



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

DANIELE CELESTINO CUNHA

**MONOLITOS DE POLIACRILAMIDA DERIVATIZADOS COM
POLIETILENOIMINA: ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO HUMANO**

CAMPINAS-SP

07-2018

DANIELE CELESTINO CUNHA

**MONOLITOS DE POLIACRILAMIDA DERIVATIZADOS COM
POLIETILENOIMINA: ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO HUMANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA DANIELE CELESTINO CUNHA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SÔNIA
MARIA ALVES BUENO.

CAMPINAS-SP

2018

Agência(s) de fomento e n°(s) de processo(s): CNPq, 152240/2015-2

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

C914m Cunha, Daniele Celestino, 1990-
Monolitos de poliacrilamida derivatizados com polietilenoimina :
adsorção de proteínas do soro humano / Daniele Celestino Cunha. –
Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Polyacrylamide monoliths derivatized with polyethyleneimine :
adsorption of human serum proteins

Palavras-chave em inglês:

Monolith

Immunoglobulin

Chromatography

Polyethyleneimine

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Sônia Maria Alves Bueno [Orientador]

Ambrósio Florencio de Almeida Neto

Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

Data de defesa: 31-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Daniele Celestino Cunha e aprovada em 31 de Julho de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno (Orientadora)

UNICAMP

Prof. Dr. Ambrósio Florêncio de Almeida Neto

UNICAMP

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

UNIFESP

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas pessoas que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho, em especial:

A minha família que, mesmo com a distância, esteve sempre presente me apoiando. Em especial aos meus pais Rita de Cássia e João Batista, por terem, desde sempre, dado asas a inúmeros dos meus sonhos e oferecido todo suporte (emocional e financeiro) necessário para que esta etapa na minha formação profissional pudesse ser concluída.

A professora Dr^a Sônia Maria Alves Bueno pela oportunidade de realização do mestrado e pelas orientações.

Aos amigos e colegas de laboratório, em especial a Gisele Pavan e Cecília Mourão que me ensinaram muito e estiveram sempre dispostas a me ajudar.

Aos amigos da pós-graduação, das atividades físicas e aqueles com quem tive o prazer de cruzar ao longo dessa caminhada, agradeço por terem tornado essa jornada mais leve e muito mais divertida. Agradeço a paciência, principalmente em ouvir todas minhas angústias durante essa fase, e a força e coragem que me transmitiram e me fizeram persistir.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra Ângela Maria Moraes por disponibilizarem as instalações dos seus laboratórios.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dr. Ambrósio Florêncio de Almeida Neto pelas correções e sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPQ, FAPESP e CAPES/Proex, pelo auxílio financeiro.

“Valeu a pena? Tudo vale a pena se a alma não é pequena. Quem quer passar além do bojador tem que passar além da dor. Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas nele é que espelhou o céu”.

(Mar Português – Fernando Pessoa)

RESUMO

O crescente emprego de imunoglobulinas G (IgG) nas áreas terapêutica, de testes diagnósticos e de biosensores tem impulsionado a busca por adsorventes para serem utilizados em técnicas cromatográficas objetivando a purificação destas glicoproteínas. É de interesse que os adsorventes sejam capazes de suportar altas vazões sem comprometer a eficiência de purificação e que imponham uma menor limitação à transferência de massa. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um adsorvente a base de poliacrilamida (PAAm) na forma de monolito, como fase estacionária para a purificação de IgG a partir do soro humano por cromatografia negativa. O monolito foi sintetizado pela técnica de criopolimerização e o ligante polietilenoimina (PEI) foi covalentemente imobilizado, obtendo-se um adsorvente de pseudoafinidade. Foram avaliados o efeito da presença do comonômero alil-diglicidil-éter (AGE), do agente de ativação (bisoxirano, bisoxi), de diferentes sistemas tamponantes e da quelação com íon metálico níquel na seletividade e capacidade de adsorção de IgG do monolito. A síntese dos criogéis (PAAM, PAAm-AGE-PEI, PAAM-Bisoxi-PEI) permitiu obtenção de materiais esponjosos porosos que permitem o emprego de vazões mais elevadas às utilizadas em géis tradicionalmente empregados em cromatografia. Os resultados indicaram que o PEI, quando imobilizado em PAAm-AGE, não proporcionou a purificação da biomolécula de interesse. Em contrapartida, quando PEI foi imobilizado no criogel de PAAm ativado com bisoxirano (Bisoxi), os perfis eletroforéticos das amostras da etapa de lavagem da cromatografia foram similares ao perfil do marcador de IgG humana. De acordo com os perfis eletroforéticos obtidos, a melhor condição tamponante foi Mes 25 mmol/L pH 6,0, tendo em vista que nesta condição, foram obtidas pelo menos uma amostra de lavagem com perfil eletroforético similar ao marcador de IgG. Apesar da baixa capacidade dinâmica obtida para o criogel ativado com bisoxirano (0,1 mg_proteína/mL_criogel), os ensaios cromatográficos revelaram ainda assim o potencial deste material de ser empregado como fase estacionária em cromatografia de pseudoafinidade para a purificação de IgG a partir do soro humano.

ABSTRACT

The growing usage of immunoglobulins G (IgG) as therapeutics, biosensors, and in diagnostic tests has driven the search for adsorbents to be used in chromatographic techniques for purifying these glycoproteins. It is desirable that adsorbents stand high flow rates while maintaining purification efficiency and reducing mass transfer resistance. In this context, this study focused on developing a polyacrylamide (PAAm)-based monolithic adsorbent as a stationary phase for purifying human serum IgG by negative chromatography. The monolith was synthesized by the cryopolymerization method, where polyethyleneimine (PEI) ligand was covalently immobilized to the PAAm cryogel resulting in a pseudoaffinity adsorbent. The effects of the presence of comonomer allyl-glycidyl-ether (AGE), activation methods (bisoxirane, bisoxi), diverse buffer systems, and nickel metal ion chelation in both monolith selectivity and adsorption capacity were evaluated. The cryogel synthesis (PAAm, PAAm-AGE-PEI, PAAm-Bisoxi-PEI) enables the formation of porous spongy materials that allows the use of flow rates higher than the ones used in gels commonly applied in chromatography. Results have shown that the PEI ligand, while immobilized in PAAm-AGE, did not purify the target biomolecule. However, when the ligand PEI was immobilized to PAAm cryogel activated with bisoxirane, the electrophoretic profiles of flowthrough fractions were similar to the profile of human IgG marker. According to the obtained electrophoretic profiles, Mes 25 mmol/L pH 6.0 was the best buffer system used, since this condition allowed at least one electrophoretic profile similar to the IgG marker. Although a low dynamic capacity was found for the bisoxi activated cryogel (0.1 mg_{protein}/mL_{cryogel}), the chromatographic experiments revealed the potential of this material to be applied as stationary phase in pseudoaffinity chromatography for the purification of immunoglobulin G (IgG) from human serum.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Fluxograma das etapas para a realização do estudo da purificação de IgG humana em criogel monolítico de poliacrilamida com PEI imobilizado.....	27
Figura 2 – Estrutura da IgG. Adaptado de Trier e Houen (2017).....	30
Figura 3 - Esquema de formação do criogel a partir da mistura reacional polimérica. Adaptado de Plieva e colaboradores (2004a).....	35
Figura 4 - Reação de formação do criogel de poliacrilamida. Adaptado de Mallik e Hage (2006).	37
Figura 5 - Parâmetros da estrutura do criogel que afetam sua performance. Adaptado de Plieva e colaboradores (2005).	37
Figura 6 - Estrutura química do PEI (Fonte: Catálogo Sigma-Aldrich).....	40
Figura 7 - Fluxograma das etapas envolvidas na síntese dos criogéis testados.....	46
Figura 8 - Composições mássicas médias do criogéis.....	54
Figura 9 - Registro fotográfico (a) do criogel PAAm com estrutura não uniforme e (b) do líquido retirado do interior da coluna, de coloração turva e apresentando fragmentos do criogel.	55
Figura 10 – Perfil eletroforético das frações obtidas da cromatografia no criogel PAAm com injeção de 2 mL de soro humano diluído 15 vezes em NaP 10 mmol/L pH 6,0: SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: <i>pool</i> das frações de lavagem com tampão de adsorção; E: <i>pool</i> das frações de eluição (tampão de adsorção contendo 1,0 mol/L NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.....	59
Figura 11 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Bis-Tris 25 mmol/L (▨), NaP 25 mmol/L (▩) e Hepes 25 mmol/L (⊗) na adsorção de IgG de alta pureza em criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II).....	60
Figura 12 - Perfis eletroforéticos das frações cromatográficas da cromatografia de soro humano diluído 15x em PAAm-AGE-PEI-Ni(II). SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: <i>pool</i> das frações de lavagem; E: <i>pool</i> das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.....	63
Figura 13 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Mes 25 mmol/L (⊗) e Mops 25 mmol/L (▩) na adsorção de proteínas do soro humano em criogel PAAm-AGE-PEI.	64

Figura 14 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-AGE-PEI com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.....	65
Figura 15 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Mes 25 mmol/L (⊗) e Mops 25 mmol/L (■) na adsorção de proteínas do soro humano em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1.....	67
Figura 16 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.	68
Figura 17 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Mes 25 mmol/L (⊗) e Mops 25 mmol/L (■) na adsorção de proteínas do soro humano em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2.....	70
Figura 18 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI -2 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.	70
Figura 19 - Perfil eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção Mes 25 mmol/L pH 6,0. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.	73
Figura 20 – Imagens produzidas por MEV das (a) superfícies, (b) secções longitudinais e (c) secções transversais ampliadas 1000 vezes dos criogéis PAAm-Bisoxi-PEI-2 e PAAm-Bisoxi-PEI-3.....	74
Figura 21 – Balanço de massa do ensaio de curva de ruptura em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 em sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0.....	75

