



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Engenharia Química

CAMILA MARCUZ

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE CRIOGEL MONOLÍTICO CONTENDO  
GRUPO EPÓXI REATIVO COM O-FOSFO-L-TIROSINA PARA  
ADSORÇÃO DE IgG E SEUS FRAGMENTOS**

CAMPINAS

2019

CAMILA MARCUZ

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE CRIOGEL MONOLÍTICO CONTENDO  
GRUPO EPÓXI REATIVO COM O-FOSFO-L-TIROSINA PARA  
ADSORÇÃO DE IgG E SEUS FRAGMENTOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Camila Marcuz e orientada pela profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M334s Marcuz, Camila, 1993-  
Síntese e avaliação de criogel monolítico contendo grupo epóxi reativo com o-fosfo-l-tirosina para adsorção de IgG e seus fragmentos / Camila Marcuz. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Sonia Maria Alves Bueno.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Imunoglobulinas. 2. Monolitos. 3. Purificação. 4. Cromatografia. I. Bueno, Sonia Maria Alves, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Synthesis and evaluation of monolithic cryogel containing reactive group and o-phospho-l-tyrosine for adsorption of IgG and its fragments

**Palavras-chave em inglês:**

Immunoglobulin

Monolith

Purification

Chromatography

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Sonia Maria Alves Bueno [Orientador]

Gisele Luiza Pavan Pereira

Everson Alves Miranda

**Data de defesa:** 01-08-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9723-8303>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9784674774273892>

Folha de Aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado defendida por Camila Marcuz aprovada em 01 de agosto de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno (Orientadora)

FEQ / UNICAMP

Dra. Gisela Luiza Pavan Pereira

Autônoma

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

FEQ / UNICAMP

ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser presente em minha vida.

Aos meus pais Neusa de Souza Baggio Marcuz e Marcelo Marcuz, por serem os responsáveis pela pessoa que me tornei. Por terem me criado com amor e aceitarem todas as minhas escolhas. Sou eternamente grata pela educação que me deram e por me incentivarem a jamais desistir. Amo vocês.

Ao meu amado esposo e parceiro Caio dos Santos, por ser dono do abraço que me conforta e responsável pelo amor que me fortalece. Agradeço-lhe pelo amor, amizade e companheirismo. Não imagino a vida sem você ao meu lado.

À professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno, não só pela orientação e ensinamentos, mas também pelo empenho e dedicação profissional. Agradeço pelos conselhos e por se preocupar comigo, além da pesquisa.

Aos professores Dra. Ângela Maria Moraes e Dr. Everson Alves Miranda, por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios. Ao professor Dr. Everson Alves Miranda e à Dra. Gisele Luiza Pavan Pereira, pelo tempo dedicado a leitura do presente trabalho.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Gisele Pavan, Cecília Mourão, Daniele Cunha, Gabriela Nascimento e Igor Fioravante, eu aprendi muito com vocês. Agradeço também aos demais colegas que compartilham as mesmas instalações: Cristiane, Paula, Monize, Mariana, Rafael Azoubel, Renata, Cecília Westin, Ana, Rafael Matsumoto, Juliano, Helberth, Luisa. Obrigada pela convivência, pela parceria, ajuda, pelas comidas, cafezinhos, risadas e por todos os momentos de descontração. Vocês são incríveis.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - código de financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo número 2017/21751-5.

## RESUMO

As imunoglobulinas G (IgG) são expressas pelo sistema imunológico de seres vertebrados. Devido à alta especificidade da IgG e seus fragmentos, essas biomoléculas são empregadas em diversas aplicações médicas, farmacêuticas e analíticas. Tais aplicações requerem preparações homogêneas desta imunoglobulina e, por serem tradicionalmente obtidas a partir do soro, plasma ou do sobrenadante de cultura celular, processos efetivos de purificação são fundamentais, acarretando em alto custo para obtenção do bioproduto. Seu elevado custo tem impulsionado os avanços em técnicas cromatográficas, principalmente as de cromatografia de pseudobioafinidade, devido à possibilidade de obtenção do produto com alto grau de pureza, menor custo e reduzido número de etapas. Aliado a isso, a introdução de leitos monolíticos poliméricos como suporte sólido para imobilização do ligante, agregou uma série de vantagens ao processo cromatográfico de purificação. Esses suportes podem ser sintetizados com diferentes monômeros e, quando obtidos pela técnica de criopolimerização, apresentam macroporos interconectados proporcionando fluxo predominantemente convectivo, sendo essa sua principal vantagem. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar um criogel monolítico a base dos monômeros de acrilamida e alginato de sódio e os agentes reticulantes alil glicidil éter e bisacrilamida (PAAm-Alg-AGE), com o ligante pseudobioespecífico o-fosfo-L-tirosina (OPT) imobilizado (PAAm-Alg-AGE-OPT), e testar este adsorvente na purificação de IgG a partir do soro humano bem como na separação de seus fragmentos proteolíticos Fab e Fc. Em experimentos de purificação de IgG, a seletividade do adsorvente em diferentes condições cromatográficas foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE. Na separação de fragmentos, a seletividade foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE, *Western Blot* e imunodifusão radial. Os resultados indicaram que o adsorvente foi seletivo à IgG presente em soro humano na presença de Tris-HCl e Hepes, ambos a 10 e 25 mmol/L e pH 7,0. Curvas de ruptura indicaram capacidade de adsorção dinâmica de  $24,91 \pm 2,41$  e  $22,24 \pm 0,21$  mg de proteína total/g seca de criogel em Tris-HCl 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L, respectivamente, sendo também efetivo na separação entre os fragmentos Fab e Fc. Por imunodifusão radial, foi obtido adsorção de 73,61% e 82,61% dos fragmentos Fab alimentados em Tris-HCl 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L, respectivamente. O conjunto dos resultados apresentados evidenciaram o potencial em utilizar o ligante OPT imobilizado ao criogel monolítico de PAAm-Alg-AGE como leito fixo para purificação de IgG humana e seu fragmento Fab, por técnicas de cromatografia líquida de adsorção.

Palavras-chave: IgG; fragmentos; purificação; criogel; cromatografia

## ABSTRACT

Immunoglobulins G (IgG) are expressed by the immune system of vertebrate beings. Due to the high specificity of IgG and their fragments, these biomolecules are employed in a variety of medical, pharmaceutical and analytical applications. All of them require homogenous preparations of immunoglobulins and because these biomolecules are traditionally obtained from serum, plasma or cell culture supernatant, effective purification processes are fundamental, resulting in a high cost bioproduct. Its high cost has driven advances in chromatographic techniques, especially in pseudobioaffinity chromatography that make possible to obtain the product with a high degree of purity, lower cost and in a reduced number of steps. In addition, the introduction of polymeric monolithic beds as a solid support for the ligand immobilization, has added many advantages to the chromatographic purification process. These supports can be synthesized with different monomers and, when obtained by the cryopolymerization technique, they show interconnected macropores providing predominantly convective flow, which is their main advantage. Thereby, the aim of this work was to synthesize a monolithic cryogel based on acrylamide and sodium alginate monomers and allyl glycidyl ether and bisacrylamide crosslinking agents (PAAm-Alg-AGE) with the pseudobiospecific ligand o-phospho-L-tyrosine (OPT) immobilized (PAAm -Alg-AGE-OPT), and to test this adsorbent in the purification of IgG from the human serum as well as in the separation of its Fab and Fc proteolytic fragments. In IgG purification experiments, the selectivity of the adsorbent under different chromatographic conditions was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis. For the separation of the fragments, the selectivity was evaluated by SDS-PAGE electrophoresis, Western Blot and radial immunodiffusion. The results indicated that the adsorbent was selective for IgG present in human serum in the presence of Tris-HCl and Hepes, both at 10 and 25 mmol/L and pH 7.0. The breakthrough curves under the same conditions indicated dynamic adsorption capacity of  $24.91 \pm 2.41$  and  $22.24 \pm 0.21$  mg total protein/g dry cryogel in Tris-HCl 10 mmol/L and Hepes 25 mmol/L, respectively. The cryogel was also effective in separating the proteolytic fragments Fab and Fc. Adsorption of 73.61% and 82.61% of the Fab fragments fed on Tris-HCl 10 mmol/L and Hepes 25 mmol/L, respectively, was obtained by radial immunodiffusion. All of these results evidenced the potential to use the ligand OPT immobilized to a monolithic cryogel of PAAm-Alg-AGE as a fixed bed for purification of human IgG and its Fab fragment by adsorption liquid chromatography.

Keywords: IgG; fragments; purification; cryogel; chromatography

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapa 1: Preparação e caracterização da fase estacionária. ....	17
Figura 2 - Etapa 2: Ensaio cromatográfico preliminar com IgG de alta pureza. ....	18
Figura 3 - Etapa 3: Ensaio cromatográfico com soro humano. ....	18
Figura 4 - Etapa 4: Ensaio cromatográfico com solução de IgG humana clivada pela enzima papaína. ....	19
Figura 5 - Esquema ilustrativo das etapas da cromatografia de afinidade. ....	21
Figura 6 - Etapas de formação do criogel a partir de mistura reacional polimérica. ....	25
Figura 7 - Formação do polímero iônico com monômeros de alginato: efeito <i>egg-box</i> . ....	27
Figura 8 - Reticulação a partir de ligações covalentes entre monômeros de AAm e MBAAm. ....	28
Figura 10 - Molécula de IgG e seus fragmentos. ....	33
Figura 11 - Fosforilação da L-tirosina resultando no O-fosfo-L-tirosina (OPT). ....	36
Figura 12 - Criogéis de PAAm-Alg-AGE com diferentes concentrações de AGE. ....	50
Figura 13 - Compressão de PAAm-Alg-AGE com diferentes concentrações de AGE. ....	50
Figura 14 - Criogel de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT. Imagens obtidas por MEV. ....	55
Figura 15 - Composição mássica do criogel de PAAm-Alg-AGE. ....	57
Figura 16 - Percentual de IgG humana de alta pureza adsorvida em PAAm-Alg-AGE-OPT em função do pH. ....	58
Figura 17 - Percentual de IgG humana de alta pureza adsorvida em PAAm-Alg-AGE-OPT em função da condutividade. ....	60
Figura 18 - Proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-OPT nas seguintes condições tamponantes: Hepes pH 7,0, Tris-HCl pH 7,0 e NaP pH 6,0. ....	61
Figura 19 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% em acrilamida) das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT realizadas com injeção de soro humano diluído nos sistemas tamponantes indicados. ....	62
Figura 20 - Proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-OPT em tampão NaP. ....	63
Figura 21 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% em acrilamida) das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT realizadas com injeção de soro humano diluído em NaP. ....	64
Figura 22 - Curva de ruptura obtida para PAAm-Alg-AGE-OPT. ....	65
Figura 23 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% de acrilamida) das frações cromatográficas referentes às curvas de ruptura realizadas em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, utilizando 2 mL de soro humano diluído em. ....	66
Figura 24 - Fragmentos totais e IgG intacta adsorvidos e não adsorvidos em PAAm-Alg-AGE-OPT. ....	68
Figura 25 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (10,0% de acrilamida) das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, realizadas com solução de IgG humana clivada nos sistemas tamponantes indicados. ....	68

Figura 26 - <i>Western blot</i> das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, realizadas com solução de IgG humana clivada nos sistemas tamponantes indicados .....	69
Figura B.1 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Hepes 10 mmol/L a pH 7,0 .....	85
Figura B.2 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Hepes 25 mmol/L a pH 7,0 .....	86
Figura B.3 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0.....	87
Figura B.4 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Tris-HCl 25 mmol/L a pH 7,0.....	88
Figura B.5 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 10 mmol/L a pH 6,0 .....	89
Figura B.6 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 25 mmol/L a pH 6,0 .....	90
Figura B.7 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 10 mmol/L a pH 6,5 .....	91
Figura B.8 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 25 mmol/L a pH 6,5. ....	92
Figura B.9 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 10 mmol/L a pH 7,0 .....	93
Figura B.10 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 25 mmol/L a pH 7,0 .....	94
Figura C.1 - Duplicata d curva de ruptura obtida para PAAm-Alg-AGE-OPT. Vazão: 1,0 mL/min .....	95
Figura C.2 - Experimento (1) e duplicata (2) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT com Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0. Cromatograma (a) e balanço de massa (b). ..	96
Figura C. 3 - Experimento (1) e duplicata (2) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT com HEPES 25 mmol/L a pH 7,0. Cromatograma (a) e balanço de massa (b).....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação na adição de APS, TEMED e AGE, na ausência e presença de íons $\text{Ca}^{2+}$ na síntese de PAAm-Alg-AGE.....	51
Tabela 2 - Balanço de massa em termos de proteínas totais e para fragmentos Fab e IgG não clivada.....	70
Tabela A.1 – IgG de alta pureza em Tris-HCl 10 mmol/L a diferentes valores de pH.....	82
Tabela A.2 - IgG de alta pureza em Tris-HCl 25 mmol/L a diferentes valores de pH.....	82
Tabela A.3 - IgG de alta pureza em NaP 10 mmol/L a diferentes valores de pH.....	83
Tabela A.4 - IgG de alta pureza em NaP 25 mmol/L a diferentes valores de pH.....	83
Tabela A.5 - IgG de alta pureza em Hepes 10 mmol/L a diferentes valores de pH.....	83
Tabela A.6 - IgG de alta pureza em Hepes 25 mmol/L a diferentes valores de pH.....	84
Tabela A.7 –Condutividade mensurada nos diferentes tampões preparados.....	84
Tabela C. 1 - Balanço de massa médio entre as curvas de ruptura de soro humano diluído 15 vezes em tampão Tris-HCl 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L a pH 7,0.....	95

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 OBJETIVO.....	16
1.2 ETAPAS DO TRABALHO.....	16
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
2.1 Cromatografia de afinidade.....	20
2.1.1 Suportes sólido empregados em cromatografia de afinidade.....	23
2.1.1.1 Criogéis monolíticos poliméricos como matriz em cromatografia de afinidade.....	24
2.1.1.1.1 Criogel monolítico de poliacrilamida com alginato.....	26
2.1.2 Tipos de ligantes empregados em cromatografia de afinidade.....	29
2.1.3 Obtenção da capacidade de adsorção: Curvas de ruptura.....	30
2.2 Imunoglobulina G e seus fagmentos .....	31
2.2.1 Purificação de IgG e seus fragmentos .....	33
2.3 cromatografia de afinidade COM O-FOSFO-L-TIROSINA IMOBILIZADA para Purificação de Imunoglobulina G humana.....	35
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
3.1 MATERIAIS.....	37
3.1.1 Reagentes.....	37
3.1.2 Equipamentos .....	37
3.2 MÉTODOS .....	38
3.2.1 Síntese do criogel híbrido de poliacrilamida com alginato e alil glicidil éter (PAAm-Alg-AGE) .....	38
3.2.1.1 Variação na concentração de AGE.....	38
3.2.1.2 Variação na concentração de APS e TEMED .....	39
3.2.2 Imobilização do ligante o-fosfo-L-tirosina (OPT).....	39
3.2.3 Clivagem enzimática de IgG policlonal: obtenção de fragmentos Fab e Fc .....	40
3.2.4 Experimentos cromatográficos .....	40
3.2.4.1 Cromatografias com IgG humana.....	41
3.2.4.2 Cromatografias com soro humano.....	41
3.2.4.3 Determinação da capacidade dinâmica do adsorvente .....	42
3.2.4.4 Cromatografia com fragmentos de IgG humana .....	42
3.2.5 Caracterização dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT .....	43
3.2.5.1 Caracterização morfológica.....	43
3.2.5.2 Quantificação da densidade de Cu <sup>2+</sup> quelatado ao criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT.....	43
3.2.5.3 Caracterizações físicas.....	44
3.2.5.3.1 Quantificação da capacidade de intumescimento.....	44
3.2.5.3.2 Quantificação da capacidade do criogel em se ligar à água presente no ar .....	45
3.2.5.3.3 Estimativa da porosidade .....	45
3.2.6 Métodos analíticos .....	46
3.2.6.1 Dosagem de proteínas totais.....	46
3.2.6.2 Eletroforese SDS-PAGE.....	46
3.2.6.3 Western blot.....	47
3.2.6.4 Quantificação de fragmentos Fab por imunodifusão radial.....	48

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL MONOLÍTICO.....	49
4.1.1 Estudo da variação da composição do criogel de PAAm-Alg-AGE .....	49
4.1.2 Imobilização e quantificação de OPT .....	53
4.1.3 Caracterização morfológica.....	54
4.1.4 Caracterização física .....	56
4.2 Ensaios cromatográficos.....	58
4.2.1 Adsorção de IgG humana de alta pureza em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT ..	58
4.2.2 Purificação de IgG a partir do soro humano .....	60
4.2.2.1 Capacidade dinâmica de adsorção de PAAm-Alg-AGE-OPT .....	65
4.2.3 Purificação de fragmentos Fab .....	67
CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO .....	72
CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
APÊNDICE A. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM IgG DE ALTA PUREZA .....	82
A.1 – Balanço de massa para cromatografias com IgG de alta pureza em PAAm-Alg-AGE-OPT.	82
A.2 Medida de condutividade dos tampões PARA DIFERENTES VALORES DE pH.....	84
APÊNDICE B. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM SORO HUMANO .....	85
APÊNDICE C. CURVAS DE RUPTURA .....	95

## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A purificação é uma etapa crítica na produção de proteínas destinadas a aplicações em uso diagnóstico ou parenteral e, muitas vezes, a de maior custo, representando até 80% do custo de todo o bioprocessamento (LOWE, LOWE e GUPTA, 2001; ROQUE, LOWE e TAIPA, 2004). Ainda, de acordo com Straathof (2011), o custo para recuperação e purificação de bioprodutos farmacêuticos pode representar até 92% do custo total do bioprocessamento. De forma geral, esse alto custo está atrelado à necessidade de obtenção da substância ativa com alto grau de pureza a partir do sobrenadante da cultura celular, caldos fermentados, células, fluidos ou tecidos humanos, vegetais ou animais. Portanto, devido à natureza proteica complexa do meio em que se encontra o bioproduto, a purificação consiste em uma série de etapas, que geralmente englobam diferentes operações unitárias.

Um exemplo de biomolécula de alto valor agregado purificada a partir de misturas proteicas complexas são os anticorpos. Estes consistem em imunoglobulinas naturalmente encontradas no plasma sanguíneo de vertebrados, cuja principal função é a de promover a imunidade celular (JANEWAY *et al.*, 2001). Anticorpos também podem ser expressos *in vitro* a partir de cultivo celular. Devido à alta estabilidade e especificidade, essas moléculas possuem aplicações médico-farmacêuticas, terapêuticas e diagnósticas. Em 2004, os anticorpos e seus derivativos já representavam 20% dos produtos biofarmacêuticos em desenvolvimento (ROQUE, LOWE e TAIPA, 2004) e o mercado de anticorpos monoclonais para uso terapêutico já havia movimentado mais de 11 bilhões de dólares (CHAMES, 2009). No ano de 2016, de acordo com a *Future Market Insights*, junto com seus fragmentos, os anticorpos movimentaram um mercado de 105 bilhões de dólares (FUTURE MARKET INSIGHTS, 2016), com previsão de 112,18 bilhões para 2021 (MED GADGET, 2017).

Para baratear o processo de purificação de imunoglobulina G (IgG) humana em larga escala, é comum a utilização de métodos físico-químicos para remoção da maior parte das moléculas indesejáveis, no entanto, esses métodos são seguidos por técnicas cromatográficas de afinidade para purificação final da IgG. Nos casos de escala laboratorial ou uso em testes diagnósticos, a IgG e seus fragmentos são purificados diretamente por técnicas seletivas, sendo comum o uso da cromatografia de afinidade com as proteínas A ou G imobilizadas (MURPHY, DEVINE e O’KENNEDY, 2016).

Ao empregar a técnica de cromatografia de afinidade para purificação desta glicoproteína, uma atenção especial deve ser dada à matriz cromatográfica, visto que esta desempenha um papel importante na eficiência e resolução da separação. Tradicionalmente,

são empregadas partículas esféricas porosas, constituídas por géis de agarose ou polímeros orgânicos e/ou sintéticos como fase estacionária. No entanto, estes géis apresentam limitações quando operados em vazões elevadas, tais como transferência de massa difusional lenta e formação de caminhos preferenciais (BUENO e MIRANDA, 2005). As limitações desses materiais alavancaram o estudo e desenvolvimento de novos suportes sólidos. Como consequência, a introdução de leitos monolíticos como fase estacionária em cromatografia e o aperfeiçoamento das técnicas utilizadas para sua obtenção impactaram a indústria farmacêutica, as aplicações médicas e analíticas (BARROSO *et al.*, 2013).

Monolitos são blocos contínuos, com estrutura sólida e porosa, sintetizados a partir de monômeros, precursores poliméricos ou materiais inorgânicos. Quando sintetizados em condições criogênicas, ou seja, em temperaturas suficientemente baixas para que haja o congelamento do solvente, os cristais do solvente atuam como agentes formadores de poros, resultando em estruturas conhecidas como criogéis (LOZINSKY *et al.*, 2003; ERTÜRK e MATTIASSON, 2014). Devido à estrutura macroporosa, na qual os macroporos encontram-se interconectados, os criogéis monolíticos tem sido empregados como fase estacionária em cromatografia de afinidade para purificação de diversas proteínas, inclusive anticorpos, provenientes de diferentes fontes (BARROSO *et al.*, 2013). Esses materiais também apresentam a vantagem de suportarem vazões mais elevadas que os géis tradicionais, proporcionando o transporte de massa preferencialmente convectivo, minimizando assim a principal limitação dos leitos particulados, os quais sofrem compactação ao serem submetidos a vazões elevadas. Além disso, os monolitos também possibilitam permeabilidade homogênea, extinguindo a formação de caminhos preferenciais (GAGNON, 2012).

Para purificação de IgG humana por cromatografia de afinidade, é comum a funcionalização da fase estacionária com moléculas chamadas de ligantes, que podem apresentar caráter hidrofóbico, ser neutros, bem como possuir cargas, positiva ou negativa, e também podem apresentar sítios específicos para interação por afinidade. Então, devido às suas propriedades mecânicas e morfológicas, os criogéis monolíticos com ligantes imobilizados são fases estacionárias com potencial a serem utilizadas em processos de purificação em pequena e larga escala, principalmente para moléculas grandes como proteínas, DNA, vírus e plasmídios (ARRUA e IGARZABAL, 2011).

Como ligantes de afinidade em processos industriais de purificação de IgG humana, é comum o uso das proteínas A e G. Contudo, estas apresentam algumas desvantagens, pois são proteínas de difícil obtenção e manipulação, possuem vida útil limitada por apresentarem rápida perda de atividade com o tempo de utilização quando

comparadas aos ligantes pseudobiospecíficos. Ainda, por apresentarem alta afinidade por IgG, a eluição destas é possível somente a baixos valores de pH, o que pode levar a agregação do bioproduto (ROQUE, SILVA e TAIPA, 2007). Os baixos valores de pH podem, também, após repetidos ciclos de utilização da coluna cromatográfica, acarretar na hidrólise ou desprendimento das proteínas A e G, contaminando o bioproduto com traços do ligante, o que pode desencadear uma resposta imune ao organismo receptor. Sendo assim, além dessas proteínas estarem diretamente relacionadas ao alto custo da etapa de purificação de IgG, há diversos outros motivos pelos quais a investigação de ligantes alternativos tem sido intensificada nas últimas décadas. Tudo isso, aliado a crescente demanda por IgG, justifica a busca por metodologias mais robustas, simples, eficientes e que tenham um custo mais praticável no que diz respeito à purificação de anticorpos a partir de misturas complexas como plasma, soro, fluidos humanos e sobrenadante de cultura de células, mesmo em escala laboratorial. Nesse contexto, a cromatografia de afinidade ainda é tida como uma das técnicas mais eficientes para a purificação de IgG em um reduzido número de etapas e, ao otimizar algumas de suas propriedades, como suporte sólido, tipo de ligante e condições tamponantes, ela pode ser aplicada à purificação em larga escala, atingindo altos rendimentos com nível elevado de pureza (ARORA, SAXENA e AYYAR, 2017).

Atualmente, a literatura relata alguns ligantes pseudobiospecíficos capazes de capturar IgG de forma seletiva. Em comparação aos biospecíficos supracitados, esses ligantes compreendem moléculas menores, mais robustas e de fácil imobilização, as quais apresentam, também, menor custo de obtenção e maior estabilidade química e física durante os processos de sanitização e esterilização (VIJAYALAKSHMI, 1989 e SAVANE *et al.*, 2016). Dentre os ligantes pseudobiospecíficos capazes de purificar IgG, peptídeos, aminoácidos, corantes, íons metálicos, aminas, tióis e boronatos apresentam potencial para a captura desta biomolécula. Devido ao potencial de adsorção atrelado à seletividade para purificação de IgG a partir de diferentes fontes, os aminoácidos e seus derivados vêm sendo muito estudados.

Recentemente, estudos realizados por Pavan *et al.* (2017) e Pavan *et al.* (2019) mostraram que o derivado de aminoácido o-fosfo-L-tirosina (OPT), quando imobilizado via grupamento amino em gel de agarose, capturou IgG a partir do plasma humano e, quando em condições tamponantes favoráveis, adsorveu os fragmentos proteolíticos Fab a partir de uma solução proveniente da digestão enzimática da IgG por papaína. A hipótese levantada para explicar a captura deve-se às interações entre a IgG presente no plasma humano e os grupos carboxilato e fosfato-aromático, carregados negativamente.

Como o suporte sólido para imobilização do ligante é outro fator importante em cromatografia de afinidade, as fases estacionárias monolíticas podem ser aliadas ao ligante OPT. Com isso, através da introdução de grupos reativos, é possível imobilizar este ligante a criogéis monolíticos. Mourão, Haupt e Bueno (2018) sintetizaram pela primeira vez um criogel monolítico a base de poliacrilamida (PAAm) e alginato (Alg) para uso como fase estacionária em cromatografia. Após a síntese, os autores ativaram este suporte com epícloridrina e bisoxirano (1,4 butanodioldiglicidil éter), possibilitando sua posterior funcionalização com o ligante OPT. Após estudos cromatográficos de adsorção, os autores reportaram potencial uso do adsorvente na purificação de IgG a partir do soro humano e para separação dos fragmentos proteolíticos dessa biomolécula. No entanto, o criogel desenvolvido pelos autores necessita de uma etapa de ativação após a síntese, acarretando em maior tempo e, conseqüentemente, maior custo para a obtenção do adsorvente. Frente a isso, o presente trabalho visa sintetizar o monolito contendo grupos reativos que possibilitem a posterior imobilização do ligante OPT.

## 1.1 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo sintetizar um monolito a base de poliacrilamida e alginato pela técnica de criopolimerização, com propriedades adequadas para ser utilizado como fase estacionária em cromatografia para purificação de biomoléculas. Para a síntese, foram utilizados grupamentos epóxi reativos provenientes do alil glicidil éter (AGE) juntamente com monômeros de acrilamida, bisacrilamida e alginato. Após completa polimerização do monolito, o criogel pode ser funcionalizado com o ligante pseudobioespecífico OPT, obtendo-se o adsorvente PAAm-Alg-AGE-OPT, o qual foi empregado em cromatografia de pseudobioafinidade para a purificação de IgG do soro humano e de seus fragmentos proteolíticos (Fab e Fc) a partir de solução de IgG clivada enzimaticamente.

## 1.2 ETAPAS DO TRABALHO

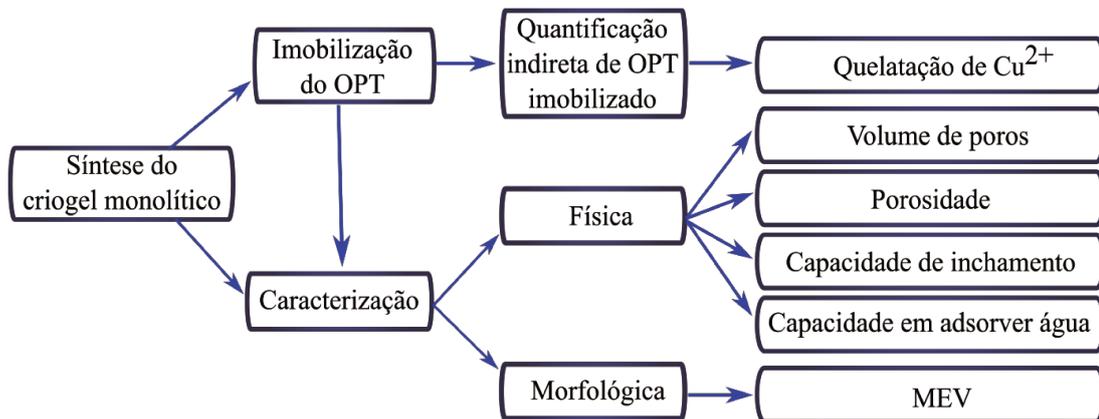
Para alcançar o objetivo proposto, o trabalho encontra-se dividido em cinco etapas:

- 1) Preparação e caracterização da fase estacionária;

- 2) Ensaios cromatográficos com IgG de alta pureza em diferentes condições tamponantes;
- 3) Ensaios cromatográficos com soro humano em diferentes condições tamponantes;
- 4) Purificação de fragmentos de IgG a partir de IgG humana clivada pela enzima papaína nas condições tamponantes selecionadas;
- 5) Curva de ruptura para determinação da capacidade dinâmica de adsorção de IgG a partir do soro humano.

A Figura 1 apresenta um esquema da primeira etapa do trabalho, na qual foi realizada a síntese e caracterização do criogel monolítico.

Figura 1 - Etapa 1: Preparação e caracterização da fase estacionária.



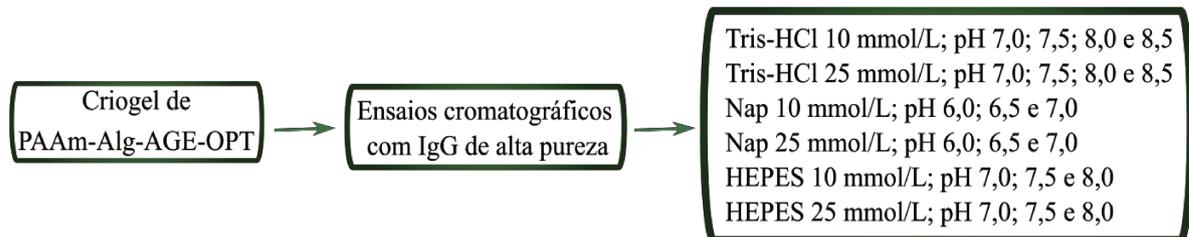
Fonte: Própria autora (2018)

O monolito foi baseado no criogel de PAAm-Alg, desenvolvido por Mourão, Haupt e Bueno (2018). No entanto, neste trabalho, foi realizada uma modificação química em sua síntese, na qual grupamentos epóxi foram incorporados pela adição de diferentes concentrações de alil glicidil éter (AGE) diretamente na solução reacional para a síntese do material, o qual foi desenvolvido na presença e ausência de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os grupamentos epóxi possibilitaram a obtenção de um criogel monolítico composto por PAAm-Alg-AGE e, por serem reativos, permitiram a imobilização direta do ligante OPT. Com isso, ainda nessa etapa, o ligante foi covalentemente imobilizado ao monolito, funcionalizando-o. A quantidade de OPT imobilizado foi mensurada de forma indireta, por quelação de íons metálicos de  $\text{Cu}^{2+}$ . Além disso, realizou-se a caracterização física, em que foram obtidos dados de porosidade, volume de poros, capacidade de inchamento e de adsorção de água; e morfológica, para visualizar e medir os poros presentes no material. Todas estas

caracterizações descritas foram realizadas para os criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT.

Após síntese e caracterização do monolito PAAm-Alg-AGE-OPT, ensaios cromatográficos foram realizados para verificar o potencial do criogel em adsorver IgG de alta pureza. As condições cromatográficas utilizadas encontram-se no esquema da Figura 2 e configuram a etapa 2.

Figura 2 - Etapa 2: Ensaios cromatográficos preliminares com IgG de alta pureza.

