 80 1 %, água destilada, tampão de ensaio e finalmente com solução de HSA. Estas lavagens são necessárias para retirar corantes fracamente ligados à superfície do adsorvente e desta forma impedir futuras contaminações nos ensaios de adsorção.

Os compósitos resultantes após a etapa de imobilização foram QAEa, QAEc, QAEv, respectivamente Reativo Azul, Cibacron Blue e Reativo Verde imobilizados na matriz de Quitosana/Alginato Epoxilado (QAE).

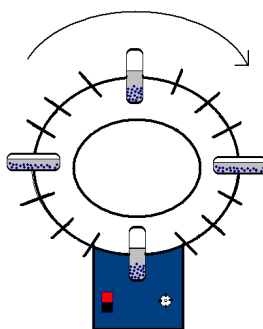
3.2.3 Caracterização dos adsorventes por FTIR

Os espectros de FTIR da quitosana, do alginato de sódio, dos corantes Reativos Azul 4 e Verde 5 e Cibacron Blue F3GA, além do compósito QAE e dos adsorventes QAEa, QAEc e QAEv foram obtidos com o espectrômetro FTIR SPECTRUM 2000 PERKIN-ELMER. A resolução foi de 1 cm⁻¹, com região espectral 4000 a 400 cm⁻¹ e 10 varreduras. As amostras secas (aproximadamente, 0,1 g) foram misturadas com KBr (0,1g) e prensado em forma de pastilha. O procedimento de preparo das pastilhas de KBr foi realizado de acordo com o manual de preparo da SHIMADZU do Brasil.

3.2.4 Ensaios em batelada

Os ensaios de adsorção foram realizados em duplicata, em um sistema de agitação rotatório (TECNAL, modelo TE-165), conforme Figura 11, de forma a simular um tanque agitado, a temperatura de 22 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e 18 rpm. Para tanto, foram adicionados 15 mg do adsorvente em tubos de acrílico juntamente com 3 mL da solução da proteína estudada em tampão.

Figura 11. Sistema de agitação rotatório



FONTE: O próprio autor

3.2.4.1 Estudo do efeito do pH na adsorção de proteínas

Utilizaram-se os tampões FS, MES, MOPS e HEPES com força iônica de 25 mM para encontrar o pH que fornece as melhores quantidades adsorvidas, sempre respeitando a faixa indicada de pH de cada um desses tampões. O sistema permaneceu sob agitação constante durante o período de, no mínimo, 90 min. Ao final deste período de tempo, 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 foi lida para cada amostra. Os valores de absorbância foram convertidos para concentração a partir de uma curva analítica previamente obtida para cada um dos tampões. A quantidade de proteína de alta pureza adsorvida foi calculada por meio de um balanço de massa, sendo a equação descrita a seguir:

$$q^* = \frac{V_{\text{SOL}} (C_0 - C_{\text{EQ}})}{m_{\text{ads}}} \quad (1)$$

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

3.2.4.2 Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção foram obtidas, em duplicata, a partir dos experimentos realizados no sistema de agitador rotatório (Figura 11). Para cada 3,0 mL da solução da proteína deixou-se em contato com 15 mg do adsorvente em tubos de acrílico sob agitação constante de 18 rpm por 3,0 h. As concentrações de proteínas utilizadas nos experimentos variaram de 1 à 10 mg/mL. Após o período necessário para atingir o equilíbrio, as amostras foram coletadas, filtradas e o sobrenadante foi centrifugado a 10000 g e em seguida foi lida a absorbância para cada amostra. Com o valor das absorbâncias, encontraram-se os valores de concentração com a partir da curva de calibração característica previamente estabelecida.

As isotermas mais utilizadas atualmente para descrever o equilíbrio sólido-líquido das proteínas são as de Langmuir e Langmuir-Freundlich. Essas isotermas têm permitido uma correta descrição dos dados experimentais de equilíbrio em vários estudos envolvendo soluções diluídas de um componente fortemente adsorvido em um adsorvente puro (GUIOCHON *et al.*, 1994). Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, descritos pelas Equações 2 e 3, respectivamente, foram utilizados para ajustar aos dados experimentais usando o método iterativo Levenberg-Marquardt (Software Origin0 6.0, Microcal, USA).

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

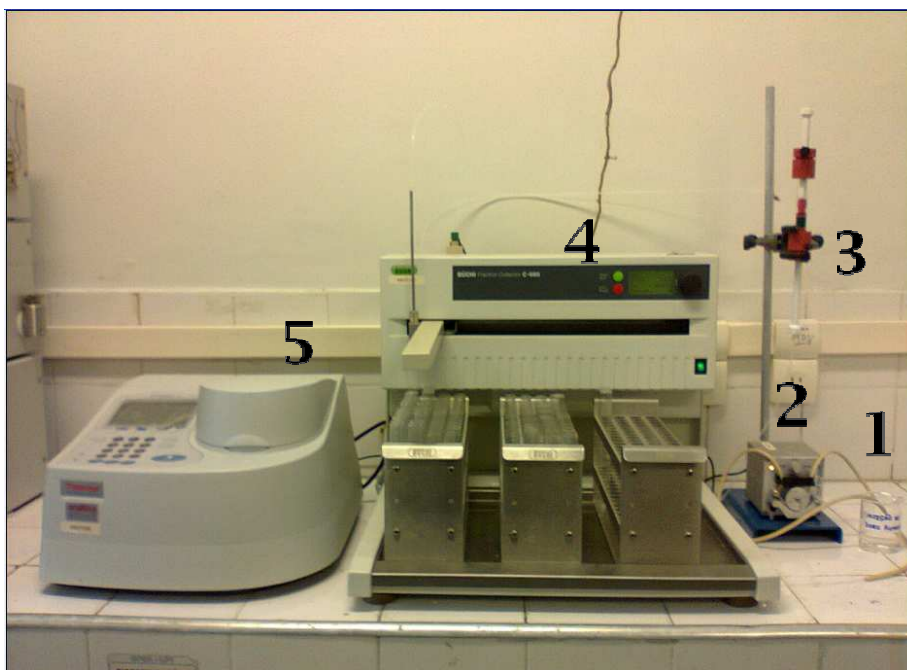
$$q = \frac{q_m (C_{eq})^n}{K_{DLF} + (C_{eq})^n} \quad (3)$$

em que q_m é a capacidade máxima de proteínas adsorvidas, em mg/g, K_D e K_{DLF} são as constantes de dissociação, e de dissociação aparente, respectivamente, expressas em mol/L ou M, a qual indica a afinidade entre proteína e adsorvente, e n é a constante de Langmuir-Freundlich, a qual indica a cooperatividade efetiva presente no sistema de adsorção. De acordo com Sharma e Agarwal (2002), citado por Sousa (2009), quando $n=1$, não existe cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios são independentes e para $n > 1$ e $n < 1$ indicam, respectivamente, cooperatividade positiva e negativa associada ao sistema.

3.2.5 Ensaio em leito fixo

Os ensaios em leito fixo foram realizados com a proteínas IgG de alta pureza e com a solução diluída do soro humano e realizou-se o balanço de massa para cada experimento. O sistema utilizado (Figura 12) para realização dos experimentos cromatográficos foi composto por uma bomba peristáltica (Watson Marlow, Modelo Q 400), uma coluna cromatográfica (C 10/10 da GE Healthcare, Figura 13), empacotada com as partículas de quitosana/alginato epoxiladas com corantes imobilizados, um coletor de frações (Buchi, Modelo C-660) e um espectrofotômetro (Termocientific Biomat 3).

Figura 12. Sistema cromatográfico para ensaios de adsorção de proteínas por cromatografia de afinidade em leito fixo. Reservatório de alimentação (1), Bomba peristáltica (2), Coluna cromatográfica (3), Coletor de frações (4) e Espectrofotômetro (5).



FONTE: O próprio autor

Figura 13. Coluna para ensaios cromatográficos (C 10/10 da Ge Healthcare) empacotada com esferas do adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Cibacron Blue F3GA imobilizado.



FONTE: O próprio autor

3.2.5.1 Ensaios com IgG e Soro Humano (SH)

Os experimentos cromatográficos realizados com a proteínas IgG de alta pureza apresentaram as seguintes condições: volume de 10,0 mL de IgG, concentração 1,0 mg/mL, vazão 0,8 mL/min e massa de adsorvente de 0,5 g, proporcionando um leito com 1,5 cm de altura. A solução de IgG foi preparada nos tampões FS, MOPS e HEPES com força iônica de 25 mM no pH de maior adsorção de cada tampão.

Os ensaios com soro humano diluído 10 vezes (concentração em torno de 5,0 mg/mL de proteínas totais) foram preparadas nos tampões FS, MOPS e HEPES 25 mM. As condições desses ensaios diferem dos realizados com IgG apenas no volume (15,0 mL) e concentração (5,0 mg/mL).

As etapas do processo cromatográfico estão descritas abaixo e são ilustradas na Figura 14. Para estes ensaios, o tempo de coleta para cada amostra foi de 2 min e o tempo total de realização desses experimentos foram entre 70 e 90 min.

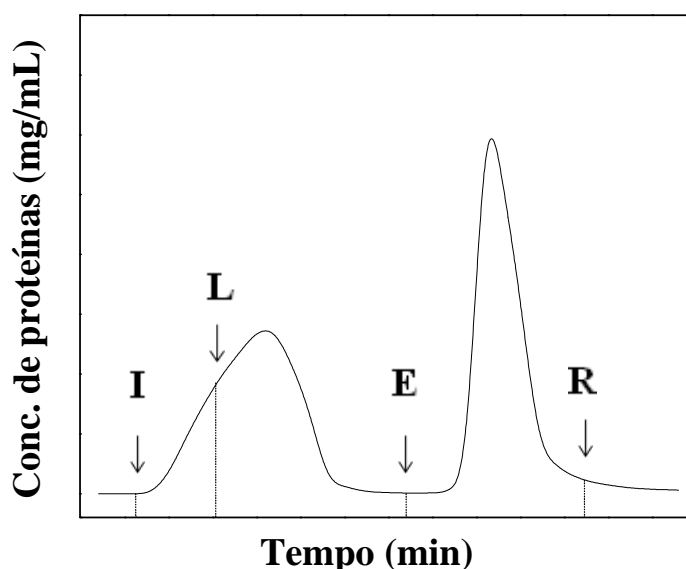
Injeção (I): após a coluna ser devidamente equilibrada com tampão de adsorção, ocorreu a passagem da solução de IgG (1,0 mg/mL) preparada no mesmo tampão. O tempo desta etapa foi de 8 min.

Lavagem (L): após o término da injeção de alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção, até que todas as proteínas não adsorvidas foram eliminadas da coluna, aproximadamente 20 min.

Eluição (E): as proteínas foram eluídas através da passagem do tampão de eluição ao qual foi composto por NaCl 1,0 M acrescido ao tampão de adsorção e teve duração de 30 min.

Regeneração (R): para o reaproveitamento do adsorvente e regeneração da coluna foi passado na coluna o tampão de adsorção para retirar qualquer proteína que não fora eluída. E a duração desta etapa foi de no mínimo 10 min.

Figura 14. Esquema ilustrativos indicando cada etapa do ensaio de adsorção/dessorção em leito fixo com QAE com corantes imobilizados



FONTE: O autor

3.2.5.2 Determinação de proteínas totais

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

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 (Mili-Q). 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.

Todas as amostras obtidas dos ensaios com soro humano foram analisadas por Bradford. Para cada 0,1 mL de amostra deixou-se em contato com 1,0 mL do reagente de Bradford por 10 min, aproximadamente, em cubetas de plásticos 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, encontraram-se os valores de concentração de proteínas totais com a curva de calibração anteriormente estabelecida.

3.2.5.3 Eletrofose (SDS-PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE) foi utilizada para analisar a seletividade dos adsorventes em purificar IgG. As frações protéicas obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das frações cromatográficas foram estudadas. 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, juntamente com o tampão de desnaturação, 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 180 V, em cubas verticais e a coloração foi realizada com nitrato de prata, conforme Morrissey (1981).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação e caracterização dos adsorventes

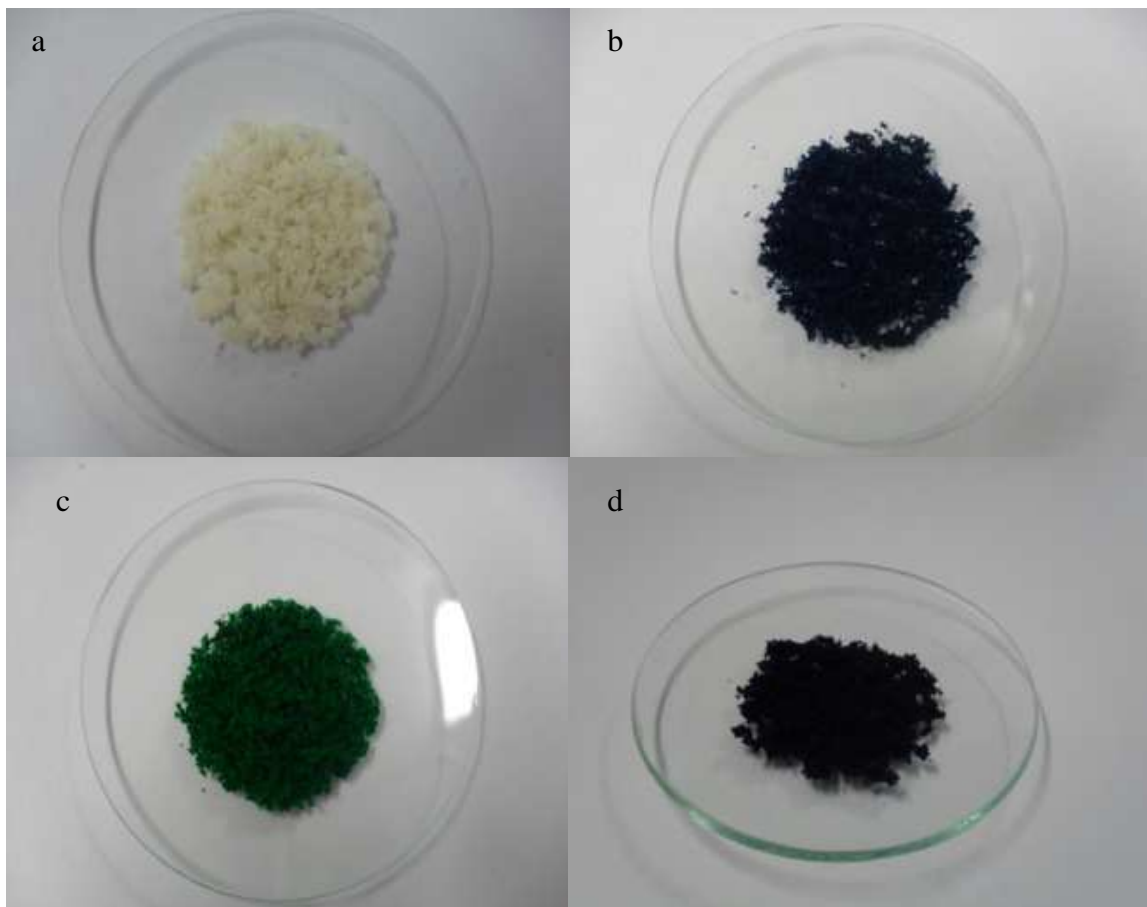
Diversos autores reportam a facilidade de corantes reativos em se aderir facilmente à superfície dos adsorventes à base de quitosana. Em contrapartida, a dessorção desses corantes normalmente é realizada em condições drásticas (força iônica) de eluição (GHOSH e BHATTACHARYYA, 2002; RAPOSO; DE LA RUBIA e BORJA, 2009; HAMEED; MAHMOUD; AHMAD, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009), devido a forte ligação ou elevado grau de irreversibilidade. Este fato motivou a utilização dos corantes Cibacron Blue F3GA, Reativo Azul 4 e Reativo Verde 5 imobilizados a estrutura do compósito quitosana/alginato epoxilado (QAE), para a purificação de IgG do soro humano. Esses corantes são os mais utilizados na literatura como ligante-corante para adsorção de proteínas em diversas matrizes.

A quitosana possui grupos reativos ($-\text{CH}_2\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$) que podem ser facilmente modificados. Devido a essa característica, foi possível modificar quimicamente a estrutura do compósito quitosana/alginato com a adição do grupo epóxido, proveniente da epicloridrina e posterior imobilização dos corantes.

A Figura 15 apresenta o compósito sem corantes imobilizados (Figura 15a) e QAE com os corantes imobilizados: Cibacron Blue F3GA (Figura 15b), Reativo Verde 5 (Figura 15c) e Reativo Azul 4 (Figura 15d).

Verificou-se que após a lavagem do material com água destilada quente, metanol, NaCl 2M, Uréia 6M, Tween 80 1 %, e com o tampões de adsorção, não ocorreu mais desprendimento do corante de sua superfície, evidenciando que o material teve boa imobilização dos mesmos. Essas lavagens foram necessárias, visto que após a imobilização ainda existem corantes fracamente fixados à superfície desse compósito.

Figura 15. Adsorvente a base de quitosana/alginato epoxilado (a) e QAE com os corantes Cibacron Blue F3GA (b), Reativo Verde 5 (c) e Reativo Azul 4 (d) imobilizados .