Figura 22 – Curva de ruptura de IgG em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 para proteínas totais. Volume de alimentação: 10,0 mL de solução de soro humano diluído 20x em tampão Mes 25 mmol/L pH 6,0.	76
Figura 23 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas da curva de ruptura no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. F _T : frações da etapa de <i>flowthrough</i> . L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.....	76
Figura 24 - Registro fotográfico dos criogéis PAAm e PAAm-AGE (a) após sintetizados (b) sendo submetidos a compressão manual.	77
Figura 25 – Registro fotográfico dos criogéis (a) PAAm e (b) PAAm-Bisoxi-PEI.....	78
Figura 26 – Imagens produzidas por MEV das (a) superfícies ampliadas 250 vezes, (b) secções longitudinais ampliadas 250 vezes (c) secções longitudinais ampliadas 1000 vezes e (d) secções transversais ampliadas 1000 vezes dos criogéis PAAm e PAAm-Bisoxi-PEI.....	79
Figura A. 1 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm utilizando sistema tamponante NaP 10 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,96 mg/mL e (2) 1,89 mg/mL. L– Lavagem: NaP 10 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: NaP 10 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl pH 6,0. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L.....	98
Figura A. 2 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,90 mg/mL e (2) 2,21 mg/mL. L– Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Hepes 25 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl pH 7,0. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L.	99
Figura A. 3 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm utilizando sistema tamponante NaP 10 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de (1) 1,5 mL e (2) 2,0 mL de solução contendo soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,24 mg/mL e (2) 3,28 mg/mL. L– Lavagem: NaP 10 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: NaP 10 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl pH 6,0. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE:	

M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição. 100

Figura B. 1 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,07 mg/mL e (2) 2,02 mg/mL. L– Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.....101

Figura B. 2 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,05 mg/mL e (2) 2,09 mg/mL. L– Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0..... 102

Figura B. 3 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,07 mg/mL e (2) 1,92 mg/mL. L– Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0..... 103

Figura B. 4 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,12 mg/mL e (2) 1,91 mg/mL. L– Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 7,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0..... 104

Figura B. 5 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,15 mg/mL e (2) 1,87 mg/mL. L– Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 8,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0..... 105

Figura B. 6 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana ultrapuro pré-purificada na concentração de (1) 2,00 mg/mL e (2) 2,16 mg/mL. L– Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. 106

Figura B. 7 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,94 mg/mL e (2) 2,06 mg/mL. L– Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. 107

Figura B. 8 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,97 mg/mL e (2) 1,94 mg/mL. L– Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. 108

Figura B. 9 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,98 mg/mL e (2) 1,94 mg/mL. L– Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. 109

Figura B. 10 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,89 mg/mL e (2) 1,99 mg/mL. L– Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. 110

Figura B. 11 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,00 mg/mL e (2) 1,99 mg/mL. L–

Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. 111

Figura B. 12 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,5 mL de solução de soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,25 mg/mL e (2) 3,24 mg/mL. L– Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 112

Figura B. 13 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,5 mL de solução de soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,22 mg/mL e (2) 3,17 mg/mL. L– Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 113

Figura B. 14 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,5 mL de solução de soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,23 mg/mL e (2) 3,23 mg/mL. L– Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R– Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 114

Figura C. 1 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,85 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E–

pool das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.

..... 115

Figura C. 2 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,80 mg/mL. L- Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 116

Figura C. 3 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 5,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,4 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 5,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 117

Figura C. 4 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,4 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 118

Figura C. 5 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,4 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 119

Figura D. 1- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 5,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,57 mg/mL e (2) 2,47 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 5,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. 120

Figura D. 2- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,59 mg/mL e (2) 2,51 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 121

Figura D. 3- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,51 mg/mL e (2) 2,47 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 122

Figura D. 4- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,69 mg/mL e (2) 2,53 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 123

Figura D. 5- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1

utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,74 mg/mL e (2) 2,63 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 124

Figura E. 6- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 5,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,32 mg/mL e (2) 2,25 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 5,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 126

Figura E. 7- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,70 mg/mL e (2) 2,79 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 127

Figura E. 8- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,17 mg/mL e (2) 2,23 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 128

Figura E. 9- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,46 mg/mL e (2) 2,46 mg/mL. L–

Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração..... 129

Figura E. 10- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,43 mg/mL e (2) 2,49 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 130

Figura F. 1- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,61 mg/mL e (2) 2,55 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.....131

Figura F. 2- Curva de ruptura (a) e perfil eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução 20x diluída de soro humano em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 10,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,26 mg/mL e (2) 2,37 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração. ... 132

Lista de tabelas

Tabela 1 – Capacidade de expansão dos criogéis PAAm e PAAm-AGE.	55
Tabela 2 - Densidade de íons metálicos cobre e níquel complexados a agentes quelantes imobilizados em matrizes ativadas com epicloridrina e bisoxirano	56
Tabela 3 - Quantificação de IgG nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas em criogel de PAAm, alimentando IgG (2 mg/mL) em NaP 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L.....	58
Tabela 4 - Quantificação de proteínas totais nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas em criogel PAAm, a partir da injeção de soro humano diluído 15 vezes em NaP 10 mmol/L, pH 6,0.....	59
Tabela 5 - Proteínas totais nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas em criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II), no sistemas tamponantes Bis-Tris 25 mmol/L e NaP 25 mmol/L, a partir da injeção de soro humano diluído 15x.	62
Tabela 6 - Proteínas totais nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas nos criogéis de PAAm-Bisoxi-PEI em sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0, a partir da injeção de 1mL de soro humano diluído 20x.	72

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	IX
LISTA DE TABELAS	XIX
SUMÁRIO	XX
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Objetivo	26
1.2. Plano de trabalho	26
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1. Imunoglobulinas	28
2.1.1. Imunoglobulina G.....	29
2.1.2. Purificação de imunoglobulinas	31
2.2. Cromatografia de afinidade	32
2.2.1. Matrizes em cromatografia de afinidade	33
2.2.1.1. Monolitos como fase estacionária em cromatografia.....	34
2.2.1.2. Criogel de poliacrilamida como fase estacionária em cromatografia	36
2.2.2. Ligantes empregados em cromatografia de afinidade	38
2.2.2.1. Polietilenoimina (PEI) como ligante em cromatografia.....	39
2.3. Purificação de proteínas por cromatografia negativa	43
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais	45
3.2. Métodos	46
3.2.1. Síntese dos criogéis	46
3.2.1.1. Criogel de poliacrilamida	46

3.2.1.2.	Criogel de poliacrilamida-AGE	47
3.2.2.	Ativação do criogel PAAm com bisoxirano.....	47
3.2.3.	Imobilização de PEI via ligação éter	48
3.2.4.	Experimentos cromatográficos	48
3.2.4.1.	Cromatografia em coluna contendo o criogel de PAAm	48
3.2.4.2.	Cromatografia em coluna contendo os criogéis PAAm-AGE-PEI quelatado ao íon metálico Ni(II)	49
3.2.4.3.	Cromatografia negativa em PAAm-Bisoxi-PEI e PAAm-AGE-PEI	49
3.2.5.	Determinação da curva de ruptura.....	50
3.2.6.	Métodos analíticos	51
3.2.6.1.	Determinação da quantidade de proteínas total.....	51
3.2.6.2.	Eletroforese SDS-PAGE	51
3.2.6.3.	Determinação da densidade dos íons metálicos imobilizados	52
3.2.6.4.	Caracterização dos criogéis	52
3.2.6.4.1.	Capacidade de expansão	53
3.2.6.4.2.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	54	
4.1.	Determinação da capacidade de expansão.....	54
4.2.	Densidade de íon metálico quelatado ao PEI	56
4.3.	Experimentos cromatográficos no criogel PAAm (controle)	57
4.3.1.	Adsorção de IgG humana em PAAm	57
4.3.2.	Adsorção de proteínas do soro humano no criogel PAAm (controle).....	58
4.4.	Purificação de IgG em PAAm-AGE-PEI	60
4.4.1.	Purificação de IgG em PAAm-AGE-PEI-Ni(II)	60
4.4.1.	Purificação de IgG em PAAm-AGE-PEI	64
4.5.	Purificação de IgG em PAAm-Bisoxi-PEI: cromatografia negativa.....	67
4.5.1.1.	Curva de ruptura.....	75

4.6. Caracterização dos criogéis sintetizados	77
4.6.1. Estrutura e morfologia	77
CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES	81
CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	83
CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICE A	98
APÊNDICE B.....	101
APÊNDICE C	115
APÊNDICE D	120
APÊNDICE E.....	126
APÊNDICE F.....	131

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são glicoproteínas presentes no plasma animal e que atuam no sistema imunológico, reconhecendo e se ligando a antígenos específicos. Esta função faz com que seja crescente a aplicação das imunoglobulinas em testes diagnósticos, em uso terapêutico (no caso de imunodeficiências congênitas ou adquiridas), no tratamento de doenças e seus sintomas (tais como as cardiovasculares, autoimunes, infecções e câncer), e também como ferramenta para purificação dos seus antígenos para fins de pesquisa ou para uso nas indústrias farmacêuticas (HUSE; BÖHME; SCHOLZ, 2002).

Diversas indicações clínicas para emprego das imunoglobulinas já foram licenciadas pela agência regulatória americana (FDA - *Food and Drug Administration*) e europeia (EMA - *European Medicines Agency*). Sua relevância reflete no mercado global, que movimentou cerca de 2,2 bilhões de dólares em 2014 no âmbito de pesquisas com anticorpos, e cerca de 63,4 bilhões de dólares em 2013 no setor de fármacos com base em anticorpos monoclonais de uso terapêutico, incluindo outras aplicações e tecnologias relacionadas (FAN, 2015).