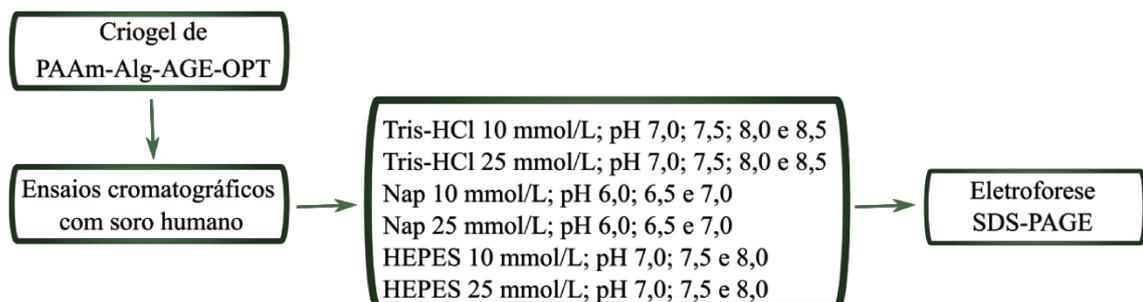


Fonte: Própria autora (2018)

Como estratégia, foram empregados três tipos de sistemas tamponantes em diferentes valores de pH, dentro de sua respectiva faixa de tamponamento: Tris-HCl, cuja carga líquida apresenta-se positiva; NaP, que apresenta carga negativa e Hepes que, por ser zwitteriônico, apresenta carga líquida predominantemente nula quando em pH 7,0 e 7,5 (apresentando carga líquida negativa quando em pH 8,0). Ainda, como estratégia para alterar a densidade de cargas líquida em solução, esses tampões foram empregados em duas molaridades distintas, sendo utilizados nas concentrações de 10 e 20 mmol/L.

Na sequência, as mesmas condições foram empregadas para o estudo da seletividade do adsorvente para IgG presente em soro humano. A Figura 3 ilustra a terceira etapa do trabalho.

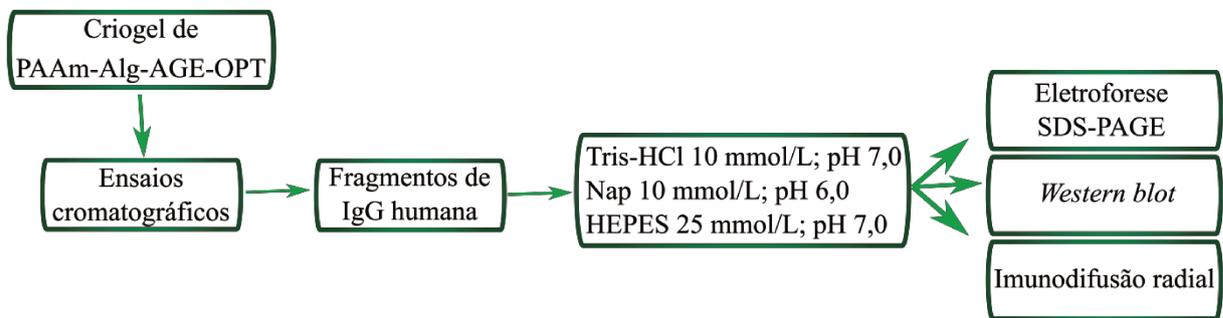
Figura 3 - Etapa 3: Ensaios cromatográficos com soro humano.



Fonte: Própria autora (2018)

Para esse estudo, soro humano foi diluído nos diferentes tampões supracitados e a seletividade do adsorvente para cada condição foi qualitativamente analisada por eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e não desnaturantes. Na sequência foram realizados estudos de interação entre o adsorvente e os fragmentos Fab e Fc de IgG humana. Estes foram conduzidos por ensaios cromatográficos e compreendem a quarta etapa, conforme esquema apresentado pela Figura 4.

Figura 4 - Etapa 4: Ensaios cromatográficos com solução de IgG humana clivada pela enzima papaína.



Fonte: Própria autora (2018)

Nessa etapa, as cromatografias foram realizadas alimentando a coluna cromatográfica com solução de IgG clivada nas condições tamponantes apresentadas pela Figura 4. A identificação dos fragmentos adsorvidos foi realizada por eletroforese SDS-PAGE em condições redutoras e não desnaturantes e *Western blot*. A quantificação, em termos de Fab, foi realizada por imunodifusão radial.

Na quinta e última etapa, a capacidade dinâmica de adsorção de IgG na fase estacionária foi obtida através da alimentação contínua de soro humano diluídos nos tampões que proporcionaram melhor seletividade.

## CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados tópicos de conhecimentos básicos, fundamentais para o entendimento do trabalho. Para melhor compreensão, a revisão bibliográfica está dividida em: cromatografia de afinidade, que aborda as principais características da técnica, destacando o desenvolvimento de suportes sólido e tipos de ligantes empregados; imunoglobulina G (IgG) humana, definindo as principais características desta proteína bem como alguns métodos para sua purificação; e por fim, a cromatografia de afinidade para purificação de IgG humana, utilizando aminoácido como ligante alternativo.

### 2.1 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

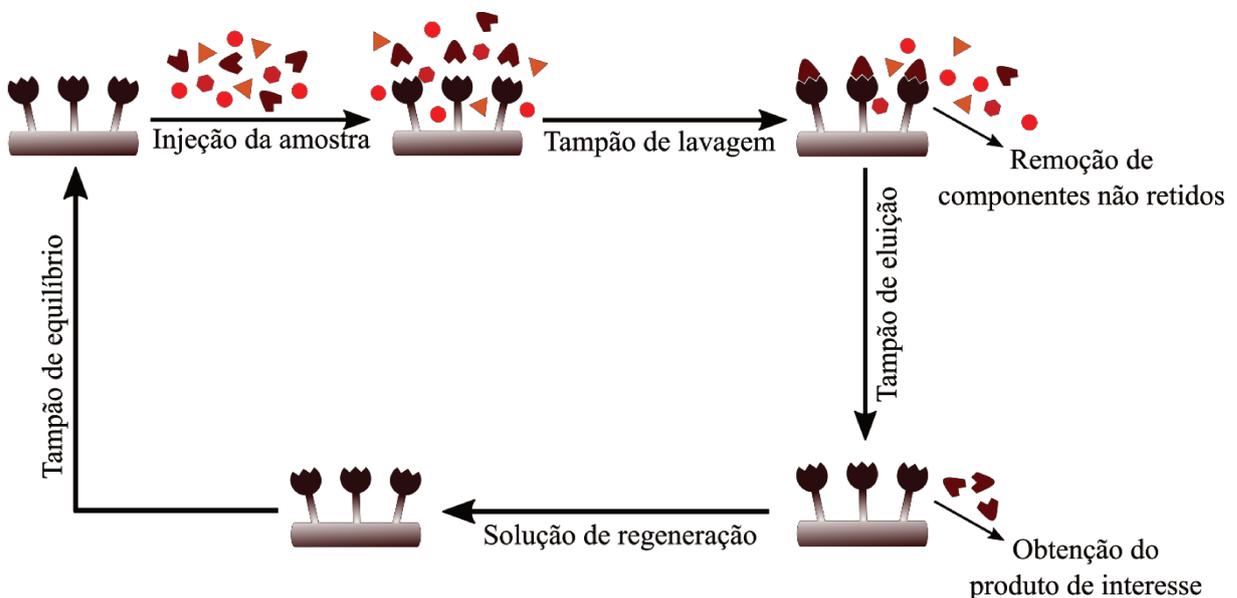
No final da década de sessenta, Axén, Porath e Ernback (1967) publicaram pela primeira vez um modo efetivo de ativação química de polissacarídeos. O método consiste em utilizar haletos de cianogênio, como brometo, iodeto ou cloreto de cianogênio (CNBr, ICN e NCCI, respectivamente) para ativação de suportes sólidos compostos por polissacarídeos insolúveis, para posterior imobilização de peptídeos e proteínas. Utilizando esses haletos, os autores ativaram dextrana, celulose e amido. Empregaram também CNBr para ativar gel de agarose, o qual foi funcionalizado com a enzima quimotripsina. Para avaliar se houve perda da atividade enzimática após sua imobilização, os autores mensuraram a atividade esterolítica para N-acetil-L-tirosina etil éster e a atividade proteolítica para a caseína, antes e após a imobilização. Eles então verificaram o sucesso da técnica de imobilização e constataram que não houve perda na atividade enzimática para ambos os substratos (PORATH, AXÉN e ERNBACK, 1967; ROQUE e LOWE, 2008).

No ano seguinte, Cuatrecasas, Wilchek e Anfinsen (1968) empregaram a técnica de ativação com CNBr para ativar gel de agarose (Sephacrose<sup>®</sup>) e imobilizaram 3'-(4-aminofenilfosforil)-desoxitimidina-5'-fosfato (derivado do inibidor da enzima nuclease de estafilococo), D-triptofano metil éster (derivado do inibidor de  $\alpha$ -quimotripsina) e L-tirosina-D-triptofano (inibidor de carboxipeptidase A) e, através da técnica de cromatografia de afinidade, as enzimas nuclease de estafilococos,  $\alpha$ -quimotripsina e carboxipeptidase A foram seletivamente adsorvidas a partir de seus respectivos caldos fermentados e sem perda significativa da atividade enzimática. Os autores atribuem o resultado à afinidade entre cada par enzima-inibidor utilizado. Esses são os primeiros relatos de cromatografia de afinidade.

A técnica consiste em cromatografia líquida de adsorção capaz de separar, seletivamente, biomoléculas presentes em uma solução ou mistura complexa. A separação ocorre devido à interação de uma biomolécula específica com determinados agentes covalentemente imobilizados em uma matriz sólida que compõe a fase estacionária (leito fixo) do módulo cromatográfico (LI, Z. *et al.*, 2017). Esses agentes de origem biológica ou não, denominados ligantes, quando capazes de interagir de forma reversível e seletiva com determinada biomolécula, possibilitam a empregabilidade da técnica em diferentes aplicações, desde a escala analítica à industrial. Para tanto, faz-se necessário que algumas propriedades relacionadas ao sistema cromatográfico sejam otimizadas, impactando assim, na especificidade, seletividade e reprodutibilidade do processo de purificação (ARORA, SAXENA e AYYAR, 2017).

Como exemplificado por Pfaunmiller *et al.* (2013) e Li, Z. *et al.* (2017), são três as etapas para purificação por cromatografia de afinidade: adsorção, lavagem e eluição (Figura 5).

Figura 5 - Esquema ilustrativo das etapas da cromatografia de afinidade.



Fonte: Própria autora (2019)

Conforme os autores Pfaunmiller *et al.* (2013) e Li, Z. *et al.* (2017), primeiramente, uma solução contendo a molécula a ser purificada é alimentada na coluna cromatográfica previamente equilibrada com um tampão adequado (tampão de equilíbrio). A

alimentação ocorre na presença deste mesmo tampão, que deve proporcionar condições de pH e força iônica que permita que o ligante, presente na fase estacionária, reconheça e adsorva a molécula alvo. O fenômeno de adsorção desta molécula corresponde à primeira etapa da cromatografia de afinidade. Após essa etapa, o mesmo tampão de alimentação percola continuamente o leito fixo, até que todas as biomoléculas não adsorvidas sejam arrastadas para fora do sistema cromatográfico. Esta remoção de moléculas não adsorvidas é característica da segunda etapa, denominada lavagem. Terminada a lavagem, inicia-se a terceira e última etapa da purificação, denominada eluição. A eluição é iniciada pela troca do tampão de lavagem pelo de eluição. Dessa forma, devido a mudança de alguma característica, como pH, força iônica, polaridade, ou a adição de algum agente competitivo no tampão de adsorção, o tampão de eluição tem como objetivo proporcionar o enfraquecimento da interação entre a biomolécula anteriormente adsorvida e o ligante em questão, e sua consequente eluição. As moléculas eluídas podem ser obtidas de forma isolada. Ainda, após a eluição, é imprescindível a regeneração do sistema cromatográfico. Para isso, uma solução que permita que o sistema retorne ao seu estado inicial é utilizada, possibilitando a realização de um novo ciclo de purificação iniciado pela etapa de equilíbrio do adsorvente com a fase móvel utilizada na etapa de adsorção.

Devido à capacidade de adsorção seletiva e reversível apresentada, a cromatografia de afinidade pode ser utilizada na purificação de grandes quantidades de proteínas mesmo quando a proteína de interesse apresenta-se em menor teor num sistema proteico complexo. Por ser uma técnica de alta resolução, capaz de proporcionar pureza na faixa de 80 a 99%, ela é amplamente utilizada na purificação de extratos ou remoção de algum componente de uma mistura complexa (HAGE, 2017). Além disso, a cromatografia de afinidade pode ser empregada para obtenção de constantes termodinâmicas e cinéticas de interação entre o ligante e a molécula alvo (LI, Z. *et al.*, 2017), dados imprescindíveis para definir a viabilidade do uso do sistema cromatográfico e escalonamento da técnica.

Em decorrência das infinitas de combinações entre suporte sólido e ligante a serem empregados, é incessante a busca por um conjunto capaz de proporcionar a purificação do produto de interesse de maneira econômica e eficiente. Portanto, é desejável que o suporte sólido a ser utilizado para imobilização do ligante apresente algumas características fundamentais e que o ligante reconheça e capture a biomolécula alvo de forma reversível.

### 2.1.1 SUPORTES SÓLIDO EMPREGADOS EM CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Por compor a fase estacionária do sistema cromatográfico, é necessário que o suporte sólido atenda algumas características desejáveis. Assim, ele deve ser insolúvel; inerte às etapas de adsorção, lavagem e eluição; estável à variação de pH e poroso, com poros de tamanho suficientemente grande para que possibilite o acesso de biomoléculas em seu interior. Deve ser também permeável e apresentar estabilidade morfológica, mecânica e química, capazes de proporcionar seu reuso (CABRERA e WILCHEK, 1988; ARRUA e IGARZABAL, 2011).

Sobretudo, é importante destacar que o suporte a ser utilizado deve apresentar ou possibilitar a introdução de grupos reativos, tornando possível a posterior imobilização do ligante. A necessidade em atender a essas características foi fundamental para alavancar o estudo e desenvolvimento de novos materiais com potencial a serem empregados em cromatografia de afinidade (BARROSO *et al.*, 2013).

Até a década de noventa era comum o uso de leitos empacotados com partículas sólidas, principalmente as porosas, compostas por sílica ou gel de agarose, como suporte sólido em cromatografia de afinidade. No entanto, nesse tipo de matriz, é comum a transferência de massa difusiva devido ao filme formado ao redor das partículas, o que acarreta lentidão ao processo de purificação (GAGNON, 2012). Com isso, o desenvolvimento de novas matrizes, como membranas e monolitos, bem como o aperfeiçoamento das técnicas utilizadas para obtenção destas matrizes beneficiaram a indústria farmacêutica, aplicações médicas e analíticas (BRANDT *et al.*, 1988; SVEC e FRÉCHET, 1992; THÖMMES e KULA, 1995).

Por suportarem vazões elevadas, essas matrizes proporcionam transporte de massa preferencialmente convectivo e, por isso, minimizam a principal limitação dos leitos particulados. Além disso, em membranas e monolitos, a formação de caminhos preferenciais é extinta, possibilitando permeabilidade mais homogênea, diferente ao observado em leitos empacotados com partículas sólidas porosas (GAGNON, 2012).

Em comparação às colunas monolíticas, as membranas, mesmo quando operadas em modo tangencial, são limitadas a menor capacidade de adsorção volumétrica por ciclo, o que acarreta em baixa produtividade e, conseqüentemente, maior volume de tampão necessário. Nesse ponto, os monolitos se destacam em relação às membranas e, por isso, novos materiais e metodologias de síntese para essas matrizes vem sendo estudados.

Outra vantagem dos monolitos, descrita por Celebi (2017), consiste em sua versatilidade estrutural, uma vez que eles podem ser sintetizados em diferentes formatos como colunas, discos, capilares e microchip. Além disso, a literatura apresenta diversas combinações de materiais para a síntese de monolitos, desde polímeros orgânicos como glicidil metacrilato e etileno glicol dimetacrilato, até materiais inorgânicos, como sílica, e mistura entre dois ou mais materiais (PFAUNMILLER, 2013). Dentre as matrizes monolíticas existentes, os criogéis poliméricos, obtidos em temperatura de congelamento de uma mistura reativa em polimerização, tem mostrado potencial para serem empregados como suporte sólido para a imobilização de ligantes em cromatografia de afinidade.

#### 2.1.1.1 *Criogéis monolíticos poliméricos como matriz em cromatografia de afinidade*

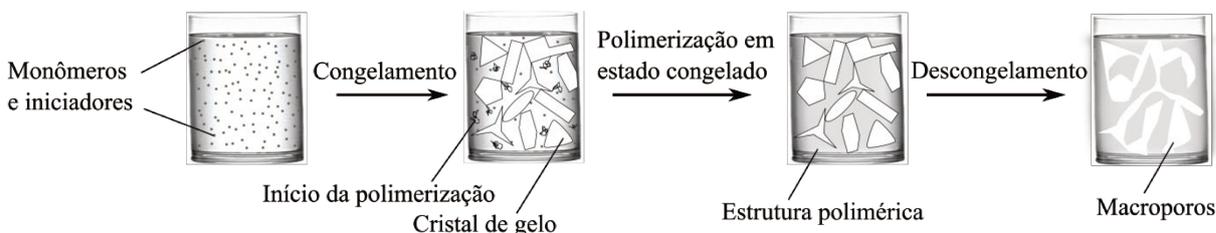
Criogel monolítico polimérico é um tipo de fase estacionária unitária (bloco contínuo) e macroporosa, com potencial a ser empregado como suporte para imobilização de ligantes em técnica de cromatografia de afinidade. Esse tipo de material pode ser empregado ao se trabalhar com purificação de biomacromoléculas provenientes de fontes naturais, pois devido à densidade de macroporos interconectados é possível processar fluidos biológicos viscosos como sangue ou plasma sem perda de carga pronunciada e com fluxo predominantemente convectivo (BAKSHPOUR *et al.*, 2019).

Esses suportes, geralmente hidrofílicos, podem ser obtidos a partir da combinação de diferentes monômeros e precursores poliméricos, sob condição de congelamento do solvente (Figura 6). Portanto, é necessário que a mistura reacional seja submetida a temperaturas negativas, entre -5 e -20 °C, para que o solvente seja congelado. Com isso, cristais de gelo de formato irregular são formados, de modo que os monômeros e precursores dissolvidos se aglomerem em pequenas regiões entre esses cristais. São nessas regiões que a polimerização prossegue, de forma lenta, sendo o gelo o agente formador de poros. Após completa polimerização, a estrutura resultante é descongelada e o gelo dá lugar a macroporos não uniformes e interconectados, por onde a fase móvel percolará (KUMAR e SRIVASTAVA, 2010; ERTÜRK e MATTIASSON, 2014).

Outras características que diferem os criogéis dos géis tradicionais estão relacionadas à sua elasticidade e estabilidade mecânica que, de acordo com o estudo apresentado por Ingavle *et al.* (2015), são dependentes do tipo e quantidade de polímero e/ou monômeros utilizados, temperatura de síntese e agentes de ligações cruzadas. Portanto, quanto menor for a temperatura de síntese, mais rápido será o congelamento do solvente, o

que favorece a nucleação de um maior número de pequenos cristais. Esse fato reflete um aumento local da concentração de monômeros e, conseqüente, diminuição do tamanho de poros (LOZINKSY *et al.*, 1986).

Figura 6 - Etapas de formação do criogel a partir de mistura reacional polimérica.



Fonte: Adaptado de Plieva *et al.* (2004a) e Plieva *et al.* (2004b).

Atualmente, a literatura apresenta diversas combinações de monômeros para a síntese de criogéis por polimerização radicalar, como o 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (PLIEVA, GALAEV e MATTIASSON, 2007; ÇORMAN, 2018), poliácridamida (PAAm) (PLIEVA *et al.*, 2004a; PLIEVA *et al.*, 2004b; MÓL *et al.*, 2017), N,N-dimetilacrilamida (DMAAm) (KUMAR *et al.*, 2003) e outros, que permitem ser ativados de diferentes formas para posterior funcionalização e uso como leito fixo em cromatografia de afinidade.

Kumar *et al.* (2003), por exemplo, prepararam criogel de DMAAm a partir dos monômeros DMAAm, N,N'-metileno-bisacrilamida (MBAAm) e alil glicidil éter (AGE). A polimerização radicalar foi iniciada com persulfato de amônio (APS) e catalisada por N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED). O criogel obtido foi ativado quimicamente e a este foi imobilizado proteína A como ligante, diretamente nos grupos epóxi ativados e também utilizando braços espaçador com 7 e 11 átomos de carbono. O gel funcionalizado foi utilizado para adsorver linfócitos B (os quais expressam IgG em sua superfície) a partir de sangue humano. Os autores capturaram esses linfócitos com diferentes percentuais de recuperação e pureza, que variaram de acordo com o comprimento do braço espaçador utilizado. Com isso, foi possível mostrar que o material sintetizado apresentou potencial a ser empregado em processos de purificação por cromatografia de afinidade e que mesmo com vazão elevada, igual a 1,5 mL/min, as moléculas percolaram livremente pelos macroporos (10 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro) do criogel, permitindo recuperação superior a 90% na melhor condição empregada.

Mól *et al.* (2017) imobilizaram hidroximetil aminometano pelo grupo amino do ligante diretamente nos grupamentos epóxi ativado do criogel de PAAm, sintetizado a partir dos monômeros de acrilamida (AAm), MBAAm e AGE. Após iniciação radicalar com APS e

empregando TEMED como catalisador, o material resultante, com diâmetro de poro entre 10 e 80  $\mu\text{m}$ , foi empregado para purificar lisozima da clara do ovo. Como resultado, os autores obtiveram boa recuperação, igual a 72% nas melhores condições testadas, destacando o potencial em utilizar o material sintetizado como leito fixo em processos cromatográficos.

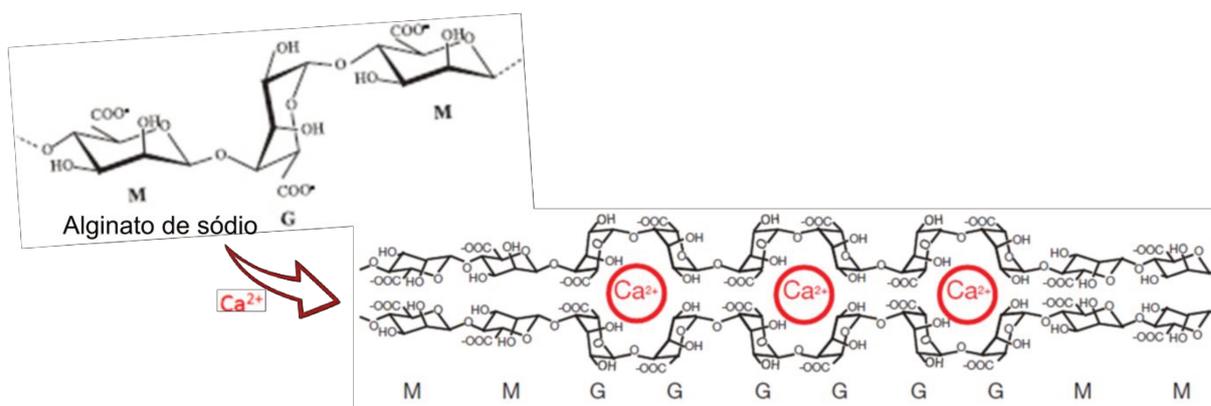
Çorman (2018) sintetizou criogel de HEMA empregando o monômero de 2-hidroxi-etil metacrilato e MBAAm como agente de ligação cruzada. APS foi utilizado como iniciador e TEMED como catalisador. O material obtido apresentou diâmetro de poro entre 20 e 100  $\mu\text{m}$  e grupos  $-\text{OH}$  reativos que, após a ativação, possibilitou a imobilização de poli-L-lisina. A estrutura final foi utilizada para remover bilirrubina de plasma humano de forma seletiva a partir da cromatografia de afinidade, demonstrando o uso efetivo deste material para este fim.

Dentre tantos outros exemplos encontrados na literatura, essas são apenas algumas aplicações que empregam diferentes criogéis como matriz em técnicas de cromatografia de afinidade. No entanto, o sucesso na utilização desses materiais como suporte sólido depende da possibilidade de modificações químicas na superfície do material, através dos mais variados métodos de ativação, para posterior funcionalização com diferentes tipos de ligantes, a serem utilizados na purificação de biomoléculas, por exemplo (ARRUA e IGARZABAL, 2011; BARROSO *et al.*, 2013; ERTÜRK e MATTIASSON, 2014). Criogéis também podem ser empregados em outras aplicações, dentre elas destacam-se as biomédicas que compreendem cultivo de células animais, a serem aplicadas em regeneração de diferentes tecidos (HIXON, LU e SELL, 2017).

#### 2.1.1.1.1 Criogel monolítico de poliacrilamida com alginato

A capacidade do alginato em formar ligações cruzadas na presença de cátions divalentes e trivalentes, quando em contato com um iniciador de polimerização, é conhecida e bem descrita na literatura (OMIDIAN, ROCCA e PARK, 2006; GURIKOV e SMIRNOVA, 2018). Tal capacidade está associada à estrutura de bloco linear do alginato (Figura 7), que é um copolímero constituído por resíduos de dois ácidos urônicos, o ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e o ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha(1-4)$ . Em condições ambientes e na presença de cátions divalentes, as unidades adjacentes do bloco G tendem a criar cavidades eletronegativas, que alocam esses cátions em seu centro, resultando em uma estrutura organizada. Essa estrutura, ilustrada pela Figura 7, é originalmente conhecida por *egg-box* (caixa de ovos) e resulta da organização iônica do alginato (LOW *et al.*, 2015; LI ZHANG e WOND, 2017).

Figura 7 - Formação do polímero iônico com monômeros de alginato: efeito *egg-box*.



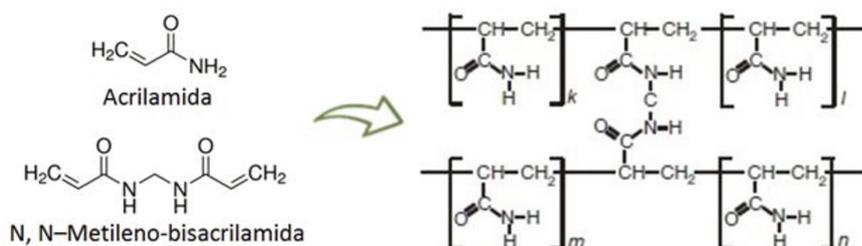
Fonte: Adaptada de Sun, J. *et al.* (2012)

Zhao *et al.* (2016) foram os primeiros a demonstrarem a possibilidade em formar uma estrutura polimérica empregando apenas alginato em condições criogênicas. Para isso, os autores diminuíram o pH para valores entre 2 e 4 de uma solução contendo 0,5 a 1,0% de alginato de sódio. Devido aos blocos M e G possuírem pKa de 3,4 e 3,6, respectivamente, em pH inferior ao pKa desses blocos, as unidades que contém ácido carboxílico apresentam-se pouco dissociadas diminuindo o grau de ionização do alginato, que acarreta em menor repulsão eletrostática dos grupamentos negativamente carregados e, como consequência, as cadeias do polímero ficam mais próximas, favorecendo a formação de precipitados por forças de Wan der Waals ou ligações de hidrogênio. A partir dessa evidência, outras formas de polimerização do alginato foram estudadas, inclusive em misturas binárias e ternárias contendo este monômero, como o polímero de alginato e álcool polivinílico e o formado por gelatina, ácido hialurônico e alginato, respectivamente (GURIKOV e SMIRNOVA, 2018); isso porque as propriedades mecânicas de materiais híbridos são, em geral, muito melhores em relação às desses polímeros naturais isolados (SAMANTA e RAY, 2014).

De forma paralela, criogéis de PAAM são bastante explorados como suporte sólido em processos de purificação e, portanto, o mecanismo de sua síntese já está consolidado (KUMAR e SRIVASTAVA, 2010). Esses criogéis possuem resistência química, física e mecânica, e apresentam estrutura macroporosa, de fácil acessibilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Sua síntese envolve a copolimerização radicalar dos monômeros de AAm, e reticulação com o monômero MBAAm, acrescidos ou não de outros monômeros como AGE, a temperaturas negativas e na presença de iniciadore e catalisador de polimerização (ERTÜRK e MATTIASSON, 2014). Dessa forma, a polimerização é iniciada

com APS e catalisada por TEMED. O APS, quando em água, promove a formação dos radicais livres e, ao entrar em contato com a solução dos monômeros, proporciona a formação do radical de AAm, que reage com sucessivos monômeros de AAm, resultando em longas cadeias. Essas cadeias então são unidas devido à ação do agente reticulante MBAAm. Após completa polimerização, a estrutura química resultante é semelhante a do hidrogel apresentada na Figura 8. A diferença consiste, basicamente, na velocidade de polimerização que, para o criogel, será reduzida em decorrência das baixas temperaturas, resultando em estruturas com maior densidade e tamanho de poros.

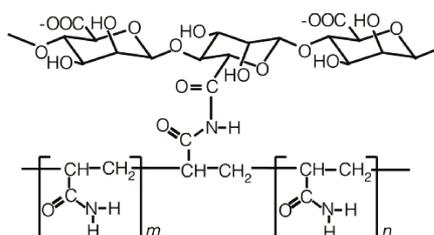
Figura 8 - Reticulação a partir de ligações covalentes entre monômeros de AAm e MBAAm.



Fonte: Adaptada de Sun, J. *et al.* (2012)

Ao incorporar alginato de sódio na presença de íons divalentes (como  $\text{Ca}^{2+}$  por exemplo) em solução de PAAm acrescida de APS e TEMED e, após inicialização da reação com luz ultravioleta a 50 °C, a polimerização radicalar é possibilitada, resultando na formação de uma estrutura semelhante à ilustrada pela Figura 9. Nesse caso, quando em contato, as cadeias de alginato e poli(acrilamida) são covalentemente unidas pelos grupos amina das cadeias de poli(acrilamida) e grupos carboxílicos do alginato (SUN, J. *et al.*, 2012), resultando em uma estrutura elástica e com características mecânicas adequadas para uso como leito cromatográfico.

Figura 9 - Hidrogel híbrido formado a partir de ligações covalentes entre o polímero iônico de alginato e o de PAAm.



Fonte: Adaptada de Sun, J. *et al.* (2012)

Embora nenhum mecanismo reacional para este criogel híbrido tenha sido reportado, sua síntese já foi desenvolvida em condições criogênicas e na ausência de inicialização com luz ultravioleta. Mourão, Haupt e Bueno (2018) reportaram pela primeira vez, uma matriz híbrida de alginato e PAAm obtida pela técnica de criogeleificação. No entanto, apesar de apresentar potencial para ser empregado como fase estacionária em técnicas cromatográficas, o material desenvolvido pelos autores deve passar por etapas subsequentes de ativação e funcionalização. Para tornar possível a imobilização do ligante nesta matriz, é necessário que uma modificação química seja realizada, de forma a introduzir grupamentos capazes de imobilizar o ligante no criogel em questão. Porém, uma vez sintetizado o material, técnicas para introdução desses grupamentos são, em geral, multietapas e agregam custo ao processo. Sendo assim, uma forma de contornar esse dispêndio econômico e facilitar o preparo da matriz, pode-se introduzir de grupos reativos diretamente na síntese do material, de forma que tais grupos fiquem acessíveis para posterior imobilização do ligante.

#### 2.1.2 TIPOS DE LIGANTES EMPREGADOS EM CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Os ligantes empregados em cromatografia de afinidade podem ter origem biológica ou não. Restrito ao primeiro caso se enquadram os ligantes chamados de bioespecíficos, que compreendem enzimas, substratos, antígenos, anticorpos, ativadores, inibidores, receptores, hormônios, lectinas, cofatores, entre outros (PFAUNMILLER *et al.*, 2013). Os ligantes chamados de pseudobioespecíficos, por sua vez, podem ou não ser moléculas biológicas. Como exemplos de moléculas biológicas dessa classe de ligantes, destacam-se os peptídeos e aminoácidos; exemplos de moléculas não biológicas são corantes, quelatos metálicos, aminas, tióis e boronatos (SAVANE *et al.*, 2016).

De acordo com Vijayalakshmi (1989), as interações entre o ligante e a biomolécula de interesse ocorrem, principalmente, através da complementariedade de cargas, hidrofobicidade, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, podendo existir uma ou mais forças intermoleculares agindo simultaneamente na estabilização do complexo biomolécula-ligante formado. No entanto, essas forças de interação se diferenciam em magnitude de acordo com a classe e tipo de ligante empregado na purificação de determinada biomolécula.

O grau de afinidade entre o ligante e a molécula de interesse pode ser medido pela constante de dissociação ( $k_d$ ). Logo, quanto numericamente menor a constante de dissociação, maior é a afinidade do ligante pela biomolécula. Valores típicos de afinidade elevada são

característicos ao se utilizar ligantes bioespecíficos, da ordem de  $10^{-6}$  a  $10^{-10}$  mol/L. Valores de  $k_d$  maiores, característicos de ligantes pseudobioespecíficos, a partir de  $10^{-5}$  mol/L caracterizam afinidade média. Portanto, à medida que  $k_d$  aumenta numericamente a afinidade diminui, até atingir valores mínimos, da ordem de  $10^{-2}$  mol/L; valores de  $k_d$  ainda maiores indicam a falta de afinidade entre as partes. Sendo assim, em processos cujo objetivo seja a purificação de determinada biomolécula sem a perda de suas características biológicas, é desejável que a taxa de dissociação seja baixa o suficiente, sendo capaz de manter o complexo estável durante as etapas de adsorção e lavagem ao mesmo tempo em que deve ser evitado valores muito baixos, que exijam condições drásticas para dessorção da biomolécula adsorvida, o que pode acarretar em desnaturação de boa parte do bioproduto desejado (PERRET e BOSCHETTI, 2018).

