



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 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

ADSORÇÃO DE IMUNOGLUBULINA G EM CORANTE REATIVO VERMELHO IMOBILIZADO EM MICROESFERAS DE QUITOSANA/ALGINATO

LAURENTINO LS¹, BRAGA IB¹, MARCONDES RR¹, OLIVEIRA FAF¹, FECHINE PBA², SILVA Jr. IJ¹

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

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Analítica e Físico-Química
E-mail para contato: Ivanildo@gpsa.ufc.br

RESUMO – *O presente trabalho teve como objetivo investigar a adsorção de imunoglobulina G (IgG) em corante reativo vermelho - Procion Red MX-5B (PR) – imobilizado em microesferas compósitas quitosana/alginate. Foram realizados ensaios em batelada com o adsorvente a fim de obter o efeito do pH, o tempo de contato e a isoterma de adsorção com a proteína IgG. O tempo necessário para estabelecer o equilíbrio foi de 4 horas e a quantidade máxima de adsorção de IgG no adsorvente foi de 565 mg/g. Portanto, o PR pode ser utilizado como ligante bioespecífico de média afinidade para com IgG.*

1. INTRODUÇÃO

Estudos anteriores, publicados por nosso grupo de pesquisa, apresentaram o potencial do corante Cibacron Blue F3GA imobilizado em matriz compósita composta de quitosana/alginate na adsorção de proteínas do soro humano, bem como na purificação de proteínas presentes no soro, em particular as imunoglobulinas G (IgG) (Gondim *et al.*, 2012; Gondim *et al.*, 2014). Mais recentemente, Santos *et al.* (2016) apresentou um estudo de purificação de Imunoglobulinas G (IgG), a partir do soro humano, utilizando o corante reativo Procion Red MX-5B imobilizado na mesma matriz (QAE-PR-MX). Nestes estudos, foram observados uma elevada capacidade de adsorção das IgGs e uma purificação elevada com relação as demais proteínas presentes no soro humano.

Entretanto, devido a não uniformidade do material obtido durante o processo de síntese, problemas no empacotamento e na realização dos ensaios cromatográficos foram observados. Diante disto, uma nova rota de síntese foi estabelecida e o material caracterizado, com o objetivo de dar maior resistência mecânica, uniformidade e evitar problemas quando submetidas a condições de fluxo no sistema cromatográfico.

Diante do que foi exposto, o objetivo do trabalho foi realizar um estudo preliminar de adsorção de IgG, usando como adsorvente microesferas compósitas quitosana/alginate imobilizadas com corante Procion Red MX-5B. Os ensaios foram realizados em sistema



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 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

batelada a fim de se obter os melhores parâmetros para a adsorção e, ao final, os resultados foram comparados com trabalhos anteriores realizados pelo grupo, a fim de se verificar os resultados da modificação desse material.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

A quitosana utilizada foi obtida da Polymar (Brasil), o alginato de sódio da VETEC (Brasil) e o Fosfato de sódio da Synth (Brasil). O corante Procion Red MX – 5B, os reagentes epicloridrina (99%), MOPS (ácido morfol inopropanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazino- N'-2- etanosulfônico), Trizma, IgG humana foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e nas preparações de todas as soluções foi utilizada água Mili-Q (Millipore, EUA).

2.2 Ensaios de adsorção com IgG de alta pureza

Os ensaios de adsorção de IgG foram realizados no modo batelada, em um sistema circular com rotação constante (TECNAL, modelo TE-165) a 18 rpm em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Inicialmente, avaliou-se o efeito do tampão e do pH no processo, onde foram preparados os tampões Tris/HCl, HEPES, MOPS e Fosfato a 25mM, sempre respeitando a faixa de tamponamento de cada um. Nestes ensaios, 5 mg de microesferas compósitas quitosana/alginato imobilizada com corante Procion Red MX-5B (MQA-PR) foram mantidas em contato com 3 mL da solução de IgG 0,75 mg/mL por 3 horas.

