

ADSORÇÃO DE IgG HUMANA EM QUITOSANA/ALGINATO EPOXIDADO COM CORANTES REATIVO AZUL 4 E REATIVO VERDE 5 IMOBILIZADOS

N. A. Dias¹; D. R. Gondim¹; B. T. C. Bezerra¹; I. T. L. Bresolin²; D. C. S. Azevedo¹; I. J. Silva Jr¹.

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: ivanildo@gpsa.ufc.br

² Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas e da Terra

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de adsorção das imunoglobulinas do isotipo G (IgGs) em quitosana/alginate epoxidado com os corantes reativo azul 4 (QAE_a) e reativo verde 5 (QAE_v) imobilizados. Inicialmente foram realizados estudos em batelada para investigar a influência da variação do pH na adsorção de IgG em diferentes tampões (MES, MOPS, HEPES, TRIS/HCl) com força iônica de 25mM. Os perfis de isoterma de adsorção de IgG foram similares com destaque ao perfil com o tampão TRIS/HCl (pH 7,2), onde as quantidades de IgG adsorvidas nos adsorventes QAE_a e QAE_v foram acima de 250 mg/g, valor bem superior dos demais tampões estudados. Os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram aos dados experimentais e foram importantes para obtenção dos parâmetros de equilíbrio. As constantes de dissociação (K_D e K_{DLF}) para ambos adsorventes tiveram valores na ordem de 10^{-6} M indicando que os corantes atuam como ligantes de afinidade. Os resultados para o leito fixo foram muito promissores, pois foi verificado um elevado percentual de IgG retida nos dois adsorventes, acima de 85 % da massa injetada diluída nos tampões MOPS (pH 6,5) e HEPES (pH 6,8).

1. INTRODUÇÃO

Anticorpos pertencem a uma classe de moléculas que formam aproximadamente 20% do plasma do plasma das proteínas do corpo humano, a classe das Imunoglobulinas. Todas elas possuem uma estrutura em comum, que consiste em quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas e idênticas (H) e outras duas leves e idênticas (L) (Amersham Biosciences, 2002).

As imunoglobulinas são separadas em cinco classes de acordo com os componentes das suas cadeias pesadas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. A IgG é dividida em quatro subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A diferença entre esses tipos está na sequência dos aminoácidos contidos em cada classe (Amersham Biosciences, 2002). Essas proteínas são indicadas para o tratamento de câncer, doenças infecciosas, deficiência seletiva de anticorpos, entre outros, mas isso requer uma quantidade grande e significativa de proteína de alta pureza (Burnouf and Radosevich 2001). A

cromatografia de afinidade é uma técnica de adsorção que explora a relação entre um ligante imobilizado e a molécula que será separada (Vijayalakshmi, 1989). Esse procedimento é considerado o método mais eficiente de purificação de proteínas.

Corantes imobilizados em diferentes matrizes cromatográficas têm sido utilizados como ligantes de afinidade para adsorção de proteína (Yavuz *et al.*, 2006, Bayramoglu *et al.*, 2007, Wongchuplan *et al.*, 2009., Gondim *et al.*, 2012) devido a elevada especificidade desses por domínios específicos das proteínas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar e comparar a capacidade de adsorção de Imunoglobulina Humana do isotipo G em Reativo Verde 5 e Reativo Azul 4 imobilizados em quitosana/alginate epoxidado em diferentes sistemas tamponantes. O efeito do pH e isoterms de adsorção foram avaliados em tanques agitados. O desempenho em leito fixo foi estudado com a finalidade de averiguar o potencial dessas fases estacionárias em reter IgG.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1 Reagentes: Os corantes Reativo Azul 4 e Reativo Verde 5, Epicloridrina (99%), MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazino-N'-2-etanosulfônico), MES (ácido morfolinoetanosulfônico), Trizma/HCl (TRIS/HCl) e IgG humana foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). A quitosana em pó utilizada foi da Polymar (BRASIL). Os outros reagentes utilizados foram todos de grau analítico e para a preparação de todas as soluções utilizou-se a água ultrapura MiliQ (Milipore, EUA). O termo QAE refere-se ao composto de quitosana-alginate epoxidado, e o QAE_a ou QAE_v refere-se aos corantes reativos (verde/azul) imobilizados nesse composto.