Além da força de interação, fatores como estabilidade mecânica e química, densidade de cargas, tamanho e estrutura da molécula, disponibilidade de sítios ativos, entre outras características específicas de cada ligante devem ser consideradas na escolha do ligante ideal a ser empregado. Escolhido o ligante é preciso, ainda, analisar o sistema cromatográfico como um todo, visando à obtenção da condição mais favorável à adsorção.

### 2.1.3 OBTENÇÃO DA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO: CURVAS DE RUPTURA

As curvas de ruptura tm por objetivo modelar a adsorção de um soluto em uma coluna de leito fixo ao longo do tempo, até a total saturação do leito, considerando possíveis efeitos de dispersão axial e transferência de massa. Com isso, o desempenho do adsorvente pode ser descrito pela sua curva de ruptura característica, afetada pela geometria da coluna, condições operacionais, concentração do soluto na corrente de alimentação, porosidade do leito fixo e densidade de adsorvente.

Para traçar a curva de ruptura, é preciso que a alimentação contendo o soluto a ser adsorvido seja realizada de forma contínua. Durante determinado intervalo de tempo o soluto não é detectado na corrente de saída da coluna cromatográfica. Isso ocorre até que o soluto percorra todo o espaço interno da coluna e os sítios responsáveis por sua adsorção sejam saturados. A partir de então, idealmente, o soluto não adsorvido passa a ser detectado na corrente de saída da coluna, e sua concentração nesta aumenta ao longo do tempo, até atingir valor próximo à concentração inicial, correspondente à da corrente de entrada da coluna. Quando a curva torna-se assintótica, indicando que a concentração de saída (C) está próxima à

concentração de entrada ( $C_0$ ), tem-se que o equilíbrio foi atingido e que o leito cromatográfico encontra-se saturado (McCABE *et al.*, 1993).

Em condições ideais de separação, a saturação do leito ocorre imediatamente após a detecção do soluto na corrente de saída, o que torna o perfil da curva vertical, como uma função degrau que, na prática, é suavizada devido à possível resistência à transferência de massa e à dispesão axial presente nas condições reais em que são realizados esses experimentos. De acordo com Guimarães (2010), a eficiência do processo é proporcional ao tempo de ruptura, assim, quanto maior o tempo de ruptura, mais alta será a eficiência do processo.

De modo geral, é desejável que a perda de produto de interesse na corrente de saída seja mínima ou até mesmo inexistente. No entanto, é comum que se trabalhe com uma margem de 10% de segurança, ao mesmo tempo em que se utiliza a maior capacidade de adsorção dinâmica do leito fixo, conhecida após traçar a curva de ruptura do processo de adsorção.

## 2.2 IMUNOGLOBULINA G E SEUS FAGMENTOS

As imunoglobulinas (Igs) ou anticorpos são glicoproteínas encontradas no plasma sanguíneo de vertebrados e tem como principal função promover a imunidade celular, de forma a reconhecer e se complexar a antígenos, ao mesmo tempo em que ativam diferentes sistemas efetores (JANEWAY *et al.*, 2001).

Moléculas de anticorpos naturalmente secretadas pelo sistema imunológico em resposta a patógenos extracelulares, como vírus, bactéria e parasitas são chamadas de anticorpos policlonais e são excretados por diferentes células B. No entanto, assim como os hibridomas, a biologia molecular possibilita a expressão de anticorpos monoclonais, os quais resultam de clones de células B. Estes são produzidos *in vitro* e apresentam características idênticas entre si (PHILLIPS, 2005; JAY *et al.*, 2018).

São cinco os isotipos de Igs produzidos pelo sistema imunológico humano:  $\gamma$  (IgG),  $\alpha$  (IgA),  $\delta$  (IgD),  $\epsilon$  (IgE) e  $\mu$  (IgM). Cada um deles possui um tipo de estrutura e uma determinada atividade biológica, sendo a IgG o isotipo com média de 25,8 dias de meia vida no soro humano, o maior tempo dentre os isotipos de Igs (MANKARIOUS *et al.*, 1988; LE *et al.*, 2016), o que favorece sua aplicabilidade em uso diagnóstico e terapêutico.

Com massa molar de 150 kDa, uma molécula de IgG é formada por pares de cadeias polipeptídicas leves (L) e pesadas (H), idênticas entre si e unidas por pontes

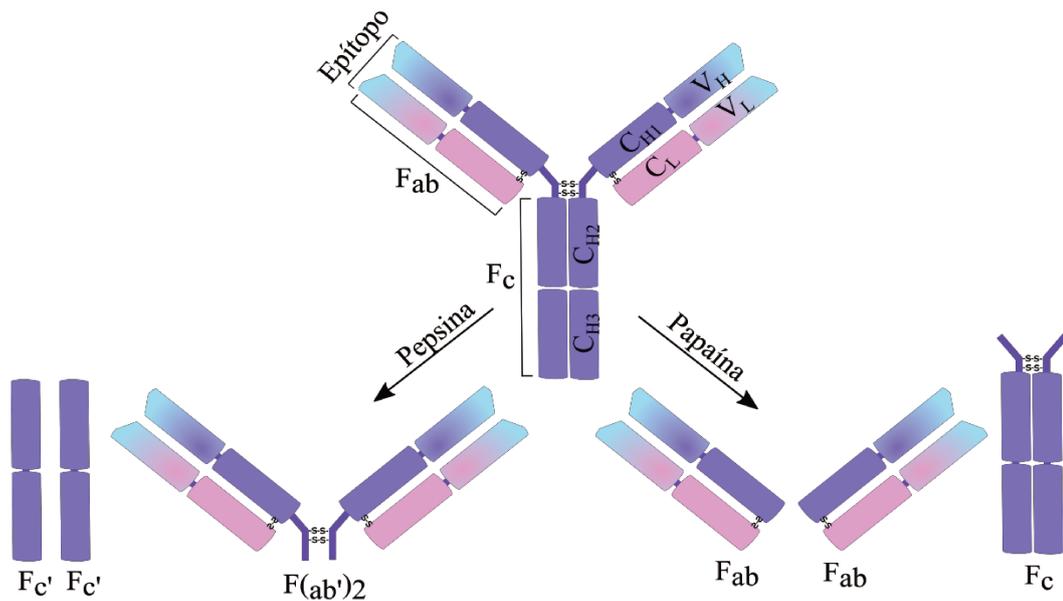
dissulfídicas, resultando em um formato de “Y” (Figura 10). Cada cadeia pesada possui massa molar de 50 kDa e contém um domínio variável ( $V_H$ ), o qual apresenta um grupo amino terminal, e três domínios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ ), com uma carboxila terminal. As cadeias leves possuem massa molar de 25 kDa e também contam com um domínio variável ( $V_L$ ) e outro constante ( $C_L$ ) (HEADS *et al.*, 2012).

Os domínios variáveis das cadeias H e L juntos ( $V_H$  e  $V_L$ ) dão origem aos epítomos, que consistem nos sítios de ligações responsáveis pela formação de uma superfície complementar à do antígeno. Os epítomos são, portanto, idênticos numa mesma molécula, mas altamente variável de uma molécula para outra, pois dependem da sequência de aminoácidos que os constituem. A porção do anticorpo que contém os epítomos denomina-se Fab, e a extremidade oposta à essa é a porção Fc, composta apenas pelo par de cadeias pesadas, as quais são determinantes para ativação dos diferentes mecanismos efetores do sistema imunológico (ALBERTS, 2017).

Na Figura 10, ilustra-se além da estrutura da IgG a estrutura de seus fragmentos, obtidos por digestão enzimática empregando as enzimas proteolíticas papaína ou pepsina. Quando a clivagem é realizada com pepsina, um fragmento  $F(ab')_2$  e dois fragmentos  $Fc'$  são obtidos. Ao empregar papaína, a clivagem resulta em dois fragmentos Fab idênticos e outro Fc (SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

Em humanos, a IgG é classificada em quatro subclasses:  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>),  $\gamma_2$  (IgG<sub>2</sub>),  $\gamma_3$  (IgG<sub>3</sub>) e  $\gamma_4$  (IgG<sub>4</sub>), as quais se diferenciam, principalmente, devido a posição dos resíduos de cisteína, que formam as ligações dissulfídicas entre as cadeias pesadas e leve e pelo comprimento das regiões das dobradiças (HEADS *et al.*, 2012). A concentração de cada uma dessas subclasses no soro humano de indivíduos adultos saudáveis apresenta variações, mas de modo geral, a IgG<sub>1</sub> é a encontrada em maior concentração, variando entre 5 a 12 mg/mL, seguida pela IgG<sub>2</sub>, com concentração entre 2 a 6 mg/mL; a IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> pertencem às subclasses de IgG menos disponíveis no soro, com concentração entre 0,5 a 1 mg/mL e 0,2 a 1 mg/mL, respectivamente. Cada subclasse também possui um ponto isoelétrico distinto, por isso, ao se tratar de uma mistura de IgG, é ampla a faixa de ponto isoelétrico (pI) que, de acordo com Hamilton (2001) varia entre 6,4 a 9,0.

Figura 10 - Molécula de IgG e seus fragmentos, obtidos por clivagem com pepsina e papaína.



Fonte: Própria autora (2018)

Moléculas de anticorpos possuem alto valor terapêutico, são empregadas em diagnósticos e também são utilizadas em escala analítica e para desenvolvimento de pesquisas. A importância desta biomolécula é atribuída a sua alta especificidade e estabilidade. Dessa forma, as imunoglobulinas G são utilizadas para tratamento de doenças autoimunes, distúrbios primários e secundários de imunodeficiências (ZUERCHER, 2016), doenças inflamatórias e infecciosas (CHOE, DUGANAVAR e CHUNG, 2016) e também são empregadas em imunodiagnósticos (como teste ELISA, *Western blot* e produção de biosensores) (DELAHAUT, 2017). Nelson e Reichert (2009) ressaltam que, em alguns casos, o uso de fragmentos de IgG provenientes da clivagem proteolítica pode ser mais vantajoso ao comparar com o uso da molécula de IgG intacta, por possuírem menor tamanho os fragmentos são capazes de penetrar tecidos e tumores com maior profundidade, rapidez e facilidade do que a molécula de IgG como um todo. Ainda, Nascimento e colaboradores (2018) afirmam que na ausência da porção Fc as interações não específicas ficam bastante reduzidas.

### 2.2.1 PURIFICAÇÃO DE IGG E SEUS FRAGMENTOS

Visto que imunoglobulinas G humanas são obtidas a partir de composições complexas, como plasma, soro, sobrenadante de cultura de células (quando monoclonais) ou de fermentados (quando recombinante), novos procedimentos para obtenção dessa proteína com alto grau de pureza são extensivamente estudados.

Para uso terapêutico, a IgG humana é purificada por indústrias de processamento de plasma. A tecnologia empregadas por essas indústrias é baseada no processo desenvolvido por Cohn *et al.* (1946), o qual consiste em uma série de precipitações de proteínas no plasma com etanol a frio. Cada etapa de precipitação é seguida por outra de filtração, microfiltração, ultrafiltração ou centrifugação, que resultam em diferentes produtos. Com base neste método, Kistler e Nitschmann (1962) consolidaram melhorias ao processo, proporcionando maior rendimento de IgG purificada com menor consumo de etanol (BERTOLINI, 2016).

Dados da *Marketing Research Bureau* (MRB) mostram que, industrialmente, a IgG tem sido a grande responsável pelo aumento do volume de plasma fracionado nos últimos 20 anos. Com recuperação aproximada de 4,5 g de IgG por litro de plasma fracionado, projeções realizadas pela MRB prevê aumento da demanda por plasma de 36 para 50 milhões de litros entre 2012 a 2020 (MRB, 2018). Para atender a esta crescente demanda, métodos que empregam menor número de etapas de produção já são aplicáveis. Com isso, a IgG pode ser obtida por métodos não cromatográficos como extração líquido-líquido e filtração por membranas (GAGNON, 2012). É possível também purificar IgG por métodos cromatográficos baseados em diferentes propriedades como tamanho da molécula, carga, caráter hidrofóbico e afinidade de ligação (ARORA, SAXENA e AYYAR, 2017). Para aumentar a eficiência da purificação, uma estratégia é utilizar técnicas não cromatográficas associadas às cromatográficas, como a precipitação fracionada associada à cromatografia de troca iônica ou de filtração em gel, por exemplo (PERRET, 2018).

Em escala laboratorial ou no caso de purificação para aplicações em testes diagnósticos, a IgG e seus fragmentos são preferencialmente purificados por técnicas mais seletivas. Para tanto, é comum o uso de cromatografia de afinidade para purificação de anticorpos monoclonais e policlonais (forma intacta ou seus fragmentos) a um alto grau de pureza e em uma única etapa. Para técnicas de cromatografia de afinidade, é comum o emprego das proteínas A, G e L como ligantes bioespecíficos.

A proteína A, obtida da parede celular de *Staphylococcus aureus*, é altamente seletiva para a porção Fc das subclasses 1, 2 e 3 da IgG humana, recuperando IgG com pureza superior a 95 % (GAGNON, 2012). A proteína G, obtida a partir de *Streptococos* do grupo G, também é seletiva para a porção Fc (PHILLIPS, 2005). No caso da proteína L, isolada de *Peptostreptococcus magnus*, sua afinidade se restringe às cadeias leves tipo *kappa* presentes na porção Fab e, por isso, adsorvem as moléculas de IgG por essa região, podendo também ser empregada para isolar estes fragmentos (CHOE, DUGANNAVAR e CHUNG, 2016).

Embora os ligantes bioespecíficos supracitados sejam altamente seletivos à IgG, tratam-se de proteínas caras devido ao alto custo de obtenção e, quando utilizados, somente as etapas de purificação e polimento de anticorpos podem apresentar custo em torno de 50 a 80% de todo o processo produtivo (LOWE, LOWE e GUPTA, 2001). Segundo Vijayalakshmi (1989), outra desvantagem em utilizar-se esse tipo de ligante está relacionada ao tamanho e fragilidade destes que, por se tratar de moléculas grandes e frágeis, sua manipulação e imobilização tornam-se dificultadas. Além disso, Choe, Dugannavare Chung (2016) reforçam que, ao usar proteínas provenientes de bactérias, o risco de contaminação do produto com traços do ligante é elevado e, caso isso ocorra, uma resposta indesejável do sistema imunológico receptor será desencadeada.

Diante do exposto, aliado a crescente demanda por IgG ou seus fragmentos, é intensa a busca por metodologias mais robustas, simples, eficientes e de relativo baixo custo para purificar os anticorpos de misturas complexas como plasma, soro e sobrenadante de cultura de células, mesmo em escala laboratorial. Nesse contexto, ao otimizar algumas propriedades da cromatografia de afinidade como o suporte sólido, o tipo de ligante e as condições a serem empregadas, a técnica pode ser aplicada à purificação em larga escala, atingindo altos rendimentos, com nível elevado de pureza (ARORA, SAXENA e AYYAR, 2017).

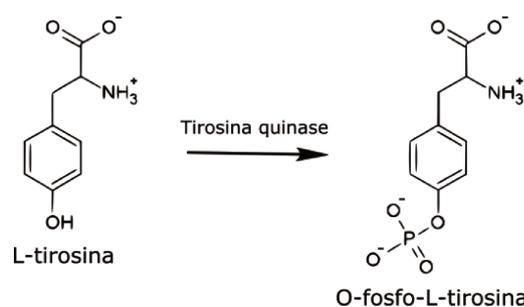
Atualmente, a literatura traz alguns ligantes pseudobioespecíficos capazes de capturar IgG de forma seletiva. No geral, esses ligantes compreendem moléculas menores, robustas e de fácil imobilização, as quais apresentam menor custo de obtenção e maior estabilidade química e física durante os processos de sanitização e esterilização (VIJAYALAKSMI, 1989; SAVANE *et al.*, 2016). Dentre os ligantes pseudobioespecíficos capazes de purificar IgG, destacam-se os aminoácidos como histidina, fenilalanina, arginina, triptofano, o-fosfo-L-serina e o-fosfo-L-tirosina, imobilizados em diferentes suporte sólidos (HWANG e PARK, 2003; ELKAK *et al.*, 2009; NAIK, RAINA e LALI, 2011; BRESOLIN e BUENO, 2012; PAVAN *et al.*, 2017).

### 2.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM O-FOSFO-L-TIROSINA IMOBILIZADA PARA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G HUMANA

A o-fosfo-L-tirosina (OPT) é um derivado fosforilado do L-tirosina, um aminoácido não essencial encontrado na sequência estrutural dos domínios citoplasmáticos presentes na estrutura de receptores para imunoglobulinas. A fosforilação é realizada por

tirosina quinases e consiste na substituição do grupo hidroxil pelo grupamento fosfato, resultando num aumento do tamanho e agregando maior densidade de cargas negativas à molécula (BRADY e LAU, 2012), conforme ilustrado pela Figura 11.

Figura 11 - Fosforilação da L-tirosina resultando no O-fosfo-L-tirosina (OPT).



Fonte: Adaptado de Rocha, Salles e Sant'anna (2017)

A fosforilação de resíduos de tirosina, além de ser importante para os eventos de ativação celular altera substancialmente sua interação com outras moléculas. De acordo com Rocha, Salles e Sant'anna (2017), isso acontece em decorrência das possíveis interações hidrofóbicas, entre o grupo aromático do OPT e o sítio receptor da proteína, juntamente com as interações do tipo ligação de hidrogênio envolvendo o fosfato.

Com o objetivo de explorar o OPT na captura de IgG humana do plasma por técnica de cromatografia de afinidade, Pavan *et al.* (2017) utilizaram este aminoácido imobilizado, via grupamento amino, em gel de agarose ativado com bisoxirano. Os autores avaliaram o efeito do sistema tamponante, pH e força iônica entre o ligante imobilizado e a IgG. Estudaram também a influência de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, avaliando a contribuição individual dos grupos aromáticos, carboxilato e fosfato presentes na molécula de OPT, utilizando como ligantes controle L-tirosina, L-fenilalanina, tiramina, feniletilamina e ácido amino metil fosfórico. Como resultado, os autores observaram que a interação entre o ligante e a IgG é influenciada pela condutividade do meio. Na melhor condição empregada, o OPT mostrou-se seletivo para IgG, revelando o potencial desse aminoácido em purificar IgG humana, contida em uma mistura complexa de outras proteínas. Os autores também concluíram que, embora as interações eletrostáticas com o grupamento fosfato sejam predominantes no processo de adsorção, os grupos carboxílico e aromático também contribuem para adsorver a molécula de IgG, demonstrando a empregabilidade da L-tirosina em sua forma fosforilada.

## CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 REAGENTES

Os reagentes acrilamida (AAM), N, N – metileno-bisacrilamida (MBAm), alginato de sódio, persulfato de amônio (APS), alil glicidil éter (AGE), o-fosfo-L-tirosina (OPT), dodecil sulfato de sódio (SDS), papaína, Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil] - etanosulfônico (Hepes), poli(etilenoglicol) (PEG 6.000), anticorpos de cabra anti-hIgG (Fab específico) conjugados a peroxidase, anticorpos de cabra anti-hIgG (Fc específico) conjugados a peroxidase, diaminobenzidina (DAB), gamaglobulina humana ( $\geq 99\%$  por eletroforese, IgG), soro humano (esterilizado, filtrado; de plasma humano masculino de tipagem AB) e agarose foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Fosfato de sódio bibásico, fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, nitrato de prata, álcool etílico absoluto, ácido cítrico, e ácido fosfórico foram adquiridos da Synth (Brasil). Kit de marcadores de massa molecular para eletroforese e marcadores de massa molecular pré-corado *Full Range Rainbow* para *Western blot*, azul de bromofenol, ditionietol (DTT) foram obtidos da GE Healthcare (EUA). Formaldeído, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), sulfato de cobre, carbonato de sódio e cloreto de cálcio foram obtidos da Merck (Alemanha). N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina (TEMED), azul de comassie (brilliant blue G-250) e membrana de nitrocelulose de 0,2 mm Trans-Blot foram obtidos da Bio-Rad (EUA). Ácido acético glacial e glicerol foram fornecidos pela Êxodo Científica (Brasil). Hidróxido de potássio foi obtido da Ecibra Reagentes Analíticos (Brasil). Água ultrapura foi obtida pelo Milli-Q da Millipore (EUA) e empregada no preparo das soluções. Os demais reagentes foram de grau analítico.

#### 3.1.2 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em balança analítica Sartorius TE214S (Alemanha); para medir o pH foi utilizado medidor de pH Oakton pH 510 series (Oakton, EUA) e a desgaseificação das misturas monoméricas foi feita em cubas de banho ultrassônico Branson 3510 series (EUA). Utilizou-se colunas cromatográficas de vidro modelo C10/10 (com 1,0 cm

de diâmetro interno, GE Healthcare, EUA) e cromatógrafo de baixa pressão Biologic LP System (Bio-Rad, EUA). As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis (DU-640, Beckman, EUA). Para realização das eletroforeses e *Western blot* foram empregados os equipamentos Mini Protean III e Mini Transblotting III System, respectivamente, ambos da Bio-Rad (EUA). Colunas de filtração em gel, modelo PD-10 (GE Healthcare, EUA) também foram empregadas.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 SÍNTESE DO CRIOGEL HÍBRIDO DE POLIACRILAMIDA COM ALGINATO E ALIL GLICIDIL ÉTER (PAAM-ALG-AGE)

O procedimento para a síntese do criogel contendo alginato, AAm e AGE foi desenvolvido com base no trabalho de Mourão, Haupt e Bueno (2018), que desenvolveram um criogel de PAAm com alginato. No entanto, os autores não introduziram grupos epóxi na síntese do material. Sendo assim, para a síntese do criogel proposto, foi realizado um estudo na variação da concentração do iniciador de polimerização (APS), do catalizador (TEMED) e da quantidade de grupos funcionais introduzidos no material (AGE), na presença e ausência de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , mantendo constante a concentração de monômeros, conforme estabelecido pelos autores. Para tal, 0,1 g de alginato de sódio foi dissolvido em 4 mL de água. Separadamente, 0,474 g de AAm e 0,126 g de MBAm foram dissolvidos em 4 mL de água. Após completa solubilização, a solução contendo os monômeros de AAm e MBAm foi incorporada à solução de alginato e a mistura foi desgaseificada por 20 minutos em cuba de banho ultrassônico. Removido o oxigênio solúvel e, com a solução resfriada a 4 °C, sob agitação magnética foram adicionados diferentes volumes de AGE, solução de  $\text{CaCl}_2$  a 2% (m/v), APS e TEMED, conforme descrito nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2.

#### 3.2.1.1 Variação na concentração de AGE

Mantendo fixa a concentração de APS 0,2% (m/v), TEMED 0,2% (v/v) e íons  $\text{Ca}^{2+}$  0,04% (m/v), foram empregados diferentes volumes de AGE até obtenção de concentração final entre 1 e 4% (v/v). Portanto, adicionou-se: 100, 150, 200, 250, 300 e 400  $\mu\text{L}$  de AGE em cada solução de monômeros anteriormente preparada e, para todas as misturas reacionais resultantes, acrescentou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{CaCl}_2$  a 2% (m/v), 1 mL de

solução de APS (20 mg/mL) e 20 µL de TEMED. O volume final de cada solução foi ajustado com água para 10 mL. Na sequência, a mistura reacional foi rapidamente fracionada em seringas plásticas com 3 mL de capacidade e 0,5 cm de diâmetro interno, previamente resfriadas a -20 °C e identificadas. Cada seringa foi preenchida com 1 mL de sua respectiva mistura reacional e imediatamente imersas em banho de etanol a -20°C, onde permaneceram por 16 h, tempo suficiente para completa polimerização. Após 16 h, os criogéis foram descongelados e lavados com água para remoção de reagente em excesso.

### 3.2.1.2 *Variação na concentração de APS e TEMED*

O efeito da concentração do iniciador de polimerização APS e do catalisador TEMED na ausência e presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  foi verificado mantendo-se fixa a concentração de monômeros (4,74% m/v de AAm, 1,26% m/v de MBAm e 1% m/v de alginato) e empregando-se duas diferentes concentrações de AGE: 1 e 2% (v/v). Dessa forma, foi adicionado 1 mL de solução de APS (10 mg/mL) e 10 µL de TEMED na presença e ausência de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nas misturas reacionais com 1% de AGE e, paralelamente, 1 mL de solução de APS (20 mg/mL) e 20 µL de TEMED novamente na presença e ausência de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . O mesmo foi feito para misturas reacionais com 2% de AGE. Posteriormente, fracionou-se cada mistura reacional em seringas plásticas previamente resfriadas a -20 °C e identificadas e prosseguiu da forma como descrito anteriormente, no item 3.2.1.2.

O criogel com as melhores características mecânicas observadas foi sintetizado em uma coluna de vidro C10/10, a qual possui 1,0 cm de diâmetro interno, como molde para a síntese de 3 mL do criogel. O criogel obtido foi denominado PAAm-Alg-AGE.

### 3.2.2 IMOBILIZAÇÃO DO LIGANTE O-FOSFO-L-TIROSINA (OPT)

A metodologia de imobilização do OPT foi adaptada do procedimento proposto por Zachariou e Hearn (2000) e Pavan *et al.* (2017). Antes, porém, a coluna contendo 3 mL do criogel de PAAm-Alg-AGE foi equilibrada com 5 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a pH 10,5. Em seguida, preparou-se 4,8 mL de solução aquosa a 0,2 mol/L de OPT, ajustando-se o pH da solução para 10,5 por adição direta de lentilhas de KOH. Essa solução foi carregada à coluna cromatográfica previamente equilibrada com a solução de KOH e mantida no leito cromatográfico por 2 h. Passado esse tempo, deu-se início à

recirculação desta solução à vazão de 0,3 mL/min por 2 h, de forma a não ultrapassar as 4 h de reação, conforme recomendado por Zachariou, Traverso e Hearn (1993) para agentes fosforados. Após a etapa de recirculação do ligante, a coluna foi lavada com 15 mL de solução de ácido acético (50 mmol/L, pH 4,0) à vazão de 0,3 mL/min e, posteriormente, com 300 mL de água. O criogel obtido foi denominado PAAm-Alg-AGE-OPT e foi armazenado à 4 °C até o uso.

### 3.2.3 CLIVAGEM ENZIMÁTICA DE IGG POLICLONAL: OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS FAB E FC

A metodologia descrita por Ternyck e Avrameas (1987) e Mourão, Carmignotto e Bueno (2016) foi utilizada para obtenção dos fragmentos proteolíticos Fab e Fc de IgG humana. Inicialmente, preparou-se 10 mL de solução de IgG humana de 30 mg/mL em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7,4. A esta solução adicionou-se 750 µL de solução aquosa de EDTA 0,04 mol/L, pH 8,0, 750 µL de solução de L-cisteína 0,2 mol/L, em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L, pH 7,4, 300 µL de solução aquosa de papaína 10,0 mg/mL e volume de tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,4 até obtenção de concentração final de IgG igual a 20 mg/mL. Essa solução foi incubada a 37°C por 2 h, tempo previamente estabelecido para que ocorra a clivagem de IgG em seus fragmentos.

Após esse tempo, a clivagem enzimática foi interrompida pela adição de 1,5 mL de solução de iodoacetamida (0,4 mol/L, em tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,4). Passados 30 min, o tampão de digestão foi trocado pelos tampões a serem empregados nas técnicas cromatográficas. Para a troca de tampão, foram utilizadas colunas PD-10, seguindo-se procedimento fornecido pelo fabricante (GE Healthcare). Na sequência, uma amostra da solução resultante da clivagem enzimática foi submetida à análise de eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras para verificar se houve a formação do produto de interesse. Após verificar se houve formação de fragmentos, a solução no tampão desejado foi fracionada em alíquotas de 500 µL, rotuladas e congeladas a -20°C, condição mantida até o uso.

### 3.2.4 EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS

Todos os experimentos cromatográficos foram conduzidos em duplicata, em coluna cromatográfica de vidro, modelo C10/10, contendo 3 mL do criogel de PAAm-Alg-

AGE-OPT. A coluna foi acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão e durante todos os experimentos a corrente de saída foi analisada por medidas de absorvância a 280 nm. Dessa mesma corrente de saída, foram coletadas frações de volume conhecido para quantificação de proteínas totais segundo metodologia de Bradford (1976). A vazão utilizada em todos os experimentos foi de 1,0 mL/min e a temperatura foi de aproximadamente 25 °C.

#### 3.2.4.1 *Cromatografias com IgG humana*

Para avaliar o potencial do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT em adsorver IgG humana, foram realizados ensaios cromatográficos com IgG de alta pureza em três diferentes sistemas tamponantes: carregado positivamente - Tris-HCl a 10 e 25 mmol/L em pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5; carregado negativamente - fosfato de sódio (NaP) a 10 e 25 mmol/L em pH 6,0, 6,5 e 7,0; e zwitteriônico - HEPES a 10 e 25 mmol/L em pH 7,0, 7,5 e 8,0.

Para cada cromatografia, o criogel foi equilibrado com 30 mL do tampão de adsorção. Posteriormente, 1,0 mL de solução de IgG (2 mg/mL) foi alimentada ao leito cromatográfico. Finalizada a alimentação, o criogel foi lavado com o mesmo tampão de adsorção até remoção de toda IgG não adsorvida e, em seguida, realizou-se a eluição com o tampão de adsorção contendo 0,5 mol/L de cloreto de sódio. Concluída a eluição, a coluna foi lavada com 30 mL de água para ser utilizada em um novo ciclo.

Durante todas as etapas cromatográficas, frações de 2,0 mL foram coletadas na corrente de saída e quantificadas pelo método de Bradford (1976).

#### 3.2.4.2 *Cromatografias com soro humano*

De forma a verificar a seletividade do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT para IgG presente no soro humano, foram realizados ensaios cromatográficos nos mesmos sistemas tamponantes empregados nos ensaios com IgG (Tris-HCl 10 e 25 mmol/L a pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5; NaP 10 e 25 mmol/L a pH 6,0, 6,5 e 7,0; e HEPES 10 e 25 mmol/L a pH 7,0, 7,5 e 8,0).

Os experimentos foram efetuados da mesma forma como descrito anteriormente pelo item 3.2.4.1, exceto pela injeção que, neste caso, consistiu em 1,0 mL de solução de soro humano diluído quinze vezes no tampão de adsorção (diluição de 75 µL de soro em 1050 µL de tampão, com concentração final de aproximadamente 3,5 mg/mL em termos de proteínas totais). Finalizada as etapas cromatográficas, a coluna foi regenerada com solução de

hidróxido de sódio a 10 mmol/L e lavada com 30 mL de água para ser utilizada em um novo ciclo cromatográfico.

Durante todas as etapas cromatográficas, frações de 1,0 mL foram coletadas na corrente de saída e quantificadas por Bradford (1976), em termos de proteínas totais. Ao final da técnica, as amostras da lavagem e as amostras mais concentradas da eluição foram agrupadas em *pools*, os quais foram analisados por eletroforese SDS-PAGE.

#### 3.2.4.3 *Determinação da capacidade dinâmica do adsorvente*

Curvas de ruptura foram realizadas somente com os tampões Hepes 25 mmol/L e Tris-HCl 10 mmol/L como tampões de adsorção, ambos a pH 7,0. Nesses experimentos, as etapas cromatográficas procederam como descritas anteriormente pelo item 3.2.4.1. No entanto, após equilibrar a coluna cromatográfica, esta foi alimentada com 28 mL de solução de soro humano diluído quinze vezes no tampão de adsorção (diluição de 2 mL de soro em 28 mL de tampão; com concentração final próxima a 3,5 mg/mL, em termos de proteínas totais). Este volume alimentado garantiu a saturação do leito fixo. Ao observar que a concentração de proteínas totais na saída da coluna (C) ficou próxima à concentração de proteínas totais alimentadas ( $C_0$ ) e, portanto, a razão  $C/C_0$  próxima a 1, foi obtido o ponto de saturação do adsorvente. Finalizada a alimentação, a coluna cromatográfica foi lavada com o tampão de adsorção. Posteriormente, as proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão de adsorção contendo 0,5 mol/L de NaCl.