AUTOR: O autor

4.1.1 Caracterização dos adsorventes por Espectroscopia de Infravermelho (*Fourier Transform Infrared – FTIR*)

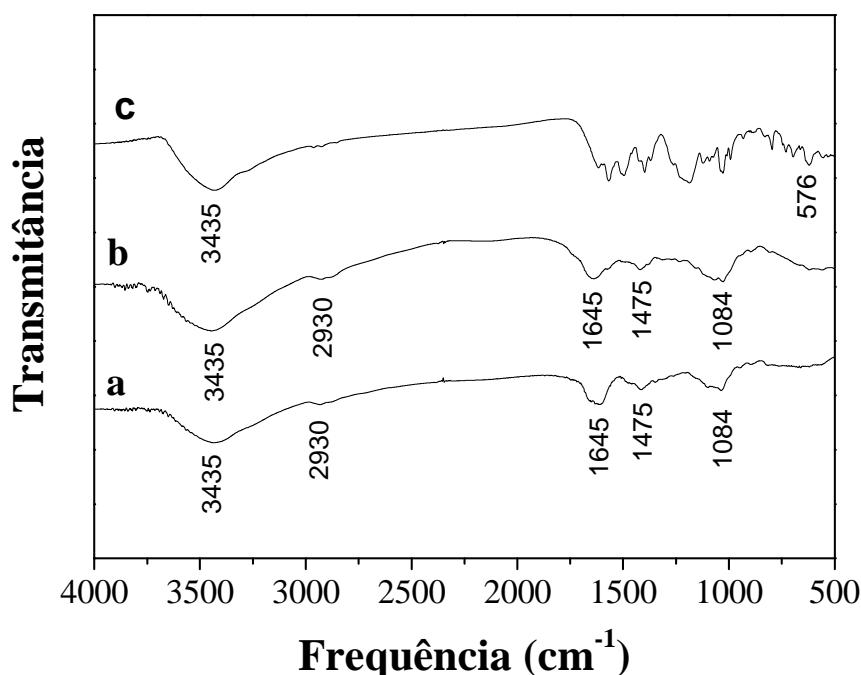
A espectrometria na região do infravermelho é uma técnica de fundamental importância na caracterização de diversos materiais e através desta análise é possível identificar os grupos funcionais de um composto ou de um composto modificado. O compósito de quitosana/alginato epoxilado (QAE) foi detalhadamente estudado por Rodrigues (2010) na adsorção de celulase e BSA. O autor observou boa estabilidade e regenerabilidade do adsorvente QAE com boa capacidade de adsorção, em torno de 11 mg/g.

A adição do alginato tem por finalidade fornecer a estrutura da quitosana natural maior resistência mecânica e melhorar as propriedades da adsorção com os corantes. A

modificação química no gel de quitosana/alginato ocasionada pela adição de epícloridrina fornece grupos epóxido, além dos já existentes com os grupos hidróxi, amino e carboxílicos presentes a estrutura do compósito QAE. A adição de alginato e dos grupos epoxi são importantes no aumento da resistência mecânica do compósito final e reatividade, tornando a matriz de quitosana mais rígida e propícia a imobilização dos corantes Cibacron Blue F3GA, Reativo Verde 5 e Reativo Azul 4. A resistência mecânica é uma característica desejável para um adsorvente, pois permite que o mesmo possa ser utilizado sob pressão, mesmo que baixa, em sistemas de cromatografia líquida. No trabalho de Rodrigues (2010) o autor verificou, por análise de FTIR, que após a incorporação dos grupos epóxidos ocorreu uma redução das bandas dos grupos amino provavelmente devido a possíveis ligações desses com a molécula do epóxido.

A Figura 16 apresenta os espectros do compósito QAE (Figura 16a), do compósito QAE com Cibacron imobilizado (Figura 16 b) e do corante Cibacron Blue F3GA (Figura 16c). Observa-se uma banda larga em torno de $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, possivelmente devido a ligações de hidrogênio à álcool (OH) e as aminas. O espectro da Figura 16b apresenta nessa mesma banda uma intensidade elevada provavelmente devido a maior interação de grupos hidroxila após a imobilização do corante a estrutura do compósito de quitosana/alginato epoxilado. A banda de 2930 cm^{-1} corresponde ao estiramento de -OH e pode ser verificado tanto no espectro de QAE como no QAEc. De acordo com Lawrie *et al.* (2007) a quitosana possui duas fortes vibrações à 1645 e 1584 cm^{-1} e tais vibrações foram atribuídas como a amida I e amida II. As vibrações nesse mesmo pico (1645 cm^{-1}) no espectro QAEc teve uma diminuição em sua intensidade, se compararmos com o espectro do compósito QAE. Lawrie *et al.* (2007) também relata que as deformações das vibrações de aminas normalmente provocam grandes bandas entre $1638\text{-}1535\text{ cm}^{-1}$.

Figura 16. Espectros de QAE (a), QAEc (b) e Cibacron Blue F3GA (c)

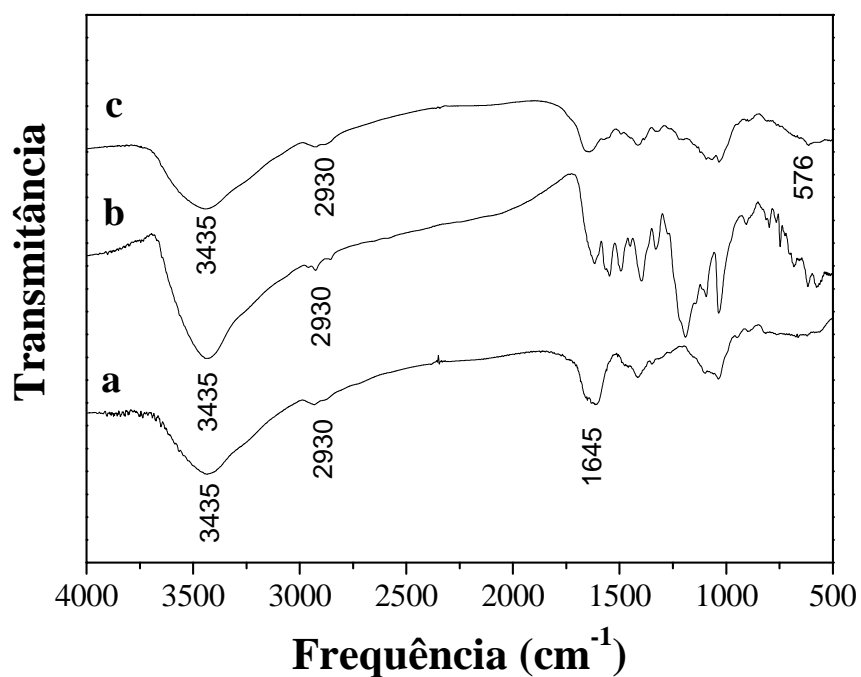


Na Figura 16, as bandas 1645, 1475 e 1084 cm^{-1} correspondem a amida secundária (amida I), as vibrações de N-H (devido a amina e amida II) e o pico característico de $-\text{CH}_2\text{-OH}$ em álcool primário, respectivamente, como reportado na literatura por outros materiais a base de quitosana/alginato (LI *et al.*, 2005; LAWRIE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; HONARY; MALEKI; KARAMI, 2009; MALESU; SAHOO; NAYAK, 2011). Para o corante Cibacron Blue F3GA (Figura 16c) verificou-se a banda de absorção na região entre 1600-1450 cm^{-1} característicos do anel de benzeno. E observou-se uma banda pequena perto de 1240 cm^{-1} originada provavelmente pelos grupos ácidos sulfônicos da molécula do corante. As bandas originadas perto de 800 cm^{-1} são resultados das vibrações dos grupos de aminas primária e secundária da molécula do corante.

A Figura 17c apresenta o espectro do composto QAE com Reativo Verde imobilizado a sua estrutura. A banda 576 cm^{-1} representa os grupos sulfônicos presente na estrutura do Reativo Verde 5. A intensidade na banda 1191 cm^{-1} do QAEv (Figura 17b) representa o alongamento simétrico de S=O ao qual é bem superior ao encontrado no espectro do corante Reativo Verde 5 (Figura 17c). As regiões das bandas de 1600-1230 cm^{-1} têm muitas bandas características do Reativo Verde 5 e também são encontradas no composto

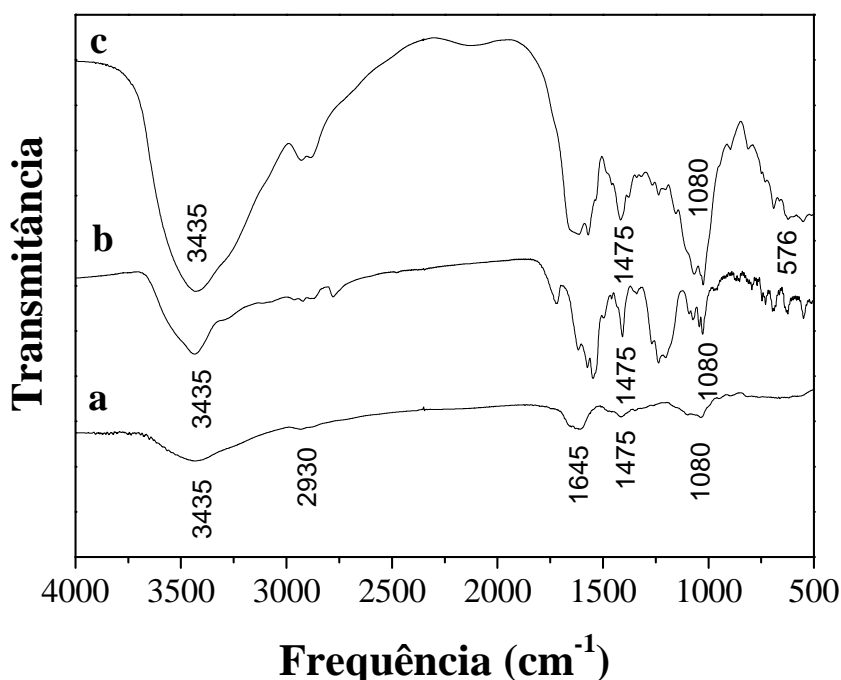
QAEv (Figura 16b). Para o corante Reativo Verde 5 (Figura 17b) verificou-se a banda de absorção na região entre 1600-1450 cm^{-1} característicos do anel de benzeno.

Figura 17. Espectros de QAE (a), Reativo Verde 5 (b) e QAEv (c)



Os espectros com QAEa e com o corante Reativo Azul 4 estão apresentados na Figura 18 (b e c). Os grupos característicos de anel benzeno típicos dos corantes normalmente aparecem entre as bandas 1600-1450 cm^{-1} . A banda 1475 cm^{-1} possui intensidade e pico semelhante à encontrada na mesma banda do espectro do corante Reativo Azul 4 (Figura 18c). A banda (Figura 18b) apresentada em 1080 cm^{-1} apresenta um pico característico de alta intensidade em relação ao composto QAE (Figura 18a).

Figura 18. Espectros de QAE (a), QAEa (b) e Reativo Azul 4 (c)



4.2 Ensaios de adsorção em tanque agitado

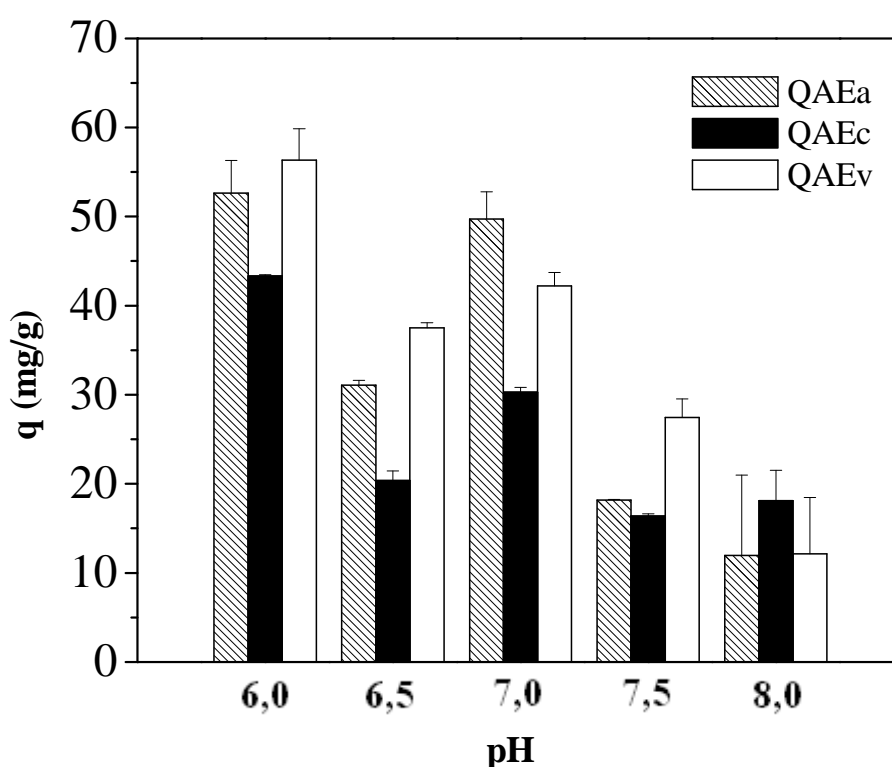
4.2.1. Efeito da natureza do tampão e do pH na adsorção de IgG

A faixa de pH estudada na adsorção de IgG foi entre 6,0 à 8,2. E para esse estudo foi utilizado os tampões fosfato de sódio (FS), Ácido Morfolinopropanosulfônico (MOPS), Ácido N-2-Hidroxietilpiperazino-N'-2- Etanosulfônico (HEPES) e Ácido Morfolinoetanosulfônico (MES). De acordo com o fabricante (SIGMA-ALDRICH) as faixas de pH úteis são 6,5 – 7,9 (MOPS), 6,8 – 8,2 (HEPES) e 5,5 – 6,7 (MES). Para o FS a faixa ideal está entre 5,8 – 8,0. É importante salientar que ao utilizar um sistema tamponante fora desse intervalo específico, possivelmente o sistema não se mantenha a pH constante. Dentre os tampões que foram estudados, o HEPES possui maior pKa (7,5) à 25 °C, enquanto o MES (6,1) possui o menor (SIGMA-ALDRICH).

Para encontrar o pH em que ocorre a maior concentração de IgG adsorvida, deixou-se a solução da proteína IgG (1,0 mg/mL) em contato com o compósito

quitosana/alginato epoxilado (QAE) com corantes imobilizados. Variou-se o sistema tamponante (FS, HEPES, MOPS e MES) com força iônica de 25 mM para os três adsorventes (QAEc, QAEv e QAEa), respeitando a faixa limite que cada tampão pode assumir. A Figura 19 apresenta os resultados para o tampão FS 25 mM. Foi verificado que a máxima quantidade adsorvida de IgG ocorreu no pH 6,0 para os três corantes imobilizados ao compósito QAE.

Figura 19. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão FS 25 mM (6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0) para o QAEc, QAEa e QAEv.



O adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Reativo Verde imobilizado (QAEv) obteve maior quantidade adsorvida (56,3 mg/g), quando comparado ao adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Reativo Azul e Cibacron imobilizados (QAEv e QAEc, respectivamente), pois esses apresentaram valores de 43,3 mg/g e 52,6 mg/g, respectivamente.

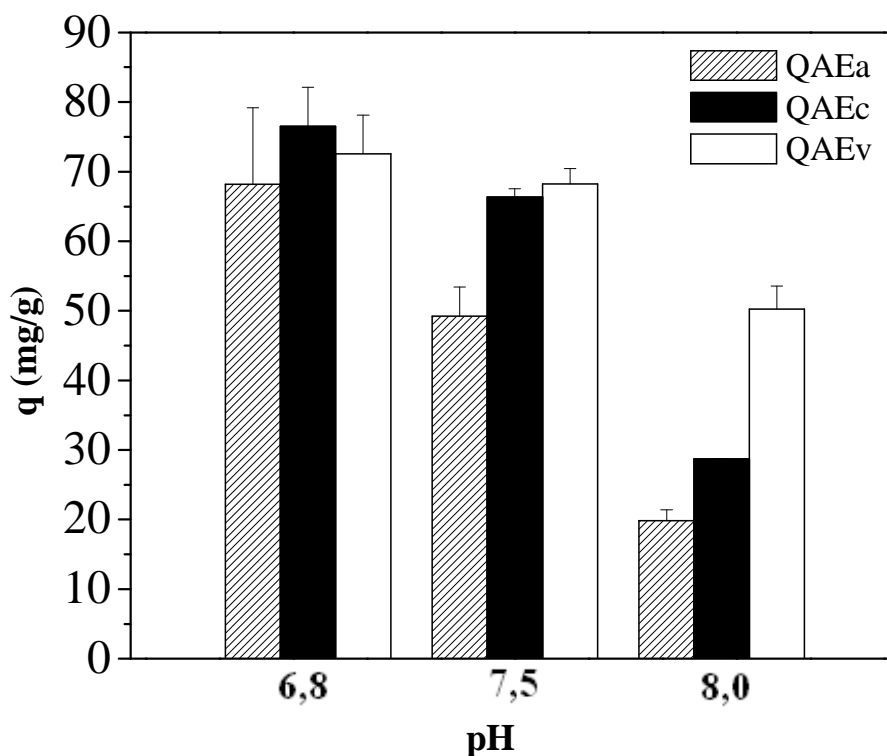
Yavuz *et al.* (2006) encontraram a máxima adsorção de IgG (71,0 mg/g) no pH 7,0 em tampão fosfato 25mM, com as esferas do polímero (hidroxipropil metacrilato) com corante Reativo Verde HE 4BD imobilizado. Esses autores investigaram a adsorção de IgG na faixa de pH de 4,0-8,0 com concentração inicial de 2,0 mg/ml e verificaram que a capacidade de adsorção decai significativamente quanto mais ácido ou alcalino for o pH do tampão. Esta

mudança pode ser induzida pelo efeito da repulsão eletrostática entre os grupos de cargas opostas. De acordo com Bresolin (2010), devido as 4 subclasses, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄ da proteína IgG, o ponto isoelétrico (pI) para essa proteína é variável, entre 6,3 à 9,0, sendo diretamente influenciado por cada uma dessas subclasses. Cada subclasse de IgG possui uma faixa de pI específico e provavelmente isso influencie na falta de uniformidade, em relação a variação da quantidade adsorvida com o aumento do pH.