Nas áreas terapêutica e de diagnóstico, dependendo da aplicação dos anticorpos, pode ser requerido grau de pureza de 95 a 99,9% (CASTILHO et al., 2008), uma vez que contaminantes e impurezas podem interferir na segurança de sua aplicação clínica (FASSINA et al., 2001). Esta exigência torna evidente a necessidade de se desenvolver técnicas de purificação capazes de atingir não só a alta pureza, mas que esteja associado a um alto rendimento e a um custo mínimo, tendo em vista que as etapas de purificação são majoritariamente responsáveis pelo custo total de produção (STRAATHOF, 2011).

A fonte dos anticorpos, seu tipo, aplicação final e o nível de pureza requerido são fatores que influenciam a escolha do método de purificação a ser utilizado. No caso do emprego da imunoglobulina G (IgG) humana para uso terapêutico, esta comumente é purificada pelas indústrias farmacêuticas a partir do plasma humano pelo método de precipitação por etanol (método de Cohn), antecedido ou sucedido por cromatografias de troca iônica (BURNOUF, 2007). No caso da IgG humana ser purificada em pequena escala (laboratorial) ou desta proteína ser destinada a aplicações que requerem alto grau de pureza, como por exemplo, testes diagnósticos ou como ligantes em cromatografia de afinidade, as imunoglobulinas, sejam elas nativas ou geneticamente engenheiradas, são comumente purificadas pela técnica de cromatografia de afinidade (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007). As proteínas A e G são ligantes de afinidade bioespecíficos amplamente empregados para purificação de anticorpos monoclonais e policlonais. Entretanto, eles apresentam como desvantagens a necessidade de

condições drásticas de eluição (baixos valores de pH), provocando, muitas vezes, agregação ou desativação do anticorpo, bem como podem co-purificar outros anticorpos (TRIER; HOUEN, 2017).

Estes fatores, somados ao alto custo (10mL de Agarose 4B com proteína A imobilizada fornecida pela Sigma-Aldrich custa cerca de R\$ 6.500,00), desfavorecem a utilização dos ligantes bioespecíficos e, conseqüentemente, impulsionam a busca por alternativas mais vantajosas como, por exemplo, os ligantes pseudoespecíficos. Estes, por sua vez, incluem aminoácidos, peptídios, ligantes tiofílicos, corantes e quelatos metálicos imobilizados, que apresentam, de maneira geral, alta estabilidade, simplicidade, seletividade e menor custo. Estes ligantes podem interagir com a proteína alvo por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ligação de coordenação, etc, com intensidades variadas (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Dentre os ligantes pseudoespecíficos encontram-se as aminas, que podem ser imobilizadas covalentemente após a ativação de diferentes matrizes e têm sido utilizadas na purificação de diversas proteínas (HOUEN, 2001). O mecanismo de adsorção de proteínas em matrizes com aminas imobilizadas ainda não foi totalmente elucidado, porém estudos demonstram que as proteínas interagem com o ligante por meio de interações eletrostáticas (com grupamentos amino positivamente carregados), hidrofóbicas ou por afinidade (BRESOLIN *et al.*, 2012).

A purificação de IgG humana em matrizes derivatizadas com aminas foi realizada por cromatografia negativa, técnica em que as impurezas presentes na solução de alimentação são adsorvidas na fase estacionária, enquanto a proteína alvo é obtida nas frações de *flowthrough* e de lavagem (LEE; CHAN; TEY, 2014). Bresolin e colaboradores (2009, 2010, 2012) obtiveram bons resultados de rendimento e pureza na purificação de IgG a partir do soro e plasma humano por cromatografia negativa em gel de agarose com aminas imobilizadas como fase estacionária: ao empregarem o ligante TREN, 73% da IgG alimentada foi recuperada nas frações não retidas, apresentando pureza superior a 90%.

De Souza e colaboradores (2010) estudaram a purificação de IgG a partir do plasma e soro humanos empregando como ligante ω -aminohexil imobilizado em agarose e demonstraram que na matriz ativada com brometo de cianogênio (CNBr) somente 30% do total de IgG alimentado foi obtido com alto grau de pureza nas frações não-retidas, enquanto que para a matriz ativada com bisoxirano, esse valor foi de 76% , sendo a pureza de 100%. Nesta última matriz, obteve-se também uma alta capacidade de adsorção de albumina de soro humano (HSA), correspondendo a 210,4 mg HSA/mL gel.

Carmignotto, Mourão e Bueno (2017) empregaram o ligante polietileimina (PEI) imobilizado em gel de agarose e alcançaram bons valores de pureza (96%) e recuperação (93%) na purificação de fragmentos proteolíticos Fab de IgG humana por cromatografia negativa.

O PEI é uma poliamina altamente ramificada, contendo elevada densidade de cargas positivas (grupamentos amino primários, secundários e terciários carregados). O PEI é capaz de estabelecer fortes interações eletrostáticas com as proteínas e seu emprego como ligante imobilizado em suportes sólidos tem resultado em elevada adsorção de proteínas (WANG *et al.*, 2013).

Em cromatografia de afinidade, a matriz cromatográfica desempenha um papel importante na eficiência e resolução da separação. Tradicionalmente são empregados partículas esféricas porosas como matrizes para imobilização de ligantes. No entanto, esses materiais podem apresentar caminhos preferenciais ao operar a altas vazões, além da queda de pressão e tempo de processamento elevado devido a difusão intrapartícula. Como alternativa, busca-se matrizes que minimizem essas limitações, tais como os monolitos macroporosos. A combinação de ligantes de afinidade com suportes monolíticos tem dado origem ao método de cromatografia de afinidade em monolitos (AMC) (MALLIK; HAGE, 2006). A AMC envolve o emprego de uma fase estacionária constituída por um único bloco contínuo de material poroso (monolitos).

Os monolitos, frente as matrizes convencionais como o gel de agarose, possuem como principais vantagens o fato de que neles a transferência de massa ocorre majoritariamente por convecção, além de possibilitarem o uso de vazões mais elevadas. Ao estudarem a relação entre a velocidade da bomba (mL/min) e vazão observada (mL/min) em colunas cromatográficas, Plieva e colaboradores (2004a) reportaram o perfil linear para criogel de poliacrilamida, testando-se vazões de até 14 mL/min, enquanto que para colunas de geometria similar empacotadas com géis comerciais os desvios da linearidade foram notados ao se empregar vazões de 3 e de 8 mL/min (para Sephadex G-100 e Sephacryl S-1000 SF, respectivamente).

Os monolitos sintetizados a partir de polimerização a baixas temperaturas ($T < -10^{\circ}\text{C}$), de monômeros dissolvidos em água, são denominados criogéis e são caracterizados pela sua estrutura hidrofílica e macroporosa, com poros interconectados. Esse material, pelas vantagens características dos monolitos e também por terem macroporos acessíveis a biomoléculas de diversos tamanhos, têm sido cada vez mais empregados como fase estacionária em processos de purificação por cromatografia de afinidade (BAKSHPOUR *et al.*, 2016; MALLIK; HAGE, 2006).

Desta maneira, o PEI imobilizado em monolito (criogel) pode ser um adsorvente com elevado potencial para ser utilizado em processos de purificação de anticorpos provenientes do

soro humano por cromatografia negativa, ao mesmo tempo em que não foram encontrados, na literatura consultada, estudos envolvendo este adsorvente na purificação de IgG humana.

1.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma matriz monolítica de poliacrilamida (PAAm) derivatizada com a poliamina PEI e empregá-la na purificação de IgG a partir de soro humano por cromatografia negativa.

