



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 29 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO HUMANO POR CROMATOGRAFIA DE MODO MISTO

SOUSA, P. L. R.¹; CUNHA, J. E.¹; TEIXEIRA, E. M. T. S.¹; GONDIM, D. R.²; AZEVEDO, D. C. S.¹; SILVA JÚNIOR, I. J.¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Estadual do Ceará, Departamento de Química

E-mail para contato: paula.sousa@gpsa.ufc.br

RESUMO – *O presente trabalho teve por objetivo avaliar a purificação das proteínas do soro sanguíneo humano por cromatografia de modo misto utilizando a resina comercial Capto MMC. Ensaios com as proteínas padrão e com mistura binária das principais proteínas presentes no soro humano (albumina humana e imunoglobulinas G) foram realizado em que o efeito da vazão de alimentação (0,5; 0,8; 1,0; 1,5 mL/min), gradiente decrescente de eluição (0,1-0; 0,2-0; 0,5-0; 0,8-0; 1,0-0 M de NaCl) e tempo de eluição (10; 15; 20 min) foram avaliados. Diante dos resultados obtidos pode-se verificar que as melhores condições foram obtidas ao se trabalhar na vazão de 0,8 mL/min, gradiente de eluição salino de 0,8 – 0 M e tempo de eluição de 15 min. Os ensaios com amostra de soro humano mostraram que o uso da resina Capto MMC foi efetiva havendo uma coeluição entre a albumina humana e a imunoglobulina nas condições trabalhadas.*

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, a cromatografia de modo misto (ou multimodal) tem sido estudada como uma alternativa viável para o processo de captura e purificação de biomoléculas. A principal vantagem desta técnica reside no fato de que o ligante acoplado a matriz sólida é capaz de realizar múltiplas interações com a biomolécula-alvo, tais como troca iônica, interação hidrofóbica, ligações de hidrogênio, ligações de dissulfeto, etc. O adsorvente Capto MMC é formado por uma matriz sólida porosa de agarose reticulada com um ligante que possui um grupo carboxílico que permite a troca iônica, um grupo fenil que confere a interação hidrofóbica, o par de elétrons livres da carbonila e as duas hidroxilas auxiliam nas interações por pontes de hidrogênio (Besselink *et al.*, 2015). Esta resina tem sido empregada em diversos estudos, tais como purificação de enzimas (Lima *et al.*, 2016), purificação de anticorpos monoclonais e policlonais (Maria *et al.*, 2015), e outras biomoléculas (Hanke & Ottens, 2014). Diante disto, o presente trabalho tem como objetivo investigar o processo de purificação das proteínas do soro sanguíneo humano, em particular a albumina humana e imunoglobulinas G, utilizando a cromatografia de modo misto.

2. METODOLOGIA

2.1. ETAPA CROMATOGRÁFICA

As condições de adsorção e eluição utilizadas nesse estudo foram previamente determinadas. São elas: Tampão fosfato de sódio 60 mM, pH 6,75 para a etapa de adsorção; e tampão acetato de sódio 56,4 mM, pH 5,2 acrescido de NaCl 1M para a eluição. Para estudo da separação das proteínas HSA e IgG foram avaliados os parâmetros: vazão (0,5; 0,8; 1,0; 1,5 mL/min); gradiente salino de eluição (0,1-0; 0,2-0; 0,5-0; 0,8-0; 1,0-0 M de NaCl) e tempo de eluição (10; 15; 20 min). Para estudos dos parâmetros e levantamento da condição ótima de separação e purificação das proteínas foi utilizada uma mistura binária de HSA e IgG com concentração total de 1 mg/mL preparada no tampão de adsorção. Por fim, obtida a melhor condição de separação, esta foi reproduzida com uma amostra de soro humano na concentração de 1 mg/mL, também preparada no tampão de adsorção. Os ensaios cromatográficos foram realizados em coluna C 10/10 adquirido da GE Healthcare (USA) empacotada com Capto MMC GE Healthcare (USA) acoplada ao FPLC- Contichrom (*Fast Purification Liquid Chromatographic*) obtido da Knauer (Alemanha). As proteínas HSA e IgG, bem como o soro humano, foram adquiridos da Sigma (EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2. ANÁLISES

No intuito de confirmar a separação das proteínas, foram realizadas duas corridas cromatográficas nas condições ótimas adquiridas, uma com a solução binária das proteínas HSA e IgG ($C_t = 1$ mg/mL) e a outra com amostra de soro humano ($C_t = 1$ mg/mL). Essas corridas foram coletadas a cada 2 min e os pontos referentes aos picos cromatográficos foram analisados por eletroforese (*SDS – PAGE*) utilizando géis de acrilamida 7% para separação das proteínas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM IgG E HSA

As Figuras 1 A, B e C ilustram os perfis cromatográficos obtidos durante os experimentos para avaliação dos parâmetros vazão, tempo de eluição e gradiente salino de eluição.