Para obtenção do tempo de equilíbrio para o processo adsorptivo, foi preparada uma solução de IgG 1,0 mg/mL com tampão Fosfato, pH fixo em 6,0 e esta foi mantida em contato com 5 mg de adsorvente, variando-se a duração do ensaio de 5 a 360 minutos, com finalidade de se obter o tempo em que a adsorção entraria em equilíbrio. Com o tempo de equilíbrio definido, foi possível obter as isotermas de adsorção. Os ensaios de isoterma foram realizados em solução tampão de Fosfato, pH 6,0 com concentrações de IgG variando de 0,5 a 6,0 mg/mL. Após os ensaios e coletadas as amostras, estas foram quantificadas por espectrofotometria UV-Vis, Thermo Scientific Biomate B (EUA) em comprimento de onda de 280 nm. A quantidade de soluto adsorvido na fase fluida foi quantificada a partir de um balanço de massa simples, conforme apresentado na Equação 1.

$$q = \frac{V_{sol} \cdot (C_0 - C_f)}{m_{ads}} \quad (1)$$

em que q expressa a quantidade adsorvida por grama de adsorvente (mg/g), V_{sol} é o volume da solução (mL) mantida em contato com a massa m_{ads} de adsorvente (g) e sendo C_0 e C_f as concentrações inicial e final na fase líquida (mg/mL), respectivamente.

Como modelos de ajuste para os dados experimentais das isotermas de adsorção foi aplicado o modelo de Langmuir, apresentado na Equação 2 e por meio da utilização da ferramenta de ajuste não linear do software OriginPro8 (EUA).

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

em que, q é a quantidade de proteína adsorvida (mg/g); q_{max} é a capacidade máxima de adsorção pelo adsorvente (mg/g); C_{eq} é a concentração da fase líquida no equilíbrio (mg/mL); e k_D é constante a constante de dissociação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostrado na Figura 1, a faixa de pH estudada foi de 5,5 à 8,6 e todos os tampões apresentaram força iônica de 25 mM. Nota-se que a faixa de pH estudada correspondeu há uma ampla faixa do ponto isoelétrico (pI) da IgG, que varia entre 6,3 à 9,0. Entretanto, o tampão Fosfato pH 6,0 sobressaiu-se, um pouco mais, dentre os sistemas tamponantes estudados, com uma quantidade de IgG adsorvida de, aproximadamente, 170 mg/g de adsorvente.

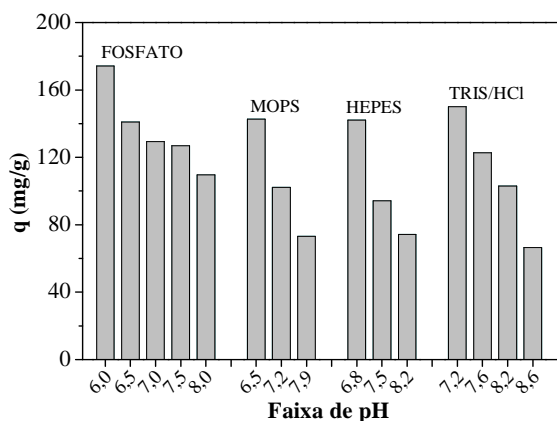


Figura 1 – Efeito do pH e do tipo de tampão na adsorção de IgG utilizando MQA-PR

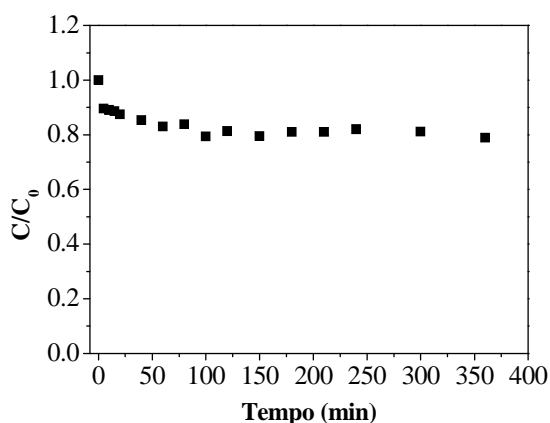


Figura 2 – Perfil cinético com MQA-PR na adsorção de IgG.