1.2. Plano de trabalho

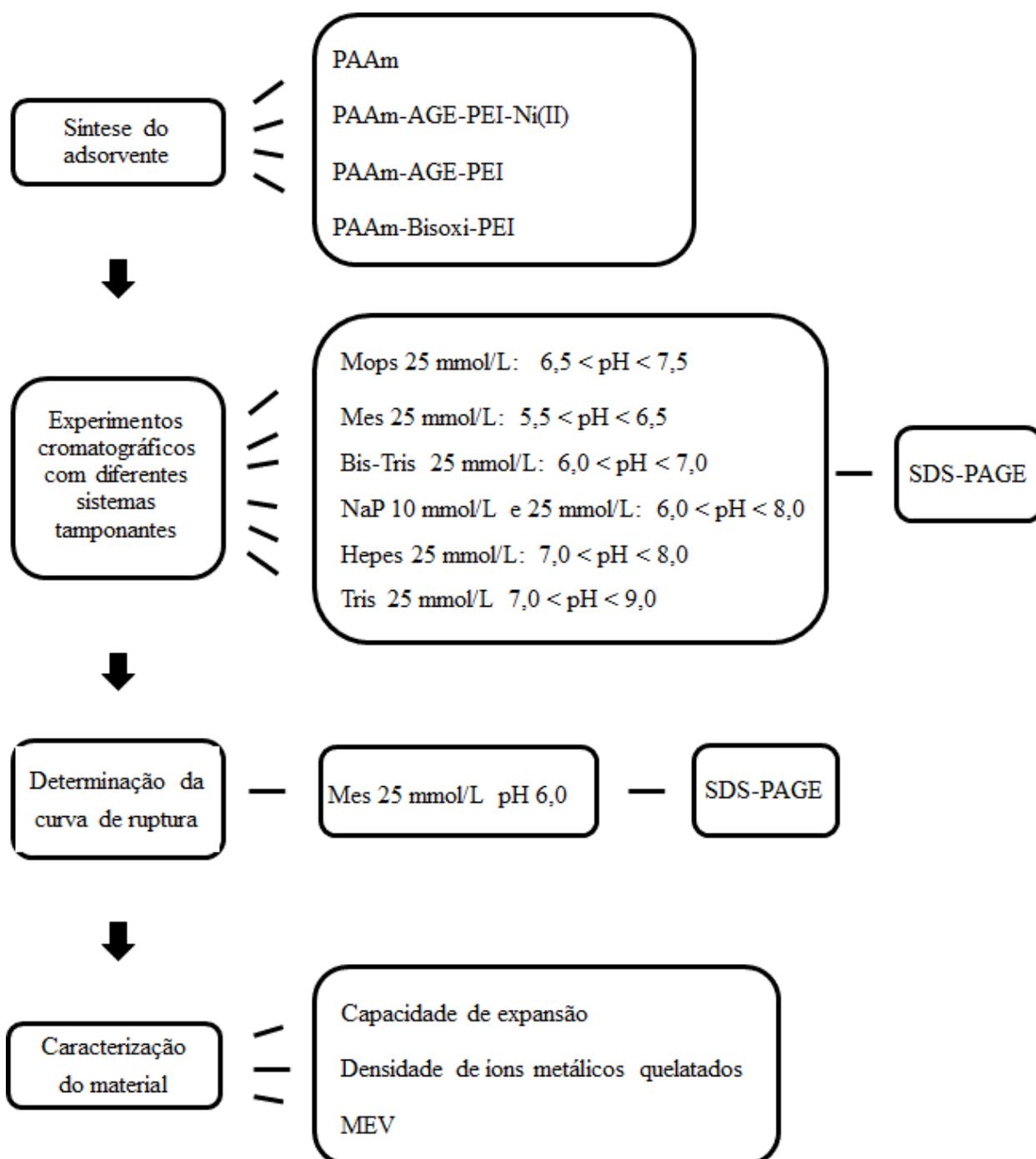
A técnica de criopolimerização foi empregada na síntese de colunas monolíticas a base de poliacrilamida, sendo posteriormente imobilizado o ligante PEI. Duas variações destas colunas monolíticas foram testadas, sendo uma sintetizada na presença do comonômero funcional alil-glicidil-éter (AGE) na mistura polimérica, quanto outra, na ausência deste comonômero, tendo sido ativada com bisoxirano (1,4 butanodiol diglicidil éter) previamente à adição do ligante.

O efeito da presença do braço espaçador bisoxirano e do comonômero AGE, do sistema tamponante, do pH e da quelação do PEI com o íon metálico níquel foi investigado visando selecionar o criogel com as características mais vantajosas e as condições que propiciassem uma melhor purificação de IgG a partir do soro humano.

Os experimentos foram realizados seguindo os seguintes passos e conforme esquematizado no fluxograma (Figura 1):

- 1) Síntese dos criogéis de PAAm, na presença de AGE ou ativado com bisoxirano, na presença ou não de ligante PEI e de íon metálico;
- 2) Determinação da capacidade de expansão dos criogéis;
- 3) Determinação da quantidade de íon metálico quelatado pelos adsorventes sintetizados;
- 4) Ensaios cromatográficos com IgG de alta pureza;
- 5) Ensaios cromatográficos visando a purificação de IgG a partir do soro humano.
- 6) Determinação da curva de ruptura (*breakthrough*) de soro humano no tampão que apresentou melhor resultado nas cromatografias de purificação de IgG a partir de soro humano.
- 7) Caracterização morfológica dos criogéis via MEV.

Figura 1 - Fluxograma das etapas para a realização do estudo da purificação de IgG humana em criogel monolítico de poliacrilamida com PEI imobilizado.



PAAm: poliacrilamida

AGE: alil-glicidil-éter

Bisoxi: bisoxirano

Ni(II): íon metálico níquel

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Imunoglobulinas

Imunoglobulinas, ou anticorpos, estão presentes no plasma de diversos organismos e atuam como principais agentes da imunidade humoral. Nos seres humanos, quando um antígeno entra no organismo, desencadeia-se uma resposta imunológica, levando a produção de anticorpos específicos pelas células derivadas dos linfócitos B (plasmócitos). Estes anticorpos são excretados para o plasma e outros fluidos extracelulares e promovem a defesa do organismo, ligando-se aos antígenos que estimularam a sua produção, através das partes específicas deste antígeno (epitopos), e promovendo a eliminação dos mesmos (WILSON; WALKER, 2010).

Os anticorpos podem ser do tipo policlonal ou monoclonal. Anticorpos policlonais se originam de diversos clones de diferentes células, mas que reconhecem o mesmo antígeno. São amplamente utilizados em testes diagnósticos, principalmente pelo seu menor custo, mas são menos específicos já que reagem com vários epitopos do antígeno. Os anticorpos monoclonais (AcM) distinguem-se dos policlonais por serem moléculas idênticas secretadas por um só tipo de linfócito B e seus clones, sendo comumente obtidos pela técnica de cultivo *in vitro* a partir de células de mamíferos. Devido a sua maior estabilidade, homogeneidade e especificidade, reagindo com somente um epitopo, os anticorpos monoclonais são de grande valor para fins terapêuticos e diagnósticos, mas estão associados a um alto custo de produção (WILSON; WALKER, 2010).

Quanto à sua composição, as imunoglobulinas são glicoproteínas compostas por aminoácidos e carboidratos. A unidade básica de todas as imunoglobulinas é constituída por quatro cadeias polipeptídicas estruturadas em formato de “Y”, sendo duas cadeias leves idênticas (L) (~25 kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (H) (de 50-70 kDa), unidas por ligações covalentes de dissulfeto (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007). Cada cadeia peptídica apresenta domínios variáveis (“V”) e constantes (“C”). A região Fab (*fragment antigen-binding*) do anticorpo apresenta ambos tipos de domínio e é a região responsável por interagir com o antígeno. Assim, essa região determina a especificidade do anticorpo. A região Fc (*fragment crystallizable*), por sua vez, apresenta somente domínios constantes e é responsável por ativar mecanismos efetores do sistema imunológico para neutralização e eliminação do antígeno (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007; TRIER; HOUEN, 2017).

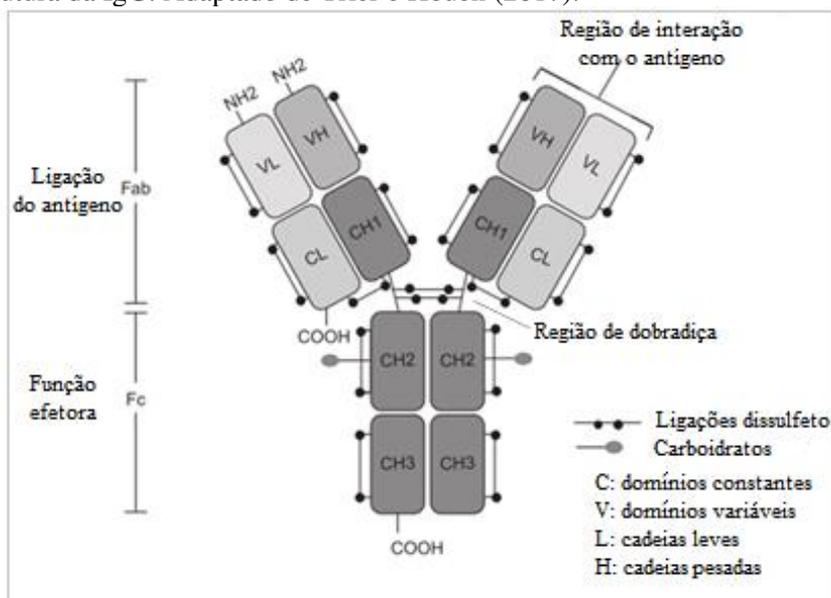
As imunoglobulinas humanas são divididas em cinco classes (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) que diferem, quanto à unidade básica, nas sequências de aminoácidos da região constante das cadeias pesadas, apresentando assim variações de massa molecular e de ponto isoelétrico (ANDERSON N. L.; ANDERSON N. G., 2002)

As interações de anticorpos com antígenos são caracterizadas pela alta afinidade e especificidade e, por esta razão, tornaram-se alvo de diversos estudos e possibilitaram a aplicação dos anticorpos nas áreas científicas e médicas. Quando utilizados em testes laboratoriais, por exemplo, possibilitam a obtenção de um vasto número de informações qualitativas e quantitativas, como a identificação de patógenos e a medição das quantidades normais e anormais de componentes sanguíneos ou de outros tecidos. De forma geral, os anticorpos podem ser aplicados em áreas como imunologia, microbiologia, hematologia e patologia. Os anticorpos monoclonais podem também ser utilizados em testes do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), radioimunoensaio, de imunofluorescência e exames imuno-histoquímicos e imunocitoquímicos para detecção de patógenos (TRIER; HOUEN, 2017).

2.1.1. Imunoglobulina G

A imunoglobulina G (IgG) é a classe mais abundante das imunoglobulinas humanas, com ponto isoelétrico entre 4,35 a 9,95, além de ser a imunoglobulina do soro humano com maior taxa de síntese (cerca de 20-60 mg/kg/dia) e maior tempo de meia-vida (cerca de 21 dias, quando comparado aos 5 dias para IgM e IgA e 2,4 dias para IgE) (PARIJA, 2009). A IgG (Figura 2) possui massa molecular de 150 kDa, sendo as cadeias leves de 25 kDa e as pesadas de 50 kDa, aproximadamente. A região de dobradiça, presente na estrutura da IgG, une as porções Fab e Fc e confere flexibilidade à esta molécula (HAMILTON, 2001; PRIN *et al.*, 1995).

Figura 2 – Estrutura da IgG. Adaptado de Trier e Houen (2017).