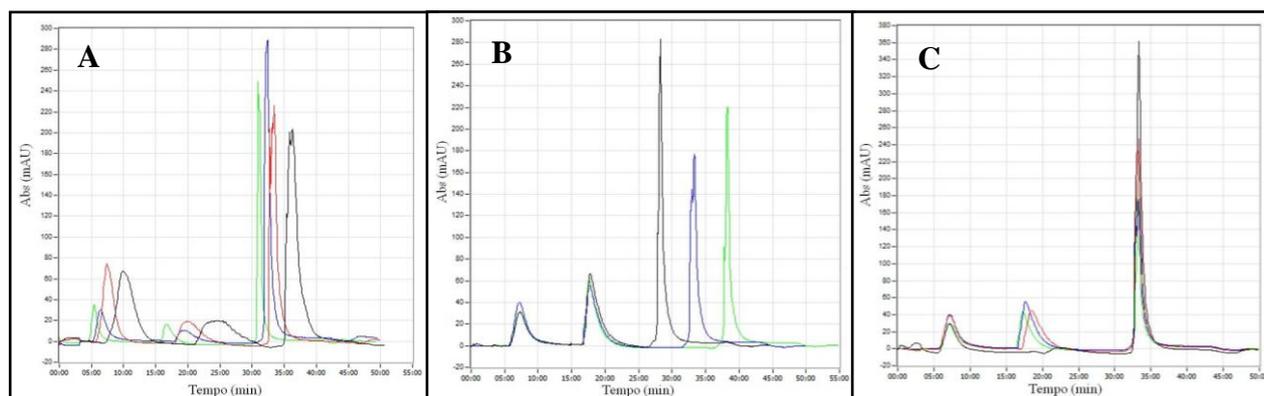


Figura 1: A) Perfil cromatográfico das proteínas HSA e IgG em diferentes vazões: (–) 0,5 mL/min; (–) 0,8 mL/min; (–) 1,0 mL/min; (–) 1,5 mL/min; B) Perfil cromatográfico das proteínas HSA e IgG em diferentes tempos de eluição: (–) 10 min; (–) 15 min; (–) 20 min; C) Perfil cromatográfico das proteínas HSA e IgG em diferentes gradientes de eluição: (–) 0,1 – 0 M; (–) 0,5 – 0 M; (–) 0,8 – 0 M; (–) 1,0 – 0 M.

Vazão: De acordo os perfis ilustrados na Figura 1A, pode se verificar que na vazão de 0,5 mL/min o segundo pico, correspondente a etapa de eluição das proteínas, não apresentou boa resolução, tendo comportamento assimétrico, alargado e com cauda severa. O mesmo pico para as demais vazões apresentaram comportamento da cauda severa, porém, mais amena. Os demais picos, referentes à etapa de lavagem (após a etapa de carregamento) e regeneração apresentaram boa resolução. Na etapa de eluição não foi possível verificar separação das proteínas HSA e IgG. Logo, optou-se por trabalhar na vazão de 0,8 mL/min, visto que nessa vazão foi possível ter uma boa eluição das proteínas e os picos obtiveram melhor resolução.

Tempo de eluição: A Figura 1B ilustra os perfis cromatográficos para diferentes tempos de eluição. Pode-se verificar que não houve diferença de comportamento do pico referente à etapa de eluição em relação ao tempo de eluição. Porém, no tempo de 10 min os picos das etapas de eluição e regeneração ficaram muito próximos. Assim, optou-se por trabalhar com o tempo de 15 min, conferindo separação segura dos picos referentes às etapas de eluição e regeneração.

Gradiente de eluição: De acordo com os perfis ilustrados na Figura 1C, pode-se verificar que à medida que aumenta a concentração salina inicial uma maior recuperação de proteínas na etapa de eluição é obtida. No entanto, o aumento da concentração de 0,8 para 1,0 M não favoreceu a recuperação, ocasionando uma redução no teor de proteínas eluídas. Dessa maneira, optou-se por trabalhar com o gradiente salino decrescente de 0,8 – 0 M.

3.2. ENSAIOS CROMATOGRAFICOS COM MISTURA BINÁRIA E SORO HUMANO

Mistura binária: Uma vez alcançada as condições ótimas de vazão, gradiente e tempo de eluição, foi realizada um corrida cromatográfica essas condições com a mistura binária de HSA e IgG. As Figuras 2 e 3 apresentam o perfil cromatográfico e análise por eletroforese. Pode-se verificar que praticamente toda a IgG está sendo adsorvida pela resina, visto que na etapa de adsorção quase não se vê a banda de IgG. Observa-se ainda que, na eluição, há presença tanto de IgG quanto de HSA.

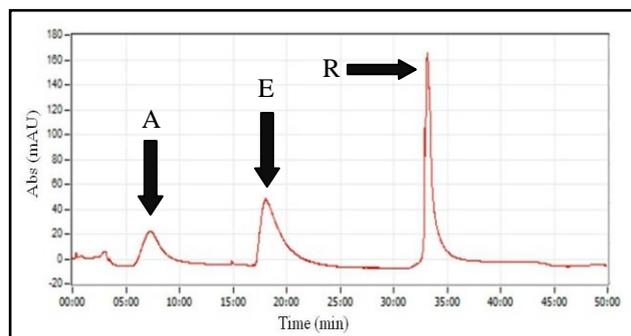


Figura 2: Perfil cromatográfico das proteínas HSA e IgG nas condições ótimas. Picos: A – Adsorção; E – Eluição; R – Regeneração.