A partir da análise da Figura 2 foi observado um decaimento na concentração de IgG relativamente lento, mas de maneira eficaz, e o tempo de equilíbrio observado foi de 240 min (4,0 h) na matriz de afinidade estudada. Com esse tempo de equilíbrio definido, os ensaios de isotermas de adsorção foram iniciados, a fim de obter as quantidades máximas de IgG adsorvida no corante analisado.

A Figura 3, mostra a isoterma de adsorção obtida, em uma faixa de concentrações de IgG variando entre 0,5 e 6,0 mg/mL e tempo de equilíbrio de 240 minutos (4h). Além disso, verificam-se ainda, a presença do ajuste do modelo de Langmuir (L). O valor de R^2 foi próximo da unidade (0,945), com o parâmetro K_D na ordem de $10^{-5} \pm 0,7$ e q_{max} 565 mg/g.

Santos e colaboradores (2016) imobilizaram o mesmo corante em matriz de quitosana/alginate, e obtiveram quantidade máxima adsorvida de 138 e 149 mg/g para os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente (Figura 4). Ao comparar a isoterma obtida neste trabalho, pode-se observar um aumento considerável da quantidade máxima adsorvida, possivelmente, este aumento está associado ao aumento e uniformidade da área superficial do material sintetizado.

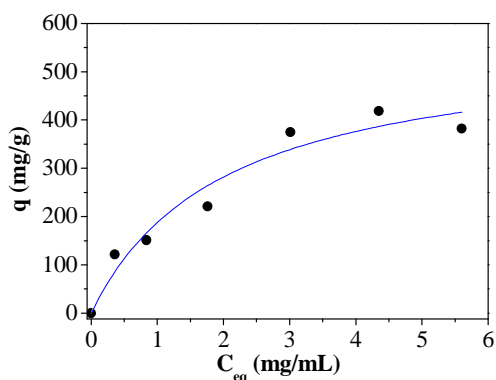


Figura 3 – Isoterma de adsorção de IgG com MQA-PR. Modelos de ajuste: Langmuir (-).

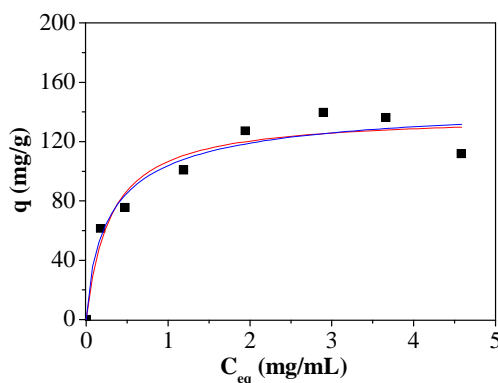


Figura 4 - Isoterma de adsorção de IgG com QAE-PR-MX. Modelos de ajuste: Langmuir (-) e Langmuir-Freundlich (-). Fonte: Santos *et al.*, 2016.

4. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que a modificação química e estrutural do compósito quitosana/alginate imobilizado corante Procion Red MX-5B pode melhorar o processo adsorptivo. O modelo de Langmuir se ajustou bem aos dados experimentais de isoterma proporcionando valores de quantidades máximas adsorvidas em torno de 565 mg/g.

5. REFERÊNCIAS

GONDIM DR, LIMA LP, DE SOUZA MCM, BRESOLIN ITL, ADRIANO WS, AZEVEDO DCS, SILVA, IJ. Dye ligand epoxide chitosan/alginate: a potential new stationary phase for human IgG purification. *Adsorp. Sci. Technol.* v. 30, p. 701 – 712. 2012.

GONDIM DR, DIAS NA, BRESOLIN ITL, AZEVEDO DCS, SILVA IJ. Human IgG adsorption using dye-ligand epoxy chitosan/alginate as adsorbent: influence of buffer system. *Adsorption*, v. 20, p. 925-934. 2014.

SANTOS SO, GONDIM DR, AZEVEDO DCS, SILVA JR IJ. Purificação de imunoglobulinas G (IgG) por cromatografia de afinidade utilizando matriz de quitosana/alginate com o corante Procion Red MX-5B imobilizado como fase estacionária. *Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ)*, Fortaleza-CE, 2016.