Em 1960, a IgG humana foi classificada em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), com base na existência de quatro subgrupos distintos de cadeias pesadas. Enquanto a sequência primária de aminoácidos das regiões constantes das cadeias pesadas são similares entre as subclasses de IgGs, as diferenças mais significativas entre elas são na região de dobradiça, no que diz respeito ao número de resíduos e de ligações dissulfídicas entre as cadeias. As subclasses mais abundantes no soro humano são IgG1 ($8,2 < pI < 9,0$) e IgG2 ($6,8 < pI < 8,0$), correspondendo respectivamente a 64% e 25% do total de IgG, enquanto que IgG3 ($7,6 < pI < 9,0$) corresponde a 7% e IgG4 ($6,4 < pI < 8,0$) aos 4% restantes (HAMILTON, 2001; PRIN et al., 1995).

A IgG tem sido empregada para detecção, prevenção e tratamento de diversas patologias, tais como infecções virais e bacterianas, câncer, doenças cardíacas, neurológicas e autoimunes (KANEKO et al., 2017; PEREZ et al., 2016). Segundo Filippidou e colaboradores (2016), manifestações clínicas parecem mais associadas a IgG do que as classes IgM e IgA. Além disso, tanto para estes fins, quanto os voltados para área de pesquisa e desenvolvimento, a IgG pode ser aplicada em técnicas de purificação de anticorpos e antígenos (HUSE; BÖHME; SCHOLZ, 2002).

2.1.2. Purificação de imunoglobulinas

O plasma humano é um fluido biológico que apresenta na sua composição mais de 3000 proteínas, sendo que mais de 95% da massa total de proteínas corresponde às 12 mais abundantes (HORTIN; SVIRIDOV; ANDERSON, 2008). Dentre estas, albumina (concentração plasmática de 50 mg/mL) e imunoglobulinas (concentração plasmática em torno de 17 mg/ml) representam 90% do total de proteínas presentes no plasma (MAES *et al.*, 2017). Por ano, mais de 22 milhões de litros de plasma humano são utilizados a fim de se obter proteínas humanas para uso terapêutico (ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L., 2002).

O uso terapêutico dos anticorpos, além de extremamente importante, representa uma oportunidade multibilionária no mercado global, tendo em vista a demanda crescente e os custos envolvidos de obtenção e comercialização. Entretanto, para esta finalidade, faz-se necessário atender as exigências de alto grau de pureza estabelecidas por órgãos regulatórios como a *Food and Drug Administration* (FDA - EUA) e a *World Health Organization* (WHO - Europa), visando a redução dos efeitos colaterais e o aumento da eficácia clínica.

Além disso, o estudo de proteínas menos abundantes do plasma humano, que podem ser biomarcadores com relevantes aplicações em diagnósticos clínicos e medicina preventiva, requer a depleção das proteínas mais abundantes – como albumina e IgG – por técnicas de purificação, tendo em vista que estas últimas podem gerar sinais que mascaram ou interferem nos sinais das proteínas presentes em menores quantidade (ROCHE *et al.*, 2009).

Para purificação de proteínas do plasma, os métodos possíveis de serem utilizados incluem precipitação por adição de etanol, polietilenoglicol (PEG) ou sal, crioprecipitação, filtração em gel e técnicas cromatográficas (troca iônica, de afinidade, imunoafinidade) (BURNOUF, 2007; PHILLIPS; MARTIN; HORTON, 1984). A escolha do método depende principalmente de fatores como rendimento, pureza do produto final, manutenção da atividade biológica dos constituintes e custo envolvido, sendo este último responsável por 50 a 80% do custo total de manufatura (HUSE; BÖHME; SCHOLZ, 2002; ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007).

A técnica de precipitação por etanol, estabelecida em 1940 por Cohn e colaboradores, é largamente aplicada para fracionamento do plasma, devido a sua simplicidade e relação custo-eficácia. O método de Cohn consiste em uma série de precipitações sucessivas em determinadas concentrações de etanol, com variações de temperatura e osmolalidade. A necessidade de recuperações mais elevadas e frações mais puras, resultou na integração de cromatografias ao processo de obtenção dessas proteínas (BURNOUF, 2007; TSCHELIESSNIG *et al.*, 2014).

A técnica de cromatografia de afinidade, devido sua alta seletividade, propicia obtenção de produtos com elevados graus de pureza, sendo por este motivo uma das mais empregadas para purificação de bioprodutos em larga escala. Contudo, ligantes de afinidade bioespecíficos tradicionalmente empregados, como as proteínas A ou G para purificação de IgG e lectinas para purificação de IgA e IgM, são obtidos por meio de etapas complexas e de elevados custos. Além disso, a alta afinidade de ligantes bioespecíficos pelos anticorpos faz com que sejam necessárias condições drásticas de eluição (baixos valores de pH), o que pode levar à agregação do anticorpo e ao desprendimento do ligante e, conseqüentemente, a contaminação do produto final. Estas desvantagens impulsionam a busca por ligantes biológicos mais simples ou ligantes sintéticos que apresentem baixo custo, resistência a degradação biológica e química, alta capacidade de adsorção, empregabilidade na purificação de tipos variados de anticorpos, baixa toxicidade e mínimo desprendimento da matriz (FASSINA *et al.*, 2001; ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007).

2.2. Cromatografia de afinidade

Nas técnicas cromatográficas, o ligante é covalentemente ligado a um suporte sólido (matriz) e a cromatografia é dita positiva quando a biomolécula alvo é adsorvida na fase estacionária, obtendo-a com alto grau de pureza nas frações de eluição, ou a cromatografia é dita negativa, quando a biomolécula alvo é recuperada com alta pureza nas etapas de *flowthrough* e lavagem da coluna. A etapa de eluição, para dessorção das proteínas adsorvidas, é alcançada pelo emprego de eluentes não específicos (mudanças de pH, força iônica, temperatura) ou específicos (agentes competitivos) (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007).

A cromatografia de afinidade por sua vez é tradicionalmente utilizada para purificação de biomoléculas, tais como os anticorpos, e tem como base a interação específica e reversível entre a molécula de interesse e um ligante imobilizado na fase estacionária. Por ser altamente seletiva, permite a obtenção de IgG com alto grau de pureza, com elevado rendimento e mínimo de perdas por degradação proteolítica e desnaturação (HUSE; BÖHME; SCHOLZ, 2002). Desta forma, é a técnica mais empregada na obtenção de IgG para fins medicinais/terapêuticos, uma vez que a eliminação de impurezas no produto final pode reduzir os efeitos colaterais do seu uso clínico.

Nesta técnica, pode-se utilizar uma variedade de tipos de agentes de interação (ligantes) e de suportes sólidos (matrizes), sendo estes escolhidos apropriadamente caso a caso. Para atingir a recuperação e a pureza desejada do produto de interesse, bem como possibilitar que a

purificação seja feita em larga escala, é necessária a otimização de fatores como seletividade (resposta a biomoléculas com uma característica em comum), especificidade (resposta a uma biomolécula específica), reprodutibilidade e custo. Por esta razão, é crescente a busca científica pela combinação ideal de matrizes e ligantes que, quando submetidas a metodologias apropriadas, possibilitem a purificação do anticorpo de interesse de maneira econômica e eficiente (ARORA; SAXENA; AYYAR, 2016).

2.2.1. Matrizes em cromatografia de afinidade

Na cromatografia de afinidade, a fase estacionária consiste de uma matriz sólida com um ligante imobilizado covalentemente. As matrizes podem pertencer às classes orgânicas naturais (por exemplo, agarose e dextrana) ou sintéticas (por exemplo, acrilamida e polimetacrilato), ou inorgânicas (por exemplo, sílica, fibras de vidro e cerâmica). É desejável que sejam hidrofílicas, que apresentem o mínimo de interações não específicas, que sejam insolúveis nas soluções empregadas nas etapas de ativação da matriz, imobilização do ligante e operação da coluna e que permitam vazões condizentes ao processo desejado. Além disso, devem apresentar alta estabilidade química e mecânica, possuir grupos funcionais que possibilitem a modificação química (ativação) e exibir elevada porosidade e área superficial (HUSE; BÖHME; SCHOLZ, 2002; MALLIK; HAGE, 2006; ARORA; SAXENA; AYYAR, 2016;).

Para que ocorra adsorção de biomoléculas, é fundamental que estas tenham acesso aos poros da matriz para que possam interagir com os sítios de adsorção. Este acesso é dependente do tipo de matriz utilizada e será maior quanto menor for a resistência à transferência de massa imposta pelo suporte sólido. Quando o processo de transferência de massa é regido pela convecção, essa resistência é mínima, favorecendo a adsorção (ALKAN *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, diversos tipos de matrizes foram desenvolvidas na tentativa de contornar as desvantagens associadas às comumente empregadas, como, principalmente, a resistência a transferência de massa, e de se obter valores ótimos de recuperação e purificação. O desenvolvimento de matrizes esféricas de agarose e do método de ativação por brometo de cianogênio (CNBr) possibilitaram avanços no acoplamento covalente de proteínas e peptídeos a materiais polissacarídicos. A toxicidade de agentes de ativação, como o CNBr, a dificuldade de ativação utilizando alguns outros agentes, a complexidade da etapa de imobilização do ligante motivaram o desenvolvimento e comercialização de matrizes pré-ativadas, tornando-se um

marco na evolução das matrizes cromatográficas (HJERTÉN, 1964; AXÉN; PORATH; ERNBACK, 1967; ARORA; SAXENA; AYYAR, 2016).