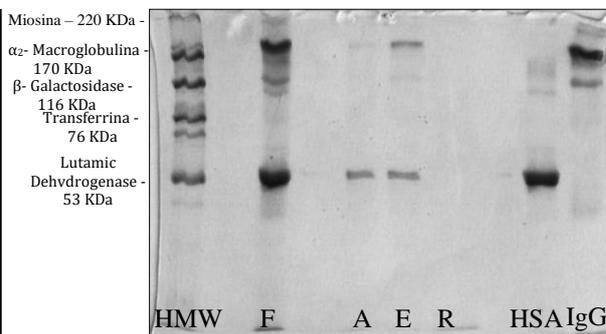


Figura 3: Perfil de separação das proteínas HSA e IgG. Pontos: HMW – Padrão de alto peso molecular; F – injeção; A – adsorção; E – eluição; R – regeneração; HSA – Albumina do soro humano; IgG – Imunoglobulina G.

Soro humano: As Figuras 4 e 5 ilustram a corrida cromatográfica e eletroforese com soro humano, realizada nas condições determinadas previamente.

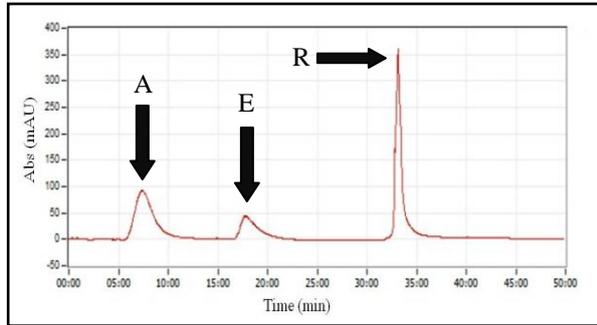


Figura 4: Perfil cromatográfico das proteínas a partir de uma amostra de soro humano nas condições ótimas. Picos: A – Adsorção; E – Eluição; R – Regeneração.

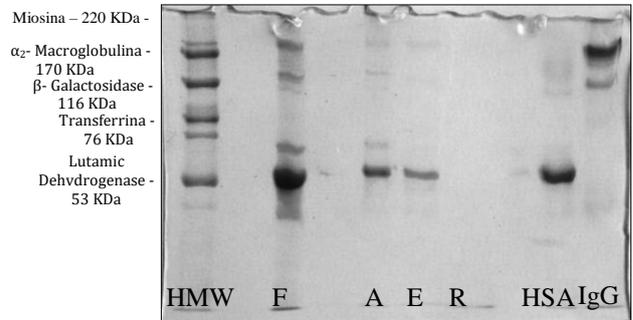


Figura 5: Perfil de separação das proteínas a partir de uma amostra de soro humano. Pontos: HMW – Padrão de alto peso molecular; F – injeção; A – adsorção; E – eluição; R – regeneração; HSA – Albumina do soro humano; IgG – Imunoglobulina G.

Visto que na etapa de eluição (E) ainda se tem a presença de HSA, verificou-se a necessidade de estudos mais aprofundados para obtenção da separação e purificação dessas proteínas. Porém, as condições utilizadas foi capaz de remover as demais proteínas, reduzindo o eluato somente a HSA e IgG. Dessa maneira, constatamos que nas condições operacionais avaliadas nesse estudo a Capto MMC podem ser utilizadas como etapa de pré-purificação do soro humano para purificação da IgG e HSA.

4. CONCLUSÃO

As condições operacionais obtidas não foram suficientes para purificação ou separação das proteínas HSA e IgG, porém, essas podem ser reproduzidas como etapa de pré-purificação, visto que na eluição só houve presença de HSA e IgG.

6. REFERÊNCIAS

- BESSELINK, T.; JANSSEN, A.E.M.; BOOM, R.M. Isolation of bovine serum albumin from whey using affinity chromatography. *Int. Dairy J.*, v. 41, p.32 – 37, 2015.
- LIMA, M. A.; FREITAS, M. F. M.; GONÇALVES, L. R. B.; SILVA JÚNIOR, I. J. Recovery and purification of a *Kluyvermyces lactis* β - galactosidase by Mixed Mode Chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 1015–1016, p.181 – 191, 2016.
- MARIA, S.; JOUCLA, G. GARBAY, B.; DIERYCK, W.; LOMENECH, A.; SANTARELLIA, X.; CABANNEA, C. Purification process of recombinant monoclonal antibodies with mixed mode Chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 1393, p. 57 – 64, 2015.
- HANKE, A. T.; OTTENS, M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. *Tren. in Biotechnol.*, v. 32, p. 210 – 220, 2014.