Todas as frações coletadas foram monitoradas a 280 nm e quantificadas pelo método de Bradford (1976) e, devido a grande quantidade de proteínas totais alimentada, o volume das frações coletadas na corrente de saída foi de 2,0 mL durante as etapas de alimentação (*flowthrough*), lavagem e eluição. Todas as frações coletadas foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

#### 3.2.4.4 *Cromatografia com fragmentos de IgG humana*

Cromatografias com fragmentos foram realizadas nos tampões NaP a 10 mmol/L pH 6,0, Tris-HCl a 10 mmol/L e Hepes a 25 mmol/L, ambos a pH 7,0. Os experimentos foram conduzidos de forma análoga aos anteriores (ver seção 3.2.4.1), exceto pela alimentação que consistiu em 1,0 mL de solução de IgG clivada no respectivo tampão de adsorção (aproximadamente 1,5 mg de solução de IgG clivada), obtida conforme metodologia descrita

no item 3.2.3. Durante todas as etapas cromatográficas, foram coletadas frações de 1,0 mL na corrente de saída. Estas foram quantificadas por Bradford (1976), em termos de proteínas totais e, ao final da técnica, as amostras de cada etapa foram agrupadas em *pools*, os quais foram analisados por eletroforese SDS-PAGE, *Western blot* e imunodifusão radial.

### 3.2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CRIOGÉIS DE PAAM-ALG-AGE E PAAM-ALG-AGE-OPT

#### 3.2.5.1 *Caracterização morfológica*

A análise morfológica da superfície do criogel foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. Para esta análise, fragmentos dos cortes das seções transversal, longitudinal e da superfície dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT foram liofilizados e recobertos por 20 nm de ouro (Sputter Coater - EMITECH K450, Reino Unido). Em seguida, as amostras foram submetidas à análise no microscópio eletrônico LEO (Electron Microscopy, Inglaterra).

#### 3.2.5.2 *Quantificação da densidade de Cu<sup>2+</sup> quelatado ao criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT*

A densidade do ligante OPT imobilizado no criogel pode ser aproximada por medida indireta de quelatação do íon metálico cobre (Cu<sup>2+</sup>). Dessa forma, após equilibrar a coluna cromatográfica contendo 3,0 mL do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT com água, esta foi alimentada com solução de sulfato de cobre a 50 mmol/L (vazão: 0,5 mL/min) até a saturação do adsorvente. A saturação do leito cromatográfico ocorre quando a concentração da corrente de saída da coluna se aproximar da concentração da corrente de alimentação e, no caso do metal em questão, o leito fixo saturado adquire coloração azul. O criogel saturado com o íon metálico Cu<sup>2+</sup> foi lavado com água e, posteriormente, com tampão acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0, para a remoção dos íons metálicos fracamente quelatados. O adsorvente foi novamente lavado com água e, para regeneração do criogel, foi utilizado solução de EDTA (100 mmol/L, pH 7,0) até o desprendimento de todo o metal, verificado ao observar a descoloração da coluna cromatográfica que, após a retirada dos íons Cu<sup>2+</sup>, o leito fixo retorna à coloração branca. Durante essa última etapa, alíquotas de 1,0 mL foram coletadas na

corrente de saída e analisadas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 733 nm, previamente determinado por varredura de espectro. Para cada amostra coletada, calculou-se a quantidade de íons  $\text{Cu}^{2+}$  ( $n_{\text{Cu}^{2+}}$ ) conforme a Equação 3.1, obtendo o valor em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ .

$$n_{\text{Cu}^{2+}}(\mu\text{mol}) = \text{Coef} * \text{ABS}_{733 \text{ nm}} * F_d * V_{\text{amostra}} \quad (3.1)$$

em que: *Coef* é a constante correspondente ao coeficiente linear da curva analítica, construída a partir de valores de absorbância obtidos para uma solução padrão de  $\text{Cu}^{2+}$  em EDTA nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{mol/mL}$ .  $\text{ABS}_{733 \text{ nm}}$  refere-se ao valor de absorbância obtido na medida da respectiva amostra;  $F_d$  é o fator de diluição e  $V_{\text{amostra}}$  trata-se do volume (em mL) de cada amostra coletada que, neste caso, é fixo e igual a 1,0 mL. O somatório de  $n_{\text{Cu}^{2+}}$  de todas as amostras resulta na quantidade total de  $\text{Cu}^{2+}$  fortemente quelatado pelo OPT, o que indica a quantidade de OPT imobilizado no adsorvente. Pela razão entre a quantidade de  $\text{Cu}^{2+}$  quelatado e a massa seca de criogel utilizado (dado em gramas), a densidade de ligante imobilizado pode ser estimada e expressa em unidades de  $\mu\text{mol/g}$  seca do adsorvente.

### 3.2.5.3 Caracterizações físicas

#### 3.2.5.3.1 Quantificação da capacidade de intumescimento

A capacidade de intumescimento, ou seja, a capacidade dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT em reterem água em seus poros, foi determinada com base no procedimento descrito em Arvidsson *et al.* (2003). Após se lavar os criogéis com água, o excesso de umidade foi retirado por filtração em funil com vidro sinterizado, com o auxílio de uma bomba a vácuo. Em seguida, os criogéis foram pesados, para obtenção da massa úmida ( $m_u$ ). Após, foram acondicionados em placas de Petri e submetidos à secagem em estufa a 60 °C até atingirem massa constante ( $m_s$ ).

Mensurada as massas úmida e seca dos criogéis, a capacidade de intumescimento ( $S$ ) foi calculada conforme a Equação 3.2 e apresentada em termos de gramas de água por grama de adsorvente seco.

$$S = \frac{m_u - m_s}{m_s} \quad (3.2)$$

### 3.2.5.3.2 Quantificação da capacidade do criogel em se ligar à água presente no ar

A capacidade do polímero seco em se ligar à água presente no ar foi estipulada com base no procedimento desenvolvido por Plieva *et al.* (2004b). Dessa forma, criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT foram secos em estufa (60 °C) até atingirem massa constante e pesados ( $m_s$ ). Em seguida, foram expostos a uma atmosfera com 85% de umidade relativa, produzida a partir de uma solução aquosa saturada com cloreto de potássio (KCl) em temperatura de 25 °C. O discreto aumento de massa dos criogéis foi monitorado ao longo de 15 dias, tempo suficiente para o criogel atingir massa constante. Após atingir massa constante, o valor mensurado ( $m_u$ ) foi considerado para o cálculo da massa de água retida no material polimérico  $m_{\text{água}}$ , em gramas, conforme Equação 3.3:

$$m_{\text{água}} = m_u - m_s \quad (3.3)$$

### 3.2.5.3.3 Estimativa da porosidade

A porosidade dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT foi estimada com base no protocolo desenvolvido por Yao *et al.* (2006b). Dessa forma, os criogéis foram saturados com água por imersão e, em seguida, submersos em um recipiente cilíndrico preenchido com volume de água conhecido ( $V_1$ ). Após, mediu-se o volume final ( $V_2$ ) e a partir da diferença entre o volume de água final e inicial, estimou-se o volume ocupado pelo criogel ( $V_0$ ). Em seguida, foram pesados os criogéis saturados com água ( $m_{\text{saturado}}$ ) e, após remover a água de dentro dos poros por simples compressão, eles foram pesados novamente ( $m_u$ ). Esses dados permitiram o cálculo da porosidade ( $\varphi$ ) com base na massa de água livre, correspondente à água removida de dentro dos poros por compressão, através da Equação 3.4:

$$\varphi = \frac{m_{\text{saturado}} - m_u}{\rho_{\text{água}} * V_0} \quad (3.4)$$

em que  $\rho_{\text{água}}$  é a densidade da água.

### 3.2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.2.6.1 *Dosagem de proteínas totais*

A concentração de proteínas totais em cada fração coletada durante os experimentos cromatográficos foi determinada pela metodologia estabelecida por Bradford (1976). Para os experimentos, a curva analítica padrão foi construída utilizando medidas de absorvância para soluções padrão de albumina de soro bovino (BSA) e de IgG humana, diluídas em diferentes concentrações. BSA foi utilizada para experimentos cromatográficos realizados com soro e, quando realizados com fragmentos, empregou-se IgG humana como proteína de referência.

#### 3.2.6.2 *Eletroforese SDS-PAGE*

Eletroforese SDS-PAGE foi utilizada para identificar, qualitativamente, as proteínas resultantes em cada etapa de cada experimento cromatográfico. A técnica foi empregada sob condições desnaturantes e não redutoras, no equipamento Mini *Protean* III (BioRad, EUA) conforme Laemmli (1970); em gel de poliacrilamida a 7,5%, ao se trabalhar com soro, e 10% ao se utilizar IgG e seus fragmentos. As amostras foram preparadas em *pools* de cada etapa, ou seja, através da mistura de quantidades iguais de todas as frações coletadas na referida etapa, exceto ao analisar a curva de ruptura, em que as amostras foram preparadas individualmente. Aos *pools* (ou às amostras individuais) foram adicionados: glicerol e tampão de desnaturação, ambos contendo SDS. Em seguida, as amostras foram desnaturadas por aquecimento a 100 °C, durante 7 minutos. Após desnaturação, alíquotas de 3 a 15 µL de cada amostra, marcadores de massa molecular e marcador de IgG foram aplicados nos géis, os quais foram submetidos a uma tensão de 150 V, em cuba vertical preenchida pelo tampão de corrida constituído por 0,3% (m/v) de Tris-HCl, 1,44% (m/v) de glicina e 0,1% (m/v) de SDS.

A coloração dos géis foi realizada com nitrato de prata, segundo Morrissey (1981). Sob agitação, os géis foram inicialmente fixados com solução aquosa contendo 40% de etanol e 10% ácido acético, por 20 min. Em seguida, trocou-se esta solução aquosa por outra contendo 5% de etanol e 7% de ácido acético, na qual ficaram submersos e em agitação por mais 20 min. Após, os géis foram colocados em solução aquosa com 10% de glutaraldeído, na qual ficaram agitando por outros 20 min. Os géis foram lavados com água ultrapura por três

vezes e depois foi adicionado uma solução contendo ditionotrieto (5 mg/mL), na qual ficou sob agitação por 20 min. A etapa posterior consistiu na adição de solução de nitrato de prata (0,1% m/v), que ficou agitando em contato com os géis por mais 20 min. Na sequência, os géis foram rapidamente lavados com água ultrapura e iniciou-se o procedimento de revelação, que consistiu em adicionar a solução reveladora até cobrir os géis e agitar até o aparecimento das bandas de proteínas. Para 100 mL de solução reveladora a 3% (m/v) de carbonato de sódio, adicionou-se 50 µL de formaldeído a 37% (m/v). Para finalizar a revelação, foi adicionado 5 mL de solução de ácido cítrico 2,3 mol/L. Após etapa de revelação, os géis foram lavados com água, digitalizados e, em seguida, envoltos em plástico devidamente identificados para armazenamento em geladeira com a finalidade em conservar a análise.

### 3.2.6.3 *Western blot*

No presente trabalho, a técnica de *Western blot* foi utilizada para detecção específica de fragmentos de IgG presentes em cada etapa cromatográfica. Com isso, os *pools* obtidos nas etapas de lavagem e eluição das cromatografias realizadas com solução de IgG clivada foram analisadas pela técnica, de acordo com a metodologia descrita por Towbin, Staehelin e Gordon (1979) e Carmignotto, Mourão e Bueno (2017).

Primeiramente realizou-se uma eletroforese SDS-PAGE em gel a 12% de acrilamida, que ocorreu em cuba vertical com tensão de 100 V. Amostras da injeção, dos *pools* referentes às etapas de lavagem e eluição e o marcador pré-corado foram aplicados ao gel. Após completa migração das proteínas, elas foram imediatamente transferidas para membranas de nitrocelulose, em equipamento Mini Transblotting III System (Bio-Rad, EUA) cuja cuba foi preenchida com o tampão de transferência a 4°C, constituído por Tris-HCl (25 mmol/L), glicina 192 (mmol/L) e etanol 20% (v/v). A etapa de transferência levou aproximadamente 45 min e foi realizada à tensão de 100 V.

Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente em tampão PBS (20 mmol/L), contendo 0,1% de Tween-20 e 5% leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), necessário para bloquear os sítios de ligações às proteínas remanescentes na superfície da membrana. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com tampão PBS (20 mmol/L) contendo 0,1% de Tween-20, até remoção do leite em pó. Posteriormente, as membranas foram incubadas, por 1 h, com anticorpos de cabra conjugados a peroxidase: uma membrana recebeu o anti-hIgG (Fab específico, diluído dez mil vezes em tampão PBS com 2% de leite em pó desnatado) e a outra, o anti-hIgG (Fc específico, diluído quinze mil vezes

em tampão PBS com 2% de leite em pó desnatado). Por último, prosseguiu-se com a coloração da membrana, pela adição da mistura de substrato e cromógeno (1,0 mg/mL de diaminobenzidina, 0,003% peróxido de hidrogênio) em tampão Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7,4). A revelação foi interrompida após o aparecimento total das bandas, pela lavagem das membranas com água em abundância.

#### 3.2.6.4 *Quantificação de fragmentos Fab por imunodifusão radial*

A quantificação de fragmentos Fab, obtidos nas condições experimentais que possibilitaram a recuperação destes na ausência da porção Fc, foi realizada pela técnica de imunodifusão radial, conforme metodologia descrita por Lu e Miller (1996) e Da Silva *et al.* (2014).

Para cada análise, preparou-se 20 mL de gel composto por 3% (m/v) de polietilenoglicol (PEG 6000) e (1,2% m/v) de agarose, solubilizados a 90 °C em tampão TBE (Tris-HCl 90 mmol/L, ácido bórico 90 mmol/L e EDTA 3 mmol/L) a pH 8,3. O antígeno anti-Fab foi adicionado à solução quando esta atingiu temperatura de 50 °C, na proporção de 1 µL de antígeno para cada 1 mL de gel que foi então disposto em um molde para geleificação à temperatura ambiente. Após completa geleificação, foram realizados orifícios simetricamente espaçados e, em cada orifício, introduziu-se 10 µL das amostras de injeção e dos pools referentes às etapas de lavagem e eluição, todas as amostras com concentração conhecida (em termos de proteínas totais). Além das amostras cromatográficas, também foram aplicados 10 µL contendo concentrações conhecidas de Fab de alta pureza para determinação da curva padrão. O gel contendo as amostras foi incubado em câmara úmida a temperatura ambiente por 48 h e, passado esse tempo, o gel foi seco por 24 h à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi corado com solução contendo o corante Coomassie brilliant blue R-250 (0,5% m/v), etanol (45%) e ácido acético (45%), em que ficou submerso por 30 min. Depois de corado, o gel foi descorado por repetitivas lavagens com solução aquosa contendo etanol (30%) e ácido acético (7%), até a visualização dos halos de precipitação. O diâmetro de cada halo de precipitação foi medido com o auxílio de um paquímetro e convertido em termos de concentração de fragmentos Fab e IgG intacta, com base na curva padrão, a qual relaciona linearmente o diâmetro dos halos com o logaritmo da concentração de fragmentos Fab.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa seção foi destinada à apresentação e discussão dos resultados provenientes do presente trabalho, iniciando-se com estudos de síntese e caracterização do adsorvente: o criogel monolítico de PAAm-Alg-AGE-OPT. Em seguida, foram abordados os resultados obtidos nos experimentos cromatográficos, visando o estudo de adsorção de IgG em diferentes soluções tamponantes, discutindo o efeito de pH e da condutividade. São também apresentados resultados dos ensaios cromatográficos, cujo objetivo foi o estudo de purificação de IgG a partir do soro humano e, por meio da curva de ruptura do adsorvente, determinou-se sua capacidade dinâmica de adsorção. Por último, foram realizados ensaios cromatográficos com fragmentos de IgG humana provenientes de clivagem enzimática de IgG e os resultados destes foram discutidos ainda neste capítulo.

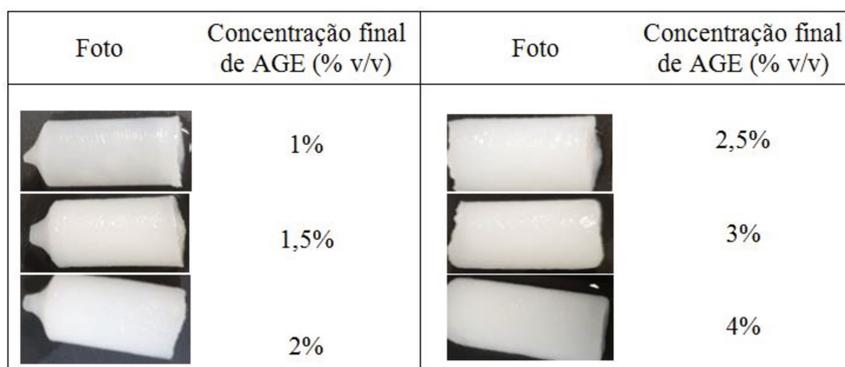
### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL MONOLÍTICO

#### 4.1.1 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO CRIOGEL DE PAAM-ALG-AGE

Em busca da composição do criogel que proporcione características favoráveis para ser empregado como fase estacionária em experimentos cromatográficos, algumas variações na composição do material foram estudadas. No primeiro estudo variou-se a quantidade de grupos funcionais introduzidos pela adição de AGE na síntese. Para tanto, foi mantida fixa a concentração de monômeros de alginato (1% m/v) e de AAm (4,74% m/v); da MBAAm (1,26% m/v); do CaCl<sub>4</sub> (0,04% m/v); do iniciador APS (0,2% m/v) e o catalisador TEMED (0,2% v/v), conforme determinado por Mourão, Haupt e Bueno (2018).

Ao variar a concentração de AGE entre 1 a 4% (v/v), conforme descrito no item 3.2.1.1 do capítulo referente a materiais e métodos, foram obtidas estruturas poliméricas semelhantes ao se tratar da morfologia macroscópica: todas de coloração branca, aspecto esponjoso, estrutura homogênea e uniforme, como mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Criogéis de PAAm-Alg-AGE com diferentes concentrações de AGE.

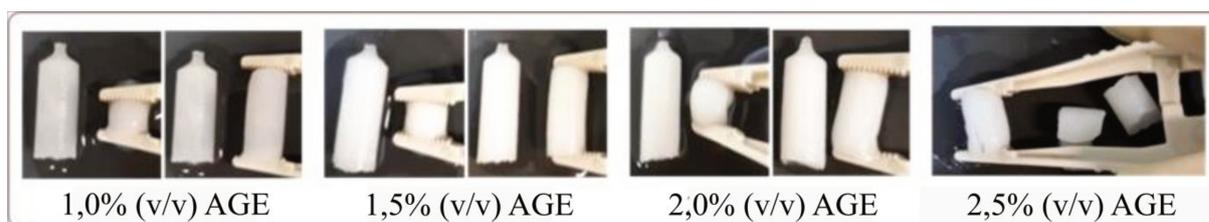


Fonte: Própria autora (2018)

Apesar da semelhança física entre os materiais apresentados, constatou-se que ao aumentar a concentração de AGE na síntese, houve aumento gradativo no enrijecimento da estrutura resultante. Da literatura, sabe-se que criogéis compostos apenas por PAAm são bastante elásticos, conforme reportado por Carvalho *et al.* (2014). Além do enrijecimento, em criogéis cuja concentração de AGE foi superior a 2%, percebeu-se odor característico desse reagente ao retirá-los do molde, indicando seu possível excesso.

Em decorrência do enrijecimento das estruturas, avaliou-se a resistência dos criogéis híbridos de PAAm-Alg-AGE em resposta à compressão. Para isso, os materiais foram manualmente comprimidos, conforme ilustra a Figura 13.

Figura 13 - Compressão de PAAm-Alg-AGE com diferentes concentrações de AGE.



Fonte: Própria autora (2018)

De acordo com Carvalho *et al.* (2014), criogéis de PAAm podem ser comprimidos em até 50% de seu volume sem sofrer deformações permanentes. Foi observada, experimentalmente, a grande capacidade de compressão dos materiais sintetizados, os quais possuem alginato em sua composição. Também foi possível verificar que altas concentrações de AGE comprometeram a elasticidade do criogel. Após ensaio manual de compressão, verificou-se que os criogéis com até 2% de AGE retornaram rapidamente a sua forma e tamanho inicial, da mesma forma que criogéis de PAAm (sem AGE), como observado por

Arvidsson *et al.* (2003). Foi observado também que quanto menor a concentração de AGE na estrutura do material, mais rápido foi o retorno e maior a compressão suportada. Por outro lado, em criogéis com concentração igual e maior que 2,5% (2,5%; 3,0% e 4,0%) de AGE, o ensaio de compressão não foi finalizado devido ao surgimento de deformações permanentes, oriundas da compressão manual. O criogel contendo 2,5% de AGE apresentou rachaduras em sua superfície e os que continham 3,0 e 4,0% foram totalmente fragmentados durante a compressão (Figura 13).

Para verificar o efeito da concentração do iniciador de polimerização APS e do catalisador TEMED na ausência e presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , foi mantida fixa a concentração de AAm (4,74% m/v), MBAAm (1,26% m/v) e alginato (1% m/v) e a síntese prosseguiu conforme descrito no item 3.2.1.2, empregando duas diferentes composições de AGE (1 e 2% (v/v)). As composições dos materiais contendo os reagentes variados (APS, TEMED e AGE) foram apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Variação na adição de APS, TEMED e AGE, na ausência e presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na síntese de PAAm-Alg-AGE.

Reagentes	Concentração (%)			
	CaCl <sub>2</sub>	APS	TEMED	AGE
CaCl <sub>2</sub>	0,04	0,04	-	-
APS	0,20	0,10	0,20	0,10
TEMED	0,20	0,10	0,20	0,10

Fonte: Própria autora (2018)

Os criogéis obtidos a partir das variações dos reagentes indicados na Tabela 1 não apresentaram diferenças entre si, tanto em termos de elasticidade quanto em aspectos relativos à cor e homogeneidade. Porém, é importante ressaltar que a polimerização teve início mais rapidamente para o criogel em que foi empregado maior concentração de APS e TEMED na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa observação condiz com os resultados de Yao *et al.* (2006a) que, a partir da variação de temperatura, diâmetro do molde e concentração de TEMED na síntese de criogéis de PAAm, concluíram que a polimerização também é bastante influenciada pela concentração do iniciador e catalisador de polimerização.

Além disso, para o criogel híbrido sintetizado no presente trabalho, foi observado experimentalmente que a presença de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  na mistura reacional contendo alginato

favoreceu a velocidade de polimerização. Essa constatação surgiu ao comparar as misturas reacionais com e sem  $\text{Ca}^{2+}$  imediatamente após introduzir o iniciador de polimerização e o catalisador. A polimerização do criogel que contém este íon em solução teve início imediato, principalmente com 0,2% de APS e TEMED, enquanto que a que ocorreu na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  tardou alguns segundos para que seu início fosse percebido. Isso pode ser devido à formação imediata do polímero iônico de alginato. Segundo Lozinsky (2002), a polimerização muito rápida é um dos maiores obstáculos para a obtenção de criogéis ionotrópicos, pois a velocidade de polimerização é determinante para o tamanho de poro e uma taxa de polimerização elevada pode resultar na diminuição desses. No entanto, devido ao mecanismo reacional da crio-polimerização de monômeros de alginato com outros componentes não estar elucidado, a questão que é levantada é se o alginato interfere na velocidade de formação do criogel após o congelamento da mistura reacional (GURIKOV e SMIRNOVA, 2018).

Em decorrência da polimerização iônica do alginato, mesmo em condições criogênicas (ZHAO *et al.* 2016; GURIKOV e SMIRNOVA, 2018), é possível que este polímero iônico se arrange da mesma forma que os hidrogéis, conforme o efeito conhecido como *egg-box*. Nesse caso, os cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ) acomodam-se entre as cavidades eletronegativas formadas a partir das unidades adjacentes que compõem o bloco G do alginato, formando um polímero iônico (OMIDIAN, ROCCA e PARK, 2006; LOW *et al.*, 2015; LI G. *et al.*, 2017).

Quando em temperatura de 50 °C e com polimerização iniciada por luz ultravioleta, as cadeias poliméricas do alginato se unem covalentemente às cadeias poliméricas da PAAm, por meio das aminas presentes na PAAm e pelos grupos carboxílicos das cadeias do alginato (SUN J. *et al.*, 2012; ARJMANDJ and RAMEZANI, 2019). Tendo isso em vista, em decorrência da diferença morfológica bem como de algumas características físicas (apresentadas pelas seções 4.1.3 e 4.1.4, respectivamente) do material híbrido sintetizado no presente trabalho em relação à criogéis de PAAm-AGE reportados por diferentes autores (ARVIDSSON *et al.*, 2003; PLIEVA *et al.*, 2004a e 2004b; DEMIRYAS *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2014), acredita-se que a estrutura obtida neste é decorrente da união covalente entre os diferentes monômeros. Dessa forma, tem-se a hipótese de que pode haver ligação covalente entre as aminas da PAAm e os grupamentos carboxílicos das cadeias do alginato, mesmo em condições criogênicas. Somente a união entre esses monômeros garantirá a não degradação do polímero iônico resultante de monômeros de alginato.

Para a escolha do material com a composição mais favorável à técnicas cromatográficas, levou-se em conta o grau de reticulação do polímero, optando também em

empregar íons  $\text{Ca}^{2+}$  na composição deste. Além disso, para técnicas cromatográficas de purificação por pseudobioafinidade, é desejável que a estrutura contenha quantidade de grupamentos reacionais (AGE) suficientes para imobilização do ligante, respeitando a quantidade máxima acima da qual foi notória interferência nas propriedades relacionadas à elasticidade do material (2% v/v). Também foram incluídas as maiores concentrações de APS e TEMED testadas, em decorrência do imediatismo do início da polimerização promovida por esses reagentes.

Definida a composição mecanicamente mais favorável às técnicas cromatográficas, o criogel foi avaliado em relação à permeabilidade. Para tanto, antes da imobilização do ligante, 3 mL de criogel composto por 4,74% (m/v) de AAm, 1,26% (m/v) de MBAm, 1% (m/v) de alginato, 2% (v/v) de AGE, 0,2% (m/v) de APS, 0,2% (v/v) de TEMED e 0,04% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  foi sintetizado em coluna de vidro C10/10 (GE Healthcare, EUA). O material então foi submetido a ensaios com diferentes vazões de água (de 0,1 a 5,0 mL/min, equivalente à velocidade superficial de 7,8 a 382,2 cm/h). Como resultado, o criogel suportou vazão de 5 mL/min, sem apresentar qualquer resistência ao fluxo.

Portanto, o criogel sintetizado mostrou ser altamente permeável e mecanicamente resistente para ser empregado como fase estacionária em cromatografia de baixa pressão, uma vez que comumente empregam-se vazões entre 0,5 a 2 mL/min (correspondente à velocidade superficial de 38,4 a 153 cm/h). Neste material realizou-se a imobilização do ligante.

#### 4.1.2 IMOBILIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE OPT

O monolito de PAAm-Alg-AGE contém em sua estrutura grupos epóxi, introduzidos pelo reagente AGE. Na presença do aminoácido OPT e, em condições que proporcione desprotonação da amina primária presente, o ligante foi imobilizado no suporte sólido via grupamento amino, originando uma ligação éter. Dessa forma, os grupos carboxílicos (iônicos) e fosfato ligado ao anel aromático (iônico e parcialmente hidrofóbico) do OPT, e provavelmente alguns grupos carboxílicos (iônicos) do alginato, ficam livres para interações com as biomoléculas.

Por quelatação de íons  $\text{Cu}^{2+}$ , conforme procedimento descrito no item 3.2.5.3, mensurou-se indiretamente quelatação de 52,72  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ /g de criogel seco (equivalente a 3,55  $\mu\text{mol}$  de OPT/mL de criogel). Este valor foi inferior ao reportado por Pavan *et al.* (2017) que, por análise elementar de nitrogênio, obtiveram 13,80  $\mu\text{mol}$  de OPT/mL ao imobilizar este aminoácido em gel de agarose ativado com bisoxirano. Embora o valor da densidade de

ligantes tenha sido inferior no presente trabalho, as técnicas empregadas para sua quantificação e a matriz cromatográfica na qual o ligante foi imobilizado são diferentes. Pavan *et al.* (2017) utilizaram gel de agarose para imobilização do OPT enquanto que o material empregado no presente trabalho trata-se de criogel e, devido à alta densidade de macroporos, a superfície disponível para imobilização de ligantes é reduzida, impactando em menor densidade de ligantes imobilizados (PLIEVA *et al.*, 2004b). Além disso, neste trabalho não foi empregado braço espaçador, ou seja, o grupamento reativo foi incorporado diretamente na síntese polimérica e isso pode acarretar em efeitos estéricos indesejáveis.

#### 4.1.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

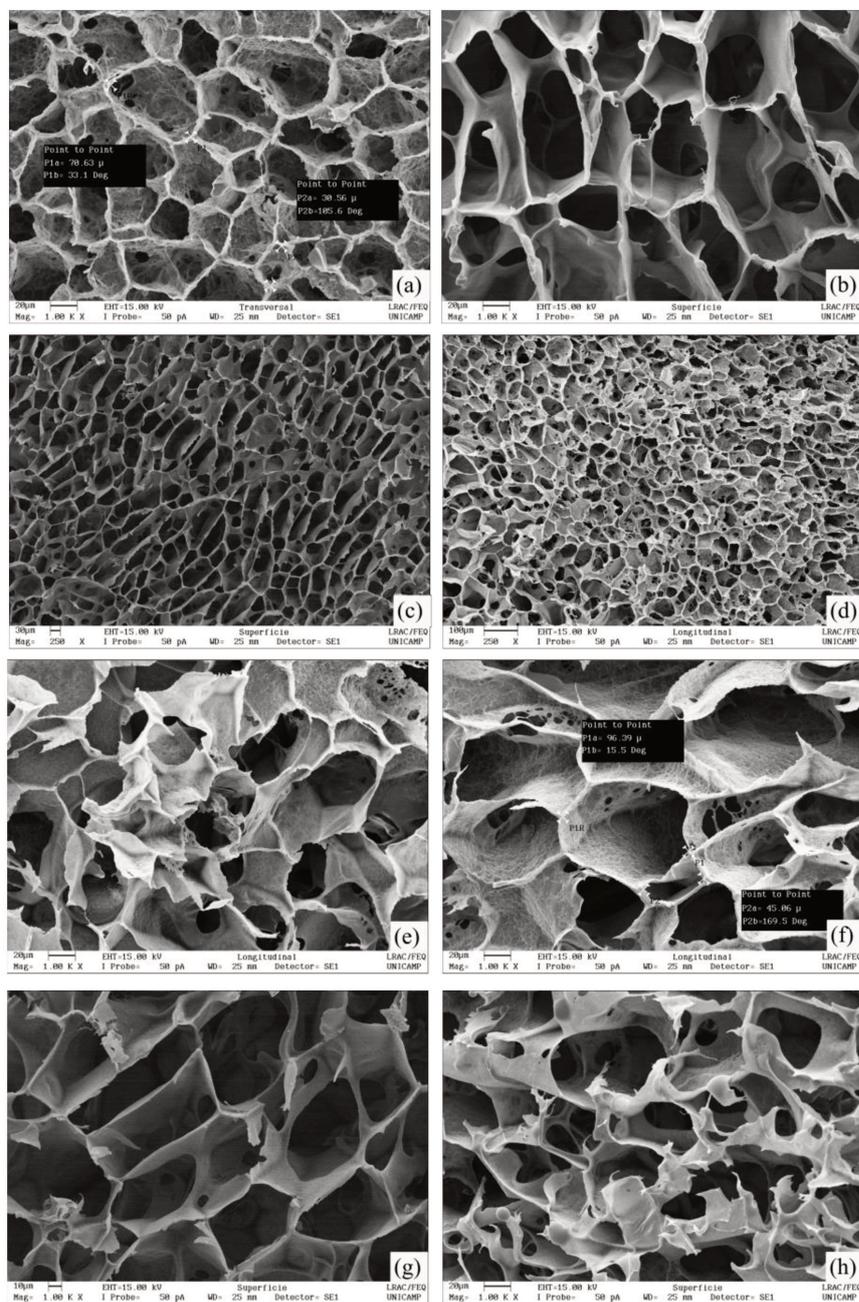
Os criogéis monolíticos, derivatizados ou não com OPT, resultaram em estruturas macroporosas com característica esponjosa, típica de criogéis. Na Figura 14 são apresentadas imagens dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT, obtidas por MEV. A Figura 14a apresenta um corte da seção transversal do criogel e, com ampliação de 1000 vezes, é possível observar a presença de poros interconectados de tamanhos e formatos diversos, que variam entre 30 e 70  $\mu\text{m}$ . Da literatura, monolitos obtidos por técnicas de criopolimerização apresentam poros relativamente grandes, entre 10 a 200  $\mu\text{m}$ , a depender da composição e temperatura de síntese (ARVIDSSON *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2003; PLIEVA *et al.*, 2004a e 2004b; ÖZGÜR *et al.*, 2011; BARROSO *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2006b).

A interconexão e a heterogeneidade dos poros é bastante evidente, tanto na superfície (Figura 14b e 14c) quanto ao longo de todo o comprimento da estrutura (corte longitudinal, Figura 14d). Devido a essa estrutura macroporosa, constituída por inúmeros poros bem definidos e interconectados, o fluxo convectivo é favorecido, minimizando a resistência à transferência de massa, que é um dos principais problemas em cromatografia líquida em fases estacionárias tradicionais.