Atualmente, matrizes de diversas composições e formatos são empregadas como fase estacionária em processos cromatográficos. A escolha da matriz depende de fatores como facilidade de obtenção, custo associado, facilidade de modificação química (ativação e mobilização de ligantes), condições de operação (vazão, força iônica e pH), características das moléculas a serem adsorvidas (principalmente no que se refere ao binômio tamanho/massa), etc. As partículas esféricas porosas, como de agarose e de sílica, por exemplo, são frequentemente empregadas em matrizes em cromatografia, mas apresentam como desvantagem o transporte de matéria regido por difusão, impondo assim uma maior resistência a transferência de massa. Já os géis de ágar e agarose são mais vantajosos que os géis de poliacrilamida e dextrana quanto a purificação de biomoléculas maiores, tais como células, mitocôndrias e microssomos. O uso de membranas de afinidade surgiu para contornar a queda de pressão ao longo das colunas cromatográficas e os elevados custos associados, além de terem como vantagem menores limitações a transferência de massa (HJERTÉN, 1964; SUN; SEHON, 1965; ARORA; SAXENA; AYYAR, 2016; DEMIRYAS et al., 2007).

Mais recentemente, observa-se o emprego crescente de suportes sólidos monolíticos de poliacrilamida, glicidil metacrilato e derivados de acrilamida como fase estacionária em cromatografia de afinidade para purificação de lisozima, imunoglobulinas e diversas outras proteínas. Esses materiais, devido a presença de poros altamente conectados na sua estrutura, têm a transferência de massa regida por convecção, sendo tidas como matrizes promissoras para a separação de nano e micro biomoléculas (MALLIK; HAGE, 2006; ERTÜRK; MATTIASSON, 2014).

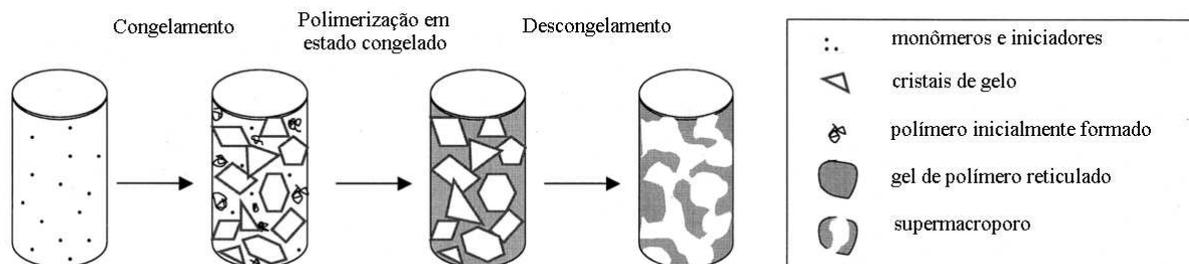
2.2.1.1. Monolitos como fase estacionária em cromatografia

Monolitos são matrizes cromatográficas constituídas por um único bloco contínuo de material poroso na forma de discos ou tubos. Os monolitos podem ser produzidos a partir de materiais orgânicos, naturais e inorgânicos, e são caracterizados principalmente por seu tamanho de poros maiores que os encontrados nas matrizes convencionais. Estes macro e mesoporos permitem que o transporte de solutos para o interior dos poros seja dado não só por difusão mas também por convecção, resultando em uma menor resistência à transferência de massa, além de possibilitar que biomoléculas grandes, como por exemplo os plasmídeos, acessem os poros (ZÖCHLING *et al.*, 2004).

Os principais tipos de suportes monolíticos reportados na literatura são os sintetizados a partir da sílica e os resultantes de polimerização. O crescente uso de monolitos como fase estacionária de cromatografia se deve, principalmente, as suas seguintes vantagens: poderem ser sintetizados já no interior de colunas e capilares, assumindo diferentes formas; serem resistentes a altas vazões, promovendo uma separação mais rápida e reduzindo o tempo de análise; possibilitarem uma transferência de massa por convecção, aumentando a eficiência de separação; poderem ser submetidos a diversas reações químicas para modificação da sua estrutura. Dentre os diversos tipos de monolitos que têm seu uso em cromatografia de afinidade reportados na literatura, encontram-se os sintetizados pela técnica de criogelificação (MALLIK; HAGE, 2006; CERNIGOJ *et al.*, 2016).

Os criogéis são géis produzidos sob condições criogênicas, ou seja, em temperaturas abaixo do ponto de congelamento do solvente. Conforme ilustrado na Figura 3, durante a etapa de congelamento da mistura líquida contendo os monômeros e o iniciador, cristais de gelo -de solvente- são formados e a polimerização e a reticulação ocorrem ao redor desses cristais. Estes cristais atuam como agentes porogênicos pois, ao serem descongelados, os espaços que ocupavam tornam-se vazios, originando assim poros no monolito. Portanto, os tamanhos e formas destes macroporos são definidos pelo tamanho e forma dos cristais. Além disso, durante o processo de polimerização, são também gerados microporos entre as cadeias poliméricas formadas (LOZINSKY *et al.*, 2003; PLIEVA *et al.*, 2004b; SAHINER; DEMIRCI, 2016).

Figura 3 - Esquema de formação do criogel a partir da mistura reacional polimérica. Adaptado de Plieva e colaboradores (2004a).



Desta forma, os criogéis apresentam estrutura “heteroporosa” caracterizada pela presença de inúmeros micro e macroporos altamente interconectados e de tamanhos de 10 a 200 μm . A depender da sua composição, podem ainda estar associados a uma alta resistência mecânica, estabilidade e à presença mínima de interações não-específicas. A diferença mais relevante entre criogéis e outros materiais macroporosos é o fato destes primeiros serem altamente elásticos, podendo ser comprimidos inúmeras vezes, sem que sua estrutura porosa sofra danos (DEMIRYAS *et al.*, 2007; ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; EROL *et al.*, 2016).

Essa elasticidade possibilita a remoção mecânica da água livre que ocupa os interiores dos poros pequenos e grandes do polímero. Além dessa água livre, os criogéis também apresentam moléculas de água que interagem quimicamente com o polímero.

As propriedades dos criogéis, tal como a distribuição do tamanho de poro e a sua espessura da parede, podem variar de acordo com o pH, a quantidade de água e de outros solventes, gradiente de temperatura e concentração de monômeros que foi aplicada durante a etapa de polimerização. Ainda não existem técnicas consolidadas para medir o tamanho do poro e sua distribuição em criogéis no seu estado úmido, segundo a literatura consultada (YAO; LENHOFF, 2004; PLIEVA et al., 2005; GUN'KO; SAVINA; MIKHALOVSKY, 2013).

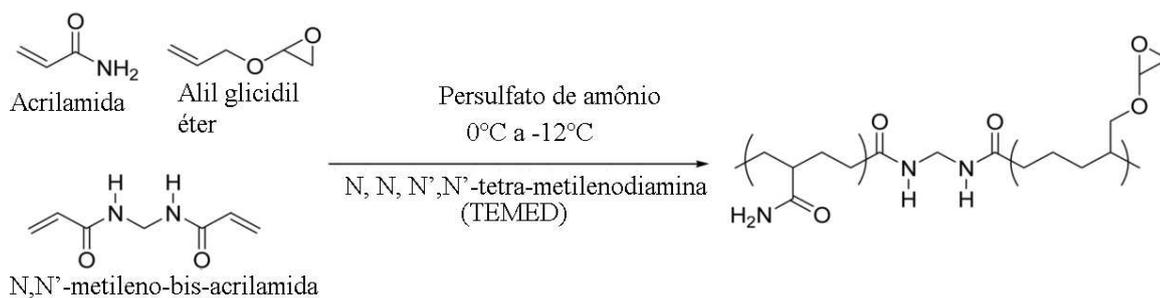
Na literatura é possível encontrar o emprego de criogéis monolíticos para cultivo de células microbianas e de mamíferos e como fase estacionária para purificação de diversos bioprodutos (KUMAR et al., 2005, 2006^a; BABAC et al., 2006; ERTÜRK; MATTIASSON, 2014). A fim de aprimorar os processos de biosseparação e maximizar a capacidade de adsorção dessas matrizes, é de grande importância o estudo dos criogéis

2.2.1.2. Criogel de poli(acrilamida) como fase estacionária em cromatografia

Colunas monolíticas supermacroporosas sintetizadas a partir de monômeros de acrilamida são apontadas como matrizes promissoras para purificação via cromatografia de nano e micropartículas biológicas, tais como plasmídeos, vírus, organelas e até mesmo células. Os criogéis de poli(acrilamida) são os mais utilizados dentre os criogéis reportados na literatura e, conseqüentemente, suas características já são bem conhecidas. Sua síntese envolve tanto polimerização quanto reticulação (KUMAR et al., 2010; LOZINSKY et al., 2003).

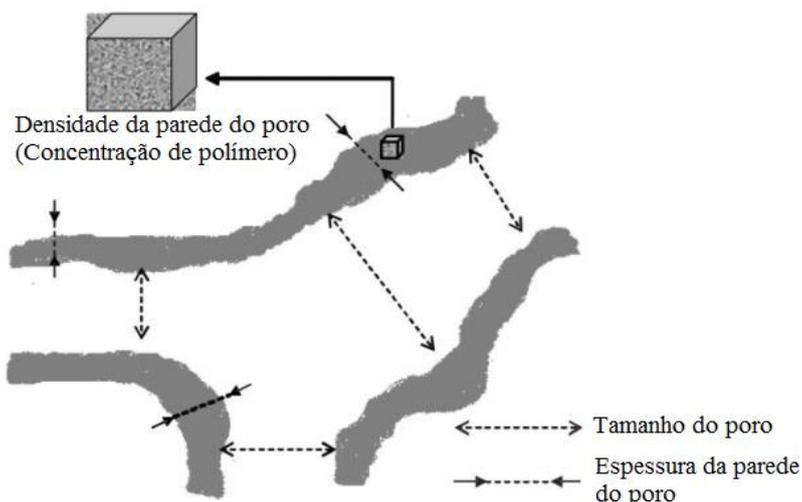
A síntese destes materiais é comumente feita pela copolimerização radicalar de monômeros de acrilamida com alil glicidil éter (AGE) e o agente reticulante N,N'-metileno-bis-acrilamida, a temperaturas abaixo de zero grau Celsius (entre -5°C e -20°C). O AGE, apesar de não ser um reagente indispensável na síntese do criogel, é geralmente utilizado para introduzir um grupamento funcional epóxi, possibilitando sua posterior conversão em um trocador aniônico, ou a inclusão de um agente quelante ou de um ligante (ERTÜRK; MATTIASSON, 2014; GUN'KO; SAVINA; MIKHALOVSKY, 2013; PLIEVA et al., 2004a). A reação associada a esta síntese encontra-se esquematizada na Figura 4.