Os resultados obtidos neste tampão (FS) estão em concordância com os encontrados na literatura. O pH ótimo do tampão FS foi 6,0, valor próximo ao encontrado por Yavuz *et al.* (2006) e igual ao obtido por Bayramoglu, Oktem e Arica (2007b). E esses autores relatam que em valores de pH alcalinos a quantidade adsorvida decai consideravelmente.

A Figura 20 mostra os valores de adsorção utilizando o tampão HEPES com o compósito quitosana/alginato com os corantes Cibacron (QAEc), Reativo Verde (QAEv) e Reativo Azul (QAEa) imobilizados.

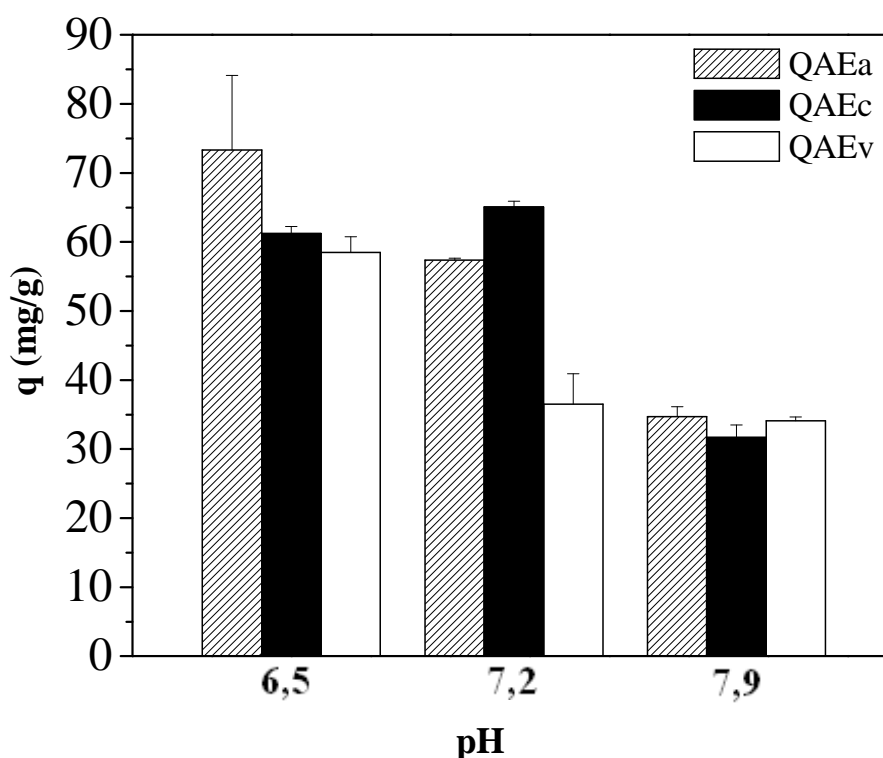
Figura 20. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão HEPES (6,8; 7,5 e 8,2) para os materiais QAEc, QAEa e QAEv.



Como mostrado na Figura 20, os melhores resultados para adsorção de IgG com o QAEa foram obtidos no pH 6,8. Os adsorventes QAEc e QAEv apresentaram valores similares de adsorção de IgG nos valores de pH 6,8 e 7,5. Para este tampão (HEPES) o adsorvente QAEc apresentou valores superiores, em torno de 76,5 mg/g, enquanto que com QAEa e QAEv foram de 68,2 e 72,6 mg/g, respectivamente.

De acordo com a Figura 21 foi possível observar que o pH 6,5 do tampão MOPS apresentou os maiores valores para adsorção de IgG para o adsorvente QAEa e QAEv. Porém, para o QAEc os valores de pH 6,5 e 7,0 apresentaram valores próximos na mesma ordem para quantidade de IgG adsorvida. O adsorvente QAEa obteve valor de 73,3 mg/g, enquanto que o QAEc e QAEv obtiveram, 61,2 e 58,5 mg/g, respectivamente no pH 6,5.

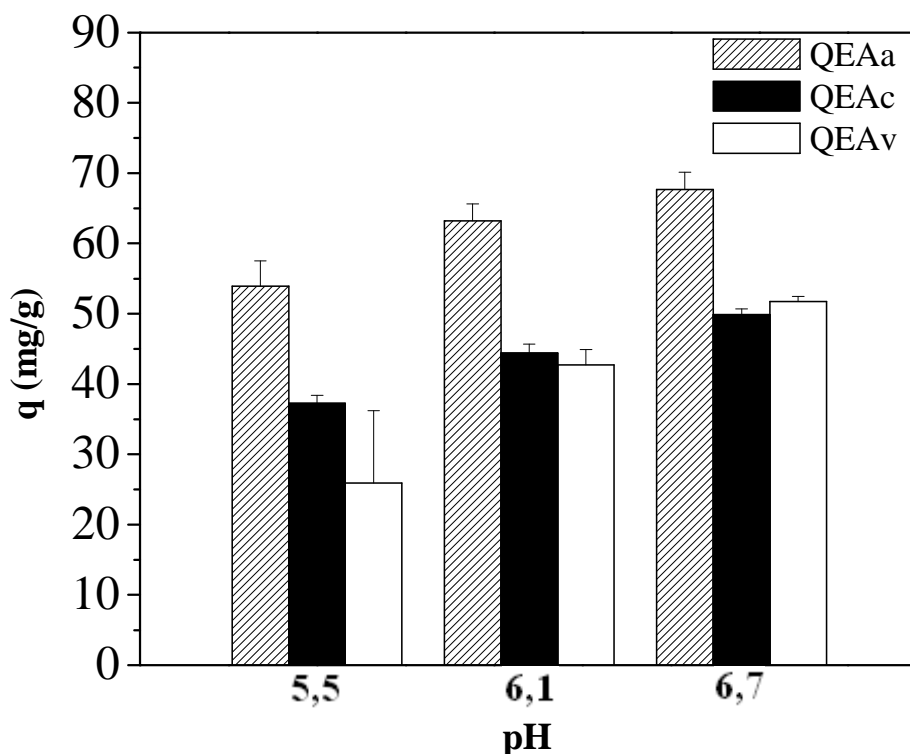
Figura 21. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão MOPS (6,5; 7,2 e 7,9) para o adsorvente com QAEc, QAEa e QAEv.



Os melhores resultados para o tampão MES (Figura 22) para adsorção de IgG foram obtidos no pH 6,7 para os 3 corantes, com destaque para o QAEa. Este material apresentou valor de 67,7 mg/g. Nesse pH a quantidade adsorvida de IgG com QAEc e QAEv foram de 49,89 e 51,73 mg/ g, respectivamente.

De acordo com a Figura 22 apenas o final da faixa de pH para o tampão MES (5,5 – 6,7) está dentro da faixa de pI da IgG (6,3-9,0) e provavelmente por isso esses resultados foram inferiores aos apresentados com os tampões MOPS e HEPES no pH de maior adsorção.

Figura 22. Efeito da adsorção de IgG com a variação do pH em tampão MES (5,5; 6,1 e 6,7) para o adsorvente com QAEc, QAEa e QAEv.



Ao compararmos os resultados apresentados até o momento, verificou-se que a adsorção de IgG nos três adsorventes em tampão HEPES apresentou resultados superiores para todos os três materiais. De acordo com Souza (2009), o pKa dos tampões MOPS e MES apresentam carga líquida negativa, enquanto que o tampão HEPES é o único com carga líquida zero. E isso facilmente pode, para os tampões MOPS e MES, ser um agravante na adsorção de proteínas, visto que íons do tampão podem estar competindo com as proteínas por os sítios positivos do adsorvente.

Wongchuphan *et al.* (2009) estudaram a resina comercial *Streamline* com Reativo Verde 5 imobilizado e avaliaram a adsorção por afinidade de IgG de coelho. Foi estudada a adsorção em solução de IgG e BSA em tampão fosfato, e encontraram a máxima adsorção de IgG no pH 6,0. Ao analisarem a adsorção em pH 7,0 os autores encontraram boa quantidade

adsorvida de IgG e menor quantidade adsorvida de BSA. Os resultados apresentados por Wongchuphan *et al.* (2009) foram similares aos obtidos nesse trabalho, pois a máxima adsorção de IgG em tampão FS (Figura 19) foi no pH 6,0 e o pH 7,0 apresentou resultados também consideráveis na adsorção de IgG.

Cada tampão estudado apresentou um valor de pH ótimo dentro da faixa estudada, conforme mostrado na Tabela 2. Os tampões HEPES, MOPS e MES apresentaram pH dentro da faixa esperada para adsorção de IgG e o tampão FS apresentou melhores resultados no pH 6,0 que não está dentro da faixa, porém próximo. Sabe-se que a máxima adsorção de proteínas ocorre geralmente no seu pI, onde as cargas superficiais da proteína são neutras. No entanto, dependendo do adsorvente, o pH de melhor adsorção poderá ser diferente do pI da proteína, se o adsorvente estiver carregado positivamente ou negativamente (BAYRAMOGLU; OKTEM; ARICA, 2007b; RODRIGUES, 2010). O pH do plasma humano está entre 7,4 e 7,5 e os melhores resultados de adsorção de IgG foram próximos ao pH do plasma.

Tabela 2. Resultados de maiores quantidade adsorvidas de IgG no pH ideal para cada tampão.

Adsorvente	Tampão 25 mM							
	FS		HEPES		MOPS		MES	
	pH	q (mg/g)	pH	q (mg/g)	pH	q (mg/g)	pH	q (mg/g)
QAEc	6,0	43,34	6,8	76,56	6,5	62,21	6,7	49,89
QAEa	6,0	52,62	6,8	68,18	6,5	73,33	6,7	67,69
QAEv	6,0	56,33	6,8	72,58	6,5	58,48	6,7	51,73

Como apresentado na Tabela 2 observou-se que o tampão HEPES apresentou resultados superiores para QAEc e QAEv quando comparado aos outros tampões. O material QAEa apresentou alta capacidade de adsorção de IgG nos tampões MOPS, HEPES e MES, porém o tampão MOPS foi o que revelou a maior adsorção de IgG.

4.2.2 Isotermas de adsorção

Para obtenção dos resultados em batelada com IgG foram necessárias 3,0 h para atingir o equilíbrio de adsorção. Para esses ensaios, foram utilizados os tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) no pH que obteve os maiores valores de quantidade adsorvida. Nos experimentos a seguir, o tampão MES não foi utilizado devido aos valores

inferiores obtidos para as quantidades adsorvidas de IgG nos adsorventes em relação aos tampões MOPS e HEPES. Outro motivo bastante relevante foi por esse tampão (MES) apresentar faixa de pH (5,5 e 6,7) que compreende apenas uma parte da faixa do pI (entre 6,3 e 9,0) da IgG. O tampão FS foi escolhido devido a questões econômicas e por ter apresentado capacidade de adsorção próxima aos demais tampões.

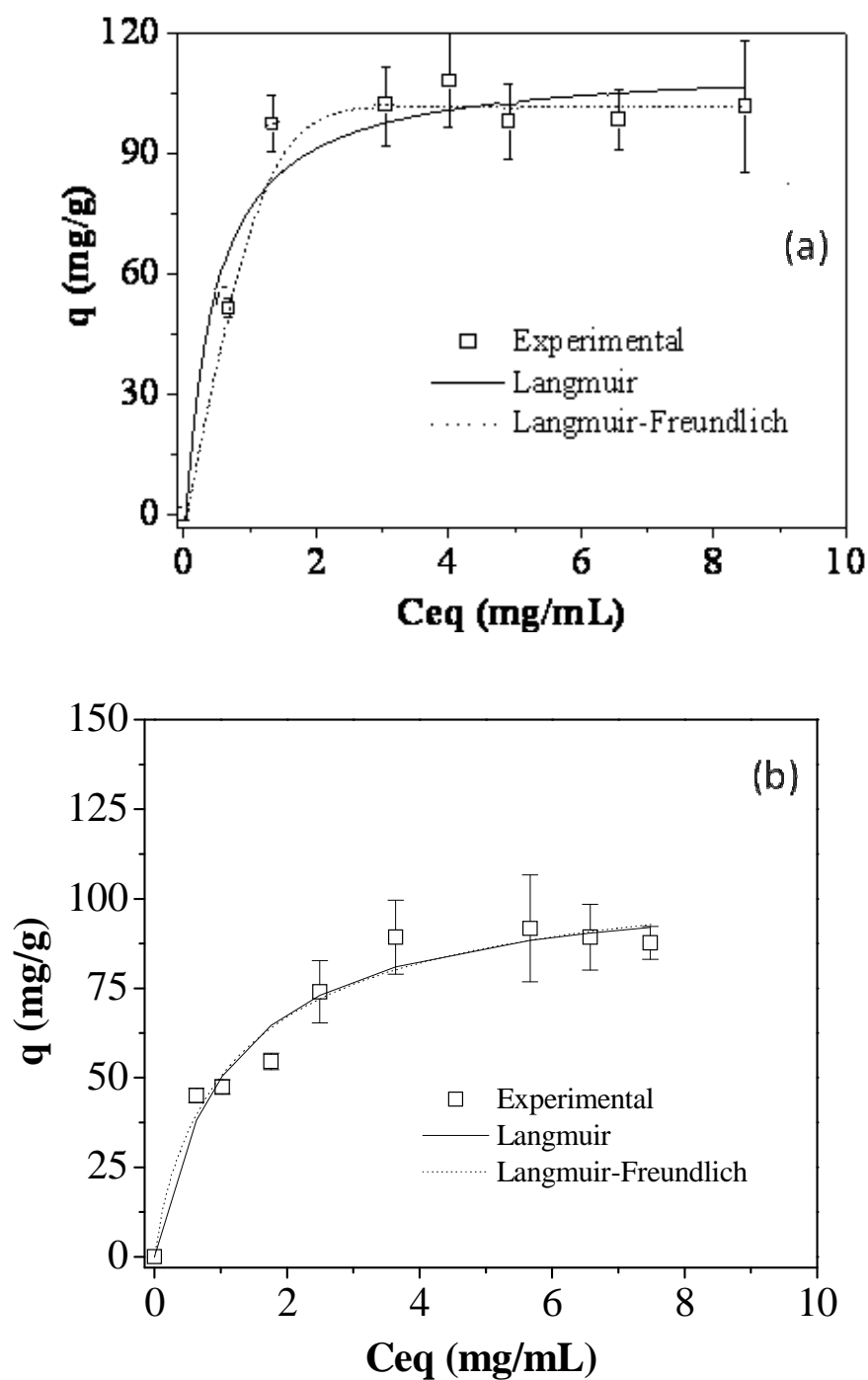
4.2.2.1 Isoterma de IgG com o adsorvente QAEc

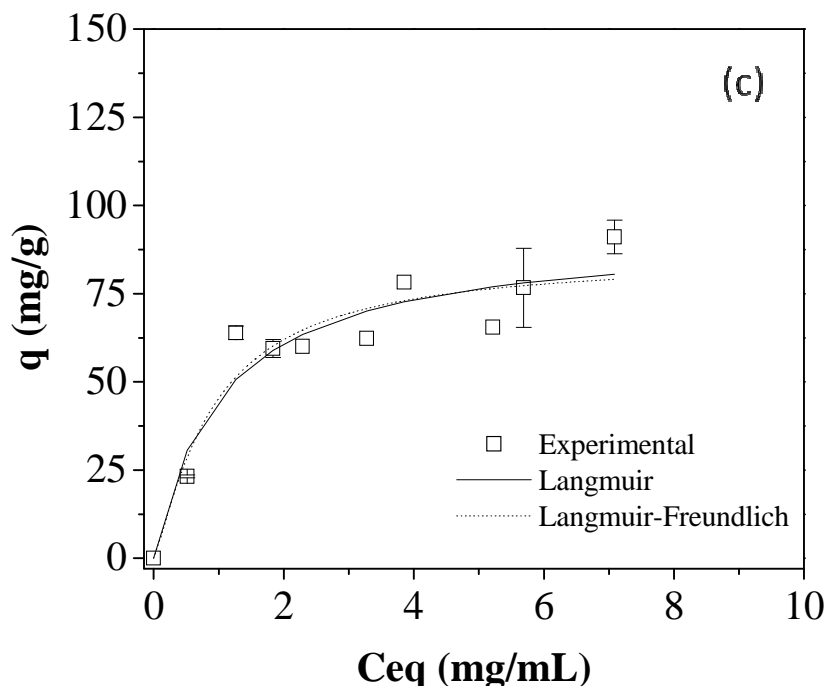
As Figuras 23 (a, b e c) mostram as isotermas de adsorção de IgG no adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Cibacron imobilizado (QAEc) nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) e os ajustes a partir dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados experimentais.

De acordo com a Figura 23a podemos observar que a isoterma é do tipo retangular. Foi verificado pela Figura 23a que os modelos se ajustaram aos dados experimentais com destaque ao ajuste de Langmuir-Freundlich. As constantes de dissociação (K_D e K_{DLF}) para ambos os modelos foram na ordem de 10^{-6} mol/L representando um adsorvente (QAEc) classificado como de média afinidade, de acordo com Vijayalakshmi (1989). O valor de K_{DLF} ($1,2 \times 10^{-6}$ mol/L) foi inferior a K_D ($3,2 \times 10^{-6}$). Outro importante parâmetro para comparação entre os modelos foi o χ^2 , a qual indica a proximidade dos dados para com o ajuste. O modelo de Langmuir-Freundlich teve valor (13,13) bem inferior ao obtido por Langmuir (73,45) mostrando que o ajuste por Langmuir-Freundlich forneceu resultados superiores. A quantidade máxima adsorvida foi 109,2 e 99,1 mg/g, respectivamente para os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich.