Mesmo após a imobilização do OPT, o material preservou suas características morfológicas, uma vez que não foram observadas grandes alterações no tamanho e aspecto dos poros, conforme comparativo entre a imagem 13e e 13f, referentes aos cortes da seção longitudinal dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT, respectivamente; macroporos com 45 e 96  $\mu\text{m}$  são identificados após a imobilização do OPT. Na superfície, as imagens 13g e 13h, referentes aos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT,

respectivamente, trazem a ampliação da superfície do material, mostrando que a imobilização do OPT não acarretou obstrução de poros.

Figura 14 - Criogel de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT. Imagens obtidas por MEV. (a) Seção transversal do criogel de PAAm-Alg-AGE ampliada 1000 vezes; (b) Superfície do criogel de PAAm-Alg-AGE ampliada 250 vezes; (c) Superfície do criogel de PAAm-Alg-AGE ampliada 1000 vezes; (d) Seção longitudinal do criogel de PAAm-Alg-AGE ampliada 250 vezes; (e) Seção longitudinal do criogel de PAAm-Alg-AGE ampliada 1000 vezes; (f) Seção longitudinal do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT ampliada 1000 vezes; (g) Superfície do criogel de PAAm-Alg-AGE ampliada 1000 vezes; (h) Superfície do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT ampliada 1000 vezes.



#### 4.1.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

Conforme caracterização morfológica, o material obtido apresentou-se bastante poroso. A presença de macroporos influencia diretamente na capacidade de intumescimento do material, que resultou em  $3,08 \pm 0,10$  e  $3,13 \pm 0,07$  g de H<sub>2</sub>O/g criogel seco para os criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT, respectivamente. Essa capacidade foi calculada conforme a equação 3.2 (apresentada no item 3.2.5.4) e, comparando ao valor reportado por Demiryas *et al.* (2007), igual a 6,84 g de H<sub>2</sub>O/g seca para criogel de PAAm-AGE, o presente material híbrido apresenta menor capacidade de intumescimento, que também é menor que a reportada por Mourão, Haupt e Bueno (2018), que obtiveram 5,46 g de H<sub>2</sub>O/g seca para criogel de PAAm-Alg.

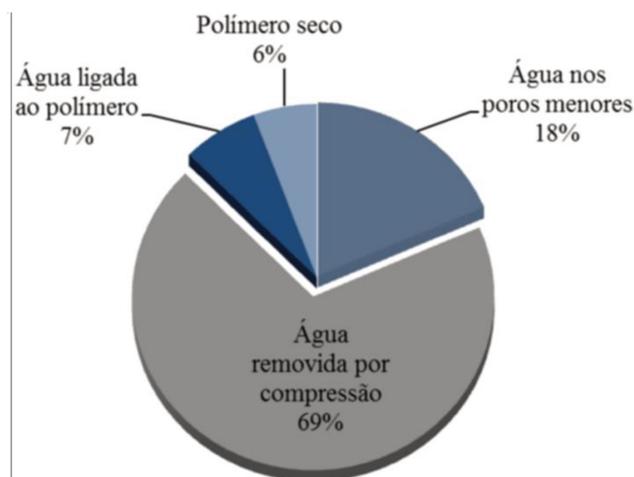
De acordo com os estudos realizados por Plieva *et al.* (2004a e 2004b), ao aumentar a concentração de agente reticulante, é perceptível o aumento na resistência mecânica do material e, portanto, maior será a vazão suportada pelas técnicas cromatográficas. Contudo, isso implica na redução da capacidade de intumescimento. Adicionalmente, Carvalho *et al.* (2014) observaram que a introdução de grupos epóxi na estrutura polimérica de criogéis acarreta em redução de sua capacidade de intumescimento, devido à estrutura apresentar-se mais reticulada em relação à estrutura sem esses grupos. Com isso, a menor capacidade de intumescimento obtida para o presente material pode estar relacionada tanto à introdução do AGE, quanto a utilização do agente reticulante MBAm, e também por se ter empregado monômeros de alginato, que reticulam ionicamente com os íons de Ca<sup>2+</sup> em solução. Todos esses reagentes, quando combinados, resultam em uma estrutura final com maior grau de reticulação e, portanto, com menor capacidade de intumescimento, conforme verificado.

Apesar dos criogéis de PAAm-Alg-AGE e PAAm-Alg-AGE-OPT apresentarem menor capacidade de intumescimento, a porosidade de ambos foi estimada em 82% (conforme equação 3.4, apresentada no item 3.2.5.6 do capítulo referente a materiais e métodos). Este valor é característico de um material com porosidade mediana e encontra-se próxima à porosidade estimada por Carvalho *et al.* (2014) para criogel de PAAm com AGE. Ao incluir AGE na síntese do criogel de PAAm, os autores estimaram porosidade na faixa de 78,2 a 88,3%, a depender da razão entre os monômeros de acrilamida e bisacrilamida.

Quantificou-se também a capacidade que os criogéis possuem em se ligar ao vapor de água presente no ar, após secos em estufa. Como resultado, cada grama de criogel (massa seca) com e sem OPT adsorveu em média, 18 e 23 mg de água, respectivamente. O

conjunto de todos os ensaios de molhabilidade do material possibilitou, ainda, a obtenção de sua composição mássica, representada pelo gráfico da Figura 15.

Figura 15 - Composição mássica do criogel de PAAm-Alg-AGE



Fonte: Própria autora (2018)

A composição obtida neste trabalho se assemelha aos criogéis de PAAm com AGE reportados por Plieva *et al.* (2014a). Os autores constataram que 5% a 6% da massa total do criogel corresponde à massa de polímero seco; 6% a 7% à massa de água adsorvida do vapor saturado (que se liga ao polímero) e que é possível remover mais de 50% da água presente no polímero saturado por simples compressão.

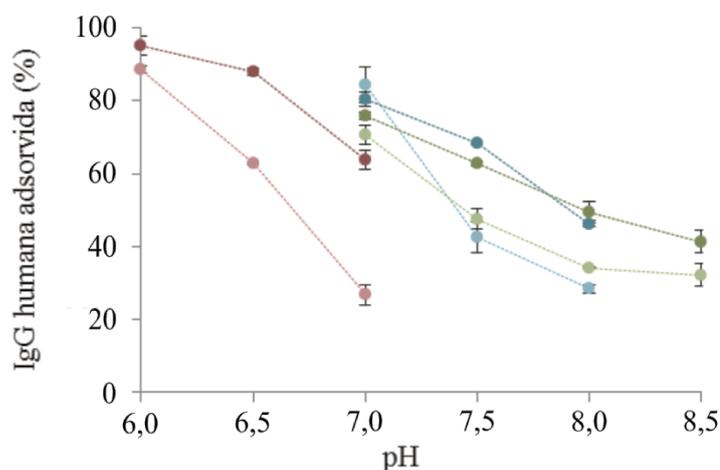
Além disso, os valores mássicos obtidos estão de acordo com o que foi observado experimentalmente, visto que ao comprimir o material, a maior parte da água retida nos poros é removida, reduzindo a massa e o volume do criogel. De acordo com a análise quantitativa, é possível retirar quase 70% da água presente no material saturado por simples compressão, seguido por filtração a vácuo. Esse excesso de água abandona a estrutura porosa com facilidade, pois se encontra nos macroporos do material. No entanto, após esgotar todo o excesso de água, ainda restam 18% de umidade no criogel, esta, por sua vez, encontra-se nos poros menores e pode ser removida por secagem em estufa. O material seco, com massa e volume reduzido, representa apenas 6% da massa do material saturado, o que agrega vantagens na conservação e armazenamento deste material, podendo ser reidratado quantas vezes forem necessárias, sem a perda de suas características iniciais.

## 4.2 ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS

### 4.2.1 ADSORÇÃO DE IGG HUMANA DE ALTA PUREZA EM CRIOGEL DE PAAM-ALG-AGE-OPT

Ensaio cromatográfico foram realizados com a finalidade de avaliar o potencial do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT em adsorver IgG humana, quando em diferentes condições tamponantes. Baseado no trabalho de Pavan *et al.* (2017), o qual mostra adsorção de IgG ao utilizar OPT imobilizado em gel de agarose ativado com bisoxirano, foram escolhidos três dos diferentes tampões empregados pelos autores a 25 mmol/L: Tris-HCl pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5; NaP pH 6,0, 6,5 e 7,0; e Hepes pH 7,0, 7,5 e 8,0. Esses tampões são bastante comuns em cromatografia de afinidade e essa mesma molaridade foi empregada por outros autores, como Naik, Raina e Lali (2011) e Bresolin e Bueno (2012), para purificar IgG. Experimentos com Tris-HCl e NaP a 10 mmol/L também foram realizados, visando diminuir a densidade de cargas líquida em solução e, portanto, diminuir a condutividade conforme estudo de adsorção mostrado em Pavan *et al.* (2017). O tampão Hepes a 10 mmol/L também foi proposto no presente trabalho e os percentuais de IgG adsorvida foram apresentados em função do pH (Figura 16), sendo empregado os mesmos valores de pH usados anteriormente, para os tampões a 25 mmol/L. Os balanços de massa para cada condição empregada estão apresentados no Anexo A.1.

Figura 16 - Percentual de IgG humana de alta pureza adsorvida em PAAm-Alg-AGE-OPT em função do pH. Tampões utilizados: (---●---) NaP 10 mmol/L; (---●---) NaP 25 mmol/L; (---●---) Hepes 10 mmol/L; (---●---) Hepes 25 mmol/L; (---●---) Tris-HCl 10 mmol/L; (---●---) Tris-HCl 25 mmol/L.



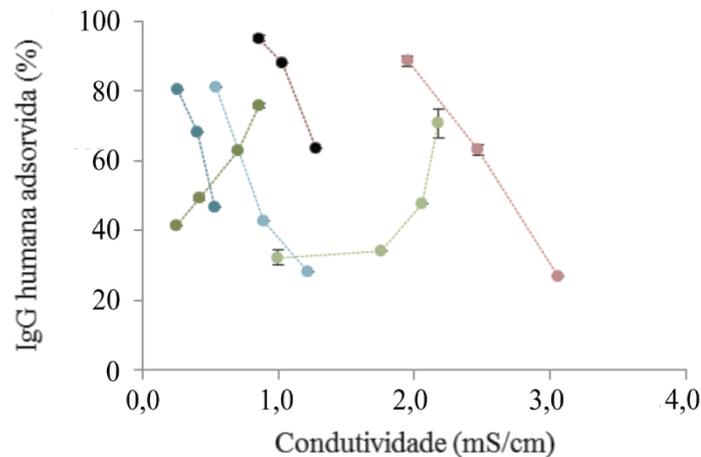
Fonte: Autora (2019)

Apesar do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT ter adsorvido IgG em todas as condições empregadas, o percentual de adsorção diminuiu com o aumento do pH, para todos os tampões avaliados. Isso provavelmente se relaciona com as interações eletrostáticas presentes, uma vez que o pH do meio afeta tanto a ionização dos grupos funcionais existentes no adsorvente quanto a das moléculas na fase móvel (SHENTU *al.*, 2005; WU, ZHU, JIA 2006; BAYRAMGOLY e ARICA, 2007; ARICA e BAYRAMOGLU, 2007). A natureza do tampão, bem como sua condutividade também são fatores relevantes para a adsorção da biomolécula, visto que diferentes percentuais de IgG são adsorvidos para um mesmo valor de pH.

Ao fixar o valor do pH em 7, por exemplo, foi obtida adsorção máxima de 84% no tampão zwitteriônico Hepes (pKa 7,5) e no de carga positiva Tris-HCl (pKa 8,3), com adsorção superior a 70%. Contudo, a adsorção foi mínima no tampão NaP (pKa 2,1;7,2;12,7) a pH 7,0, principalmente ao empregar a concentração de 25 mmol/L. Por outro lado, para NaP a pH 6,0, a adsorção foi de 95% e 89% nas concentrações de 10 e 25 mmol/L, respectivamente, sendo a condição que mais adsorveu esta proteína. No entanto, foi observado diminuição considerável do percentual de IgG adsorvida ao aumentar o pH de 6,0 para 7,0, sendo adsorvido apenas 64 e 27% na concentração de 10 e 25 mmol/L, respectivamente. Este último resultado mostra que a adsorção não é influenciada somente pelo pH e tipo de tampão, mas também pela densidade de íons em solução.

Bresolin e Bueno (2012) observaram comportamento similar ao empregar o tampão NaP a 25 mmol/L na purificação de IgG em gel de agarose ativado com CNBr e com o ligante OPS imobilizado; ao aumentarem o pH, a quantidade de IgG adsorvida diminuiu. Pavan *et al.* (2017) obtiveram baixo percentual de IgG adsorvida pelo ligante OPT ao empregarem o tampão NaP a 25 mmol/L e os autores atribuíram o resultado à condutividade elevada do tampão, por isso propuseram diminuir a molaridade dos tampões com elevada condutividade resultando em maiores percentuais de adsorção. Sendo assim, de modo a compreender o efeito da concentração do tampão no percentual de IgG adsorvida, valores de condutividade foram relacionados aos resultados de adsorção para as diferentes condições tamponantes empregadas, conforme Figura 17. Os valores de condutividade, mensurados para cada tampão, encontram-se no Apêndice A.2.

Figura 17 - Percentual de IgG humana de alta pureza adsorvida em PAAm-Alg-AGE-OPT em função da condutividade. Tampões utilizados: (●) NaP 10 mmol/L; (●) NaP 25 mmol/L; (●) Hepes 10 mmol/L; (●) Hepes 25 mmol/L; (●) Tris-HCl 10 mmol/L; (●) Tris-HCl 25 mmol/L.



Fonte: Autora (2019)

Com exceção ao tampão Tris-HCl, o aumento da condutividade acarretou diminuição no percentual de IgG adsorvida. Para o tampão NaP, carregado negativamente, o efeito do aumento da condutividade na adsorção de IgG foi o mais pronunciado entre os tampões empregados, principalmente na concentração de 25 mmol/L que de 88,54% de adsorção em valores de condutividade de 1,95 mS/cm caiu para 26,81% aumentando a condutividade para 3,06 mS/cm.

Os autores Arica, Yalçın e Bayramoglu (2004), Bayramoglu, Senel e Arica (2006), Naik, Raina e Lali (2011) e Pavan *et al.* (2017) também observaram que o aumento na condutividade do meio acarreta em diminuição na quantidade de IgG adsorvida em diferentes aminoácidos imobilizados em suportes sólidos. Nesses casos, notou-se predominância de contribuições eletrostáticas na adsorção da biomolécula alvo, as quais são influenciadas principalmente pelo pH e natureza dos íons presentes em solução.

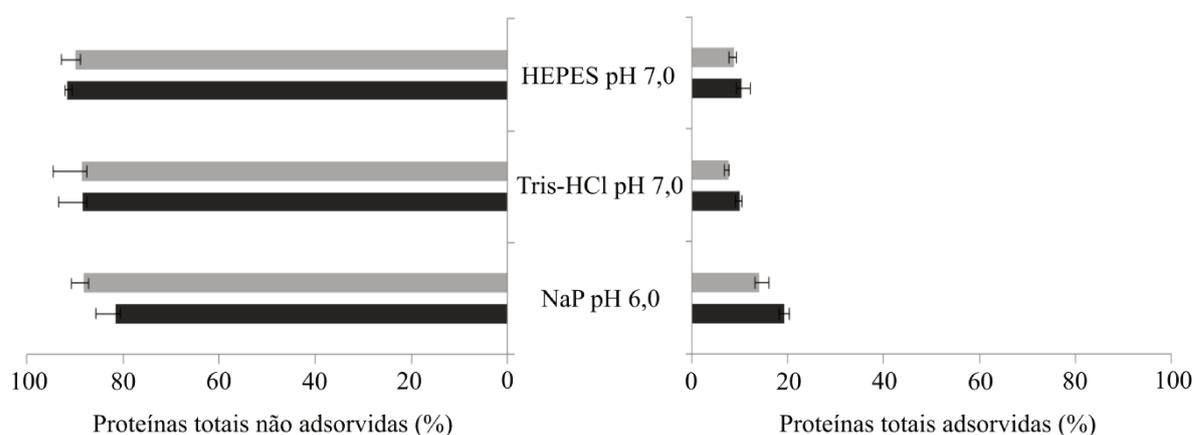
#### 4.2.2 PURIFICAÇÃO DE IGG A PARTIR DO SORO HUMANO

Visto que o pH do meio, bem como a natureza do tampão são fatores importantes na adsorção de IgG, foram realizados ensaios cromatográficos com soro humano nas

condições tamponantes que mais adsorveram IgG pré-purificada, ou seja: Tris-HCl e Hepes a 10 e 25 mmol/L em pH 7,0 e NaP a 10 e 25 mmol/L em pH 6,0.

As cromatografias foram realizadas conforme descrito no item 3.2.4 da seção de materiais e métodos, e os resultados foram apresentados em termos de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas (Figura 18). Também foram apresentadas as eletroforeses para cada condição (Figura 19). Os cromatogramas com as eletroforeses, bem como o balanço de massa de todas as cromatografias e suas duplicatas encontram-se no Apêndice B.

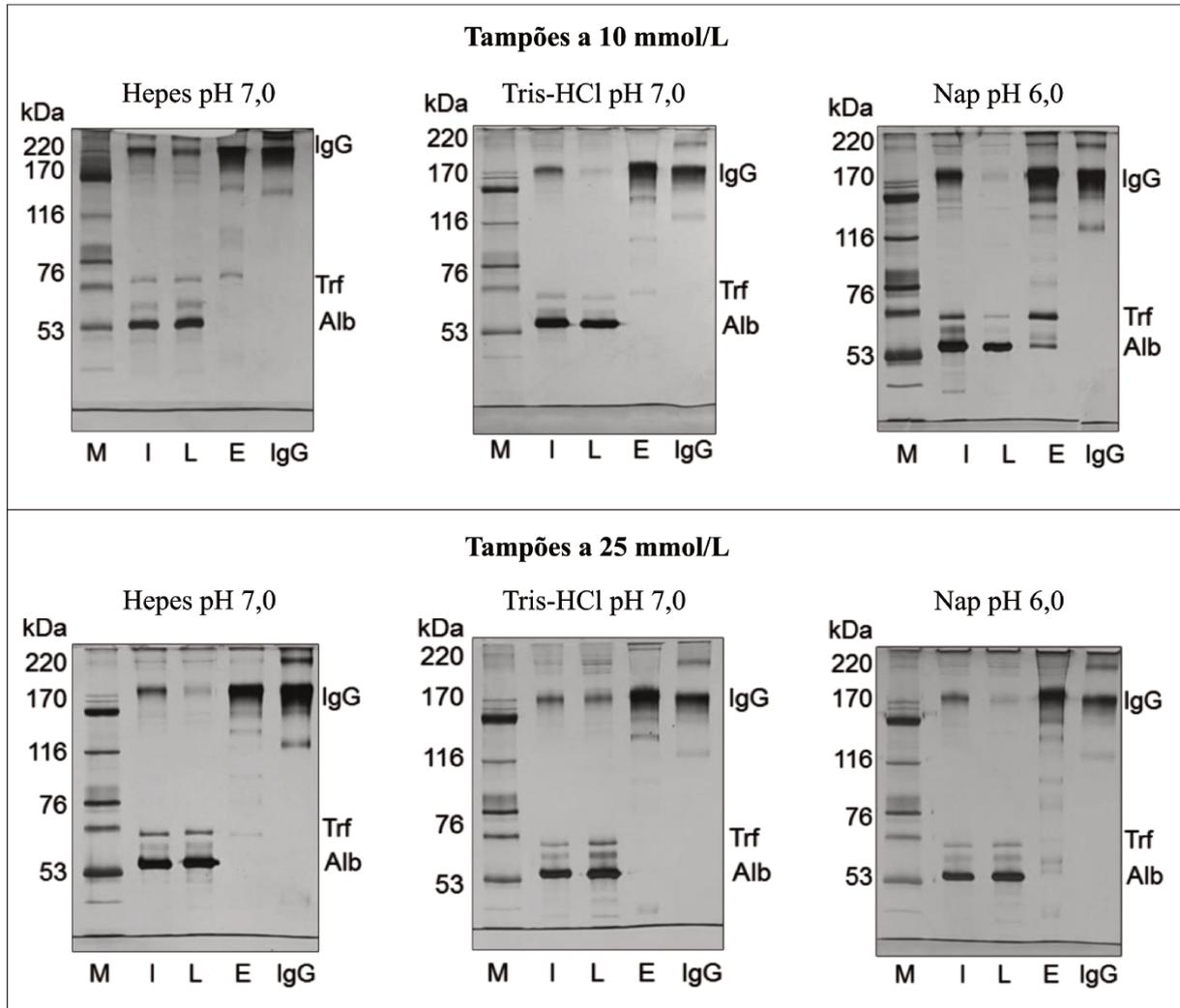
Figura 18 - Proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-OPT nas seguintes condições tamponantes: Hepes pH 7,0, Tris-HCl pH 7,0 e NaP pH 6,0, a (■) 25 mmol/L e (■) 10 mmol/L.



Fonte: Autora (2019)

Dentre os tampões avaliados, o NaP proporcionou maior percentual de proteínas totais adsorvidas, com 19,32% e 14,16% ao empregar concentrações de 10 e 25 mmol/L, respectivamente. No entanto, o perfil eletroforético revelou menor seletividade para este, observado pela presença de bandas de impurezas transferrina, albumina e outras proteínas na pista correspondente a etapa de eluição, principalmente ao empregar concentração de 10 mmol/L do tampão. Ao utilizar Tris-HCl e Hepes, o percentual de proteínas totais adsorvidas foi menor, variando entre 7,77% para Tris-HCl 25 mmol/L a 10,33% para Hepes a 10 mmol/L, ambos a pH 7,0. Por outro lado, o perfil eletroforético nessas condições mostrou ausência de banda correspondente a albumina e apenas traços de transferrina e outras proteínas na pista correspondente à eluição, revelando maior seletividade do adsorvente para IgG quando nessas condições.

Figura 19 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% em acrilamida) das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT realizadas com injeção de soro humano diluído nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana (Sigma).



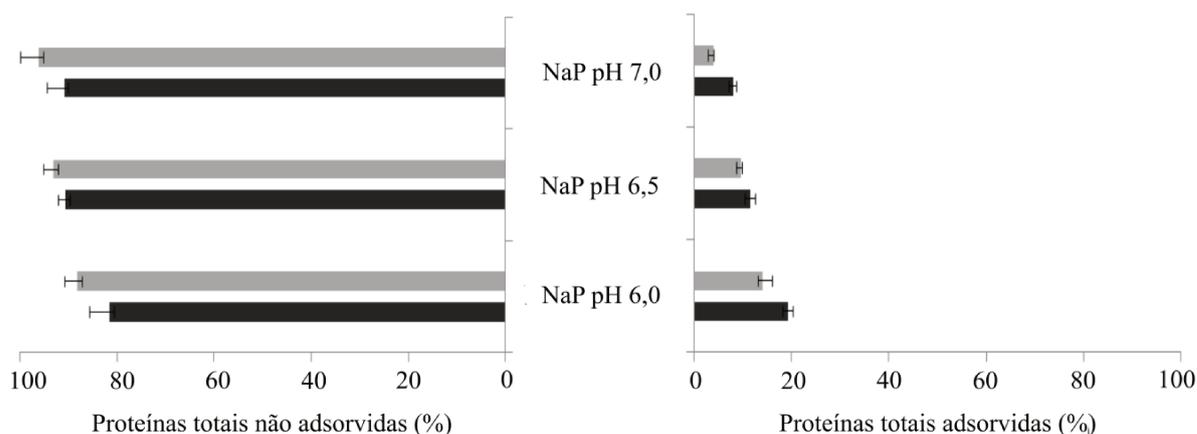
Fonte: Autora (2019)

Os resultados observados podem ser explicados devido às interações eletrostáticas predominantes no sistema. Em ambos os valores de pH utilizados (6,0 e 7,0), o ligante OPT encontra-se negativamente carregado (Pavan *et al.*, 2017). Da mesma forma ocorre com as principais impurezas transferrina e albumina, que possuem pI de 4,9 e  $5,2 < pI < 5,9$ , respectivamente (Putnam, 1984). Devido à IgG ser proveniente do soro humano, ela é policlonal e, por isso, possui moléculas com cargas positiva, negativa e neutra, compreendidas em uma ampla faixa de ponto isoelétrico, que varia entre 4,3 a 9,3, (Pavan *et al.*, 2017). Portanto, é possível que a maior pureza observada nos tampões Tris-HCl e HEPES deva-se

principalmente ao valor de pH (7,0). Este valor encontra-se mais de uma unidade acima do ponto isoelétrico das impurezas, sendo capaz de promover repulsão mais efetiva entre as cargas do adsorvente e a dos contaminantes, permitindo que somente as moléculas de IgG positivamente carregadas interajam com o adsorvente. Por resultar em maior pureza, esse fato justifica a menor quantidade de proteínas totais adsorvidas. Adicionalmente, para o tampão Tris-HCl 25 mmol/L, o menor percentual de proteínas adsorvidas também pode ser explicado devido à natureza do tampão que, por ter carga positiva, compete com a IgG pelos sítios de adsorção do OPT, dificultando a interação.

Para verificar se o pH é fator decisivo na seletividade do adsorvente, foram realizados experimentos cromatográficos no tampão que mostrou menor seletividade, para diferentes valores de pH. Sendo assim, NaP a 10 e 25 mmol/L foi empregado em pH 6,0; 6,5 e 7,0. Os resultados foram apresentados em termos de proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas, conforme Figura 20, seguido pelas eletroforeses (Figura 21). Os cromatogramas e demais eletroforeses, bem como os balanços de massa de todas as cromatografias e suas duplicatas encontram-se no Apêndice B.

Figura 20 - Proteínas totais adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-OPT em tampão NaP a (■) 25 mmol/L e (■) 10 mmol/L, para pH 6,0; 6,5 e 7,0.

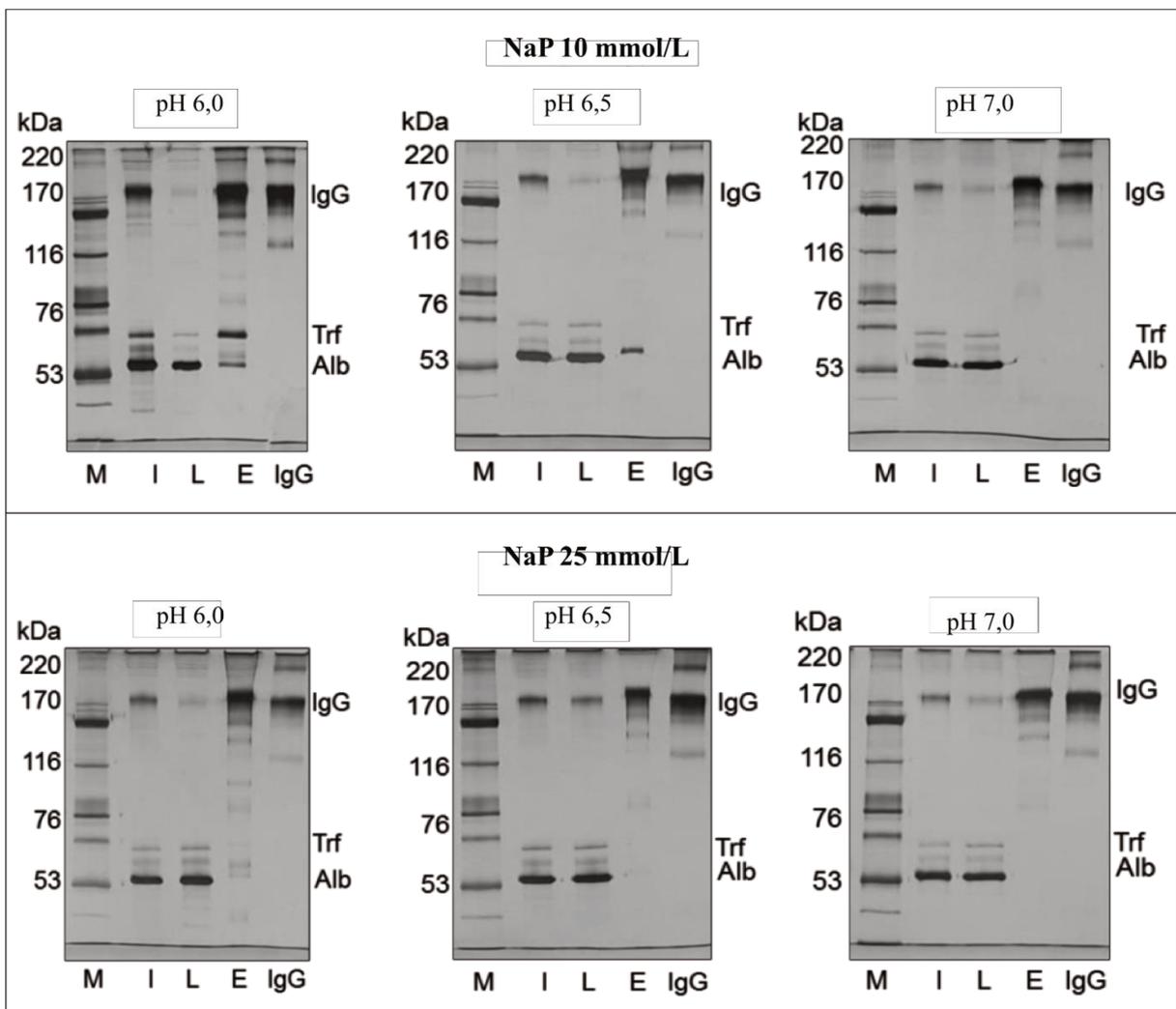


Fonte: Autora (2019)

A análise dos resultados obtidos para NaP em outros valores de pH permite concluir que há melhora na seletividade do adsorvente ao aumentar o pH de 6,0 para 7,0. O aumento do pH proporciona aumento de biomoléculas com carga negativa em solução. Conseqüentemente também diminui a quantidade de proteínas adsorvidas pelo ligante, sendo adsorvida apenas 8,14% e 3,97% de proteínas totais na condição em que foi verificado banda

de eluição eletroforéticamente mais homogênea (NaP a 10 e 25 mmol/L, respectivamente, ambos em pH 7,0) (Figura 21). Bresolin e Bueno (2012) também observaram diminuição na quantidade de IgG adsorvida em OPS - ligante de carga negativa, ao aumentar de 6,0 para 7,5 o pH do tampão NaP.

Figura 21 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% em acrilamida) das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT realizadas com injeção de soro humano diluído em NaP a 10 e 25 mmol/L em pH 6,0; 6,5 e 7,0. M: marcador de massa molecular; I: injeção; L: pool das frações de lavagem; E: pool das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana (Sigma)



Fonte: Autora (2019)

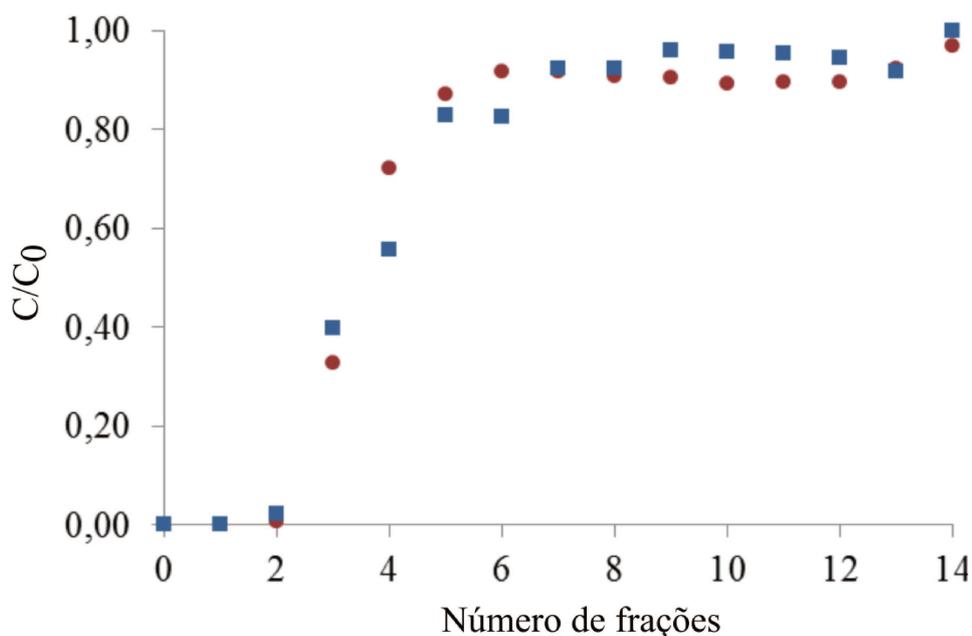
Em relação à melhora na seletividade com o aumento do pH, esta deve-se à repulsão mais efetiva entre a carga negativa do ligante e a das impurezas, devido ao afastamento do ponto isoelétrico dessas moléculas. Contudo, ressalta-se que apesar da

seletividade observada para NaP a pH 7,0, nessa condição foram obtidos os menores percentuais de proteínas totais adsorvidas e, conseqüentemente, baixa eficiência na adsorção de IgG, visualizada pela presença dessa biomolécula na banda correspondente à etapa de lavagem, indicando que parte da IgG não foi adsorvida, principalmente ao ser empregado tampão NaP com concentração de 25 mmol/L.