2.2 Métodos

2.2.1 Ensaio em batelada: Os ensaios de adsorção foram realizados em duplicata, em um sistema de agitação rotatório (TECNAL, modelo TE-165), a temperatura de 22 °C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$). Foram adicionados 15 mg do adsorvente em tubos de acrílico juntamente com 3 mL da solução da proteína estudada em tampão. Utilizaram-se os tampões MES, MOPS, HEPES e TRIS/HCl com força iônica de 25 mM para encontrar o pH que ocorre as maiores quantidades adsorvidas, sempre respeitando a faixa de pH, indicada pelo fabricante, de cada tampões utilizado.

2.2.2 Efeito do pH na adsorção de proteínas: O sistema permaneceu sob agitação constante durante o período de duas horas. Ao final do tempo, as amostras foram coletadas e centrifugadas em microcentrífuga (CT-15000R CIENTEC) por 10 min com rotação igual a 10000 rpm e a absorbância foi lida para cada amostra. Os valores foram convertidos para concentração a partir de uma curva de calibração 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 1 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 de adsorvente (g) e V_{SOL} é o volume da solução (mL) para o contato com o adsorvente.

2.2.3 Isotermas de adsorção: As concentrações de proteínas utilizadas nos experimentos variaram de 0,5 à 10 mg/mL. As isotermas mais utilizadas atualmente para descrever o equilíbrio sólido-líquido das proteínas são as de Langmuir (Equação 2) e Langmuir-Freundlich (Equação 3). 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.

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

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

em que q_m é a capacidade máxima de proteínas adsorvidas, em mg.g^{-1} , 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.

2.2.4 Ensaios em leito fixo: Os experimentos cromatográficos com a proteína IgG foram realizados nas seguintes condições: volume de injeção de 10,0 mL e concentração 1,0 mg/mL de IgG, vazão 0,8 mL/min e massa de adsorvente (QAE_a ou QAE_v) de 0,5 g. A solução de IgG foi preparada nos tampões MOPS, HEPES e TRIS/HCl 25 mM. A eluição foi realizada com adição do sal NaCl 1,0 M ao tampão de corrida.

3. DISCUSSÃO E RESULTADOS

3.1. Estudo do pH na adsorção de IgG em QAE_a e QAE_v

O estudo do pH na adsorção de biomoléculas é um resultado necessário haja vista que cada proteína possui um ponto isoelétrico (pI) próprio. O pI da proteína é o pH onde há um balanceamento de cargas e normalmente a maior adsorção ocorre no pI ou em valores próximos ao pI. Observa-se nas Figuras 1 e 2 o comportamento da adsorção de IgG nos dois materiais (QAE_a e QAE_v) nos diferentes sistemas tamponantes. Observou-se que no tampão TRIS/HCl a adsorção de IgG foi bem superior frente aos demais e o pH de maior adsorção foi o 7,2. Para os

outros tampões tivemos a maior adsorção nos pHs 6,7 (MES), 6,5 (MOPS) e 6,8 (HEPES). Constatou-se que o pH de maior adsorção de IgG foi próximo para todos os tampões. Uma provável explicação deve-se ao pI da IgG que não é fixo e está compreendido no intervalo de 6,3 à 9,0 (Bresolin *et al.*, 2010). A IgG possui um pI variável devido as suas quatro subclasses que a compõe, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Esses resultados estão em concordância com outros trabalhos na literatura (Gondim *et al.*, 2012; Yavuz *et al.*, 2006) que encontraram pH de maior adsorção de IgG no intervalo do pI da IgG.

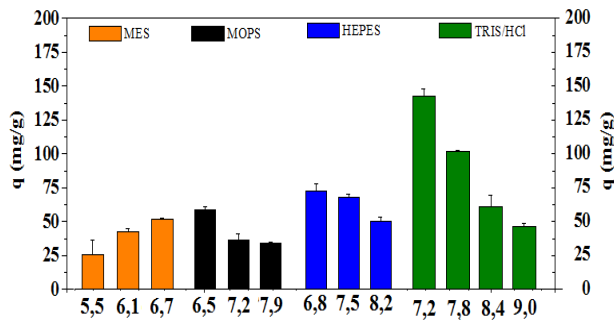


Figura 1 – Adsorção de IgG em QAE_v nos tampões: MES, MOPS, HEPES e TRIS-HCl.