As Figuras 23b e 23c mostraram quantidades adsorvidas de IgG próximas de 100 mg/g. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram bem aos dados experimentais. De acordo com a Tabela 3 a adsorção de IgG com o adsorvente QAEc nos tampões MOPS e HEPES apresentaram valores de K_D e K_{DLF} na mesma ordem de grandeza de 10^{-6} mol/L.

Figura 23. Isoterma de adsorção de IgG para o adsorvente QAEc ajustadas pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich com os tampões FS (a), MOPS (b) e HEPES (c).





Dentre as três isothermas de adsorção de IgG com QAEc, a isoterma no tampão FS destaca-se devido a elevada adsorção em baixas concentrações de IgG no meio. As quantidades adsorvidas, para essas três isothermas, foram próximas. Os modelos de ajuste proporcionaram os parâmetros de adsorção mostrados na Tabela 3. As constantes de dissociação (K_D e K_{DLF}) são uma medida da estabilidade do complexo formado entre a proteína e o adsorvente sob especificadas condições experimentais. A constante de dissociação é um parâmetro que avalia a força de ligação entre o adsorvente e a proteína e quanto menor essa constante maior a facilidade dessa proteína ser desorvida na eluição. De acordo com a Tabela 3, todas as três isothermas obtiveram parâmetros de K_D e K_{DLF} na ordem de 10^{-6} mol/L e estes valores indicaram boa afinidade do adsorvente com IgG.

Wongchuphan *et al.* (2009) ajustaram os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich aos dados experimentais para adsorção de IgG de coelho com adsorvente (*Streamline*) com Reativo Verde imobilizado. O modelo de Langmuir não proporcionou bons resultados e os autores justificaram tais resultados devido ao fato deste modelo ser restrito para sistemas homogêneos de adsorção. Em contrapartida as isothermas de Freundlich e Langmuir-Freundlich foram bem ajustadas para sistemas heterogêneos. Wongchuphan *et al.* (2009) encontraram na isoterma de Langmuir-Freundlich o melhor ajuste dos parâmetros estimados e a quantidade máxima de adsorção foi de 49,3 mg/g.

Tabela 3. Parâmetros encontrados pelo modelo de Langmuir ajustada aos dados experimentais com o adsorvente QAEc nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (6,8) à temperatura de 22 °C.

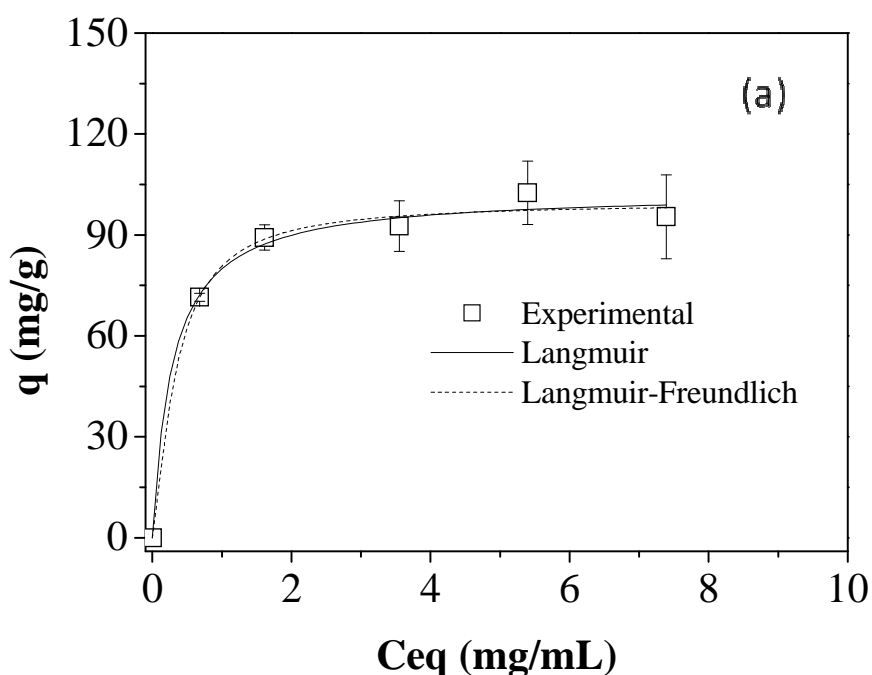
Parâmetros	Cibacron Blue (FS 25mM)		Cibacron Blue (MOPS 25mM)		Cibacron Blue (HEPES 25mM)	
	Langmuir	Langmuir- Freundlich	Langmuir	Langmuir- Freundlich	Langmuir	Langmuir- Freundlich
q_m (mg/g)	$109.2 \pm 6,3$	$99,1 \pm 1,6$	$105,9 \pm 6,4$	$114,3 \pm 32,0$	$92,3 \pm 9,0$	$85,4 \pm 15,0$
K_D ($\times 10^6 M$)	$3,20 \pm 1,2$	-	$7,48 \pm 1,65$	-	$6,92 \pm 2,59$	-
$K_{DLF}(\times 10^6 M)$	-	$1,2 \pm 0,7$	-	$8,47 \pm 4,35$	-	$5,88 \pm 2,95$
n	-	$4,86 \pm 3,29$	-	$0,84 \pm 0,42$	-	$1,22 \pm 0,63$
R^2	0,952	0,993	0,965	0,966	0,912	0,913
χ^2	73,45	13,13	37,53	42,60	72,17	81,59

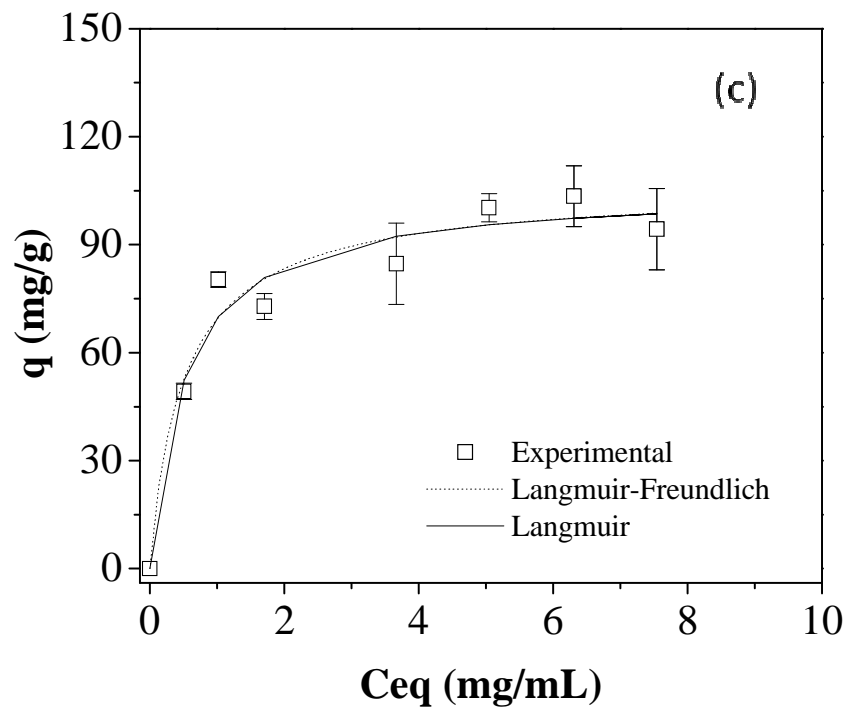
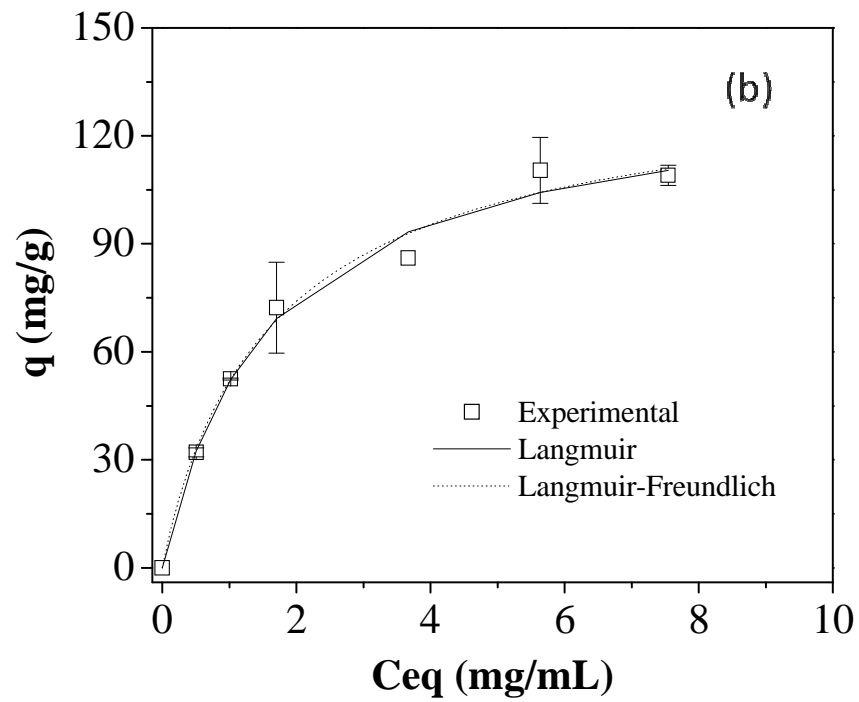
4.2.2.2 Isoterma de IgG com o adsorvente QAEv

As Figuras 24 (a, b e c) apresentam as isotermas de adsorção com o adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Reativo Verde 5 imobilizado (QAEv) nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8).

A isoterma da Figura 24a apresentou quantidade adsorvida de IgG elevada em concentrações baixas indicando uma isoterma favorável, bem característica das isotermas de Langmuir. As quantidades adsorvidas de IgG foram próximas para os dois modelos de ajuste e de acordo com a Tabela 4, os valores foram de 102,8 e 99,6 mg/g por Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente. Tais resultados experimentais proporcionaram bom R^2 , próximo da unidade, e χ^2 , entre 11 e 15. As constantes de dissociação foram na ordem de 10^{-6} mol/L indicando boa afinidade deste adsorvente para com a proteína IgG.

Figura 24. Isoterma de adsorção de IgG para o adsorvente QAEv ajustadas pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich com os tampões FS (a), MOPS (b) e HEPES (c).





A Figura 24b apresenta os resultados da adsorção de IgG no QAEv em tampão MOPS e neste verificou-se os maiores valores para quantidade adsorvida de IgG, em comparação com as isotermas com o mesmo adsorvente (QAEv) nos tampões FS (Figura 24b) e HEPES (Figura 24c). As quantidades máximas adsorvidas foram superior a 130 mg/g e as constantes de dissociação foram superiores as obtidas com HEPES e FS. O ajuste proporcionou um R^2 próximo da unidade e χ^2 , entre 20 e 25.

De acordo com a Tabela 4 os valores de quantidade adsorvida de IgG no adsorvente QAEv em tampão HEPES foram inferiores aos das isotermas com FS e MOPS. As quantidades máximas de adsorção de IgG no QAEv em tampão HEPES foram de 92,80 e 85,4 mg/g, respectivamente por Langmuir e Langmuir-Freundlich. O ajuste para essa isoterma apresentou tanto R^2 como χ^2 inferiores em comparação com as demais com o mesmo adsorvente. As constantes de dissociação foram na ordem de 10^{-6} mol/L comprovando a potencial afinidade deste adsorvente com IgG.

Dentre os três tampões estudados com o QAEv, os resultados com o tampão MOPS apresentaram elevados valores para quantidade máxima de adsorção e baixos valores de χ^2 . Porém, através da Figura 24b não foi verificado uma isoterma do tipo favorável, na forma retangular. E desta maneira não ficou evidente a estabilidade na quantidade máxima de adsorção.

Tabela 4. Parâmetros encontrados pelo modelo de Langmuir ajustada aos dados experimentais com o adsorvente QAEv nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (6,8) à temperatura de 22 °C.

Parâmetros	Reativo Verde (FS 25mM)		Reativo Verde (MOPS 25mM)		Reativo Verde (HEPES 25 mM)	
	Langmuir	Langmuir- Freundlich	Langmuir	Langmuir- Freundlich	Langmuir	Langmuir- Freundlich
q_m (mg/g)	$102,8 \pm 2,8$	$99,6 \pm 5,12$	$133,5 \pm 6,61$	$138,3 \pm 25,60$	92,80	$85,4 \pm 4,12$
K_D ($\times 10^6$ M)	$1,90 \pm 0,39$	-	$10,5 \pm 1,58$	-	$2,24 \pm 0,8$	-
$K_{DLF}(\times 10^6$ M)	-	$1,6 \pm 0,70$	-	$11,1 \pm 3,60$	-	$2,45 \pm 1,30$
n	-	$1,35 \pm 0,73$	-	$0,945 \pm 0,26$	-	$0,14 \pm 0,12$
R^2	0,994	0,994	0,990	0,990	0,957	0,971
χ^2	11,85	14,51	20,24	25,03	53,76	45,57

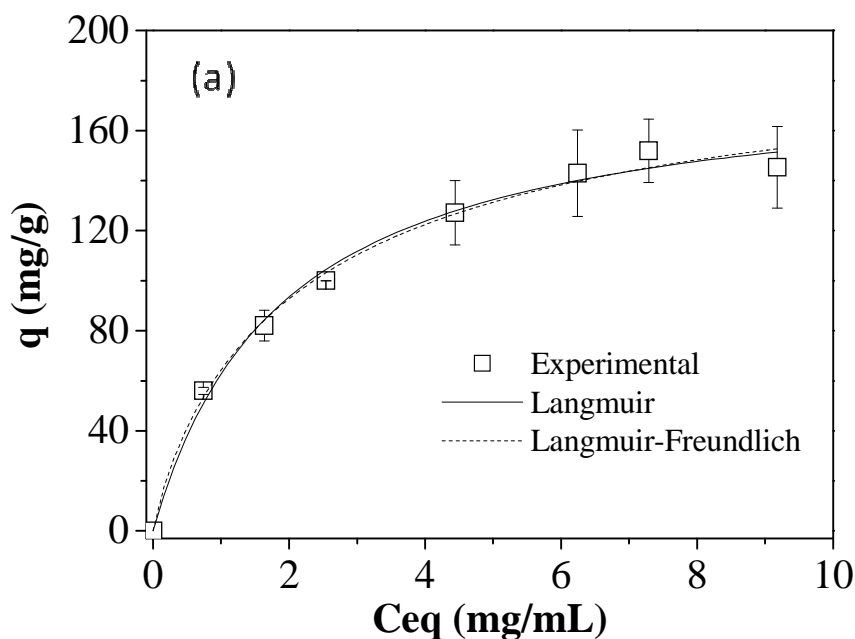
4.2.2.3 Isoterma de IgG com o adsorvente QAEa

As Figuras 25 (a, b e c) apresentam os resultados experimentais na adsorção de IgG de alta pureza com o adsorvente quitosana/alginato epoxilado com Reativo Azul imobilizado (QAEa) nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8).

Dentre os três tampões (FS, MOPS e HEPES) estudados com QAEa observou-se elevadas quantidades adsorvidas para os tampões FS e HEPES, com valores acima de 180 mg/g. A constante de dissociação do adsorvente QAEa em tampão FS foi a maior entre os tampões e apresentou valores de K_D na ordem de grandeza de 10^{-5} representando média afinidade. Essa afinidade pode ser constatada também pela Figura 25a, visto que a isoterma não foi tipo retangular.

De acordo com a Tabela 5 verificou-se que o adsorvente com QAEa em tampão FS apresentou K_D e K_{DLF} na ordem de 10^{-5} e R^2 próximos da unidade. Os valores de χ^2 apresentados proporcionam valores altos para QAEa em HEPES, no valor de 56,67 e 43,85 para Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente. Em todos os resultados com QAEa nos três tampões os R^2 foram próximo da unidade.

Figura 25. Isoterma de adsorção de IgG para o adsorvente QAEa ajustadas pelos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich com os tampões FS (a), MOPS (b) e HEPES (c).