Figura 4 - Reação de formação do criogel de poliacrilamida. Adaptado de Mallik e Hage (2006).



A estrutura porosa característica dos criogéis de poliacrilamida é função da temperatura de congelamento, da concentração de monômeros inicialmente presente na mistura reacional, e do tipo e quantidade de agente reticulante. O tamanho dos poros controla a resistência ao fluxo e, junto à espessura da parede do poro, definem o volume total de poro no criogel de poliacrilamida. Esta espessura, concomitante à densidade (concentração do polímero) das paredes do poro, determina as propriedades mecânicas macroscópicas do criogel, enquanto que a acessibilidade dos ligantes quimicamente associados ao polímero é afetada pelo tamanho do poro e pela densidade da parede do poro (PLIEVA *et al.*, 2005). Estes parâmetros, que afetam a performance do criogel, são ilustrados na Figura 5.

Figura 5 - Parâmetros da estrutura do criogel que afetam sua performance. Adaptado de Plieva e colaboradores (2005).



O trabalho desenvolvido por Plieva e colaboradores (2005) demonstra que o aumento na concentração de monômeros na mistura reacional provoca o aumento da resistência ao fluxo, ao mesmo tempo em que diminui a capacidade de expansão e aumenta a quantidade de água associada ao polímero.

Para aplicações biomédicas e biotecnológicas é comum a imobilização de um ligante na matriz polimérica, sendo este capaz de estabelecer interações específicas e seletivas com a biomolécula alvo. Os parâmetros da estrutura dos criogéis afetam, portanto, a acessibilidade das biomoléculas aos sítios de interação dos ligantes imobilizados. A presença de maior número de canais interligados tem como vantagem, por exemplo, proporcionar maior acessibilidade de biomoléculas grandes (CERNIGOJ *et al.*, 2016).

2.2.2. Ligantes empregados em cromatografia de afinidade

Para purificação de anticorpos, as técnicas com base em afinidade têm sido as mais utilizadas e que demonstram maior eficiência, tanto nas escalas laboratoriais quanto industriais. A separação por afinidade baseia-se no reconhecimento entre a biomolécula de interesse e o ligante covalentemente imobilizado a um suporte sólido. Os ligantes atualmente utilizados variam de moléculas biológicas, engenheiradas ou totalmente sintéticas, desenvolvidas para possuírem elevada seletividade além de resistência e estabilidade otimizadas (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007).

Os ligantes imobilizados à matriz polimérica e utilizados na cromatografia de afinidade são então divididos em duas classes: bioespecíficos e pseudobioespecíficos. Estes primeiros, que incluem antígenos, anticorpos, lectinas, cofatores, dentre outros, apesar da sua alta especificidade, são geralmente mais custosos, mais difíceis de imobilizar e mais propícios a desnaturação ao longo do tempo, enquanto que os ligantes pseudobioespecíficos, tais como aminoácidos e íons metálicos imobilizados, são mais simples e também demonstram alta afinidade por biomoléculas (VIJAYALAKSHMI, 1989).

Em comparação aos ligantes bioespecíficos, como Proteína A, os ligantes pseudobioespecíficos apresentam custos, toxicidade e imunogenicidade inferiores, esterilização *in situ* facilitada na produção em larga-escala, além de terem maior resistência à degradação química e bioquímica. Por serem mais estáveis, são menos susceptíveis a se desprenderem da matriz e contaminarem o produto final. Além disso, ligantes pseudobioespecíficos possibilitam a eluição em condições brandas. Desta maneira, eles têm sido empregados na purificação de enzimas e de diversas outras proteínas e continuam sendo alvo de diversos estudos (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007; SAVANE *et al.*, 2016).

Para purificação de anticorpos por cromatografia de pseudoafinidade, diversas moléculas biológicas, como o aminoácido histidina, e sintéticas, como o tiofílico 2-mercaptoetanol, já foram empregadas como alternativas em substituição da proteína A,

comumente utilizada. Todavia, alguns destes ligantes podem ter seu uso limitado devido a sua menor seletividade ou à necessidade de se empregar condições tamponantes nem sempre compatíveis com a manutenção da atividade da biomolécula de interesse. Estas razões, bem como a exigência por parte das agências reguladoras de se conhecer detalhadamente as características e propriedades destes compostos, principalmente no que se refere ao desprendimento e toxicidade, fomentam a busca por ligantes alternativos que sejam estáveis, seletivos e proporcionem uma elevada recuperação e grau de pureza. É desejável também, que estes ligantes possam ser aplicados na purificação de mais de um tipo de imunoglobulina e, de preferência, possibilitem a purificação em larga-escala (FASSINA *et al.*, 2001).

Além do propósito de purificação, os ligantes empregados em cromatografia de afinidade são capazes de estabelecer interações seletivas e reversíveis com as biomoléculas de forma similar às interações presentes em diversos sistemas biológicos, o que permite a utilização da cromatografia de afinidade como um método para estudar e modelar as interações químicas e bioquímicas que ocorrem em sistemas vivos, sendo portanto de grande interesse para aplicações clínicas e farmacêuticas (HAGE, 2017).

2.2.2.1. Polietilenoimina (PEI) como ligante em cromatografia

As aminas são compostos orgânicos oriundos da substituição de um ou mais hidrogênios da amônia por grupamentos alquila ou arila. Se houver um, dois ou três grupamentos ligados ao nitrogênio, a amina é definida como primária, secundária ou terciária, respectivamente. As aminas apresentam elevado valor de pKa, atuando como bases, de forma que quanto maior o valor do seu pKa, maior seu caráter nucleofílico (BRUICE, 2003)

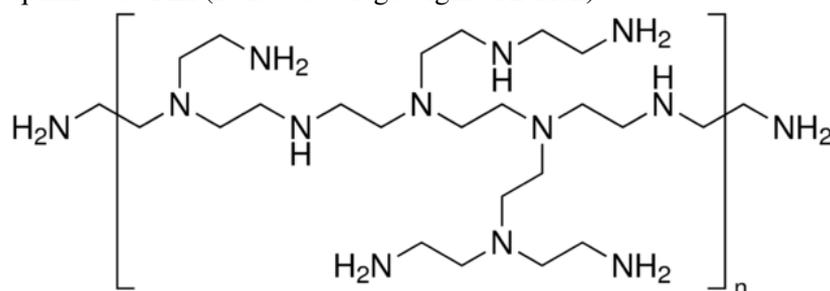
Poliaminas são compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura dois ou mais grupamentos aminas. Visto que são policações, as poliaminas são um excelente recurso para interagir eletrostaticamente com moléculas carregadas negativamente em pH neutro, tal como DNA, RNA e algumas proteínas (HOUEN, 2001). A depender do tamanho da cadeia alquila, as poliaminas também são capazes de estabelecer interações hidrofóbicas. As matrizes com poliaminas permitiram obtenção de produtos com elevado grau de pureza, tendo sido empregadas em estudos com lactoferrinas, plasminogênios e outras proteínas. Além disso, assim como ligantes pseudobioespecíficos, são estáveis, simples e seletivas (DE SOUZA; BRESOLIN; BUENO, 2010; MINOIS; CARMONA-GUTIERREZ; MADEO, 2011).

Poliaminas podem ser immobilizadas em diferentes matrizes ativadas com agentes tais como brometo de cianogênio (CNBr), epícloridrina, divinilsulfona e bisoxirano. Apesar do

potencial de purificação das poliaminas como ligantes, ainda se faz necessário elucidar o efeito da quantidade de grupamentos amino, da sua natureza (primária, secundária ou terciária) e do tamanho da cadeia alquila, bem como da presença de braço espaçador e das condições de operação no processo de purificação de proteínas por cromatografia (DE SOUZA; BRESOLIN; BUENO, 2010).

O PEI é um polímero altamente ramificado, de elevada massa molecular ($M_n \sim 10000$; $M_w \sim 25000$), obtido a partir da polimerização de aziridina (etilenoimina) e que possui forte potencial catiônico. Os grupamentos aminos presentes na sua estrutura química (Figura 6) possuem valores de pKa entre 10 e 11, conferindo a este composto uma carga positiva em uma ampla faixa de pH. A elevada densidade de cargas positivas presente no PEI possibilita o estabelecimento de fortes interações eletrostáticas com moléculas de carga negativa, tal como ácidos nucleicos (BURGESS, 2009; FLOREA *et al.*, 2002; JAGER *et al.*, 2012).

Figura 6 - Estrutura química do PEI (Fonte: Catálogo Sigma-Aldrich).