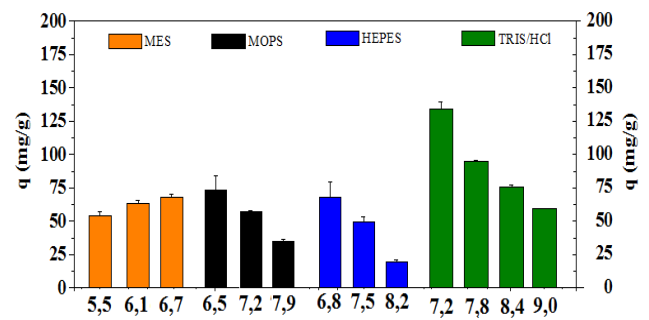


Figura 2 – Adsorção de IgG em QAE_a nos tampões: MES, MOPS, HEPES e TRIS-HCl.

A Tabela 1 apresenta uma comparação com os valores das quantidades adsorvidas de IgG nos dois materiais (QAE_a e QAE_v) destacando o pH de maior adsorção nos quatro tampões. Destaca-se os resultados com o tampão TRIS/HCl (pH 7,2), onde os valores de adsorção de IgG foram muito superiores aos demais. Para os próximos ensaios escolheu-se trabalhar com os tampões MOPS, HEPES e TRIS/HCl para investigar os parâmetros no equilíbrio de adsorção.

Tabela 1 – Resultados de maiores quantidade adsorvidas de IgG em QAE_a e QAE_v no pH ideal de cada tampão estudado.

Adsorvente	HEPES (pH 6,8)		MOPS (pH 6,5)		MES (pH 6,7)		TRIS/HCl (pH 7,2)	
	q	erro	q	erro	q	erro	q	erro
	(mg/g)		(mg/g)		(mg/g)		(mg/g)	
QAE _a	68,18	11,0	73,33	10,8	67,69	2,4	133,81	5,4
QAE _v	72,58	5,5	58,48	2,3	51,73	0,8	142,28	5,9

3.2. Isotermas de adsorção de IgG

Na Figura 3 verifica-se as isotermas de adsorção de IgG para os adsorventes QAE_a (Figura 3.1) e QAE_v (Figura 3.2). Nos dois materiais verificou-se que no tampão TRIS/HCl, a adsorção de IgG foi superior aos demais, esses resultados são apoiados pelos resultados anteriores (teste do

pH), onde o tampão TRIS/HCl apresentou elevado destaque. Para os outros tampões observou-se uma quantidade adsorvida de IgG muito significativa, superior a 100 mg/g.

Os modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich se ajustaram aos dados experimentais proporcionando os parâmetros destacados nas Tabelas 2 e 3. As quantidades máximas de IgG adsorvidas foram acima de 250 mg/g em ambos adsorventes no tampão TRIS/HCl. Os parâmetros K_D e K_{DLF} são importantes, pois valores entre 10^{-5} e 10^{-8} M indicam que o adsorvente possui forte ligação com a molécula alvo e são definidos como ligantes de afinidade. De acordo com os resultados das Tabelas 2 e 3 esses dois adsorvente podem ser considerado como de ligantes de afinidade por possuírem valores na ordem de 10^{-6} M para as constantes de dissociação (K_D e K_{DLF}). Para os outros tampões (MOPS e HEPES) verificou-se quantidade adsorvida de IgG similares, com destaque ao adsorvente QAE_a no tampão HEPES com quantidade máxima de IgG adsorvida de 192,8 mg/g.

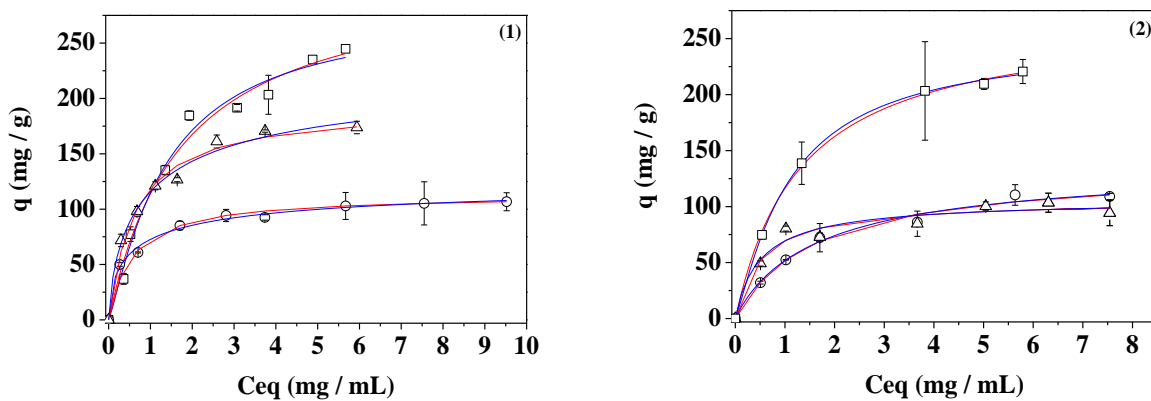


Figura 3 – (1) Isotherma de IgG em QAE_a nos tampões TRIS/HCl (□) pH 7,2, MOPS (○) pH 6,5 e HEPES (Δ) pH 6,8. (2) Isotherma de IgG em QAE_v nos tampões TRIS/HCl (□) pH 7,2, MOPS (○) pH 6,5 e HEPES (Δ) pH 6,8. Modelos de ajuste: Langmuir (linha vermelha) e Langmuir-Freundlich (linha azul).