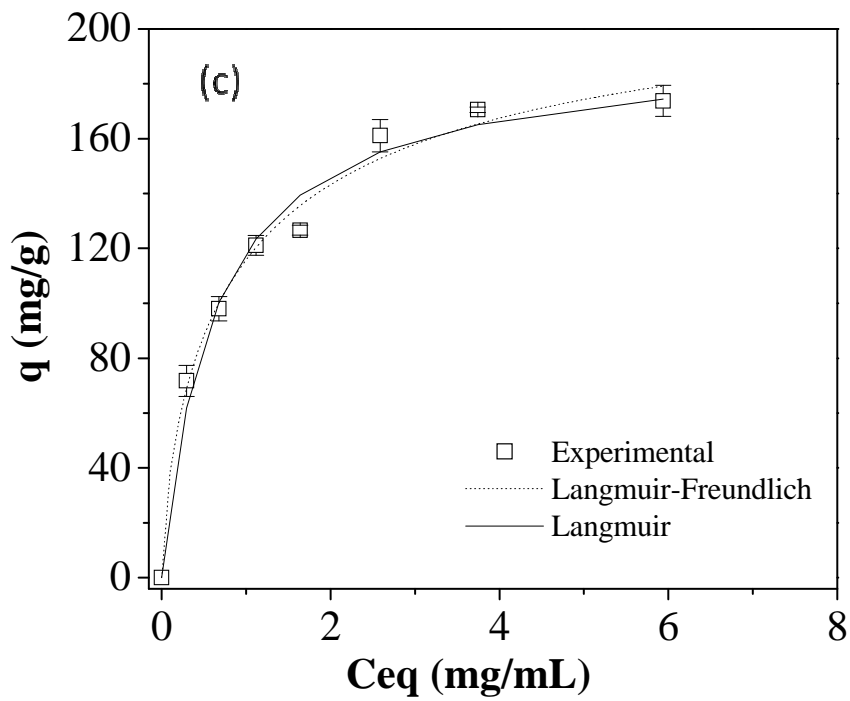
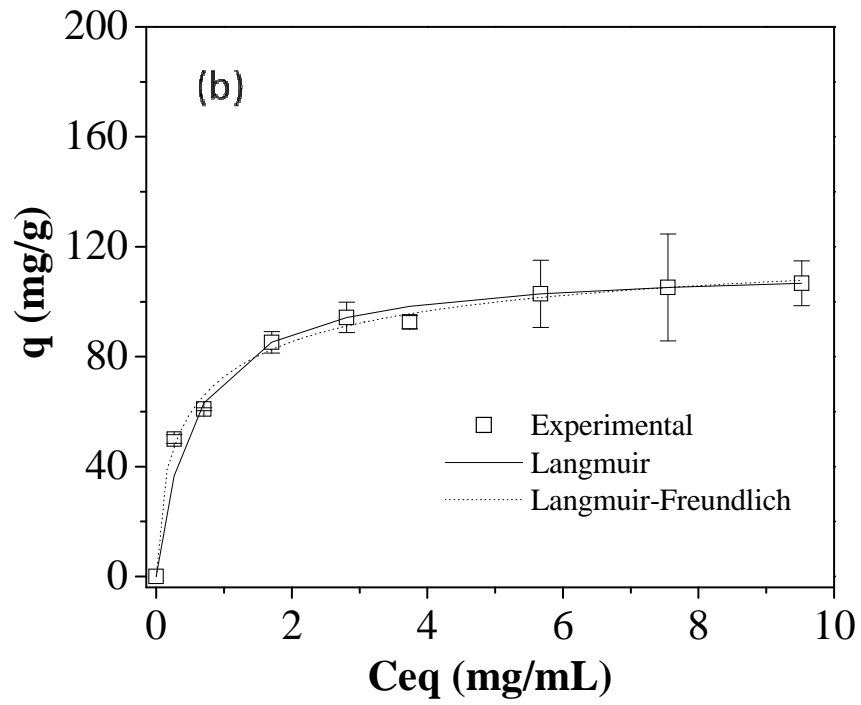


Tabela 5. Parâmetros encontrados pelo modelo de Langmuir ajustada aos dados experimentais com o adsorvente QAEa nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (6,8) à temperatura de 22 °C.

Parâmetros	Reativo Azul 4 (FS 25mM)		Reativo Azul 4 (MOPS 25mM)		Reativo Azul 4 (HEPES 25mM)	
	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Langmuir	Langmuir-Freundlich
q_m (mg/g)	$182,9 \pm 6,8$	$199, \pm 33,4$	$108,5 \pm 3,0$	$130,4 \pm 14,8$	$192,8 \pm 7,8$	$228,44 \pm$
K_D ($\times 10^6$ M)	$12,7 \pm 1,5$	-	$2,83 \pm 0,4$	-	$4,18 \pm 0,63$	-
$K_{DLF}(\times 10^6$ M)	-	$14,0 \pm 3,2$	-	$5,3 \pm 1,6$	-	$6,48 \pm 2,53$
n	-	$0,87 \pm 0,2$	-	$0,59 \pm 0,13$	-	$0,71 \pm 0,38$
R^2	0,993	0,993	0,984	0,994	0,986	0,991
χ^2	24,0	26,31	22,73	10,15	56,67	43,85

4.3 Ensaios em leito fixo com a proteína IgG de alta pureza

Os ensaios em leito fixo, com cada um dos materiais sintetizados, foram realizados com a proteínas IgG nos sistemas tamponantes (FS pH 6,0, MOPS pH 6,5 e HEPES 6,8). O volume de injeção foi de 10,0 mL com concentração de proteínas de 1,0 mg/mL e na eluição foi utilizado NaCl 1,0 M acrescido ao tampão de adsorção. Em todos os ensaios foram realizados balanços de massa, bem como a quantificação de proteínas para as etapas de alimentação, lavagem, eluição e regeneração.

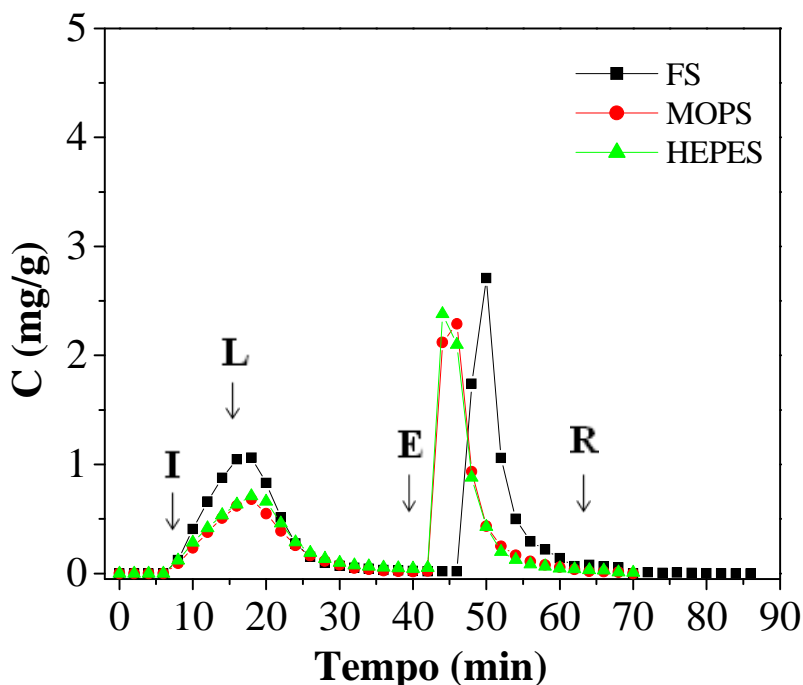
Rukenstein e Zeng (1998) relataram que para impedir qualquer desprendimento de corante durante a adsorção e eluição, o adsorvente com corantes imobilizados deveriam ser colocados em contato com uma solução de HSA (2,0 mg/mL) para que os corantes fracamente ligados fossem removidos. Devido a essas observações abordadas por Rukenstein e Zeng (1998), todas as corridas no leito fixo iniciaram primeiramente com a alimentação da proteína HSA para retiradas de corantes que por ventura ainda estivesse fracamente ligados ao compósito com corantes imobilizados mesmo após as sucessivas lavagens realizadas.

4.3.1 Ensaios com IgG e o adsorvente QAEC

A Figura 26 apresenta os resultados para a injeção de 10,0 mL de IgG na coluna empacotada com QAEC. Os ensaios com os três tampões confirmaram a capacidade do adsorvente QAEC em adsorver IgG, já que na etapa da eluição foram observados picos com elevada concentração de IgG. A quantidade adsorvida de IgG com adsorvente QAEC nos tampões FS, MOPS e HEPES foram 10,62, 10,92, 10,66 mg/g, respectivamente

O percentual de IgG adsorvida no leito com QAEC nos tampões FS, MOPS e HEPES foi superior a 50 % da massa injetada.

Figura 26. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de IgG com QAEc. Condições: Vazão de 0,8 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.



A Tabela 6 mostra o balanço de massa em todas as etapas no leito fixo com o adsorvente QAEc nos tampões FS, MOPS e HEPES. Foi verificado menor percentual de IgG retida no QAEc, no valor de 51,8 %, para o tampão FS e para os tampões HEPES e MOPS foram 54,8 e 59,4 %. Por esses valores constatou-se que o adsorvente no tampão HEPES teve afinidade por IgG superior aos outros tampões. Esses resultados confirmam o que foi discutido anteriormente no estudo do pH (Tabela 2).

De acordo com a Tabela 6 todos os balanços realizados nos experimentos cromatográficos com a proteína IgG e o adsorvente QAEc nos três tampões apresentaram erros dentro do esperado.

Tabela 6. Balanço de massa de IgG na coluna com QAEc obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões FS, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	TAMPÃO 25mM								
	FS			MOPS			HEPES		
	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b
	(mg)	(mg)		(mg)	(mg)		(mg)	(mg)	
I	10,04	0,3	100	9,21	0,04	100	8,91	0,014	100
A	1,0	0,4	9,5	1,01	0,10	11,0	1,1	0,18	12,3
L	4,1	0,4	40,6	2,46	0,06	26,6	2,74	0,25	30,8
E	5,2	0,5	51,8	5,05	0,14	54,8	5,29	0,085	59,4
R	0,1	0,01	0,8	0,42	0,09	4,5	0,04	0,007	0,4
REC	10,4		102,7	8,94		96,9	9,2		103

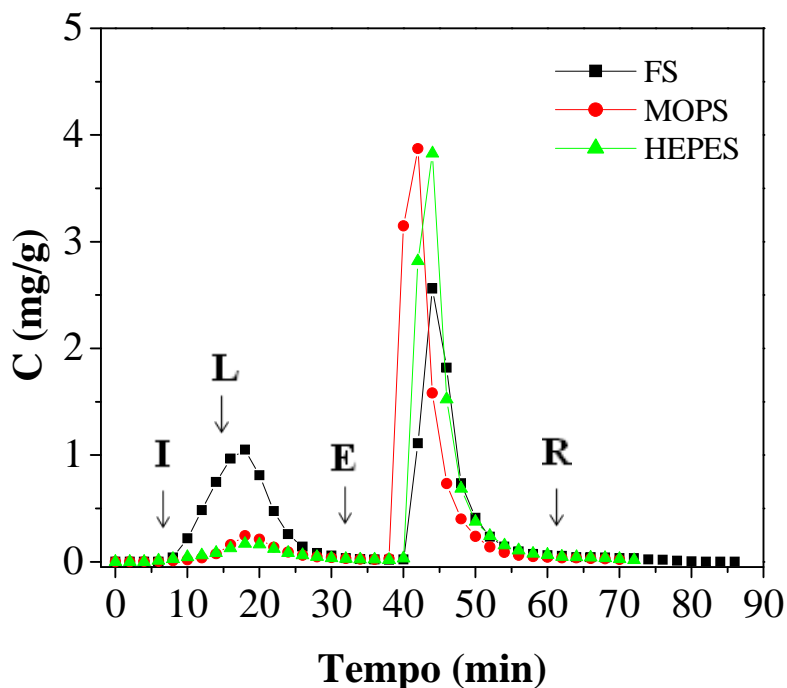
^a Proteína Total a 280 nm

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

4.3.2 Ensaios com IgG e o adsorvente QAEv

A Figura 27 mostra o cromatograma de IgG ao longo das etapas de alimentação, lavagem, eluição e regeneração com os três tampões estudados com o adsorvente QAEv. A quantidade adsorvida de IgG ao se utilizar os tampões FS, MOPS e HEPES foram de 12,18, 17,10 e 16,44 mg/g, respectivamente. Logo, verificou-se maior afinidade da IgG ao utilizar os tampões MOPS e HEPES com o adsorvente QAEv, em relação ao tampão FS. Tal afirmação se deve aos elevados valores de quantidade de proteínas adsorvidas para QAEv com os tampões MOPS e HEPES.

Figura 27. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de IgG com QAEv. Condições: Vazão de 0,8 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.



A Tabela 7 apresenta o balanço de massa para os três tampões estudados com QAEv. Destaca-se a diferença do percentual da quantidade adsorvida existente na etapa da eluição entre os tampões MOPS e HEPES com relação ao FS, visto que tanto MOPS quanto HEPES apresentaram percentual de IgG adsorvida no leito empacotado com QAEv superior a 85%, enquanto que o FS não atingiu 60%. Tais resultados estão de acordo com estudo realizado anteriormente ao se verificar a influência do tampão e pH na adsorção de IgG, a qual já indicava maior capacidade adsorvativa para os tampões MOPS e HEPES. Foi observado elevada desempenho dos tampões HEPES e MOPS com o adsorvente QAEv indicando ser um tampão potencialmente interessante para se realizar ensaios com o soro humano. Nas etapas de lavagem destacou-se a baixa presença de IgG nos cromatogramas resultado da alta adsorção de IgG.

Tabela 7. Balanço de massa de IgG na coluna com QAEv obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões FS, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	TAMPÃO 25mM								
	FS			MOPS			HEPES		
	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b
	(mg)	(mg)		(mg)	(mg)		(mg)	(mg)	
I	10,3	0,40	100	9,6	0,46	100	9,12	1,02	100
A	1,2	0,28	11,6	0,11	0	1,2	0,18	0,03	2,0
L	3,15	0,62	30,3	0,82	0,06	8,6	0,69	0,20	7,6
E	5,9	0,16	57,3	8,36	0,68	87,4	8,00	0,47	87,7
R	0,16	0,02	1,6	0,20	0,04	2,0	0,22	0,06	2,4
REC	10,4		100,8	9,49		99,2	9,09		99,7

^a Proteína Total a 280 nm

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

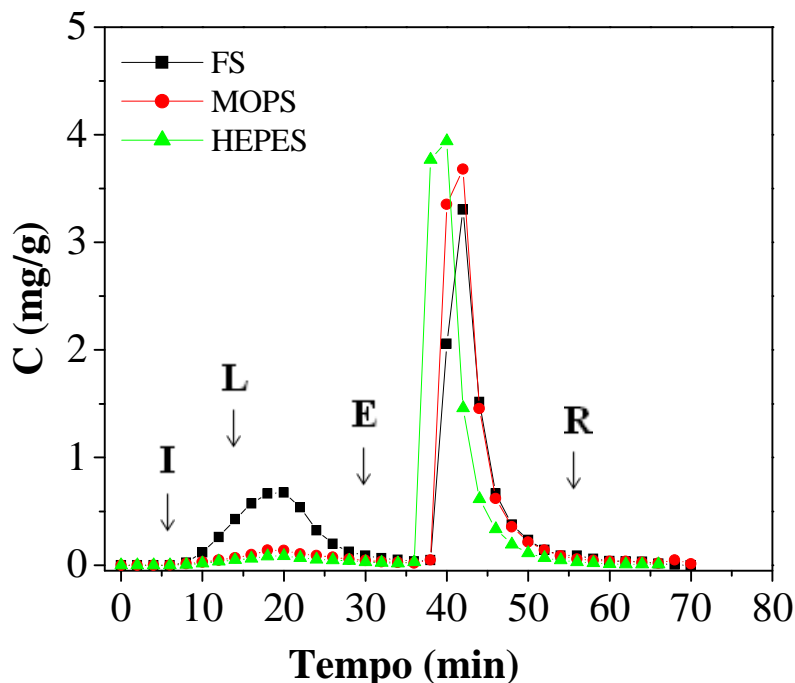
4.3.3 Ensaios com IgG e o adsorvente QAEa

A Figura 28 apresenta o cromatograma da concentração de IgG pelo tempo nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) com o adsorvente QAEa. De acordo com o pico da eluição, constatou-se que também ocorreu dessorção da proteína IgG no leito com QAEa, sendo o tampão HEPES com maior quantidade adsorvida de 17,56 mg/g, valor este superior aos obtidos com tampão FS (13,86 mg/g) e MOPS (16,56 mg/g).

A Tabela 8 mostra os resultados do adsorvente QAEa nos três tampões estudados e novamente ficou evidente a afinidade dos tampões HEPES e MOPS em relação ao FS.

Ao compararmos os resultados mostrados do adsorvente com os três corantes imobilizados no compósito em tampão FS apresentados pelas Tabelas 6, 7 e 8 verificou-se que ocorreu aumento tanto na quantidade adsorvida de IgG como no percentual que foi adsorvido no leito do adsorvente QAEa em relação ao QAEc e QAEv.

Figura 28. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de IgG com QAEa. Condições: Vazão de 0,8 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.



Foi observado alto percentual de IgG adsorvida com QAEa superior a 65 % para os três tampões. E para os tampões MOPS e HEPES os percentuais foram de 85,8 e 90,0 % de IgG adsorvida para uma injeção de 10,0 mL e 1,0 mg/mL de concentração.

Os resultados apresentados (Tabelas 6 à 8) com os três corantes imobilizados ao compósito quitosana/alginate epoxilado nos tampões estudados, verificou-se que o QAEc teve valores inferiores para a adsorção de IgG em todos os tampões. O QAEa apresentou maior quantidade adsorvida de IgG ao comparar com o QAEc e QAEv. Os ensaios em coluna dos três materiais em tampão HEPES apresentaram maior capacidade de adsorção em relação ao FS, tendo apenas valores inferiores quando se trabalhou com o adsorvente QAEv no tampão MOPS.

Tabela 8. Balanço de massa de IgG na coluna com QAEa obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões FS, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	TAMPÃO 25mM								
	FS			MOPS			HEPES		
	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b
	(mg)	(mg)		(mg)	(mg)		(mg)	(mg)	
I	10,2	0,15	100	9,16	0,15	100	9,56	0,071	100
A	0,66	0,11	6,5	0,14	0,04	0,4	0,09	0,028	0,94
L	2,56	0,25	25,1	0,63	0,21	6,9	0,39	0,11	4,1
E	6,78	0,39	65,8	7,86	0,23	85,8	8,60	0,021	90
R	0,14	0,08	1,4	0,42	0,063	4,6	0,16	0,063	1,7
REC	10,1		98,8	9,05		97,7	9,24		96,7

^a Proteína Total a 280 nm

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

4.4 Ensaios em leito fixo com Soro Humano (SH)

Após os ensaios com as proteínas IgG de alta pureza no leito fixo com os corantes imobilizados ao compósito QAE, buscou-se averiguar o real potencial desses três materiais na purificação de IgG a partir do soro humano.

A fim de determinar o volume de saturação do leito empacotado com esferas dos três adsorventes estudados variou-se o volume de injeção. Os resultados com Soro Humano diluído em FS (pH 6,0) com os volumes de injeção de 1,0 e 10 mL mostraram a não saturação do leito (resultados em anexo). Porém, com a injeção de 15,0 mL (Figuras 29) de SH diluído verificou-se a saturação, visto que a concentração na saída atingiu a concentração inicial com os três adsorventes.