#### 4.2.2.1 Capacidade dinâmica de adsorção de PAAm-Alg-AGE-OPT

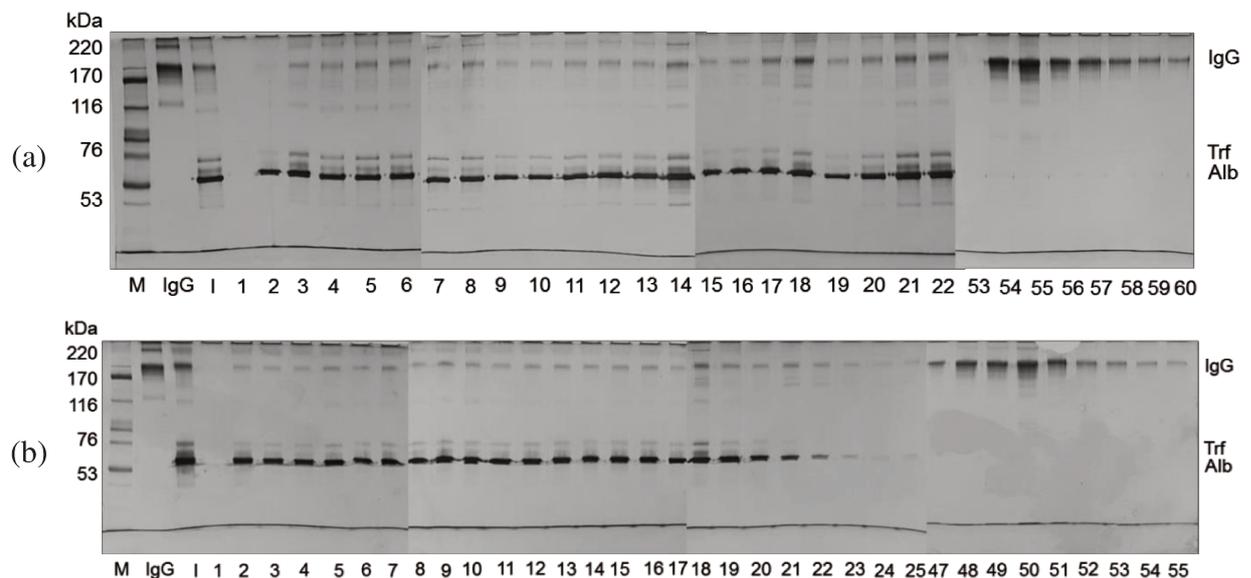
Para determinar a capacidade de adsorção dinâmica do criogel e verificar se ele é seletivo para IgG mesmo em condições de saturação, foram determinadas as curvas de ruptura para o criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT em Tris-HCl 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L, ambos a pH 7,0. A Figura 22 ilustra o comportamento de adsorção nesses tampões e, em seguida, na Figura 23 são apresentadas as eletroforeses para cada condição. Os cromatogramas, balanço de massa e as duplicatas desses experimentos encontram-se no Apêndice C.

Figura 22 - Curva de ruptura obtida para PAAm-Alg-AGE-OPT. Vazão: 1,0 mL/min. Adsorção em (●) Tris-HCl 10 mmol/L e (■) Hepes 25 mmol/L a pH 7,0. Injeção: 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão de adsorção (concentração entre 3,0 e 3,4 mg/mL em termos de proteínas totais, volume total de 28 mL de solução contendo soro humano). Massa total de proteína alimentada: 95,58 e 84,40 mg. Volume de leite: 3,0 mL. Volume das frações: 2,0 mL.



Fonte: Autora (2019)

Figura 23 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% de acrilamida) das frações cromatográficas referentes às curvas de ruptura realizadas em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, utilizando 2 mL de soro humano diluído em (a) Tris-HCl 10 mmol/L; e (b) HEPES 25 mmol/L, ambos a pH 7,0 (injeção: 28 mL de solução). M: marcador de massa molecular; IgG: marcador de IgG humana; I: injeção; 1-14: amostras da *flowthrough*; 15-22 (a) e 15-25 (b): amostras da lavagem; 53-60 (a) e 47-55 (b): amostras da eluição



Fonte: Autora (2019)

As eletroforeses referentes às frações obtidas nas curvas de ruptura foram semelhantes às dos experimentos em que foi alimentado apenas 75  $\mu$ L de soro humano, mostrando que a seletividade do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT para IgG independe da quantidade de proteínas alimentada (Figura 23). A predominância de IgG nas frações correspondentes às etapas de eluição mostraram a pureza desta proteína retida na coluna para ambas as condições. A capacidade dinâmica de adsorção de IgG em 3 mL de PAAm-Alg-AGE-OPT foi de  $4,76 \pm 0,46$  mg ( $24,91 \pm 2,41$  mg/g seca de criogel) em Tris-HCl 10 mmol/L e  $4,25 \pm 0,04$  mg ( $22,24 \pm 0,21$  mg/g seca de criogel) em HEPES 25 mmol/L, ambos a pH 7,0. Quantidade semelhante foi encontrada por Denizli, Rad e Piskin (1995). Para purificação dessa proteína contida no plasma humano, os autores empregaram micropartículas de poli(hidroxietil)metacrilato (PHEMA) com proteína A imobilizada, que adsorveu  $24,00 \pm 2,19$  mg de IgG/g. No entanto, é importante ressaltar que esses resultados são provenientes de experimentos em batelada e que as micropartículas empregadas foram ativadas com CNBr, possibilitando a imobilização de grande densidade do ligante ( $2,89 \pm 0,02$  mg/g de adsorvente).

Em ensaio dinâmico de adsorção de IgG a partir do soro humano, Bresolin e Bueno (2012) alcançaram adsorção inferior à deste trabalho, adsorvendo apenas 4,40 mg de IgG/mL de gel (11 mg de IgG/g de gel) no ligante OPS imobilizado em gel de agarose ativado com CNBr.

Por outro lado, Najafian *et al.* (2017), atingiram capacidade de adsorção dinâmica superior à do presente estudo. Os autores obtiveram 9,0 mg de IgG/mL de criogel ao imobilizar o peptídeo sintético His-Trp-Arg-Gly-Trp-Val em criogel de metacrilato ativado com glicidil metacrilato. Nesse caso, porém, os autores alimentaram o leito cromatográfico com solução de IgG pré purificada enquanto que neste trabalho foi empregado soro, o qual é constituído por diversas outras proteínas.

Em relação aos estudos de outros autores, a capacidade de adsorção dinâmica do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT pode ser considerada intermediária. Diversos são os fatores que influenciam na capacidade de adsorção do leito fixo, como o impedimento estérico, a densidade de ligantes presentes no suporte sólido, a presença de várias proteínas na alimentação da coluna, entre outros. No caso do presente experimento, a capacidade intermediária de adsorção pode estar relacionada ao impedimento estérico devido à imobilização do OPT com a ausência de braço espaçador e também pode ser devido à menor densidade de ligantes imobilizados, decorrentes dos macroporos que impactam na diminuição da área útil à imobilização do ligante.

Contudo, apesar da capacidade intermediária de adsorção do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, o material mostrou-se seletivo à IgG humana, obtendo-a eletroforeticamente homogênea nas frações correspondentes à etapa de eluição; ou seja, mesmo após atingir a saturação (a partir da fração 6, Figura 22), as eletroforeses revelam o potencial que o adsorvente possui em manter-se seletivo à IgG presente no soro humano.

#### 4.2.3 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS FAB

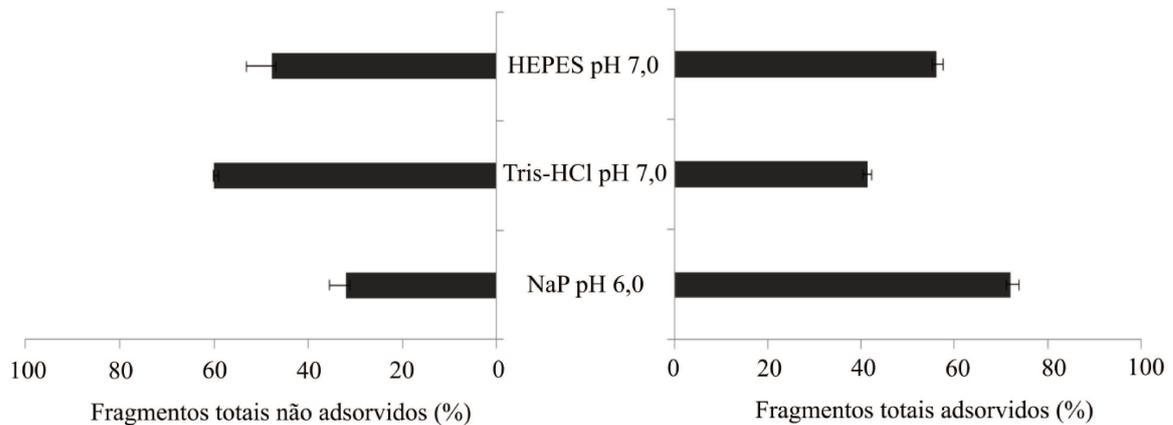
Baseado nos estudos apresentados anteriormente, as interações eletrostáticas contribuem para a adsorção de IgG humana em PAAm-Alg-AGE-OPT. Então, devido ao ponto isoelétrico distinto entre os fragmentos Fab (6,0 – 9,3) e Fc (6,3 – 6,9), foram realizados ensaios cromatográficos com a finalidade de verificar se é possível a separação desses fragmentos proteolíticos. Para tanto, os experimentos foram conduzidos na condição que mais adsorveu IgG pré-purificada: NaP 10 mmol/L a pH 6,0 e para as duas condições que

foi observada maior pureza nos experimentos de purificação de IgG a partir do soro humano: Hepes 25 mmol/L a pH 7,0 e Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,0.

Os resultados obtidos indicaram adsorção maior adsorção, de 72%, em NaP 10 mmol/L a pH 6,0, conforme gráfico apresentado na Figura 24. No entanto, o alto percentual de adsorção obtido nessa condição deve-se à presença de fragmentos Fc na banda de eluição (Figura 25), indicando que não houve separação efetiva dos fragmentos quando em NaP.

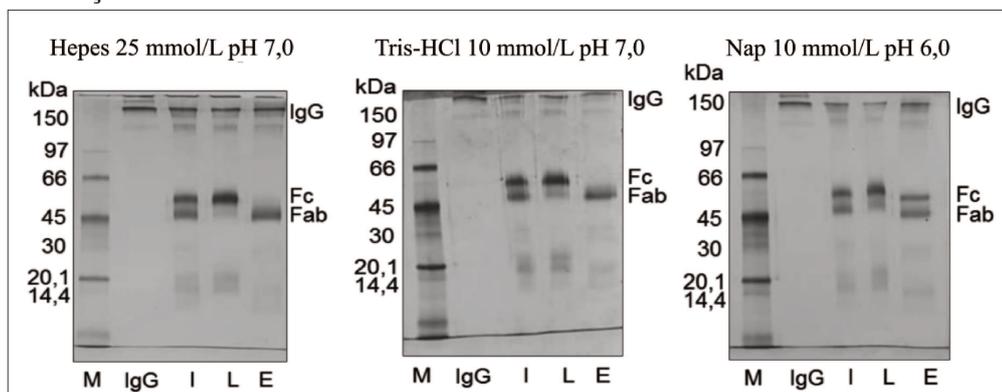
Para os tampões Hepes e Tris-HCl, os perfis eletroforéticos indicaram a separação entre os fragmentos, com adsorção apenas da porção Fab e de IgG não clivada (Figura 25).

Figura 24 - Fragmentos totais e IgG intacta adsorvidos e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-OPT. Condições: Hepes 25 mmol/L a pH 7,0; Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0 e NaP 10 mmol/L a pH 6,0.



Fonte: Autora (2019)

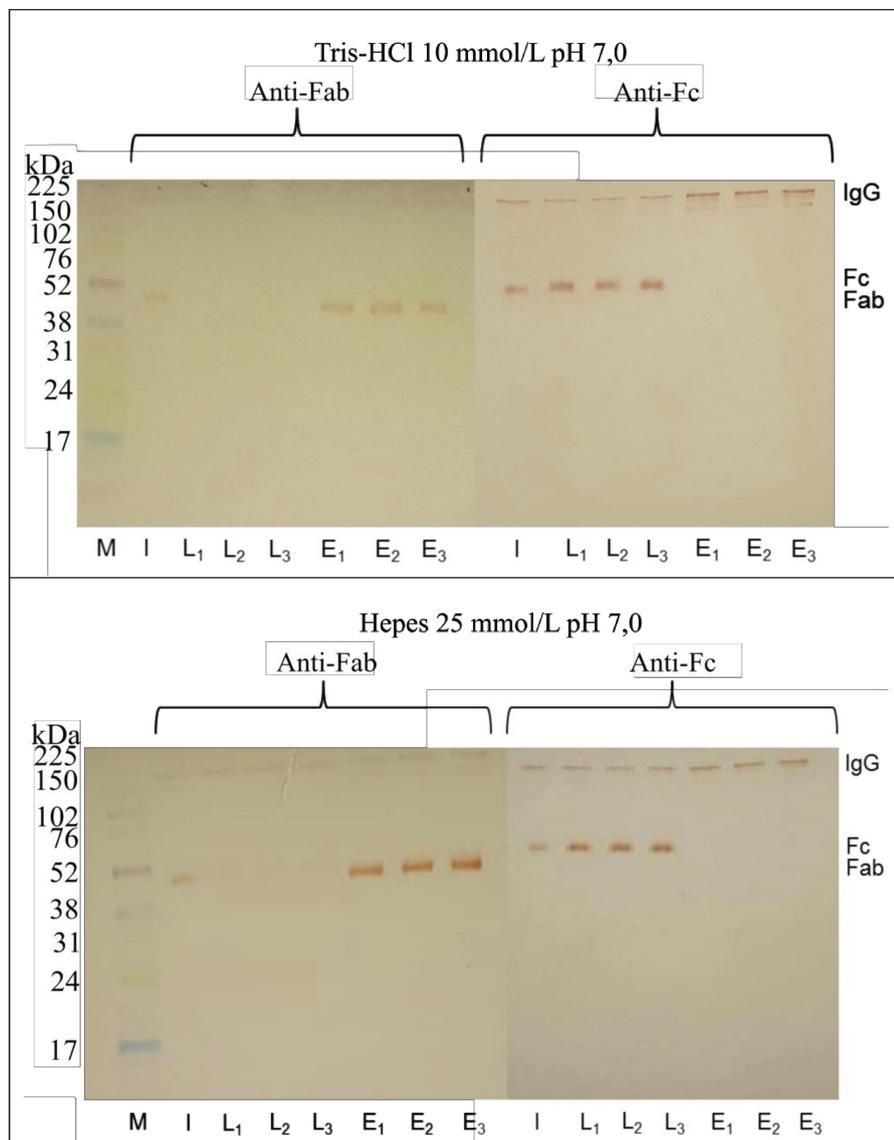
Figura 25 - Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (10,0% de acrilamida) das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, realizadas com solução de IgG humana clivada nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de baixa massa molecular; IgG: marcador de IgG humana (Sigma); I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações de eluição.



Fonte: Autora (2019)

Para confirmar a separação entre os fragmentos, detectando de forma específica a presença destes em cada etapa cromatográfica, foi utilizada a técnica de *Western blot*. O resultado confirmou que o criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT adsorveu somente a porção Fab dos fragmentos e a IgG não clivada. Os fragmentos Fc, por não terem sido adsorvidos, foram removidos na etapa de lavagem, conforme mostrado na Figura 26.

Figura 26 - *Western blot* das cromatografias em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT, realizadas com solução de IgG humana clivada nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de massa molecular pré-corado (12 a 225 kDa); I: injeção; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> e L<sub>3</sub>: *pools* das frações de lavagem; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>: *pools* das frações de eluição.



Fonte: Autora (2019)

As análises de eletroforese e *Western blot* indicaram que, além dos fragmentos Fab, o criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT também adsorveu moléculas de IgG intacta, em

ambas as condições empregadas. Pavan *et al.* (2019) reportou comportamento semelhante, ao empregar esse mesmo ligante imobilizado em gel de agarose. Após comparar o ligante pseudobioespecífico OPT à proteína L (ligante bioespecífico tradicionalmente empregado para a adsorção de fragmentos Fab), os autores concluíram que assim como a proteína L, o ligante OPT possui potencial para a separação dos fragmentos. No entanto, enquanto a proteína L apresenta afinidade pela cadeia leve *kappa* de moléculas de IgG de forma bioespecífica, a separação entre os fragmentos pelo ligante OPT pode ser explicado pela diferença entre os pontos isoelétricos desses fragmentos. De acordo com Mourão *et al.* (2016), fragmentos Fab possuem ponto isoelétrico entre 6,0 e 9,3 enquanto que o ponto isoelétrico dos fragmentos Fc estão entre 6,3 a 6,9. Dessa forma, em pH 7,0 os fragmentos Fc encontram-se negativamente carregados, sofrendo repulsão pelo ligante que também possui carga negativa. Por outro lado, nesse mesmo pH, existem fragmentos Fab com carga positiva, os quais são adsorvidos. Ao utilizar NaP a pH 6,0 ambos os fragmentos podem estar positivamente carregados, resultando na adsorção de ambos, o que inviabiliza a separação.

Para a quantificação dos fragmentos obtidos em cada etapa, foi realizado a imunodifusão radial, em termos de fragmentos Fab (Tabela 2).

Tabela 2 - Balanço de massa em termos de proteínas totais e para fragmentos Fab e IgG não clivada.

Frações	Hepes 25 mmol/pH 7,0					Tris-HCl 10 mmol/L pH 7,0				
	PT <sup>a</sup> (mg)	Fab <sup>b</sup> (mg)	Rend <sup>c</sup> (%)	Pureza <sup>d</sup> (%)	FP <sup>e</sup>	PT <sup>a</sup> (mg)	Fab <sup>b</sup> (mg)	Rend <sup>c</sup> (%)	Pureza <sup>d</sup> (%)	FP <sup>e</sup>
Injeção	3,85	2,78	100,00	72,34	1,00	3,44	1,99	100,00	57,71	1,00
Lavagem	1,69	0,33	12,04	19,81	0,27	2,06	0,71	35,72	34,40	0,60
Eluição	2,12	2,30	82,61	108,16	1,50	1,45	1,46	73,61	100,98	1,75
Rec. (%)	99,21	-	94,65	-	-	101,98	-	109,25	-	-

<sup>a</sup>PT: proteínas totais, determinada pela metodologia de Bradford (1976); <sup>b</sup>Fab: fragmentos Fab e IgG não clivada, determinada por imunodifusão radial; <sup>c</sup>Rend: rendimento, razão entre a massa de Fab e IgG não clivada de cada etapa e a massa de Fab e IgG não clivada alimentada multiplicado por 100; <sup>d</sup>Pureza: razão entre a massa de Fab e IgG não clivada e a massa de proteína total presente em cada etapa multiplicado por 100; <sup>e</sup>FP: fator de purificação, razão entre a pureza dos fragmentos Fab e IgG não clivada e a pureza dos fragmentos Fab e IgG não clivada alimentada.

Conforme apresentado na Tabela 2, 82,61% e 73,61% de fragmentos Fab e de IgG não clivada foram separados dos fragmentos Fc e recuperados na etapa de eluição, com pureza de 108,16% e 100,98% e fator de purificação de 1,50 e 1,75, para os tampões Hepes e Tris-HCl, respectivamente. Os valores de pureza maiores que 100% justificam-se devido às variações de sensibilidade da metodologia de Bradford para diferentes proteínas (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998). Sendo assim, a metodologia de Bradford, empregada para mensurar a quantidade de proteínas totais, pode subestimar a concentração de Fab e IgG, enquanto que a imunodifusão radial é mais específica, por se tratar de ensaio baseado em interação antígeno-anticorpo.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi obtido um criogel monolítico polimérico, com grupamentos reativos e características mecânicas adequadas para uso como suporte sólido (fase estacionária) em técnicas cromatográficas. Baseado nos resultados obtidos pela variação de AGE, APS e TEMED, foi possível inferir que o alginato, a acrilamida, o AGE e o cloreto de cálcio podem ser utilizados para síntese de criogéis de PAAm-Alg-AGE e estes géis, quando derivatizados com OPT, apresentam potencial para purificação de IgG humana e separação de seus fragmentos proteolíticos Fab e Fc. Os criogéis com e sem o ligante imobilizado mostraram-se porosos, com poros entre 30 e 96  $\mu\text{m}$  interconectados e capacidade de intumescimento intermediária, possibilitando seu uso como fase estacionária em técnicas cromatográficas de baixa pressão.

Tendo isso em vista, foram realizados estudos de adsorção de IgG no criogel de PAAm-Alg-OPT, o qual chegou à adsorver 95% de IgG de alta pureza quando em tampão NaP 10 mmol/L a pH 6,0. Ao observar diferentes percentuais de adsorção em diferentes condições tamponantes, foi verificado que tanto a condutividade quanto a natureza do sistema tamponante e, sobretudo, o pH apresentaram efeito na adsorção de IgG humana de alta pureza, provavelmente devido à predominância de interações eletrostáticas no sistema cromatográfico.

Realizou-se também experimentos para avaliar a seletividade do adsorvente para IgG em soro humano. Como resultado, a condição que mais adsorveu IgG de alta pureza (NaP 10 mmol/L a pH 6,0) apresentou menor seletividade para esta molécula; sendo Tris-HCl e Hepes em pH 7,0 as condições que proporcionaram a maior seletividade observada ao adsorvente. A curva de ruptura do criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT mostrou que, mesmo em condições de saturação do leito fixo, o adsorvente mantém-se seletivo à IgG humana, cuja capacidade de adsorção dinâmica foi de  $24,91 \pm 2,41$  mg/g seca de criogel quando em Tris-HCl 10 mmol/L e  $22,24 \pm 0,21$  mg/g seca de criogel quando em Hepes 25 mmol/L, ambos a pH 7,0.

O adsorvente também se mostrou eficiente na separação dos fragmentos proteolíticos Fab e Fc provenientes da clivagem de IgG humana por papaína, conforme verificado por *Western blot*. Nos experimentos cromatográficos com fragmentos, foram purificados 82,61 e 73,61% dos fragmentos Fab alimentados, ao empregar os tampões Hepes 25 mmol/L a pH 7,0 e Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0, respectivamente.

Dessa forma, o conjunto dos resultados apresentados evidenciam o potencial em utilizar o ligante OPT imobilizado ao criogel monolítico de PAAm-Alg-AGE como leito fixo para purificação IgG humana e seu fragmento Fab, por técnicas de cromatografia líquida de adsorção.

## CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERSTS, J.; JOHNSON X.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. *Biologia molecular da célula*. **Taylor & Francis group LLC**, ed. 6, cap 24, p. 1297-1339, 2017

ARICA, M. Y.; BAYRAMOGLU, G. Biosorption of Reactive Red-120 dye from aqueous solutions by native and modified fungus biomass preparations of *Lentinus sajor-caju*. **Journal of Hazardous Materials**, n. 149, p. 499-507, 2007

ARICA, M. Y.; YALÇIN, E.; BAYRAMOGLU, G. Preparation and characterisation of surfaces properties of poly(hydroxyethylmethacrylate-co-methacryloylamido-histidine) membranes: application for purification of human immunoglobulin G. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 315-325, 2004

ARJMANDI, M.; RAMEZANI, M. Mechanical and tribological assessment of sílica nanoparticle-alginate-polyacrylamide nanocomposite hydrogels as a cartilage replacement. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 95, p. 196-204, 2019

ARORA, S.; SAXENA, V.; AYYAR, B. V. Affinity chromatography: a versatile technique for antibody purification. **Methods**, 2017

ARRUA, R. D.; IGARZABAL, C. I. A. Macroporous monolithic supports for affinity chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 16-17, p. 1974-1987, 2011

ARVIDSSON, P.; PLIEVA, F. M.; LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. **Journal of chromatography A**, v. 986, p. 275-290, 2003

AXÉN, R.; PORATH, J.; ERNBACK, S. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. **Nature**, v. 24, p. 1302-1304, 1967

BAKSHPOUR, M.; IDIL, N.; PERÇIN, I.; DENIZLI, A. Biomedical Applications of Polymeric Cryogels. **Applied Sciences**, v. 9, n. 553, p. 1-22, 2019

BARROSO, T.; HUSSAIN, A.; ROQUE, A. C. A.; AGUIAR-RICARDO, A. Functional monolithic platforms: chromatographic tools for antibody purification. **Biotechnology Journal**, v. 8, p. 671-681, 2013

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Biosorption of benzidine based textile dyes “Direct Blue 1 and Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, n. 143, p. 135–143, 2007

BAYRAMOGLU, G.; SENEL, A. U.; ARICA, M. Y. Adsorption of IgG on Spacer-Arm and L-Arginine Ligand Attached Poly(GMA/MMA/EGDMA) Beads. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, p. 672- 679, 2007

BERTOLINI, J. The purification of plasma proteins for therapeutic use. **Rossi's principles of transfusion medicine**, cap. 27, p. 302 – 320, 2016

BRADY, S. T.; LAU, L.-F., TYROSINE PHOSPHORYLATION. **Basic Neurochemistry**, ed. 8, p. 493-511, 2012

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976

BRANDT, S.; GOFFE, R. A.; KESSLER, S. B.; O'CONNOR, J. L.; ZALE, S. E. Membranebased affinity technology for commercial scale purifications. **Bio-Technology**, v.6, p.779-782, 1988

BRESOLIN, I. T. L.; BUENO, S. M. A. Evaluation of amino acid o-phosphoserine as ligand for the capture of immunoglobulin G from human serum. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, p. 632-644, 2012

BUENO, S. M. A., MIRANDA, E. A. Membranas Adsorptivas em Purificação de Produtos Biotecnológicos. **Ed Pessoa Jr. A, Kilikian BV, Editora Manole**, 2005

CABRERA, K. E, WILCHECK, M. Polymeric supports for affinity chromatography and high-performance affinity chromatography. **Makromol. Chem., Macromol. Symp**, V. 19, p. 145-154, 1988

CARMIGNOTTO, G. P.; MOURÃO, C. A.; BUENO, S. M. A. Separation of human Fab fragments by negative chromatography on  $\omega$ -aminohexyl- and poly(ethyleneimine)-agarose. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 267-275, 2017

CARVALHO, B. M. A.; DA SILVA, S. L.; DA SILVA, L. H. M.; MINIM, V. P. R.; DA SILVA, M. C. H.; CARVALHO, L. M.; MINIM, L. A. Cryogel Poly(acrylamide): Synthesis, Structure and Applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 43, n. 3, p. 241-262, 2014

CELEBI, B. A Simple synthetic route for the preparation of a reversed-phase stationary phase based on monosized-porous hydrogel beads and its chromatographic use for separation of small molecules. **Acta Chromatographica**, v. 29, n. 2, p. 143-159, 2017

CHAMES, P.; REGENMORTEL, M. V.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies:successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 220-233, 2009

CHOE, W.; DUGANAVAR, T. A.; CHUNG, S. J. Fc-binding ligand of immunoglobulin G and overview of high affinity proteins and peptides. **Materials**, v. 9, n. 12, 2016

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 plasma proteins: a system for the separation into fraction of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 8, p. 459-475, 1946

CONROY, P. J.; LAW, R. H. P.; CARADOC-DAVIES, T. T.; WHISSTOCK, J. C. Antibodies from novel repertoires to defining and refining the structure of biologically important targets. **Methods**, v. 116, p. 12-22, 2017

ÇORMAN, M. E. Poly-l-lysine modified cryogels for efficient bilirubin removal from human plasma. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 291-298, 2018

CUTRECASAS, P. WILCHEK, M., ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 61, n. 2, p. 663-643, 1968

DA SILVA, L. C. A.; SERRACCHIANI, M. M.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Separation of Human Fab Fragments on Negative Mode Ni(II)-TREN-Agarose Chromatography. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 715-723, 2014

DELAHAUT, P. Immunisation – choice of host adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. **Methods**, v. 116, p. 4-11, 2017

DEMIRYAS, N.; TÜZMEN, N.; GALAEV, I. Y.; PIŞKIN, E.; DENIZLI, A. Poly(acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 4, p. 1808–1816, 2007

DENIZLI, A.; RAD, A. Y.; PISKIN, E. Protein A immobilized polyhydroxyethylmethacrylate beads for affinity sorption of human immunoglobulin G. **Journal of Chromatography B**, v. 668, n. 1, p. 13-19, 1995

ELKAK, A.; ISMAIL, S.; UZUN, L.; DENIZLI, A. Adsorption study of immunoglobulin G subclasses from different species by pseudobioaffinity separation on histidyl-bisoxirane-sepharose. **Chromatographia**, v. 69, n. 11/12, p. 1161-1167, 2009

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. Cryogels versatile tools in bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 24-35, 2014

FMI – Future Market Insights <<http://www.futuremarketinsights.com/reports/antibodies-market>> Acesso em 16/08/2017

GAGNON, P. Technology trends in antibody purification. **Journal of chromatography A**, v. 1221, p. 57-70, 2012

GUIMARÃES, D. Tratamento de efluentes ricos em sulfato por adsorção em resinas de troca iônica. (Mestrado). **Engenharia de Materiais**, UFOP, p. 173, 2010.