Tabela 2 – Parâmetros de ajuste pelos modelos de Langmuir e Langmuir –Freundlich com o adsorvente QAE_a nos tampões MOPS (pH 6,5), HEPES (pH 6,8) e TRIS/HCl (pH 7,2).

	MOPS (25mM)				HEPES (25 mM)				TRIS/HCl (25 mM)			
	L	erro	LF	erro	L	erro	LF	erro	L	erro	LF	erro
q_m (mg/g)	108,5	3,0	130,4	14,8	192,8	7,8	228,44	3,0	315,5	21,2	281,9	35,7
K_D ($\times 10^6$ M)	2,83	0,4	-	-	4,18	0,6	-	-	0,72	0,10	-	-
K_{DLF} ($\times 10^6$ M)	-	-	5,3	1,6	-	-	6,48	2,5	-	-	1,46	0,4
n	-	-	0,59	0,13	-	-	0,71	0,4	-	-	1,17	0,23
R^2	0,98	-	0,99	-	0,99	-	0,99	-	0,98	-	0,99	-
χ^2	22,7	-	10,15	-	56,7	-	43,9	-	157,7	-	149,1	-

L- Langmuir e LF- Langmuir-Freundlich

Tabela 3 – Parâmetros de ajuste pelos modelos de Langmuir e Langmuir –Freundlich com o adsorvente QAE_v nos tampões MOPS (pH 6,5), HEPES (pH 6,8) e TRIS/HCl (pH 7,2)

	MOPS (25mM)				HEPES (25 mM)				TRIS/HCl (25 mM)			
	L	erro	LF	erro	L	erro	LF	erro	L	erro	LF	erro
q_m (mg/g)	133,5	6,6	138,3	25,6	92,80	4,5	85,4	4,12	269,8	5,2	249,0	8,9
K_D ($\times 10^6$ M)	10,5	1,6	-	-	2,24	0,8	-	-	0,76	0,05	-	-
K_{DLF} ($\times 10^6$ M)	-	-	11,1	3,6	-	-	2,45	1,3	-	-	1,12	0,10
n	-	-	0,94	0,3	-	-	0,14	0,12	-	-	1,18	0,09
R^2	0,99	-	0,99	-	0,96	-	0,97	-	0,99	-	0,99	-
χ^2	20,2	-	25,0	-	53,8	-	45,6	-	11,21	-	6,9	-

L- Langmuir e LF- Langmuir-Freundlich

3.4. Leito fixo com IgG e os adsorventes QAE_a e QAE_v

A Figura 4 mostra os perfis do comportamento da adsorção de IgG no leito fixo com as fases estacionárias QAE_a (Figura 4.1) e QAE_v (Figura 4.2) para um volume de injeção de IgG de 10 mL e concentração de 1,0 mg/mL, representando, em torno de 10 mg de IgG (em massa) injetada na coluna. Após os ensaios em batelada, os experimentos em leito fixo confirmaram o potencial dos corantes reativo verde 5 e reativo azul 4 imobilizados em quitosana/alginato epoxidado (QAE_a e QAE_v) em adsorver a proteína IgG.