Através das análises realizadas pela metodologia de Bradford, ainda não se pode afirmar quais proteínas estão sendo adsorvidas no leito. Mas observa-se claramente que o adsorvente tem potencial em adsorver proteínas, visto que foi comprovado anteriormente pelas isotermas de adsorção que a IgG fora adsorvida com elevada quantidade adsorvida nos três adsorventes. Precisam-se comprovar quais proteínas que esses adsorventes estão

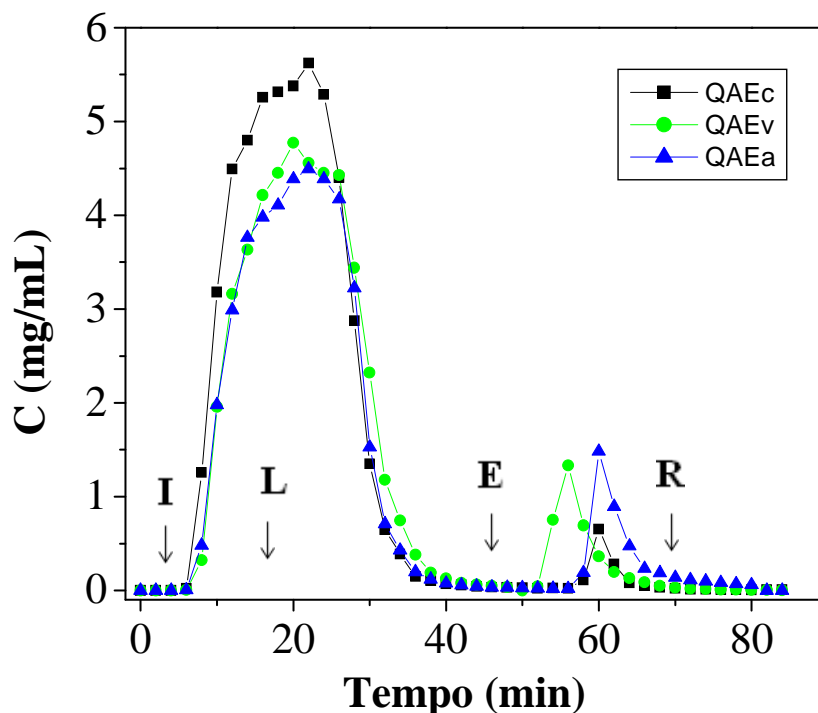
conseguindo reter no leito. Para tal análise foram realizados eletroforeses para todas essas corridas com soro humano nos tampão estudados.

A partir desses resultados procurou-se verificar a capacidade de adsorção dinâmica dos três adsorventes (QAEc, QAEv e QAEa) em purificar IgG nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8).

4.4.1 Ensaios em leito fixo com FS 25 mM

A Figura 29 apresenta a curva de *breakthrough* para o a injeção de 15,0 mL de soro humano (SH) diluído 10 vezes em tampão FS. As concentrações iniciais foram 5,56, 5,01, 4,73 mg/mL, respectivamente, para os ensaios nas mesmas condições com os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa.

Figura 29. Perfil da concentração de proteínas totais em função do tempo de ensaio com os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa com soro humano (15,0 mL) diluído 10 vezes em tampão MOPS pH 6,5. As etapas dos ensaios foram: Injeção (I), Lavagem (L), Eluição (E) e Regeneração (R)

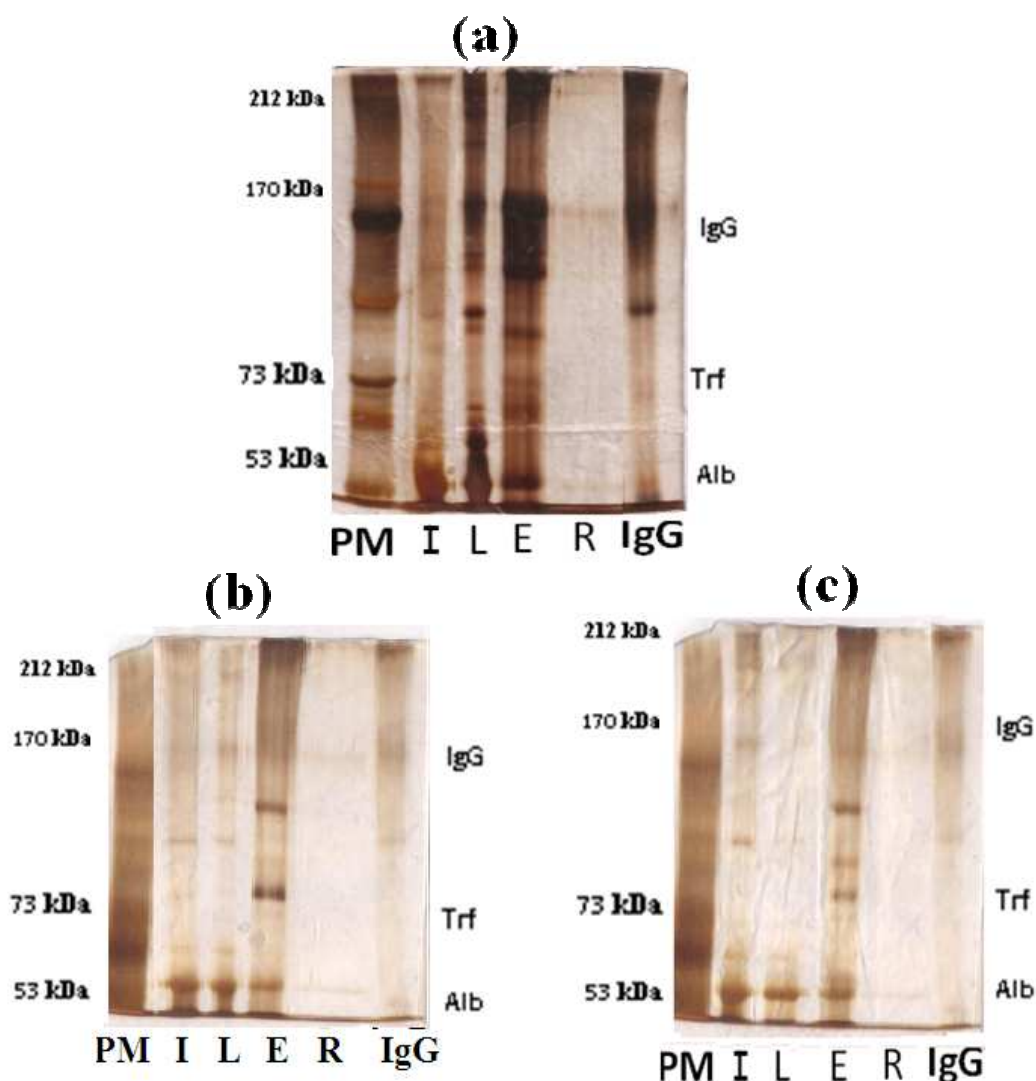


De acordo com a Figura 29 pode-se verificar um elevado pico durante a etapa de lavagem, evidenciando as proteínas do soro que não foram adsorvidas nas três fases estacionárias estudadas. Nas etapas da eluição para os três adsorventes verificou-se quantidades de proteínas adsorvidas superiores para os adsorventes QAEv e QAEa. Para o ensaio com QAEc em FS 25 mM verificou-se 2,19 mg/mg de proteínas totais adsorvidas no leite. Essa quantidade de proteínas adsorvidas representou o percentual de 2,57 % da massa de proteínas injetadas do soro humano.

Foi observado pela eletroforese do ensaio com o adsorvente QAEc (Figura 30a) que parte da IgG e a maior parte de HSA e das outras proteínas do SH encontravam-se na etapa da lavagem, indicando uma afinidade do adsorvente QAEc com IgG. E na etapa da eluição foi observado que houve adsorção de IgG, em maior quantidade, e de HSA, correspondendo a cerca de 2,61% da massa total da injeção. É possível verificar que as frações de eluição (E) tiveram um enriquecimento em termos de IgG. É importante destacar que na etapa da regeneração (R) não apareceu nenhuma proteína, demonstrando que todas as proteínas do SH foram dessorvidas.

Foi observado pela Tabela 9 na corrida com QAEv, a qual a concentração inicial do SH diluído foi de 5,01 mg/mL, que a quantidade de proteínas totais adsorvidas foram de 3,74 mg, representando 4,98 % da massa injetada. Essa quantidade de proteínas adsorvidas foi superior a obtida com QAEc nas mesmas condições. A eletroforese deste ensaio (Figura 30b) mostra que além de IgG e HSA adsorvidas apareceram traços da proteína transferrina. Logo, a quantidade de proteínas totais, mesmo possuindo valores superiores aos obtidos com o adsorvente QAEc, não foi interessante devido ao aparecimento da transferrina na eluição. Portanto, QAEv aparentou ter menor afinidade por IgG com relação ao QAEc, mesmo obtendo valor superior em quantidades totais de proteínas.

Figura 30. Eletroforeses das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão FS 25 mM com os adsorventes QAEc(a), QAEv(b), QAEa(c): Indicador de peso molar (PM), injeção (I), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG).



Avaliando o ensaio com SH e QAEa, nas mesmas condições que os anteriores, também se observou a presença da proteína transferrina na eletroforese apresentada pela Figura 30c, e não foi evidenciado tal proteína (transferrina) no ensaio com QAEc (Figura 30a). Na corrida com QAEa a quantidade adsorvida de proteínas totais foram de 5,12 mg. Essa quantidade de proteínas adsorvidas foi superior as obtidas com os outros dois adsorventes nessas mesmas condições. Apesar, de esta quantidade possuir valores superiores aos outros adsorventes, foi identificado à presença não só de IgG na eluição, mas também de transferrina e HSA.

A Tabela 9 apresenta os balanços realizados para os três ensaios com os adsorventes estudados. O percentual de massa na alimentação variou de 68,8 mg (QAEc) à 81,88 mg (QAEa). A partir dos dados apresentados na Tabela 9, verificou-se que em todos os ensaios com SH a etapa da regeneração não apresentou significativo aparecimento de proteínas, constatando que todas as proteínas foram dessorvidas na eluição com NaCl acrescido ao tampão FS 25 mM.

Partindo do mesmo volume de injeção de 15,0 mL de SH em FS 25 mM, apresentados na Tabela 9, o QAEa apresentou maior percentual de utilização do leito para adsorção de proteínas, porém com afinidade para IgG inferior em relação ao QAEc, como discutido anteriormente. Desta forma, o QAEc apresentou maior afinidade em adsorver a proteína IgG do soro humano, visto que possuiu menor presença de HSA e ausência de outras proteínas na eletroforese. Desta forma o QAEc foi adsorvente que apresentou melhores resultados para possível purificação de IgG.

Tabela 9. Balanço de massa na coluna com QAEc, QAEv e QAEa nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão FS 25 mM e pH 6,5 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	Soro Humano em FS 25mM					
	QAEc		QAEv		QAEa	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
I	83,42	100,0	75,14	100,0	70,95	100,0
A	56,53	67,80	48,64	64,70	41,89	59,04
L	24,75	29,70	23,27	31,0	24,05	33,90
E	2,14	2,57	3,71	4,94	4,99	7,04
R	0,05	0,06	0,03	0,04	0,13	0,18
REC	83,47	100,13	75,65	100,7	71,06	100,16

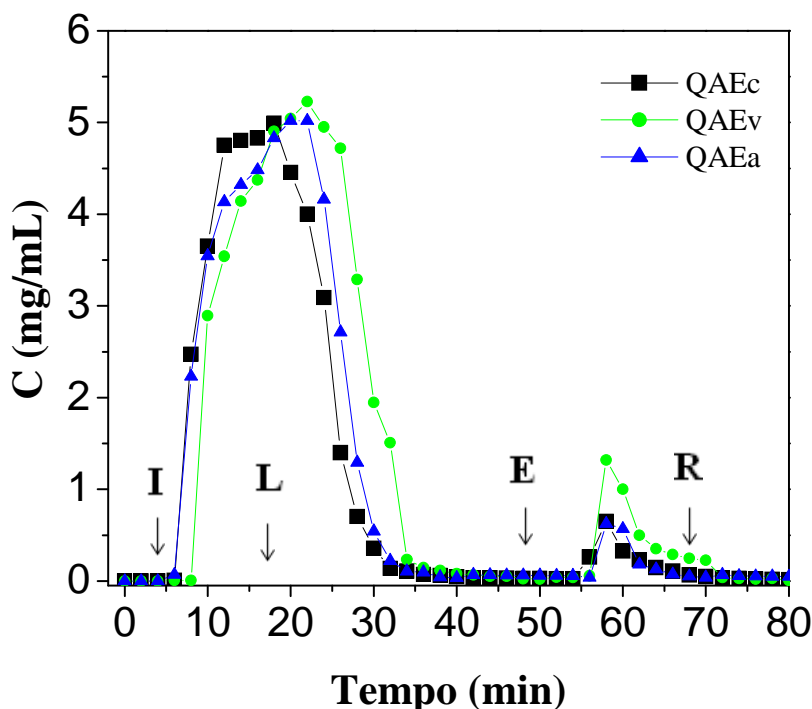
^a Proteína Total quantificada por Bradford, 1976

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

4.4.2 Ensaios em leito fixo com MOPS 25 mM

As concentrações iniciais foram, 4,56, 5,46 e 4,99 mg/mL, respectivamente para os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa. A massa de injeção alimentada variou de 68 à 82 mg de proteínas totais para o mesmo volume de injeção. Pela figura 30 foi observado picos na etapa da eluição, em torno de 60 min, caracterizando as proteínas do soro humano adsorvidas no leito fixo com as fases estacionárias (QAEc, QAEv e QAEa). A maior quantidade de proteínas totais adsorvidas foi para o adsorvente QAEv (6,77 mg/mL) quando comparado com o QAEc (3,32 mg/mL) e QAEa (3,62 mg/mL). Vale ressaltar que a corrida com QAEv iniciou-se com maior concentração na injeção do SH. Entretanto, o pico da eluição proporcionado com QAEv foi bem superior aos outros dois adsorventes com o mesmo tampão.

Figura 31. Perfil da concentração de proteínas totais em função do tempo de ensaio com os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa com soro humano (15,0 mL) diluído 10 vezes em tampão MOPS pH 6,5. As etapas dos ensaios foram: Injeção (I), Lavagem (L), Eluição (E) e Regeneração (R).

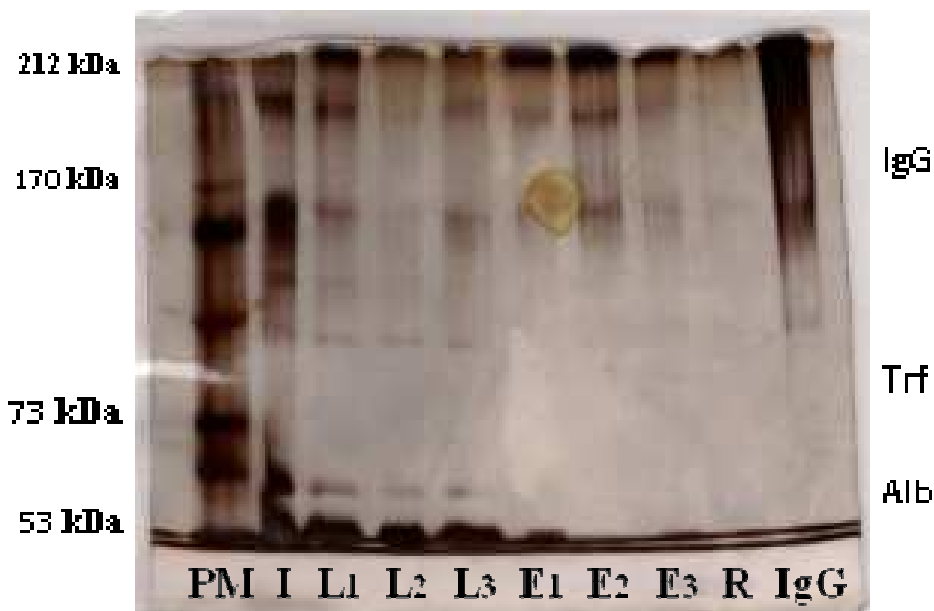


A Figura 32 apresenta os resultados da análise qualitativa referente aos ensaios com soro humano diluído em tampão MOPS (pH 6,5) com os três adsorventes (QAEc, QAEv

e QAEa). As bandas (Figura 32) foram denominadas da seguinte forma: indicador de massa molar (PM), injeção (I), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R) e padrão de IgG (IgG). Os números indicativos 1, 2 e 3 que acompanham as lavagens (L) e eluição (E) denotam, respectivamente, Cibacron (1), Reativo Verde (2) e Reativo Azul (3).

Foram analisadas apenas as amostras que apresentaram maior concentração de cada uma das etapas. E para cada etapa analisou-se uma amostra com a mistura das amostras de maior concentração. Verificou-se pela eletroforese da Figura 32 a presença de diversas proteínas na etapa da lavagem (L₁, L₂, L₃), fato normal, devido ao soro conter inúmeras proteínas de concentração variável. É possível verificar que na dessorção (E₁, E₂, E₃) foi possível observar que IgG estava aparecendo com relativa pureza, visto que não foi observado nenhuma outra contaminação (proteína). Novamente, na etapa da regeneração, não foi evidenciado pela eletroforese nenhuma contaminação. E o adsorvente foi reutilizado em sucessivos ensaios sem perda significativa da capacidade de adsorção.

Figura 32. Eletroforese das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão MOPS 25 mM com os adsorventes QAEc(1), QAEv(2), QAEa(3): Indicador de peso molar (PM), injeção (15,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG).