GURIKOV, P.; SMIRNOVA, I. Non-Conventional Methods for Gelation of Alginate. **Gels**, v. 4, n.14, p. 1-14, 2018

HAGE, D. S. Analysis of biological interactions by affinity chromatography: clinical and pharmaceutical applications. **Clinical Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1083-1093, 2017

HAMILTON, R. G. The human IgG subclasses. **Baltimore**, 2001

HEADS, J. T.; ADAMS, R.; D'HOOGE, L. E.; PAGE, M. J. T.; HUMPHREYS, D. P.; POPPLEWELL, A. G.; LAWSON, A. D.; HENRY, A. J. Relative stabilities of IgG1 and IgG4 Fab domains disulfide bond architecture. **Protein Science**, v. 21, p. 1315-1322, 2012

HIXON, K. R.; LU, T.; SELL, S. A. A Comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 62, n. 15, p. 29-41, 2017

HWANG, T-S; PARK, J-W. Preparation of modified hollow polypropylene membrane and their adsorption properties of  $\gamma$  -globulins. **Macromolecular research**, v. 11, n. 5, p. 347-351, 2003

INGAVLE, G. C.; BAILLIE, L. W. J.; ZHENG, Y., LIS, E. K.; SAVINA, I. N.; HOWELL, C. A.; MALOVSKY, S. V.; SANDEMAN, SUSAN, R. Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protectantigen. **Biomaterials**, v. 50, p. 140-153, 2015

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Immunobiology: The immune system in health and disease. **Garland Publishing**, ed 5, 2001

JAY, J. W.; BRAY, B.; QI, Y.; IGBINIGIE, E.; WU, H.; LI, J.; REN, G. IgG Antibody 3D structures and dynamics. **Antibodies**, v. 7, n. 18, 2018

KISTLER, P.; NITSCHMANN, H. Large scale production of human plasma fractions. **Vox Sanguinis**, v. 7, n. 4, p. 414-424, 1962

KUMAR, A.; PLIEVA, F. M.; GALEAV, I. Y.; MATTIASSON, B. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. **Journal of Immunological Methods**, v. 283, p. 185-194, 2003

KUMAR, A.; SRIVASTAVA, A. Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. **Nature America, Inc.**, v.5, n. 11, p. 1737-1747, 2010

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970

LE, N. P. L.; BOWDEN, T. A.; STRUWE, W. B.; CRISPIN, M. Immune recruitment or suppression by glyengineering of endogenous and therapeutic antibodies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1860, p. 1655-1668, 2016

LI, G.; ZHANG, G.; SUN, R.; WONG, C. P. Mechanical strengthened alginate/polyacrylamide hydrogel crosslinked by barium and ferric dual ions. **Journal of Materials Science**, v. 52, p. 8538-8545, 2017

LI, Z.; RODRIGUEZ, E.; AZARIA, S.; PEKAREK, A.; HAGE, D. S. Affinity Monolith chromatography: A review of general principles and applications. **Electrophoresis**, v. 38, p. 2837-2850, 2017

LOWE, C. R.; LOWE, A. R.; GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 49, p. 561-574, 2001

LOW, Z. W.; CHEE, P. L.; KAI, D.; LOH, X. J. The role of hydrogen bonding in alginate/poly(acrylamide-co-dimethylacrylamide) and alginate/poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate-based tough hybrid hydrogels. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 57678-57685, 2015

LOZINSKY, V. I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 71, n. 6, p. 559-585, 2002

LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 10, 2003

LOZINSKY, V. I.; VAINERMAN, E. S.; IVANOVA, S. A.; TITOVA, E. F.; SHTIL'MAN, M. I.; BELAVTSEVA, E. M.; ROGOZHIN, S. V. Study of cryostructurization of polymer systems: The influence of the process temperature on the dynamics of formation and structure of cross-linked polyacrylamide cryogels. **Acta polymerica**, v. 37, n. 3, p. 142–146, 1986

LU, X. S.; MILLER, C. J. Concentration of IgG in the sera of normal rhesus macaques as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 197, n.1-2, p.193-196, 1996

MANKARIOUS, S.; LEE, M.; FISCHER, S.; PYUN, K. H.; OCHS, H. D.; OXELIUS, V. A.; WEDGWOOD, R. J. The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 112, n. 5, p. 634-640, 1988

McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. Unit operations of chemical engineering. **McGraw-Hill**, ed. 5, 1993

MED GADGET <<https://www.medgadget.com/2017/08/global-monoclonal-antibodies-market-size-worth-usd-112175-5-million-by-2021-5.html>> Acessado em 16/08/2017

MÓL, P. C. G.; VERÍSSIMO, L. A. A.; ELLER, M. R.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Development of an affinity cryogel for one step purification of lysozyme from chicken egg White. **Journal of chromatography B**, v. 1044, p. 17-23, 2017

MORRISSEY, J. H. Morrissey silver stain. **Cell**, v. 310, p. 307–310, 1981

MOURÃO, C. A.; CARMIGNOTTO, G. P.; BUENO, S. M. A. Separation of human IgG fragments using copper, nickel, zinc, and cobalt chelated to CM-Asp-agarose by positive and negative chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 1017, p.163-173, 2016

MOURÃO, C. A.; HAUPT, K.; BUENO, S. M. A. Synthesis and characterization of cryogel of alginate and acrylamide for biomolecules adsorption. **Encontro Brasileiro sobre Adsorção**, ed. 12, Gramado, RS - Brasil. 2018

MRB – Marketing Research Bureau, 2018 <<https://marketingresearchbureau.com/plasma-industry/plasma-economics-concept-of-plasma-market-driver/>> Acesso em 04/06/2018

MURPHY, C.; DEVINE, T.; O'KENNEDY, R. Technology advancement in antibody purification. **Antibody Technology Journal**, v. 6, p. 17-32, 2016

NAJAFIAN, F. T.; BIBI, N. S.; ISLAM, T.; FERNANDEZ-LAHOORE, M. A megaporous material harbouring a peptide ligand for affinity IgG purification. **Electrophoresis**, v. 38, p. 2914-2921, 2017

NAIK, A. D.; RAINA, M.; LALI, A. M. Absep – An amino acid based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G. **Journal of chromatography A**, v. 1218, n. 13, p. 1756-1766, 2011

NASCIMENTO, A.; PINTO, I. F.; CHU, V.; AIRES-BARROS, M. R.; CONDE, J. P.; AZEVEDO, A. M. Studies on the purification of antibody fragments. **Separation and purification technology**, v. 195, p. 388-397, 2018

NELSON, A. L.; REICHERT, J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. **Nature biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 331-337, 2009

OMIDIAN, H.; ROCCA, J. G.; PARK, K. Elastic, superporous hydrogel hibrids of polyacrylamide and sodium alginate. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, p. 703-710, 2006

ÖZGÜR, E.; BERELI, N.; TÜRKMEN, D.; ÜNAL, S.; DENIZLI, A. PHEMA cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, p. 915-920, 2011

PAVAN, G. L.; BRESOLIN, I. T. L.; MUZIO, A. F. V.; CUNHA, D. C. C.; BUENO, S. M. A. Phospho-L-tyrosine-agarose chromatography: Adsorption of human IgG and its proteolytic fragments. **Biomedical Chromatography**, v. 33, ed. 1, 2019

PAVAN, G. L.; BRESOLIN, I. T. L.; GRESPAN, A.; BUENO, S. M. A. Phosphorylated-tyrosine based pseudobioaffinity adsorbent for the purification of immunoglobulin G. **Journal of chromatography B**, v. 1052, p. 10-18, 2017

PERRET, G.; BOSCHETTI, E. Aptamer affinity ligands in protein chromatography. **Biochimie**, v. 145, p. 98-112, 2018

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

PHILLIPS, T. M. Affinity Chromatography in Antibody and Antigen Purification, in Handbook of Affinity Chromatography. **CRC**, 2 ed., chap. 14, p. 368-397, 2005

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10–11, p. 828–836, 2004a

PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications. **Journal of separation science**, v. 30, n. 11, p. 1657-1671, 2007

PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based

matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of chromatography B**, v. 807, p. 129-137, 2004b

PORATH, J.; AXÉN, R.ERNBACK, S. Possible Cytotoxic Role of Nitrenes. **Nature**, v. 215, p. 1491 e 1492, 1967

PUTNAM, F. W. The plasma proteins: Structure, function, and genetic control. **New York: Academic**, ed. 2, 1984

ROCHA, S. F. L. S.; SALLES, C. M. C.; SANT'ANNA, C. M. R. Proteína Tirosina Fosfatase SHP-2 e sua relação com o câncer. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 3, p. 1342 – 1363, 2017

ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. Â. Antibodies and Genetically Engineered Relate Molecules: Production and Purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 639-654, 2004

ROQUE, A. C. A.; SILVA, C. S. O.; TAIPA, M. Â. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification. Advances and perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, p. 44-55, 2007

SAMANTA, H. S.; RAY, S. K. Synthesis, characterization, swelling and drug release behavior of semi-interpenetrating network hydrogels of sodium alginate and polyacrylamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 666-678, 2014

SAVANE, T. S.; KUMAR, S.; JANAKIRAMAN, V. N.; KAMALANATHAN, A. S.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Molecular insight in the purification of immunoglobulin by pseudobioespecific ligand L-histidine and histidyl moieties in histidine ligand affinity chromatography (HLAC) by molecular docking. **Journal of chromatography B**, v. 1021, p. 129-136, 2016

SCHROEDER, H. W. JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 123, n. 2, p. S41-S52, 2010

SHENTU J., WU, J.; SONG, W.; JIA, Z. Chitosan microspheres as immobilized dye affinity support for catalase adsorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 42-46, 2005

STRAATHOF, A. J .J. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. **Comprehensive Biotechnology**, p.811-814, 2011

SUN, J. Y.; ZHAO, X.; ILLEPERUMA, W. R. K.; CHAUDHURI, O.; OH, K. H.; MOONEY, D. J.; VLASSAK, J. J.; SUO, Z. Highly stretchable and tough hydrogels. **Nature**, v. 489, p. 133-136, 2012

SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J. Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media. **Analytical Chemistry**, vol.64, p.820-822, 1992

TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. Techniques Immunoenzymatiques, **França: INSERM**, p. 14-29, 1987

THÖMMES, J.; KULA, M. R. Membrane Chromatography - an integrative concept in the downstream processing of proteins. **Biotechnology Progress**, v.11, p.357-36, 1995

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS**, v. 76, p. 4350-4354, 1979

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Tibtech**, v. 7, p. 71-76, 1989

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

YAO, K.; SHEN, S.; YUN, J.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Preparation of polyacrylamide-Based supermacroporous monolithic cryogel beds under freezing-temperature variation conditions. **Chemical engineering science**, v. 61, p. 6701-6708, 2006a

YAO, K.; YUN, J.; SHEN, S.; WANG, L.; HE, X.; YU, X. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. **Journal of chromatography A**, v. 1109, p. 103-110, 2006b

ZACHARIOU, M.; HEARN, M. T. W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilized hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. **Journal chromatography A**, v. 890, p. 95-116, 2000

ZACHARIOU, M.; TRAVERSO, I.; HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins CXXXI. O-Phosphoserine as a new chelating ligand for use with hard Lewis metal ions in the immobilized-metal affinity chromatography of proteins. **Journal of chromatography A**, v. 646, n. 1, p. 107-120, 1993

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998

ZHAO, Y.; SHEN, W.; CHEN, Z.; WU, T. Freeze-thaw induced gelation of alginates. **Carbohydrates Polymers**, v. 148, p. 45-51, 2016

ZUERCHER, A. W.; SPIRING, R.; MORELLI, A. B.; KÄSERMANN, F. IVIG in autoimmune disease – potential next generation biologics. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, p. 781 – 785, 2016

## APÊNDICE A. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM IgG DE ALTA PUREZA

### A.1 – BALANÇO DE MASSA PARA CROMATOGRAFIAS COM IGG DE ALTA PUREZA EM PAAM-ALG-AGE-OPT

Tabela A.1 – IgG de alta pureza em Tris-HCl 10 mmol/L a diferentes valores de pH. Leito: 3 mL de criogel de PAAM-Alg-AGE-OPT. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: proteínas totais; I: injeção; L: lavagem; E: eluição; Rec.: recuperação.

Tris-HCl 10 mmol/L								
Frações	pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0		pH 8,5	
	PT(mg)	%	PT(mg)	%	PT(mg)	%	PT(mg)	%
I	1,98 ± 0,00	100,00	1,93 ± 0,01	100,00	1,94 ± 0,00	100,00	1,95 ± 0,00	100,00
L	0,44 ± 0,02	21,97	0,87 ± 0,01	45,12	1,08 ± 0,02	55,92	1,33 ± 0,07	67,92
E	1,50 ± 0,02	75,76	1,21 ± 0,01	62,79	0,96 ± 0,06	49,41	0,81 ± 0,06	41,38
Rec.	1,94 ± 0,04	97,74	2,08 ± 0,00	107,91	2,04 ± 0,03	105,33	2,14 ± 0,01	109,30

Tabela A.2 - IgG de alta pureza em Tris-HCl 25 mmol/L a diferentes valores de pH. Leito: 3 mL de criogel de PAAM-Alg-AGE-OPT. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: proteínas totais; I: injeção; L: lavagem; E: eluição; Rec.: recuperação.

Tris-HCl 25 mmol/L								
Frações	pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0		pH 8,5	
	PT(mg)	%	PT(mg)	%	PT(mg)	%	PT(mg)	%
I	1,80 ± 0,00	100,00	2,15 ± 0,00	100,00	2,17 ± 0,00	100,00	2,12 ± 0,00	100,00
L	0,61 ± 0,04	33,82	1,26 ± 0,00	58,69	1,56 ± 0,03	71,57	1,56 ± 0,03	73,80
E	1,27 ± 0,05	70,67	1,02 ± 0,06	47,55	0,74 ± 0,00	34,16	0,68 ± 0,07	32,24
Rec.	1,88 ± 0,09	104,49	2,28 ± 0,06	106,24	2,30 ± 0,02	105,73	2,25 ± 0,04	106,03

Tabela A.3 - IgG de alta pureza em NaP 10 mmol/L a diferentes valores de pH. Leito: 3 mL de criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: proteínas totais; I: injeção; L: lavagem; E: eluição; Rec.: recuperação.

<b>NaP 10 mmol/L</b>						
<b>Frações</b>	<b>pH 6,0</b>		<b>pH 6,5</b>		<b>pH 7,0</b>	
	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>
I	1,92 ± 0,00	100,00	1,79 ± 0,00	100,00	2,05 ± 0,00	100,00
L	0,09 ± 0,02	4,64	0,30 ± 0,04	16,89	0,89 ± 0,03	43,56
E	1,82 ± 0,05	95,10	1,57 ± 0,02	87,98	1,31 ± 0,05	63,69
Rec.	1,91 ± 0,03	99,74	1,87 ± 0,05	104,87	2,20 ± 0,02	107,25

Tabela A.4 - IgG de alta pureza em NaP 25 mmol/L a diferentes valores de pH. Leito: 3 mL de criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: proteínas totais; I: injeção; L: lavagem; E: eluição; Rec.: recuperação.

<b>NaP 25 mmol/L</b>						
	<b>pH 6,0</b>		<b>pH 6,5</b>		<b>pH 7,0</b>	
	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>
I	2,31 ± 0,00	100,00	2,29 ± 0,00	100,00	2,10 ± 0,00	100,00
L	0,23 ± 0,03	10,11	0,94 ± 0,00	41,19	1,73 ± 0,08	82,70
E	2,05 ± 0,02	88,54	1,44 ± 0,01	62,88	0,56 ± 0,06	26,81
Rec.	2,28 ± 0,05	98,65	2,38 ± 0,01	104,07	2,30 ± 0,02	109,51

Tabela A.5 - IgG de alta pureza em Hepes 10 mmol/L a diferentes valores de pH. Leito: 3 mL de criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: proteínas totais; I: injeção; L: lavagem; E: eluição; Rec.: recuperação.

<b>Hepes 10 mmol/L</b>						
	<b>pH 7,0</b>		<b>pH 7,5</b>		<b>pH 8,0</b>	
	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>	<b>PT(mg)</b>	<b>%</b>
I	1,88 ± 0,05	100,00	2,06 ± 0,15	100,00	2,19 ± 0,00	100,00
L	0,33 ± 0,01	17,38	0,76 ± 0,03	36,83	1,35 ± 0,02	61,70
E	1,51 ± 0,01	80,45	1,41 ± 0,11	68,17	1,01 ± 0,02	46,19
Rec.	1,83 ± 0,00	97,83	2,17 ± 0,14	105,00	2,37 ± 0,00	107,89

Tabela A.6 - IgG de alta pureza em HEPES 25 mmol/L a diferentes valores de pH. Leito: 3 mL de criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: proteínas totais; I: injeção; L: lavagem; E: eluição; Rec.: recuperação.

HEPES 25 mmol/L						
	pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0	
	PT(mg)	%	PT(mg)	%	PT(mg)	%
I	2,24 ± 0,09	100,00	1,89 ± 0,09	100,00	2,24 ± 0,16	100,00
L	0,43 ± 0,03	19,19	0,98 ± 0,03	51,86	1,73 ± 0,05	77,37
E	1,89 ± 0,03	84,43	0,81 ± 0,03	42,58	0,64 ± 0,07	28,36
Rec.	2,31 ± 0,01	103,62	1,78 ± 0,01	94,45	2,37 ± 0,12	105,72

## A.2 MEDIDA DE CONDUTIVIDADE DOS TAMPÕES PARA DIFERENTES VALORES DE PH

Tabela A.7 –Condutividade mensurada nos diferentes tampões preparados.

Tampão	pH	Concentração (mmol/L)	Condutividade média (mS/cm)
Tris-HCl	7,0	10	0,86 ± 0,01
	7,5	10	0,70 ± 0,00
	8,0	10	0,42 ± 0,01
	8,5	10	0,25 ± 0,00
	7,0	25	2,18 ± 0,04
	7,5	25	2,06 ± 0,00
	8,0	25	1,76 ± 0,00
	8,5	25	1,00 ± 0,02
NaP	6,0	10	0,86 ± 0,01
	6,5	10	1,03 ± 0,00
	7,0	10	1,28 ± 0,00
	6,0	25	1,95 ± 0,01
	6,5	25	2,47 ± 0,01
	7,0	25	3,06 ± 0,01
Hepes	7,0	10	0,26 ± 0,00
	7,5	10	0,40 ± 0,00
	8,0	10	0,53 ± 0,00
	7,0	25	0,54 ± 0,00
	7,5	25	0,89 ± 0,00
	8,0	25	1,22 ± 0,00

## APÊNDICE B. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM SORO HUMANO

Figura B.1 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Hepes 10 mmol/L a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de Hepes 10 mmol/L a pH 7,0 (concentração: 3,53 mg/mL). L - Lavagem: Hepes 10 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição (E): Hepes 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

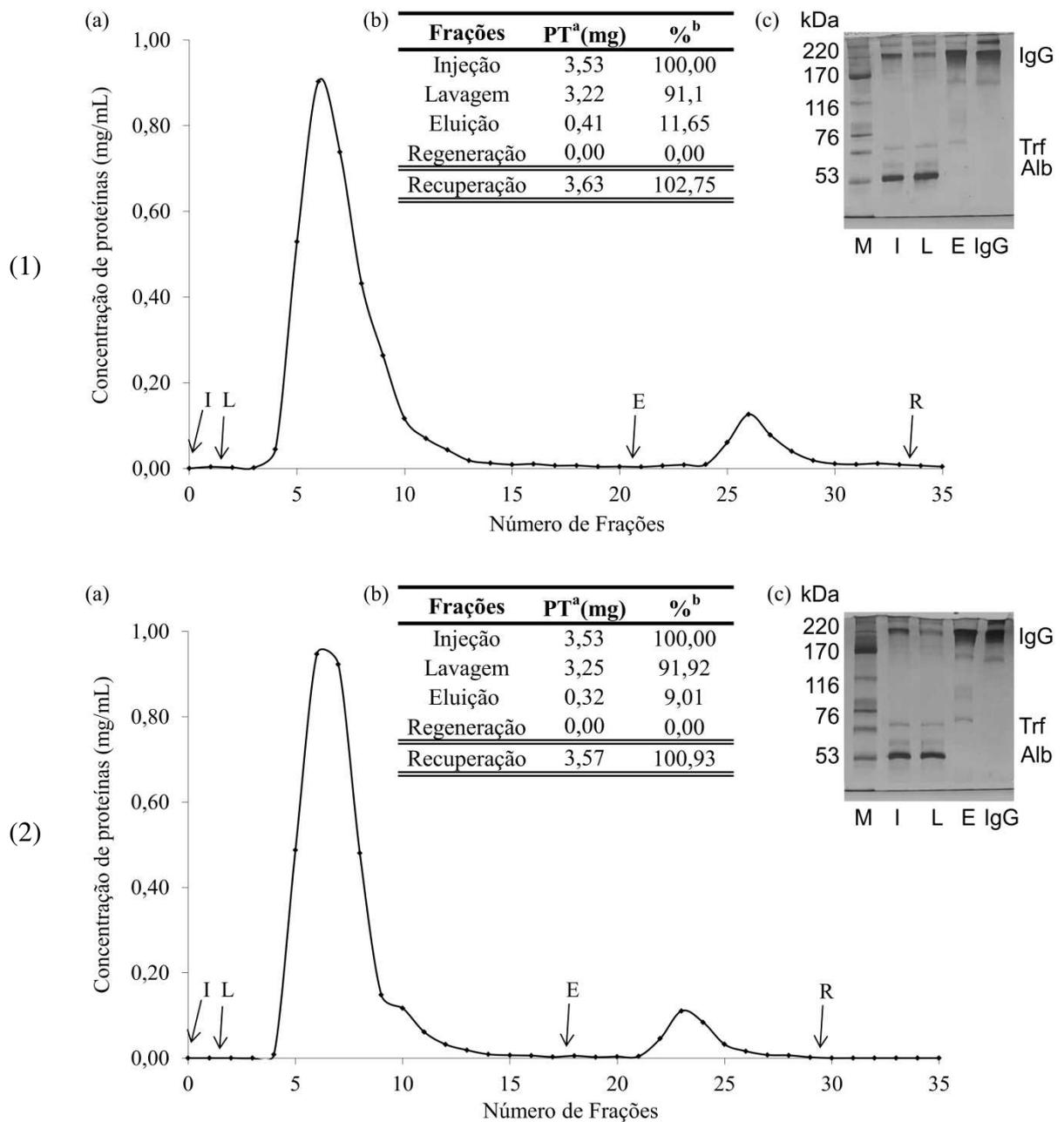


Figura B.2 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Hepes 25 mmol/L a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de Hepes 25 mmol/L a pH 7,0 (concentração: 3,54 e 3,59 mg/mL, respectivamente). L - Lavagem: Hepes 25 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição (E): Hepes 25 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

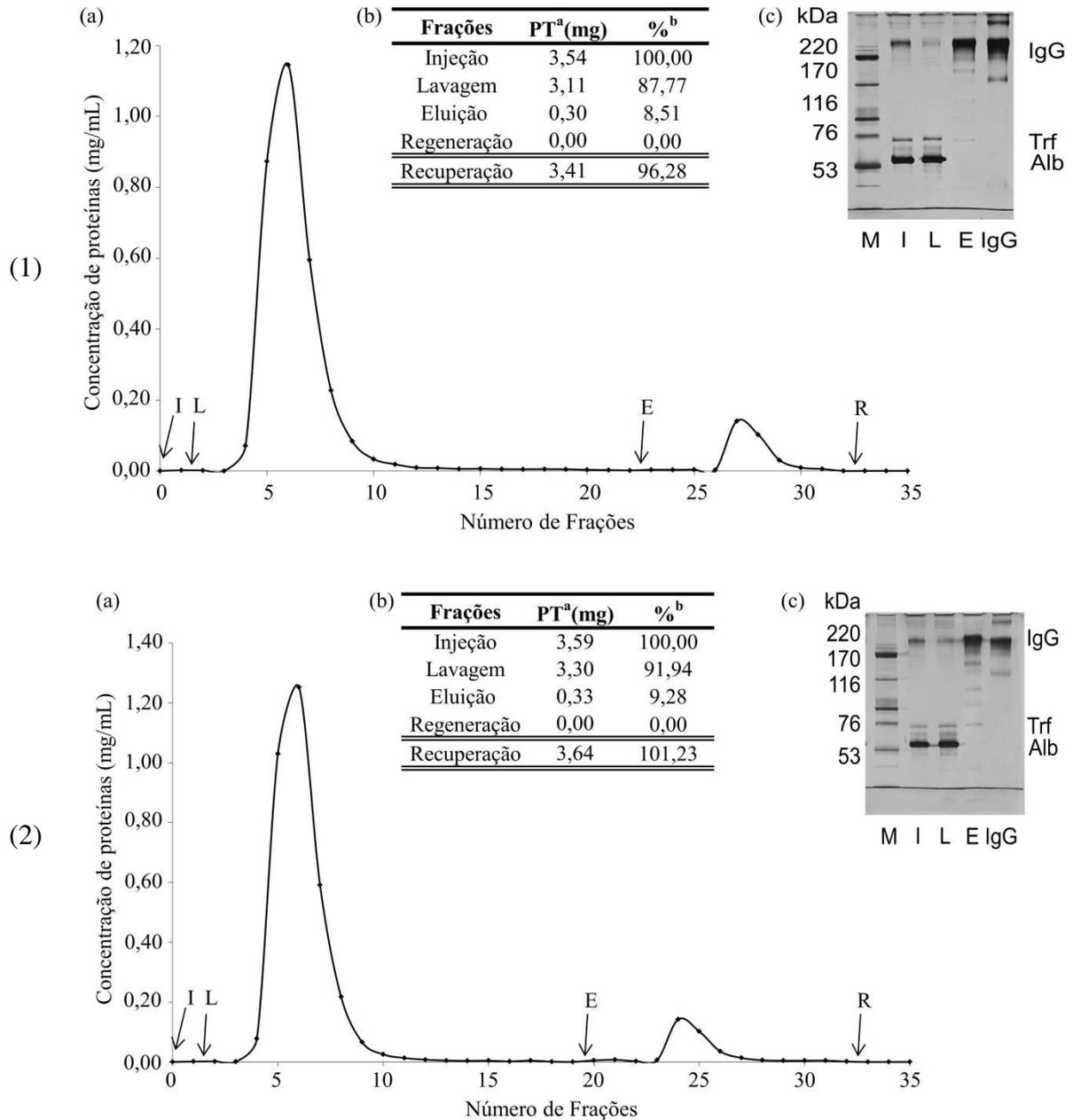


Figura B.3 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0 (concentração: 3,65 e 3,39 mg/mL, respectivamente). L - Lavagem: Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição (E): Tris-HCl 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

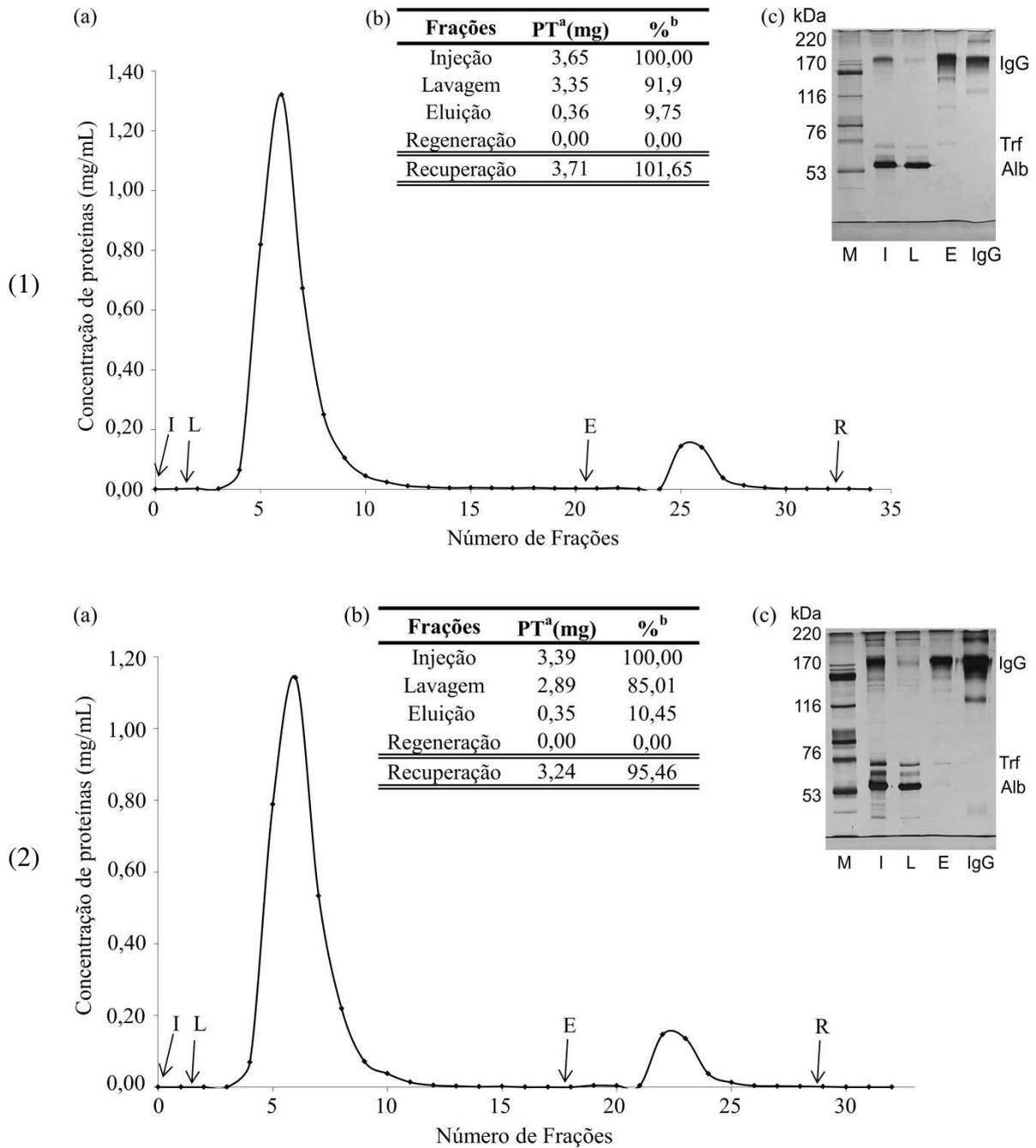


Figura B.4 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão Tris-HCl 25 mmol/L a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de Tris-HCl 25 mmol/L a pH 7,0 (concentração: 3,68 mg/mL). L - Lavagem: Tris-HCl 25 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição (E): Tris-HCl 25 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

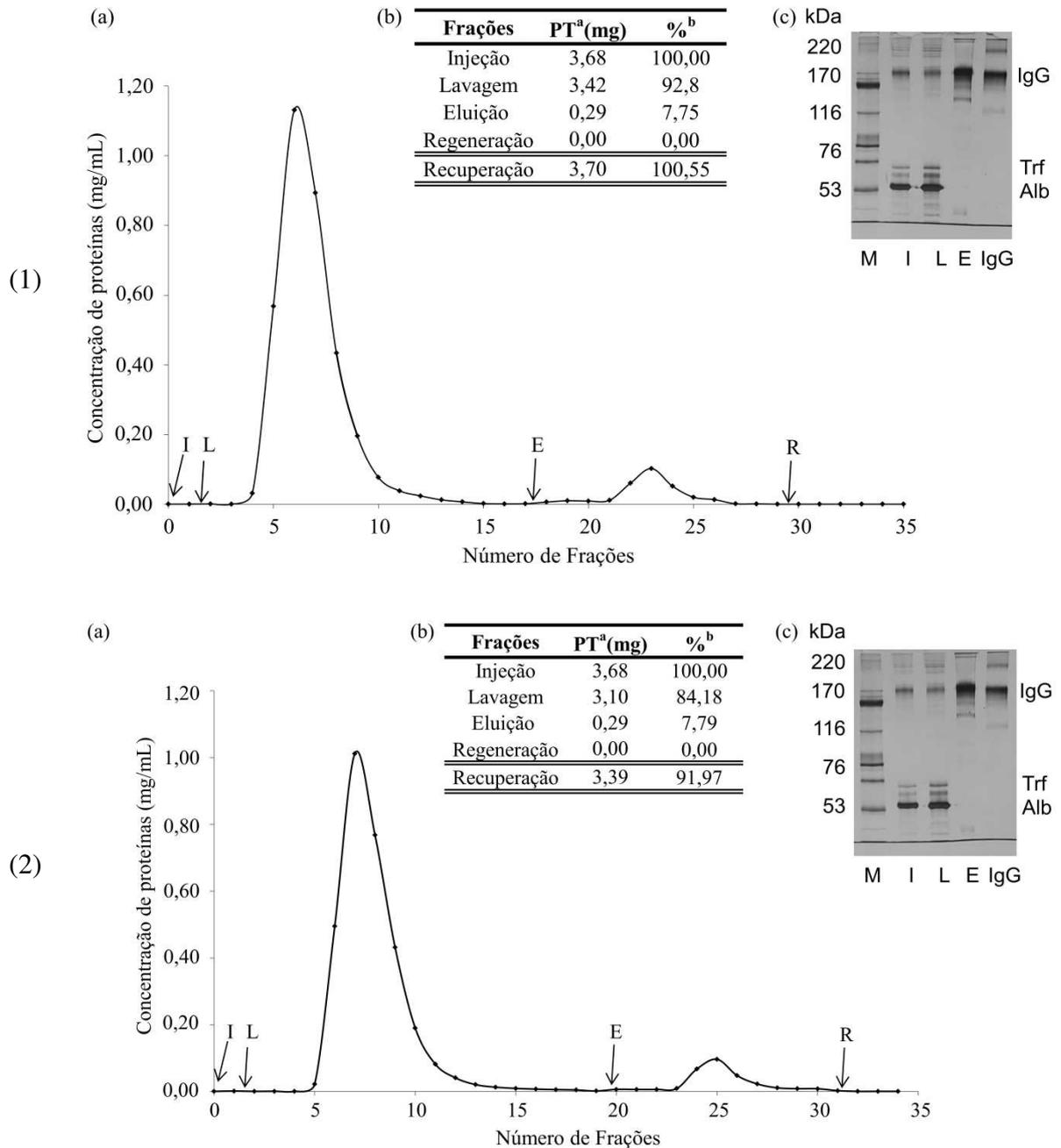


Figura B.5 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 10 mmol/L a pH 6,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de NaP 10 mmol/L a pH 6,0 (concentração: 3,39 e 3,61 mg/mL, respectivamente). L - Lavagem: NaP 10 mmol/L a pH 6,0. E - Eluição (E): NaP 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 6,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