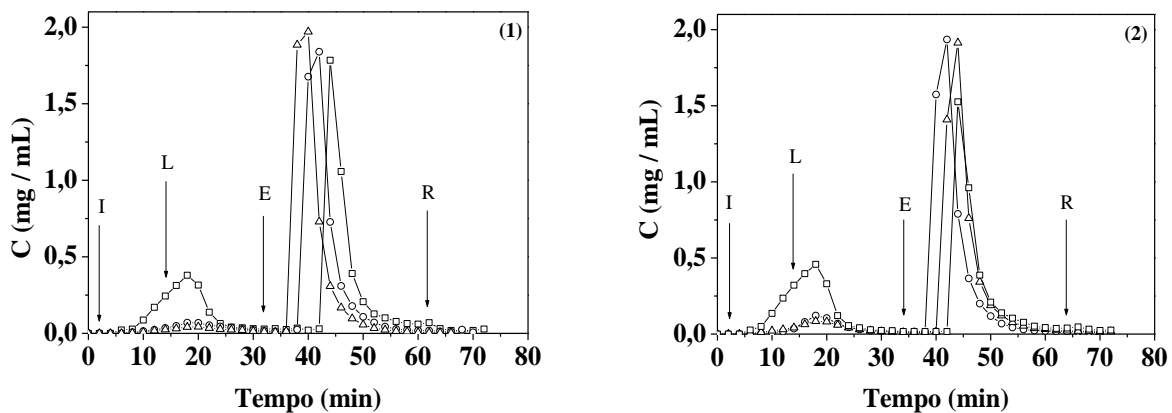


Figura 4 – Ensaios em leito fixo com IgG e os adsorventes QAE_a (1) e QAE_v (2) nos tampões TRIS/HCl (□) pH 7,2, MOPS (○) pH 6,5 e HEPES (Δ) pH 6,8 com injeção de 10 mL de IgG (1,0 mg/mL).

O primeiro pico que pode ser visualizado na Figura 4 caracteriza a quantidade de proteínas que estão passando pela fase estacionária sem ser adsorvida. O segundo pico representa a

dessorção da proteína (IgG) que foi adsorvida nos dois adsorventes. Observou-se um elevado pico de dessorção indicando alta quantidade de IgG foi adsorvida em todos os tampões estudados.

O tampão que proporcionou os melhores resultados de IgG no leito foi o HEPES (pH 6,8), onde o percentual de IgG retida na fase estacionária foi de 90,0 e 88,0 %, respectivamente com os adsorventes QAE_a e QAE_v. Esses resultados significam que para cada 10 mg de IgG injetada (diluída no tampão HEPES) no leito fixo com QAE_a e QAE_v, aproximadamente 90,0 % foram adsorvidas e recuperadas na eluição (pico 2, Figura 4).

Com esses resultados pode-se afirmar que os dois adsorventes QAE_a e QAE_v possuem alto potencial em adsorver IgG e ensaios futuros com amostras de soro humano serão realizados a fim de se confirmar a seletividade por IgG do soro humano. No trabalho realizado por Gondim *et al.*, (2012) os autores utilizaram uma matriz de quitosana/alginato epoxidado com o corante cibacron blue F3GA como ligante de afinidade e obtiveram resultados satisfatórios para purificação de IgG humana.

4. CONCLUSÃO

Foi possível concluir a partir dos resultados desse trabalho que os corantes reativo verde 5 e reativo azul 4 atuaram de forma eficiente como ligantes de afinidade propiciando elevada capacidade de adsorção por IgG. Constatou-se que os diferentes tampões utilizados tiveram influência na adsorção de IgG nos dois adsorventes utilizados. A adsorção de IgG no tampão TRIS/HCl foi superior aos demais tampões nas curvas de isoterma de adsorção. No entanto para os ensaios em leito fixo a adsorção de IgG em tampão HEPES foi superior aos demais tampões e com um percentual elevado de IgG retida nos dois adsorventes, em torno de 90,0 %. Tais resultados foram satisfatório para o propósito da busca de novos adsorventes com alta seletividade por domínios específicos da IgG.

5. REFERÊNCIAS

AMERSHAM. *Antibody Purification Handbook*. Amersham Biosciences, 2002.

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

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

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *J. Biochem. Biophys. Meth.* v. 49, p. 575-586, 2001.

DENIZLI, A.; PISKIN, E. Dye-ligand affinity systems. *J. Biolchem. Bioph. Meth.* v. 49, p. 391-

416, 2001.

GONDIM, DIEGO R. ; LIMA, LUANA P. ; DE SOUZA, MARIA C. M. ; BRESOLIN, IGOR T. L.; ADRIANO, WELLINGTON S. ; AZEVEDO, DIANA C. S. ; SILVA, IVANILDO J. Dye ligand epoxide chitosan/alginate: a potential new stationary phase for human IgG purification. *Adsorp. Sci. Technol.* v. 30, p. 701 - 712, 2012.

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

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. *Biochem. Eng. J.* v. 45, p. 232-238, 2009.

YAVUZ, H.; AKGÖL, S.; SAY, R.; DENIZLI, A. Affinity Separation of Immunoglobulin G Subclasses on Dye Attached poly (hydroxypropyl methacrylate) beads. *Intern. J. Biol. Macromol.* v. 39, p. 303-309, 2006.