A Tabela 10 apresenta os valores encontrados através do balanço de massa ocorrido com os três adsorventes em tampão MOPS (pH 6,5). A concentração de proteínas

totais foi analisada por Bradford e as concentrações iniciais foram em torno de 5,0 mg/mL. Estes ensaios proporcionaram uma quantidade inicial de proteínas totais (PT) entre 68,45 e 74,88 mg, de acordo com a Tabela 10. Todos os balanços de massa foram satisfatórios, visto que apresentaram variação relativamente baixa. O adsorvente QAEv apresentou melhores resultados para adsorção de proteínas do SH e apresentou cerca de 6,66 mg de proteínas adsorvidas, representando 8,13 % da massa injetada na alimentação. Para os adsorventes QAEc e QAEv a quantidade de proteínas adsorvidas foram próximas e no valor de 3,19 e 3,62 mg, respectivamente para QAEc e QAEv.

Tabela 10. Balanço de massa na coluna com QAEc, QAEv e QAEa nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão MOPS 25 mM e pH 6,5 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	Soro Humano em tampão MOPS 25mM					
	QAEc		QAEv		QAEa	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
I	68,45	100,0	81,88	100,0	74,88	100,0
A	47,94	70,0	39,86	48,7	45,82	61,19
L	16,22	23,69	35,89	43,83	23,28	31,09
E	3,16	4,62	6,66	8,13	3,20	4,28
R	0,13	0,18	0,11	0,14	0,42	0,56
REC	67,45	98,49	82,52	100,8	72,72	97,12

^a Proteína Total quantificada por Bradford, 1976

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

4.4.3 Ensaios em leito fixo com HEPES 25 mM

A Figura 33 apresenta as corridas com os três adsorventes em tampão HEPES (pH 6,8) e o tempo decorrido para cada etapa. As concentrações iniciais do soro diluído foram 5,18, 4,56 e 4,72 mg/ mL com os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa, respectivamente. As quantidades de proteínas adsorvidas foram próximas para os três materiais, porém com

destaque maior para o QAEv. Este adsorvente apresentou pico de maior concentração de 0,84 mg/mL, enquanto que o QAEc e QAEa apresentaram pico de maior concentração de 0,61 e 0,70 mg/mL, respectivamente.

A eletroforese apresentada pela Figura 34 mostra a presença de IgG nas amostras das eluições para o Cibacron e para o Reativo Verde 5. Fica bem evidente a presença de IgG com o adsorvente QAEc (E_1), enquanto que aparece fracamente com o QAEv. Importante salientar a não presença de outras proteínas do soro humano. Na regeneração foi novamente observado a ausência total de proteínas e ou contaminantes. Para este material, bem como para os outros dois materiais, foi constatado a mesma característica favorável quanto a reutilização do leito sem perdas na capacidade de adsorção.

Figura 33. Perfil da concentração de proteínas totais em função do tempo de ensaio com o adsorvente QAEc, QAEv e QAEa e soro humano (15,0 mL) diluído 10 vezes em tampão HEPES pH 6,8. As etapas dos ensaios foram: Injeção (I), Lavagem (L), Eluição (E) e Regeneração (R).

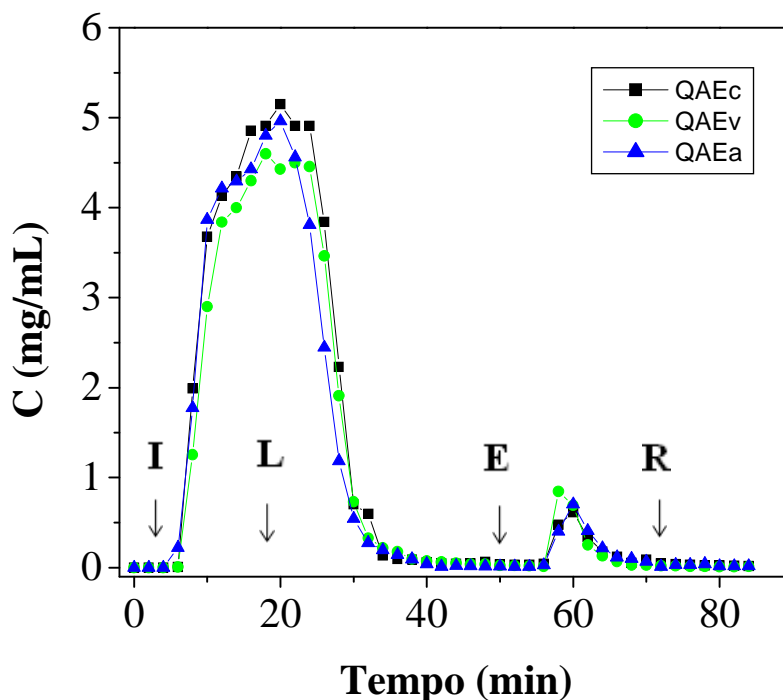


Figura 34. Eletroforese das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão HEPES 25 mM com os adsorventes QAEc(1), QAEv(2), QAEa(3): Indicador de peso molar (PM), injeção (15,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG).



A Tabela 11 apresenta o balanço de massa com todos os três adsorventes e soro humano diluído em tampão HEPES (pH 6,8). As massas de injeção na alimentação foram de 77,69, 70,86 e 68,45 mg, para os adsorventes QAEc, QAEv e QAEa, respectivamente. Os maiores percentuais de proteínas totais aparecem nas etapas de alimentação e lavagem. O percentual de proteínas adsorvidas no leito foram similares para os três adsorventes. O balanço de massa para todos os materiais foram satisfatórios, visto que foram próximos de 100 %. As explicações mais realistas para entender a diferença entre a massa inicial e a final seriam as eventuais perdas (mínimas) de amostras, ou a dificuldade em manter uma vazão plenamente constante.

Tabela 11. Balanço de massa na coluna com QAEc, QAEv e QAEa nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão HEPES 25 mM e pH 6,5 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	Soro Humano em tampão HEPES 25mM					
	QAEc		QAEv		QAEa	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
I	77,69	100,0	70,86	100,0	68,45	100,0
A	46,53	59,89	45,71	64,52	37,06	54,14
L	28,46	36,63	21,39	30,19	25,98	37,95
E	3,32	4,28	3,41	4,82	3,46	5,06
R	0,21	0,27	0,22	0,31	0,10	0,15
REC	78,52	101,07	70,73	99,84	66,6	97,30

^a Proteína Total quantificada por Bradford, 1976

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

5. CONCLUSÕES

Os corantes foram imobilizados satisfatoriamente ao compósito quitosana/alginato epoxilado não foi evidenciado desprendimento dos corantes.

Os tampões que apresentaram melhores resultados para adsorção de IgG em batelada para os três materiais foram o MOPS (pH 6,5) e o HEPES (pH 6,8).

Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram aos dados experimentais com boa aproximação. As quantidades máximas de IgG adsorvida foram próximas a 100 mg de IgG/g de adsorvente para os três materiais com os tampões estudados. Com destaque para os resultados com QAEa nos tampões HEPES e MOPS que apresentaram quantidade adsorptivas superiores a 180 mg/g.

Nos ensaios em leito fixo com IgG de alta pureza foi observado o potencial dos três adsorvente em adsorver IgG. E os melhores resultados de adsorção de IgG foram em tampão HEPES apresentando percentual de IgG retidas na fase estacionária acima de 80 % da massa injetada.

Para os ensaios com soro humano diluído nos tampões FS, MOPS e HEPES verificou-se que:

- A saturação do leito ocorreu com a injeção de 15,0 mL de soro humano diluído dez vezes (concentração próxima de 5,0 mg/mL);
- Os três materiais apresentaram potencial para purificar IgG do soro humano e foi observado quantidades de proteínas totais adsorvidas superior para os tampões MOPS e HEPES. As eletroforeses indicaram a presença de frações possivelmente puras de IgG humana para os tampões MOPS e HEPES.

Através desse estudo com os três materiais adsorventes imobilizados com corantes reativos pode-se utilizar esses adsorventes sintetizados satisfatoriamente para a purificação de IgG humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3ed. Rio de Janeiro: Revinter. p. 486, 2000.

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. **Improving the properties of chitosan as suport the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin**. *Biomacromolecules* v. 9, p. 2170-2179, 2008.

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

ALMEIDA, C. A. P.; DEBACHER, N. A.; DOWNS, A. J.; COTTET, L.; MELLO, C. A. D. **Removal of methylene blue from colored effluents by adsorption on montmorillonite clay**. *Journal Colloid Interface Science*. v. 332, p. 46–53, 2009.

BAYRAMOGLU, G.; KAYA, B.; ARICA, M. Y. **Procion brown MX-5BR attached and lewis metals ion-immobilized poly (hydroxyethyl methacrylate)/chitosan IPNs membranes: their lysozyme adsorption equilibria and kinetics characterization.** *Chemical Engineering Science*. v. 57, p. 2323-2334, 2002.

BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, M. Y. **Affinity dye–ligand poly(hydroxyethyl methacrylate)/chitosan composite membrane for adsorption lysozyme and kinetic properties.** *Biochemical Engineering Journal*. v. 13, p. 35–42, 2003

BAYRAMOGLU, G.; YAÇIN, 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 measurement.** *Biochemical Engineering Journal*. V. 26, p. 12-21, 2005.

BAYRAMOGLU^a, G.; SENEL, A. U.; ARICA, M. A. **Adsorption of IgG on spacer-arm and l-arginine ligand attached poly (GMA/MMA/EGDMA).** *Journal Applied Polymer Science*. v. 104, p. 672-679, 2007.

BAYRAMOGLU^b, G.; H. 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 (2), p. 147-155, 2007.

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

BRESOLIN, I. T.; SOUSA, M. C. M.; BUENO, S. M. A. **A new process of IgG purification by negative chromatography: adsorption aspcts of human serum proteins onto ω -aminodecyl-agarose.** *Journal of Chromatography. B*, v. 878, p. 2087-2093, 2010.

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

BURTON, S. J.; MCLOUGHLIN, S. B.; STEAD, C. V.; LOWE, C. R. **Design and applications of biomimetic anthraquinone dyes.** *Journal Chromatography.* v. 435, p. 127-137, 1988.

CARTER, D. C.; HO, J. X. **Em *Advances in Protein Chemistry*.** Academic Press: Huntsville/Alabama, v. 45, 1994.

CLONIS, Y. D. Matrix evaluation for preparative high performance affinity chromatography. *Journal chromatography.* v. 407, p. 179-187, 1986.

CLONIS, Y. D.; ATINKSON, T.; BRUTON, C. J.; LOWE, C. R. **Reactive dyes in protein and enzyme technology.** London: Stockton press, 1987.

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

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, p. 360-366, 1999.

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

FUNDUENANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. **Physicochemical characterization of Ca-alginate microparticles produced by different methods.** *Biomaterials.* v.20, p.1427-1435, 1999.

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

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

GALAEV, GARG e MATTIASSON. *Journal of Chromatography A*. v. 684, p. 45, 1994;

GOEL A, KUNNUMAKKARA B.A; AGGARWAL B. B. **Curcumin as “Curecumin” from kitchen to clinic (commentary)**. *Biochemichal Pharmacol*, v. 75, p. 787-809, 2008.

GHOSH, D.; BHATTACHARYYA, K.G. **Adsorption of methylene blue on kaolinite**. *Applied Clay Science*. v. 20, p. 295–300, 2002.

GOODMAN, J. W. **Immunoglobulin structure and function**. In: STITES, D. P., TERR, A. I. eds. *Basic and clinical immunology*. 7 ed. Norwalk: Appleton & Lange. p. 109-121, 1991.

KENNEDY, J.; GRITHS, A.; ATKINS, D. **The application of hydrocolloy: recent developments, future trends**. *Proc. Int. Conf. Gums Stab. Food Ind. Appl. Hydrocolloý*, p. 417–55, 1984.

HAMEED, B.H.; MAHMOUD, D.K.; AHMAD, A.L. **Equilibrium modeling and kinetic studies on the adsorption of basic dye by a low-cost adsorbent: coconut (Cocos nucifera) bunch waste**. *J. Hazard. Mater*. v. 158, p. 65–72, 2008.

HAHN, A. **Sangue Bom**. *Química e Derivados*. p. 10-14, setembro, 2004.

HEMODERIVADOS, ANBIO. **Associação Nacional de Biossegurança**. Disponível em: www.anbio.org.br/pdf/2/tr07_hemoderivados.pdf, acessado em abril de 2012.

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

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

HOVEN, V. P.; TANGPASUTHADOL, V.; ANGKITPAIBOON, Y.; VALLAPA, N.; KIATKAMJORNWONG, S. **Surface'charged chitosan: Preparation and protein adsorption.** *Carbohydrate polymers.* v. 68, p. 44-53, 2007.

ILLUM, L.; WATTS, P.; FISHER, A.N.; HINCHCLIFFE, M.; NORBURY, H.; JABBALGILL, L.; NANKERVIS, R.; DAVIS, S. S. **Intranasal delivery of morphine,** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* v. 301, p. 391-400, 2002.

JINZENJI, D. **Desenvolvimento de processo cromatográfico para purificação de fator VIII humano. Emprego de anticorpos contra fragmentos específicos da proteína na avaliação da pureza e estabilidade durante as etapas de purificação.** São Paulo: Programa de pós-graduação interunidades em biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual de São Paulo, 2008, s.n. Dissertação (mestrado).

KAS, H.S. **Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems.** *Journal of Microencapsulation.* v. 14 (6), p. 689-711, 1997.

KRAJEWSKA, B. *Separatio and purification Technology.* v. 49(9), p. 2321-2327, 2008.

KUMAR, S.; DALVI, D. B.; MOORTHY, M.; KORDE, S. S.; FONDEKAR, K. P.; SAHASRABUDHE, S. D.; SCHACHT, H. T.; EKKUNDI, V. S.; HALIK, C.; CHOUDHURY, R., KUMAR, A.; PUNEKAR, N. S. **Discriminatory protein binding by a library of 96 new affinity resins: A novel dye-affinity chromatography tool-kit.** *Journal of Chromatography.* v. 877, p. 3610-1318, 2009.

LABROU, A.; KARAGUNI, N. E.; CLONIS, Y. D. *Biothechnology and Bioeneeneering.* v. 279, p. 48, 1995.

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

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P. e GRØNDAHL, L. **Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS.** *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LI, P.; DAI, Y.-N.; ZHANG, J.-P.; WANG, A.-Q. e WEI, Q. **Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for Nifedipine.** *International journal of Biomedical Science*, v. 4, p. 221-228, 2008.

LI, Z.; RAMAY, H.R.; HAUCH, K.D.; XIAO, D., e ZHANG, M. **Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering.** *Biomaterials*, v. 26, p. 3919-3928.

LOPES, E. C. N.; ARODI, C. **Scantest e caracterização de quitosana modificada com cloreto cianúrico e etilenodiamina.** *30º reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2007.

MALESU, V.K.; SAHOO, D. e NAYAK, P. L. **Chitosan-sodium alginate nanocomposites blended with Cloisite 30b as a novel drug delivery system for anticancer drug Curcumin.** *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, v. 2, p. 402-411, 2011.

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

MCLACHLAN, J. **Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization.** *Plant Soil Sci., Scandinavica*, v.89, p. 137-57, 1985.

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

ODABAŞI, M.; DENIZLI, A. **Cibacron Blue F#GA-attached magnetic poly (2-hidroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption.** *Polymer International*. v. 53, p. 332-338, 2004.

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

PENHA, T. R. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti Fragmento fc de IgG de bovino.** Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-graduação em Processos Biotecnológicos, Dissertação de Mestrado, Parana – PR, 2007.

RAPOSO, F.; DE LA RUBIA, M.A.; BORJA, R. **Methylene blue number as useful indicator to evaluate the adsorptive capacity of granular activated carbon in batch mode: influence of adsorbate/adsorbent mass ratio and particle size.** *Journal Hazard. Materials*. v. 165, p. 291–299, 2009.

RODRIGUES, E. C. **Estudo de adsorção de celulase e albumina de soro bovino utilizando microesferas de quitosana/alginato quimicamente modificadas com epícloridrina.** Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Dissertação de Mestrado, Fortaleza – CE, 2010.

ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. **Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification.** *Biotechnology progress*, v. 20, p. 639-654, 2004.

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

SCHÄRER, C. Good practice in plasma collection and fractionation. *ISBT Science Series*, v. 5, p. 95-98, 2010.

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

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

SOUZA, M. C. M. **Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose.** Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Dissertação de Mestrado, São Paulo – SP, 2009.

SOUZA, M. C. M.; BRESOLIN, I. T. L.; BUENO, S. M. A. **Purification of human IgG negative chromatography on ω -aminohexyl-agarose.** *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 557- 566, 2010.

SREEJAYAN RAO M. N. **Nitric oxide scavenging by curcuminoids.** *Journal Pharmaceutical Pharmacol*, v. 49, p. 105-7, 1997.

TORRES, M. A.; BEPPU, M. M. e SANTANA, C. C. **Characterization of chemically modified chitosan microspheres as adsorbents using standard proteins (Bovine Serun Albumin and Lisozyme).** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. v. 24 (3), p. 325-336, 2007.

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

VLUG, A.; VAN REMORTEL, P. **The structure and function of human IgG subclasses.** *American Clinical Laboratory*. v. 8, p. 28-36, 1989.

WORDELL, C. J. **Use of intravenous immune globulin therapy: na overview.** DICP, Ann. Pharmacother, Cincinnati. v. 25, p. 805-817, 1991.

WONGCHUPHAN, R., TEY, T. B., 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, p. 232-238, 2009.

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

YAVUZ, H., AKGÖL, S., SAY, R., DENIZLI, A. **Affinity Separation of Immunoglobulin G Subclasses on Dye Attached poly (hydroxypropyl methacrylate) beads.** *International Journal Biological Macromolelcules*. v. 39, p. 303-309, 2006.

VELTEN, F.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. **The effect of alginate and hyaluronate on the viability and function of immuno isolated neonatal rat islets.** *Biomaterials*, v.20, p.2161- 2167. 1999.

ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. **Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption.** *Journal of Membrane Science*. v. 117, p. 271-278, 1996.

ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. **Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres.** *Reactive and Functional Polymers, Amsterdam*, v. 66, p. 712-719, 2006.

APÊNDICE A

Ensaio iniciais em leito fixo com os adsorventes QAEc, QAEv, QAEa na adsorção de HSA, nos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8).

Figura 35. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de HSA com QAEc. Condições: Vazão de 0,78 ml/min, concentração de HSA de 1,0 mg/mL.

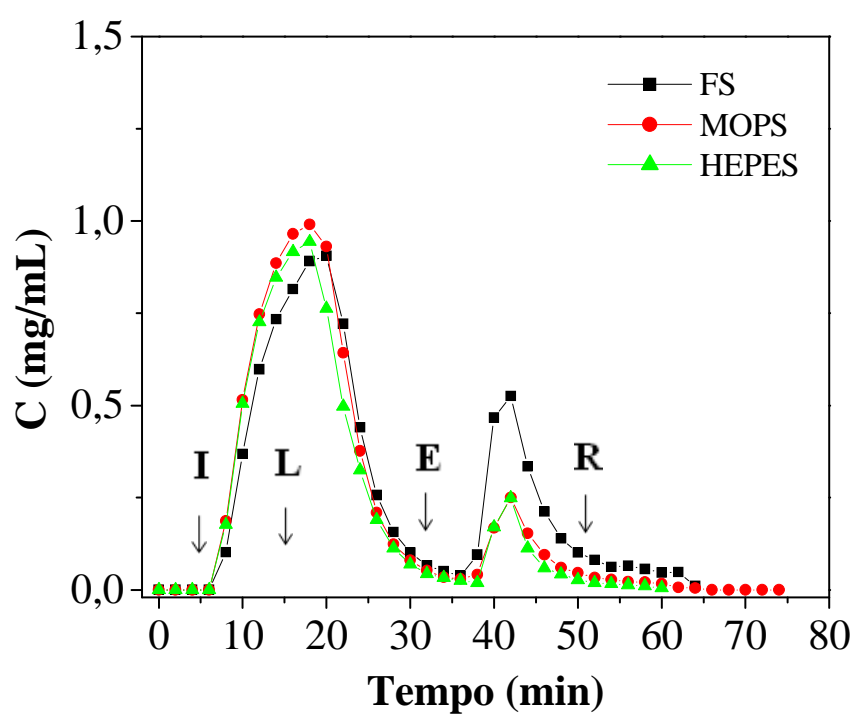


Tabela 12. Balanço de massa de HSA na coluna com QAEc obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões FS, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	TAMPÃO 25mM								
	FOSFATO SÓDIO			MOPS			HEPES		
	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b
	(mg)	(mg)		(mg)	(mg)		(mg)	(mg)	
I	10,2	-	100	9,72	0,20	100	10,0	0,12	100
A	2,8	0,02	27,4	3,6	0,16	37,0	3,52	0,05	35,2
L	6,6	0,23	64,7	6,9	0,25	71,0	6,04	0,12	60,4
E	3,2	0,45	31,4	1,8	0,36	18,5	1,51	0,22	15,1
R	0,4	0,11	3,9	0,33	0,1	3,4	0,23	0,09	2,3
REC	13,1		127,4	12,6		130	11,3		113

^a Proteína Total a 280 nm

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

Figura 36. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,7) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de HSA com QAEv. Condições: Vazão de 0,78 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.

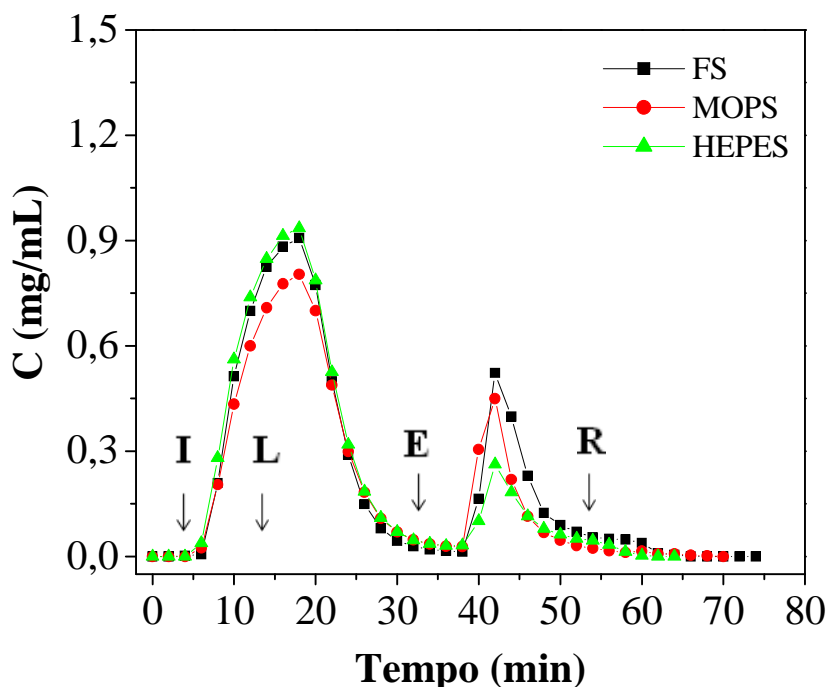


Tabela 13. Balanço de massa de HSA na coluna com QAEv obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões fosfato de sódio, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	TAMPÃO 25mM								
	FS			MOPS			HEPES		
	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b
	(mg)	(mg)		(mg)	(mg)		(mg)	(mg)	
I	10,5	0,21	100	10,03	0,1	100	10,4	0,03	100
A	3,42	0,33	32,7	3,08	0,24	30,7	4,52	1,04	43,3
L	5,56	0,95	53,1	5,42	0,24	54	5,44	0,28	52,3
E	2,56	0,54	24,4	2,02	0,3	20,1	1,36	0,56	13,1
R	0,27	0,06	2,6	0,18	0,08	0,78	0,1	0,14	0,96
REC	11,8		112,8			106	11,4		109

^a Proteína Total a 280 nm

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

Figura 37. Efeito da variação dos tampões FS (pH 6,0), MOPS (pH 6,7) e HEPES (pH 6,8) na adsorção de HSA com QAEa. Condições: Vazão de 0,78 ml/min, concentração de IgG de 1,0 mg/mL.

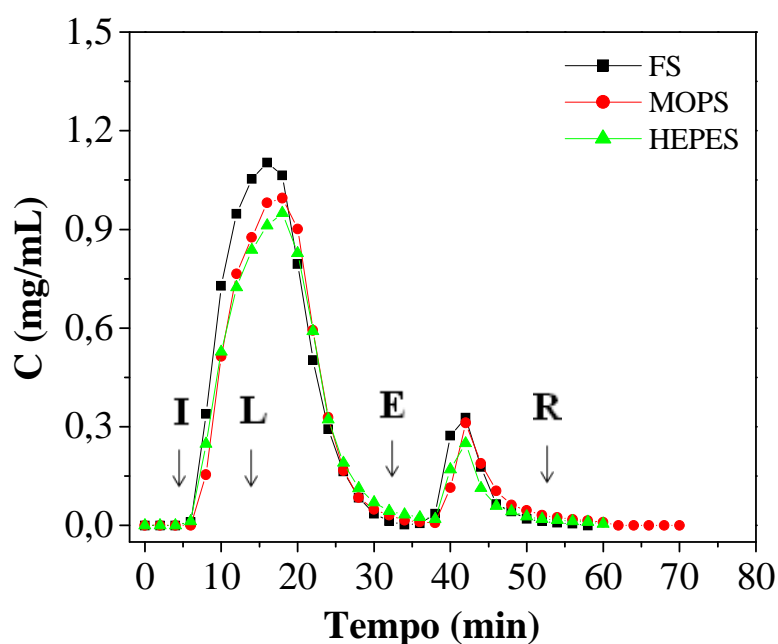


Tabela 14. Balanço de massa de HSA na coluna com QAEa obtida na injeção (I) e nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) com os tampões FS, MOPS e HEPES e força iônica de 25 mM e o total de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	TAMPÃO 25mM								
	FS			MOPS			HEPES		
	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b	PT ^a	ERRO	% ^b
	(mg)	(mg)		(mg)	(mg)		(mg)	(mg)	
I	10,5	0,11	100	10,1	-	100	9,84	0,08	100
A	4,8	0,27	45,7	3,6	0,16	35,6	3,7	0,03	37,3
L	6,32	0,63	60,2	6,4	0,56	63,4	6,3	0,18	63,7
E	1,48	0	14	1,3	0,53	12,9	1,2	0,28	11,7
R	0,04	0,06	0,4	0,15	0,11	1,5	0,1	0,06	1,0
REC	12,6		120			113	11,2		114

^a Proteína Total a 280 nm

^b Percentual de massa obtida em cada etapa

APÊNDICE B

Ensaio em leito fixo com soro humano (SH) diluído 10 x com o adsorvente QAEc no tampão FS (pH 6,0) 25 mM. Os volumes de alimentação foram 1,0 e 10,0 mL.

Figura 38. Cromatograma e eletroforese das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão FS 25 mM com QAEc: Indicador de alto peso molar (PM), injeção (1,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG).

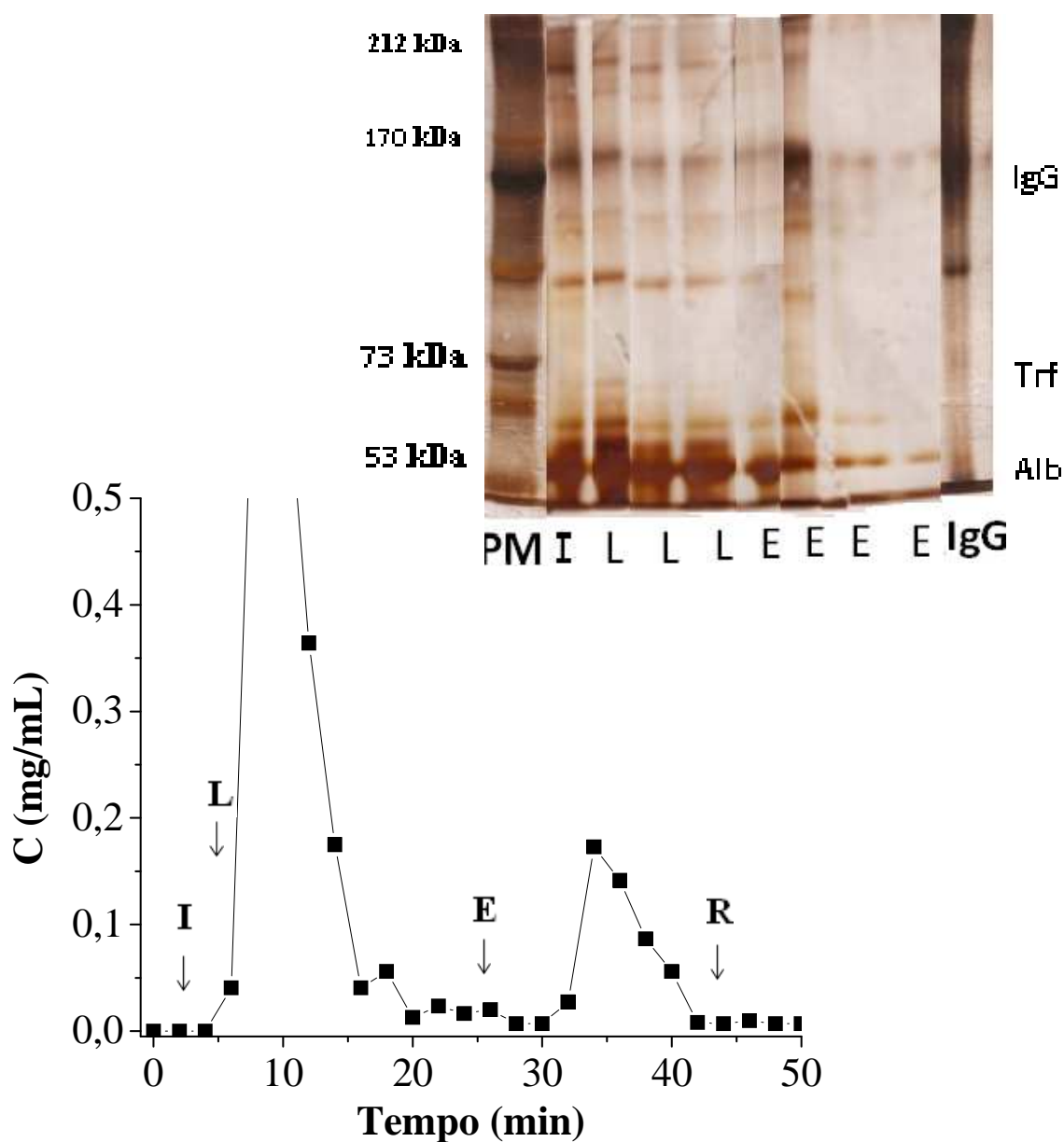


Figura 39. Cromatograma e eletroforese das amostras com SH diluído 10 vezes em tampão fosfato de sódio 25 mM com QAEc: Indicador de alto peso molar (PM), injeção (10,0 mL), lavagem (L), eluição (E), regeneração (R), indicador de IgG com alto grau de pureza (IgG).

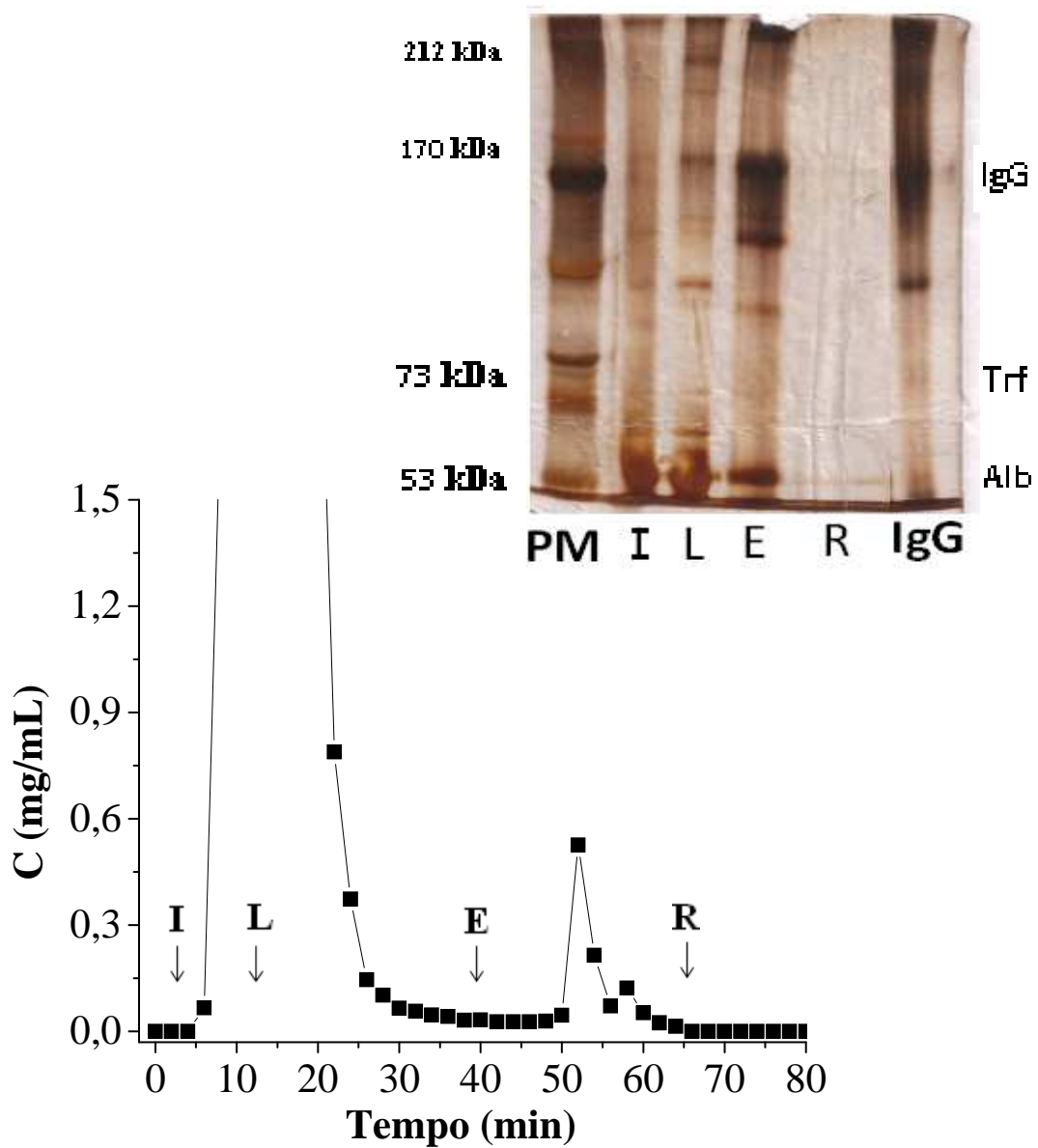


Tabela 15. Balanço de massa na coluna com QAEc nas etapas de lavagem (L), alimentação (A), eluição (E) e regeneração (R) obtida na injeção (I) de 1,0, 10 e 15,0 mL do soro humano diluído 10 vezes em tampão fosfato de sódio 25 mM e pH 6,0 e a quantidade de proteínas recuperadas (REC).

ETAPAS	SORO HUMANO EM TAMPÃO FS 25mM			
	V = 1,0 mL		10,0 mL	
	PT ^a (mg)	% ^b	PT ^a (mg)	% ^b
I	5,55	100	55,62	100,0
A	0,00	0,00	28,17	50,7
L	3,57	64,25	22,80	41,0
E	0,87	15,62	1,90	3,41
R	0,09	1,66	0,06	0,11
REC	4,53	81,53	52,93	95,22

^a Proteína Total quantificada por Bradford, 1976

^b Percentual de massa obtida em cada etapa