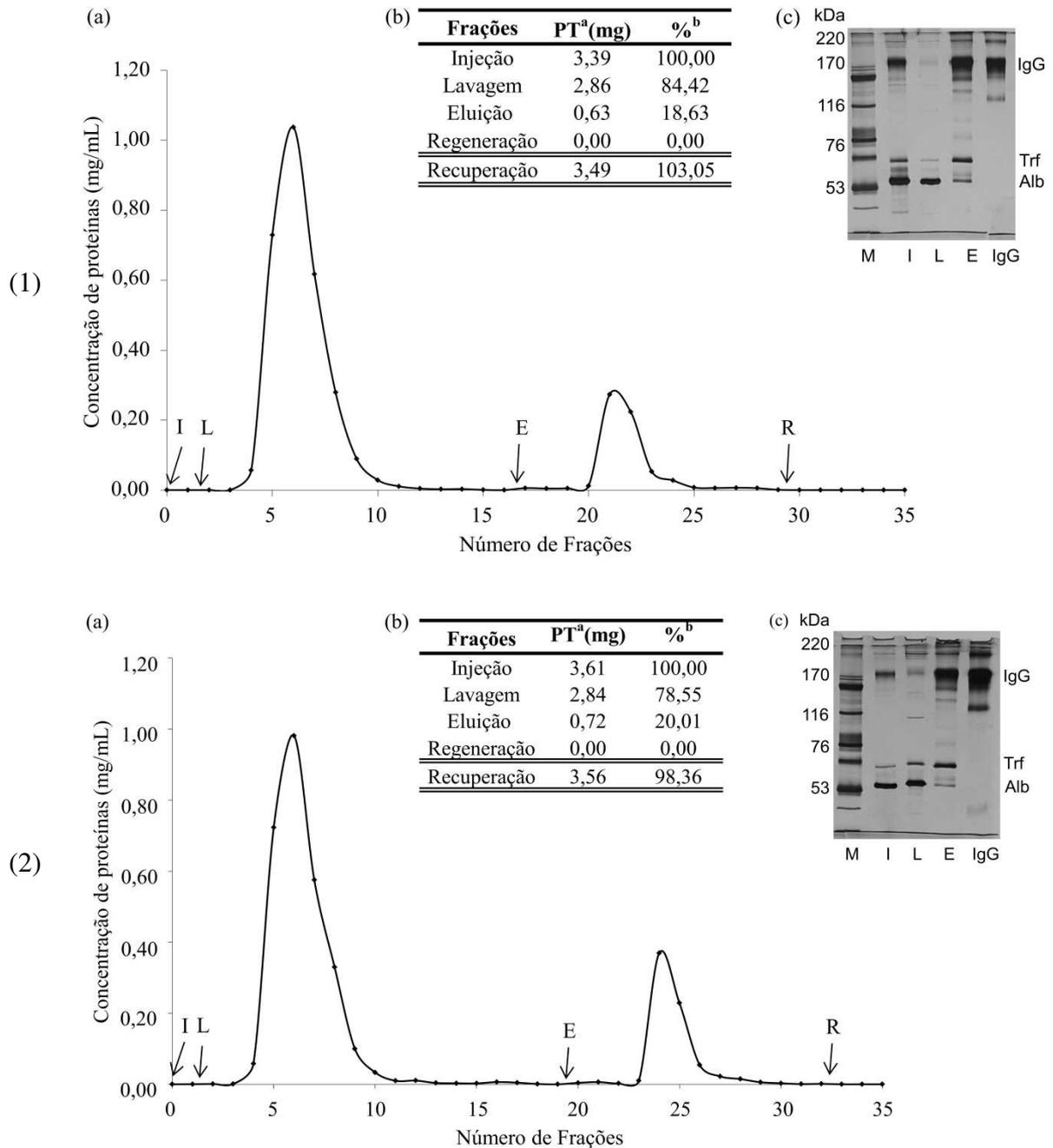


Figura B.6 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 25 mmol/L a pH 6,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de NaP 25 mmol/L a pH 6,0 (concentração: 3,33 mg/mL). L - Lavagem: NaP 25 mmol/L a pH 6,0. E - Eluição (E): NaP 25 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 6,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

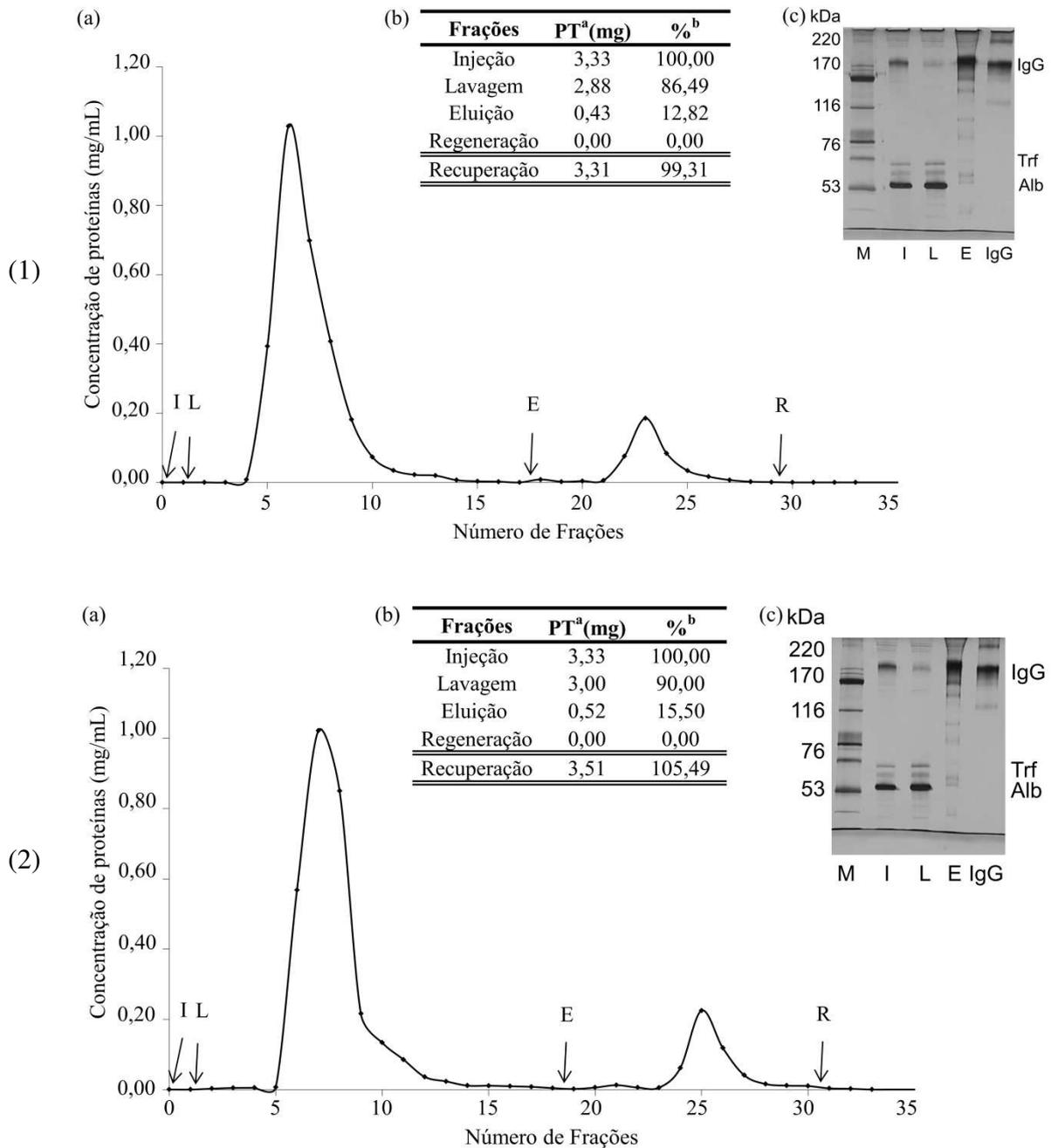


Figura B.7 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 10 mmol/L a pH 6,5. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de NaP 10 mmol/L a pH 6,5 (concentração: 3,47 e 3,70 mg/mL, respectivamente). L - Lavagem: NaP 10 mmol/L a pH 6,5. E - Eluição (E): NaP 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 6,5. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

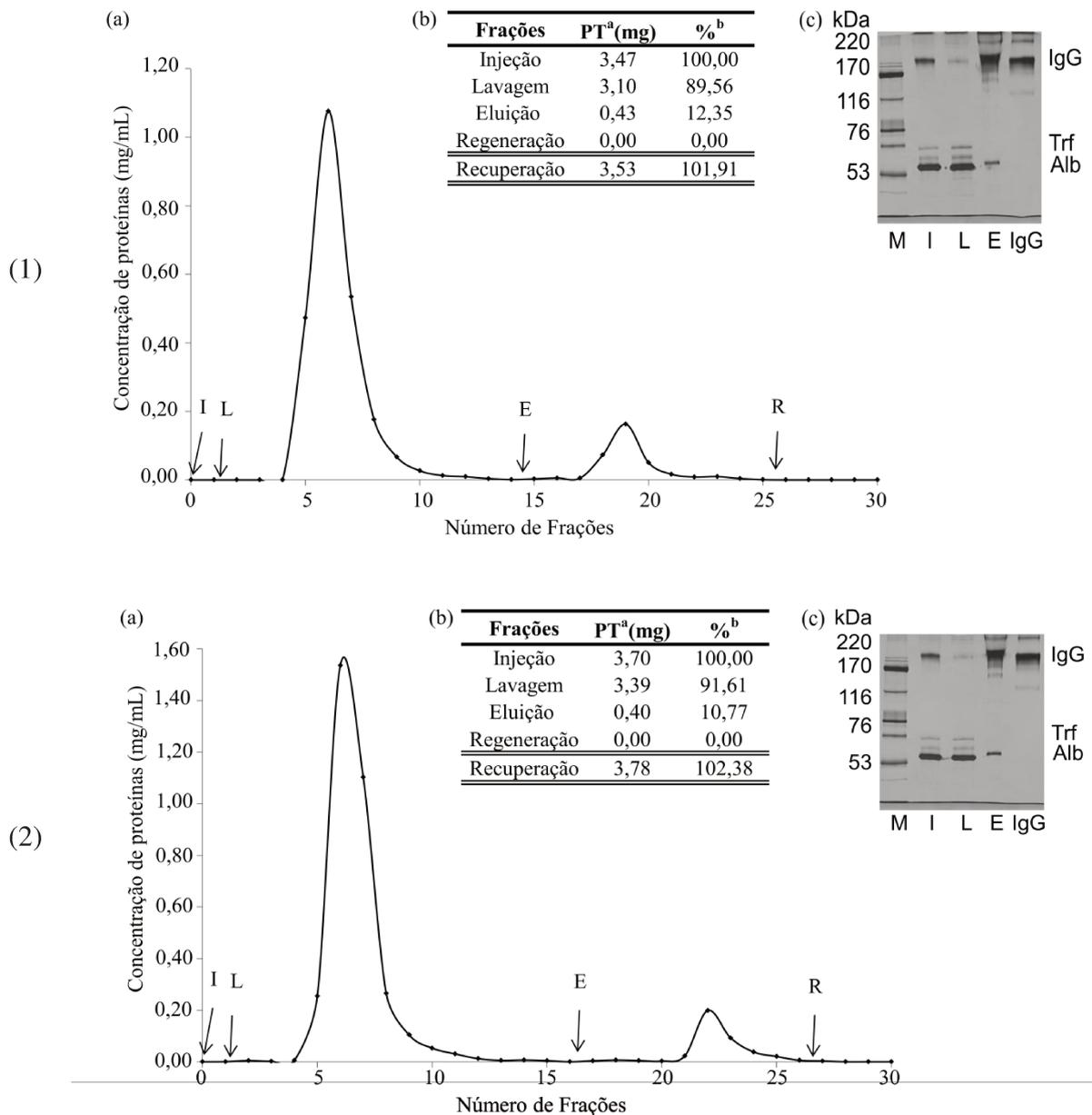


Figura B.8 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 25 mmol/L a pH 6,5. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de NaP 25 mmol/L a pH 6,5 (concentração: 3,63 mg/mL). L - Lavagem: NaP 25 mmol/L a pH 6,5. E - Eluição (E): NaP 25 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 6,5. R - Regeneração: NaOH 25 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: pool das frações de lavagem; E: pool das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

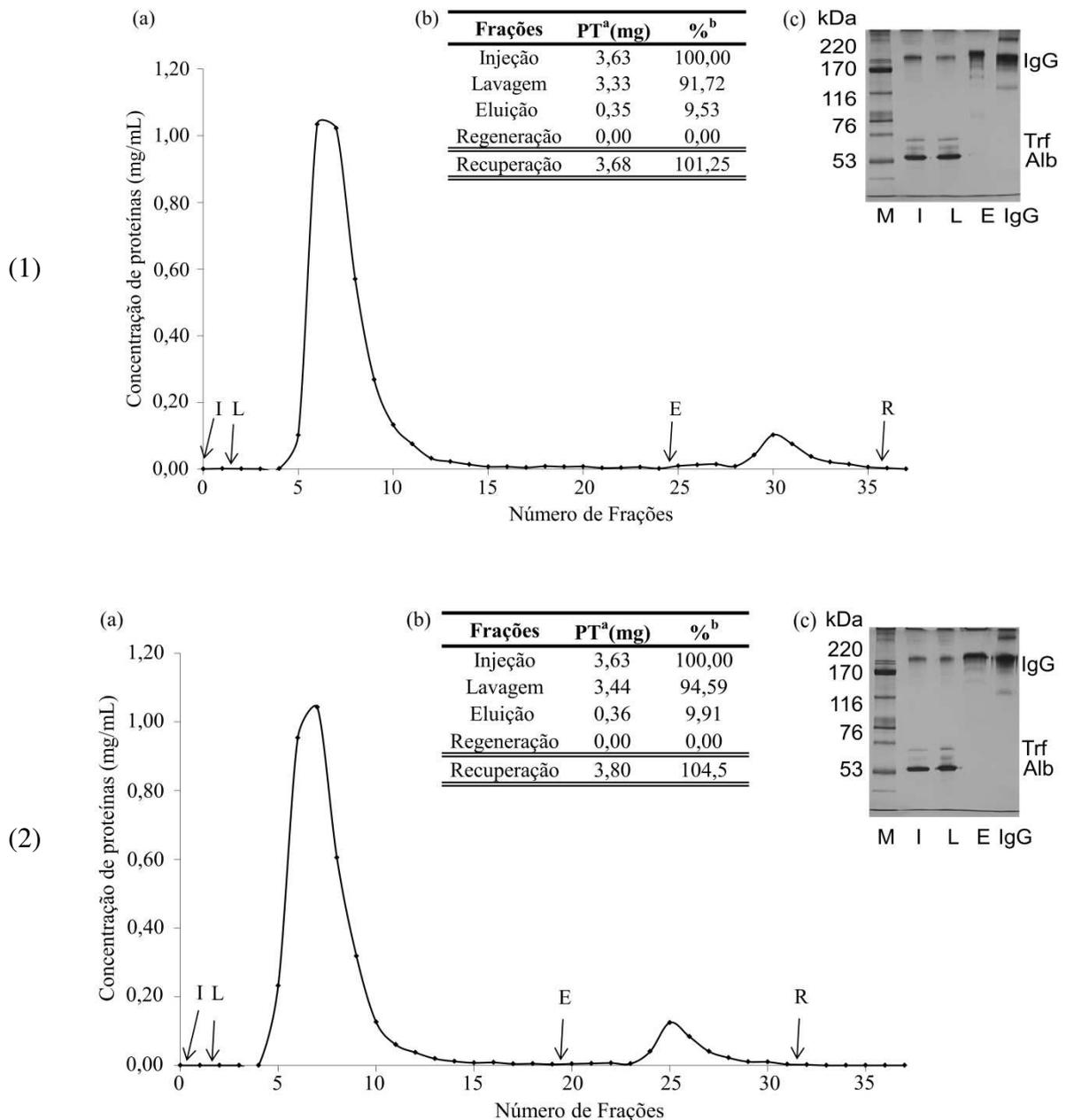


Figura B.9 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 10 mmol/L a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de NaP 10 mmol/L a pH 7,0 (concentração: 3,60 mg/mL). L - Lavagem: NaP 10 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição (E): NaP 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.

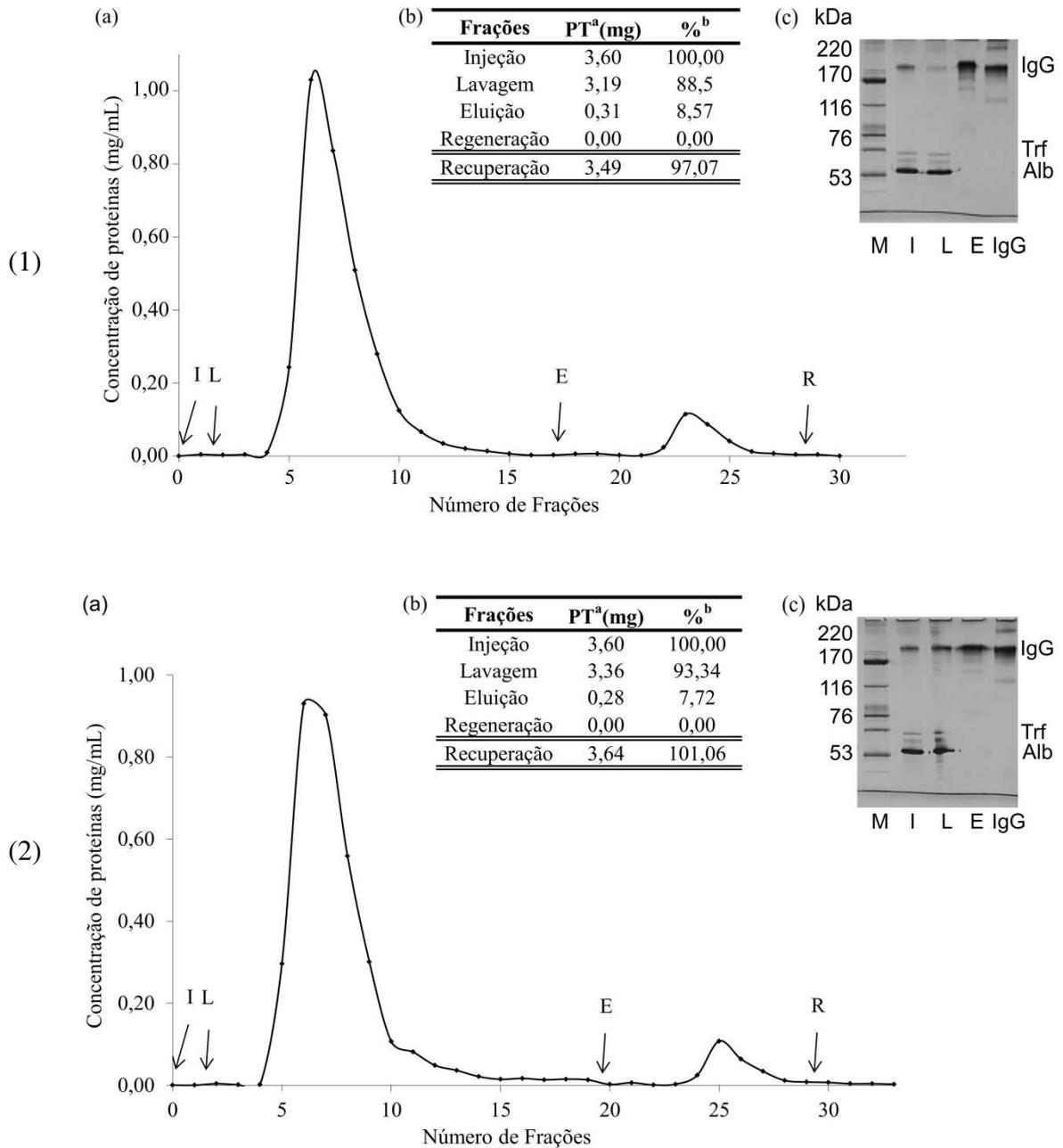
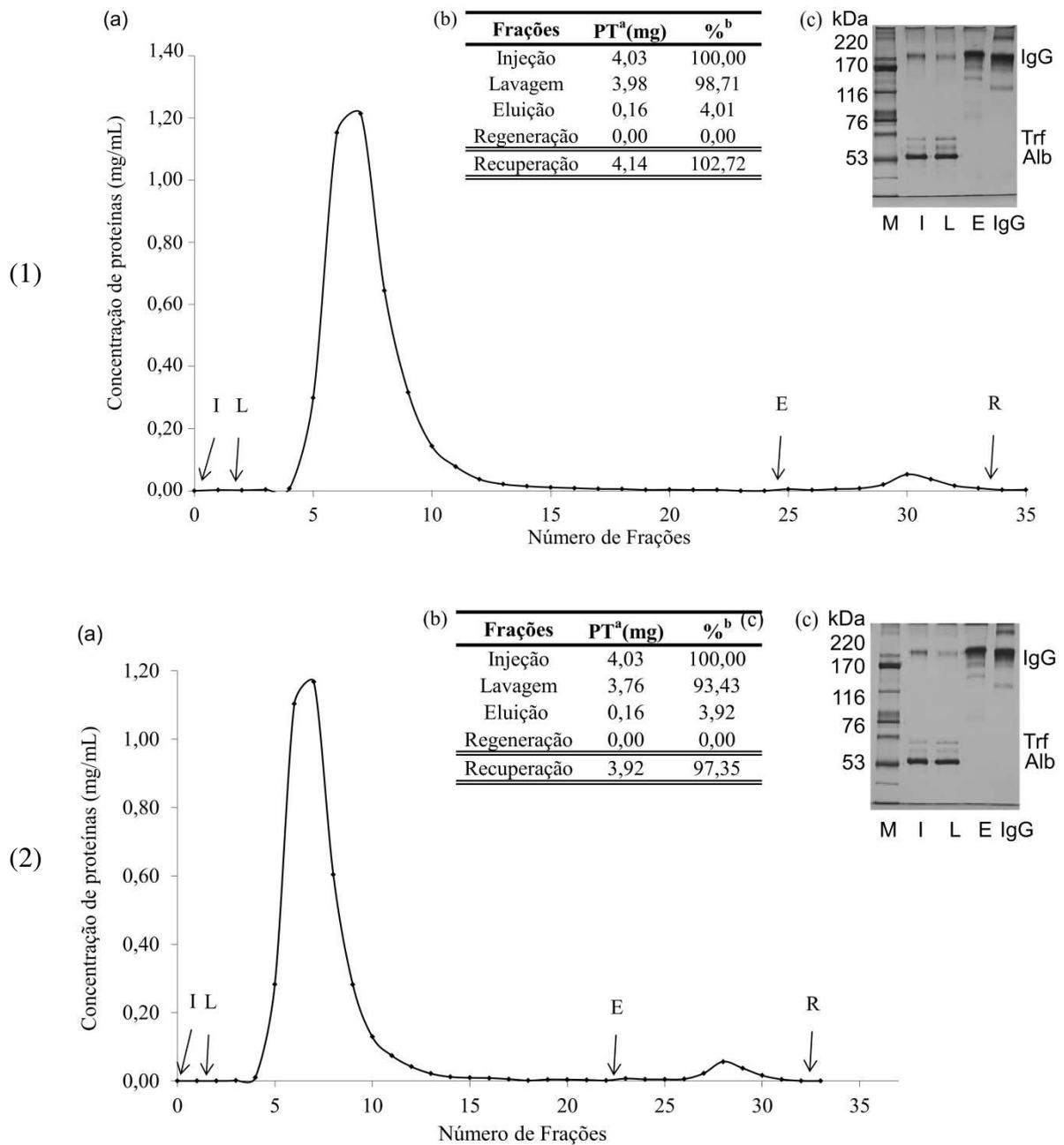


Figura B.10 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de: cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de IgG em PAAm-Alg-AGE-OPT empregando tampão NaP 25 mmol/L a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Legenda: I - Injeção: 75  $\mu$ L de soro em 1050  $\mu$ L de NaP 25 mmol/L a pH 7,0 (concentração: 4,03 mg/mL). L - Lavagem: NaP 25 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição (E): NaP 25 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações mais concentradas da eluição; IgG: marcador de IgG humana.



## APÊNDICE C. CURVAS DE RUPTURA

Figura C.1 - Duplicata d curva de ruptura obtida para PAAm-Alg-AGE-OPT. Vazão: 1,0 mL/min. Adsorção em (●) Tris-HCl 10 mmol/L e (■) Hepes 25 mmol/L a pH 7,0. Injeção: 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão de adsorção (85,44 e 84,40 mg de proteínas totais).

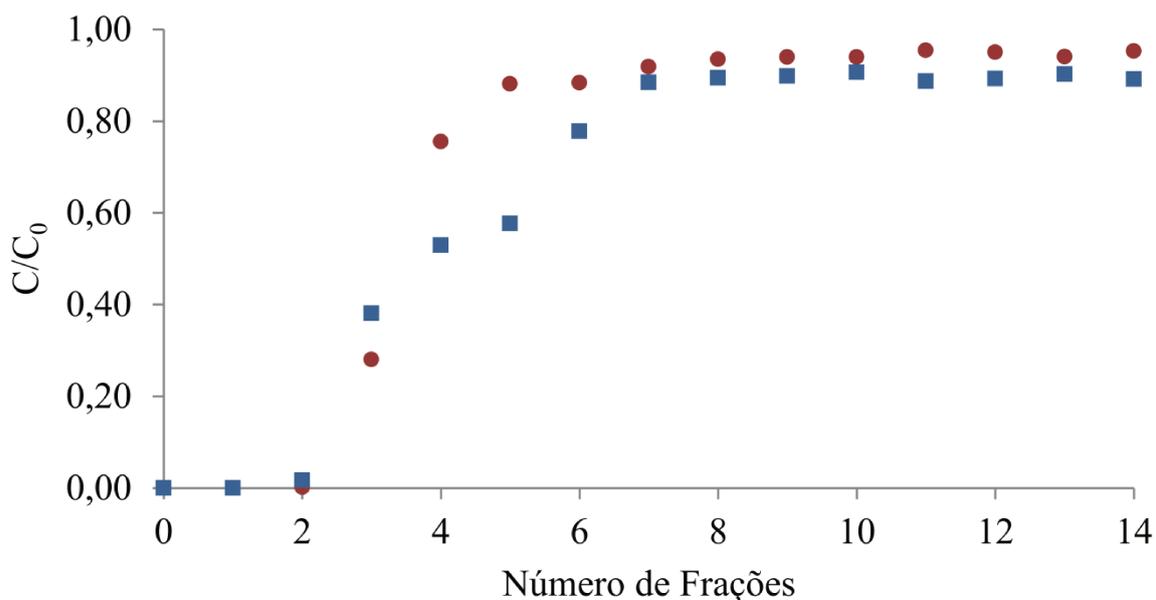


Tabela C. 1 - Balanço de massa médico entre as curvas de ruptura de soro humano diluído 15 vezes em tampão Tris-HCl 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L a pH 7,0. PT<sup>a</sup>: proteínas totais, quantificadas pela metodologia de Bradford (1976)

	Tris-HCl 10 mmol/L	HEPES 25 mmol/L
Frações	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>a</sup> (mg)
Injeção	90,51 ± 7,17	84,40 ± 0,00
<i>Flowthrough</i>	62,85 ± 0,27	73,57 ± 3,20
Lavagem	20,85 ± 6,21	11,49 ± 0,11
Eluição	4,76 ± 0,46	4,25 ± 0,04
Recuperação	88,46 ± 5,48	89,30 ± 3,13

Figura C.2 - Experimento (1) e duplicata (2) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT com Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0. Cromatograma (a) e balanço de massa (b). Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Injeção: 28 mL de solução de soro humano 15 vezes diluído em Tris-HCl 10 mmol/L (concentração: 3,41 e 3,05 mg/mL, respectivamente). F- *Flowthrough*: Proteínas não adsorvidas durante a injeção. L - Lavagem: Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição: Tris-HCl 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. PT<sup>a</sup>: proteínas totais, quantificadas pela metodologia de Bradford (1976). %<sup>b</sup>: Razão entre a massa de proteínas totais de cada etapa e a massa de proteína alimentada, multiplicado por 100.

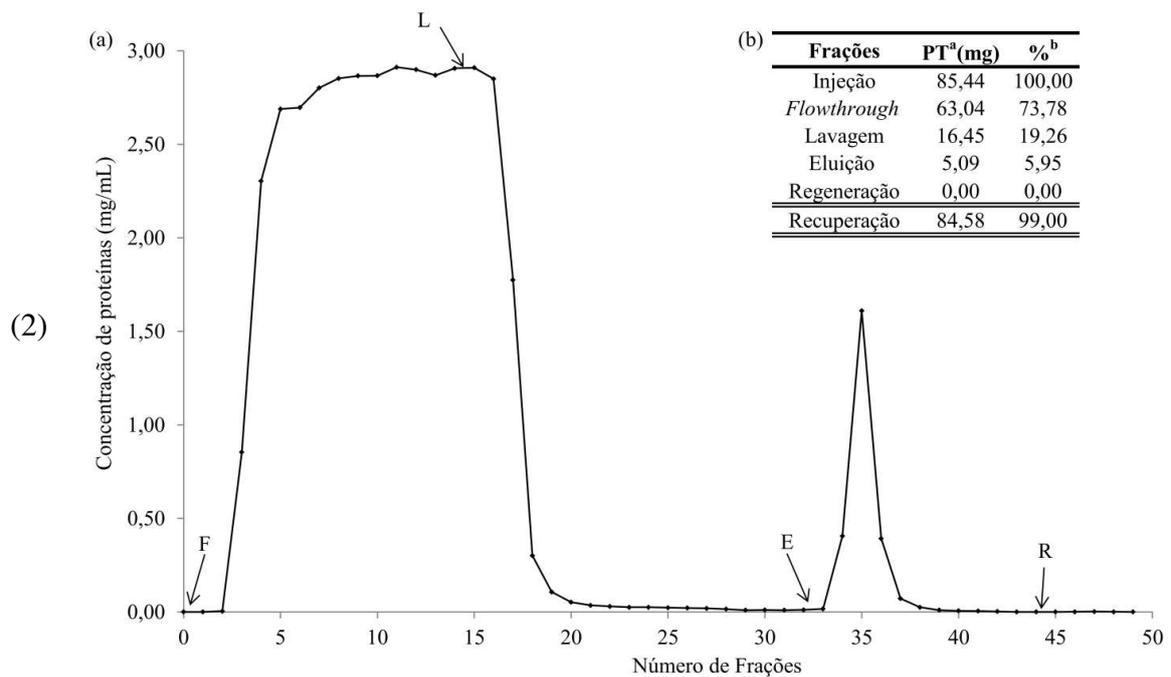
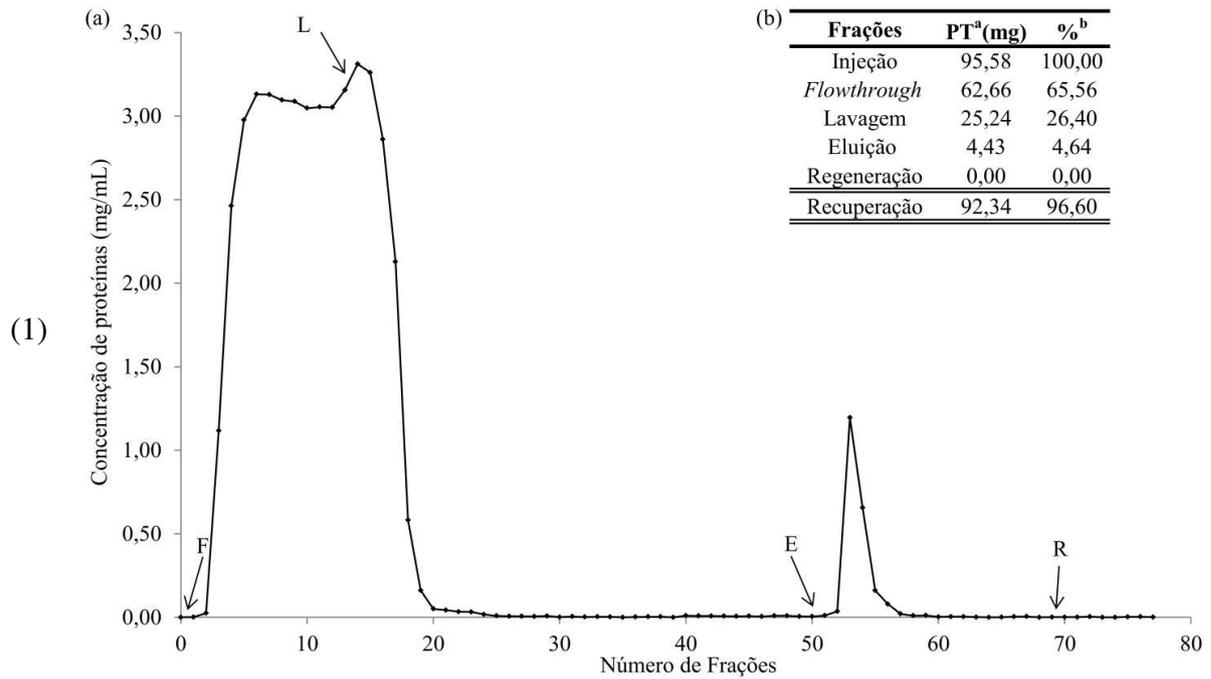


Figura C. 3 - Experimento (1) e duplicata (2) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-OPT com HEPES 25 mmol/L a pH 7,0. Cromatograma (a) e balanço de massa (b). Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Injeção: 28 mL de solução de soro humano 15 vezes diluído em Tris-HCl 10 mmol/L (concentração: 3,41 e 3,05 mg/mL, respectivamente). F- *Flowthrough*: Proteínas não adsorvidas durante a injeção. L - Lavagem: Tris-HCl 10 mmol/L a pH 7,0. E - Eluição: Tris-HCl 10 mmol/L com 0,5 mol/L de NaCl a pH 7,0. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. PT<sup>a</sup>: proteínas totais, quantificadas pela metodologia de Bradford (1976). %<sup>b</sup>: Razão entre a massa de proteínas totais de cada etapa e a massa de proteína alimentada, multiplicado por 100.