Comercialmente, o PEI é geralmente utilizado como aditivo na indústria de papel e na indústria têxtil, e também como floculante no processo de tratamento de água. É também reportado o uso do PEI em aplicações clínicas *in vivo*, em que atua como carreadores não-virais de material genético na terapia gênica (JAGER *et al.*, 2012). Além disso, seu alto potencial catiônico tem sido empregado para remoção de componentes aniônicos de soluções aquosas, tal como a de íons fosfato (ANIRUDHAN; RAUF; REJEENA, 2012).

A aplicação e eficiência do PEI são influenciadas por diversos parâmetros estruturais, tal como massa molar, tipo, número e densidade de cargas, estrutura tridimensional e flexibilidade. PEI com um grande número de ramificações, elevada massa molar e estrutura flexível estabelece fortes interações eletrostáticas com ácidos nucleicos carregados negativamente (JAGER *et al.*, 2012).

Na literatura são reportados diversos trabalhos que aplicaram PEI para adsorção de proteínas diversas. Torres e colaboradores (2006), ao estudarem a adsorção de proteínas do extrato de *Escherichia coli*. em matrizes de agarose, reportaram que suportes cromatográficos

com PEI imobilizado (PEI-agarose), quando comparados a suportes convencionais (DEAE-Sephrose), promovem a adsorção de uma maior quantidade de proteínas e são capazes de adsorver tipos de proteínas que não são adsorvidas nestes últimos. Tal fato é justificado não só devido ao maior número de grupos carregados na estrutura do PEI, mas também por, dada a flexibilidade desse polímero, ser maior a área superficial que estabelece interações com a proteína.

Wang e colaboradores (2013) ao estudarem adsorção de lipase, pectinase, α -amilase, celulase e papaína em microesferas de poliamina, empregando valores de pH entre os valores de pI da microesfera (10,6) e das proteínas, identificaram que a adsorção de proteínas é regida pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas, sendo as interações hidrofóbicas mais importantes para adsorção de lipase, quando comparada as demais proteínas testadas.

Erol e colaboradores (2016) desenvolveram criogéis molecularmente impressos a partir de criogel de metacrilato com PEI imobilizado, empregando-os para purificação de lisozima tanto em soluções aquosas quanto direto da fonte natural (clara de ovo de galinha). Além disso, ao testarem a purificação na presença de proteínas competidoras (albumina e citocromo c), obtiveram uma elevada seletividade. Murakami e colaboradores (2009) ao empregarem matriz de hidroxiapatita (HAp) na cromatografia das proteínas ovoalbumina, α - quimiotripsinogênio-A, mioglobina e citocromo C, observaram que apenas quando na presença do ligante PEI esta coluna era eficiente para purificação seletiva dessa mistura proteica. Neste mesmo estudo, os resultados também demonstraram que a coluna HAp-PEI oferece vantagens quando comparada a colunas de sílica-PEI e celulose PEI por ser estável em condições alcalinas e possuir uma maior estabilidade mecânica e durabilidade.

Quando na presença de quelato metálico, o criogel oriundo da mistura polimérica de álcool polivinílico (PVA) e PEI também demonstrou resultados promissores na depleção de hemoglobina de extratos de sangue hemolisado (GÖKTÜRK *et al.*, 2016). Sahiner e Demirci (2016) sintetizaram um criogel de PEI utilizando uma mistura aquosa de PEI de diferentes massa molares e, estudando cromatografia de albumina de soro bovino (BSA) nesse material, obtiveram valores de adsorção de 36,4 mg BSA/g criogel seco, valores estes superiores aos encontrados na literatura utilizando matrizes convencionais, bem como demonstraram sua eficiência na separação de corantes orgânicos, removendo efetivamente o azul de metileno de uma mistura contendo alaranjado de metila e eosina Y.

No ramo da medicina terapêutica, diversos trabalhos empregam o PEI para remoção de endotoxinas bacterianas. As endotoxinas são lipopolissacarídeos da parede celular externa das bactérias Gram-negativas e, quando presentes no sangue –quadro denominado endotoxemia–

podem ocasionar reações adversas nos pacientes. Pacientes submetidos repetitivamente a hemodiálise são mais suscetíveis a endotoxemia, o que pode agravar seu quadro clínico. Além disso, agentes antibacterianos também podem provocar endotoxemia enquanto agem contra as bactérias. Desta forma, se faz necessário desenvolver técnicas para neutralizar as endotoxinas. Mitzner e colaboradores (1993) obtiveram total remoção de endotoxinas do plasma e da água a partir de esferas celulósicas macroporosas com PEI imobilizado, demonstrando a alta eficácia do PEI e seu potencial para tratamentos de endotoxemia. Resultado semelhante foi obtido por Hanora e colaboradores (2005) utilizando PEI imobilizado em criogel de poliacrilamida ativado com bisoxirano. Este trabalho apontou também a possibilidade de se empregar vazão de 10 ml/min para esta coluna monolítica proceder a detoxificação de lisados de células de *Escherichia coli*, não havendo perda na capacidade de adsorção, enquanto que para a coluna de Sepharose 4B ativada a vazão máxima que pôde ser empregada sem que houvesse colapso da matriz foi de 1 ml/min, reduzindo assim o tempo necessário para processar o mesmo volume de solução alimentada.

Além de ligante, o PEI é também um importante agente quelante para vários metais. O PEI é um dos quelantes policatiônicos que originam uma matriz hidrofílica tridimensional altamente ramificada, podendo ser empregado como agente quelante na técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Esta, por sua vez, baseia-se na afinidade das proteínas por íons metálicos, como por exemplo, os de transição Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), quelatados a uma matriz (BAKSHPOUR *et al.*, 2016; CHAGA, 2001).

A estabilidade dos quelatos metálicos, bem como sua capacidade em adsorver proteínas, sofre influência não apenas do metal e do agente quelante empregado, mas também dos parâmetros empregados, tais como a natureza do tampão, pH, força iônica e concentração da solução de íons metálicos alimentada a coluna (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

Apesar dessa interação do PEI com os íons metálicos ainda ser pouco conhecida e demandar mais estudos na área, sabe-se que este agente quelante se complexa de forma estável com íons de cobre, de forma que quatro nitrogênios da cadeia polimérica são utilizados para quelatar um íon de cobre (Cu(II)) (MAKETON; ZENNER; OGDEN, 2008). São reportados na literatura estudos em que adsorventes contendo PEI foram aplicados com sucesso na remoção seletiva de metais dissolvidos em solução aquosa, obtendo-se, em alguns casos, resultados superiores a resinas comerciais empregadas com a mesma finalidade (DURU *et al.*, 2001; PANG *et al.*, 2011; ZANDER, 2009).

Türkme, Yavuz e Denizli (2006) ao empregarem esferas magnéticas de hidroxietilmetacrilato com PEI imobilizado, obtiveram uma capacidade de adsorção de

citocromo C correspondente a 4,6 mg/g de polímero seco. Este valor, quando na presença de íons de cobre quelatados ao PEI, elevou-se para 40,1 mg/g de polímero seco, demonstrando a presença de interações específicas entre a proteína e o íon metálico.

Com o potencial de purificação do PEI como ligante ou como agente quelante em cromatografia tendo sido demonstrados nesses variados estudos e tendo em vista a crescente procura por adsorventes de alta durabilidade e que sejam biocompatíveis e biodegradáveis, intensificaram-se as pesquisas envolvendo este composto, visando principalmente aplicações nas áreas de terapia gênica e de separação e purificação de biomoléculas.

2.3. Purificação de proteínas por cromatografia negativa

A cromatografia negativa consiste na adsorção das impurezas de uma solução proteica na matriz cromatográfica, enquanto que a molécula de interesse, por não interagir com a matriz, é obtida na etapa de *flowthrough* e lavagem (LEE; CHAN; TEY, 2014). Diversos autores utilizaram a cromatografia negativa como técnica para separação de vírus, enzimas, hemoglobina e IgG (BROOKS; STOREY, 1996; DE SOUZA; BRESOLIN; BUENO, 2010; IYER et al., 2011; LU; ZHAO; SU, 2004).

O pH e a condutividade do tampão empregado são fatores decisivos para a adsorção de impurezas. O valor de pH afeta o grau de ionização e as cargas dos grupamentos constituintes não só da proteína alvo, como também das impurezas (LEE; CHAN; TEY, 2014; LEVISON, 2003). Segundo Levison (2003), a escolha entre cromatografia positiva e negativa é influenciada por diversos fatores, sendo os dois principais: a) a razão entre a quantidade de proteína de interesse e impurezas, sendo a cromatografia negativa preferível quando as impurezas se encontram em menor quantidade de forma a maximizar a capacidade do adsorvente; b) a necessidade de se ajustar o sistema tamponante e os custos envolvidos neste ajustes para possibilitar que as biomoléculas de interesse presentes na solução de alimentação sejam adsorvidas na matriz cromatográfica.

O uso de um pH adequado, junto à utilização de ligantes de carga positiva, tais como TREN, aminohexil e L-lisina, possibilitam que a IgG, de carga positiva, seja repelida e conseqüentemente flua pela coluna sem ser adsorvida. Da Silva e colaboradores (2014) obtiveram uma purificação eficiente de Fab a partir de IgG humana clivada (106% de pureza) por cromatografia negativa empregando uma matriz de agarose com TREN imobilizado e íon metálico níquel quelatado. De Souza, Bresolin e Bueno (2010) purificaram IgG humana a partir

de soro e de plasma humano por cromatografia negativa utilizando matriz de agarose (ativada com CNBR ou bisoxirano) com ligante aminoetil imobilizado.

O emprego de ω -aminoetil e de PEI como ligantes imobilizados em gel de agarose possibilitou a purificação de fragmentos Fab a partir de IgG humana clivada por cromatografia negativa. Neste trabalho desenvolvido por Carmignotto, Mourão e Bueno (2017b) foram obtidos valores de pureza e recuperação acima de 96% e 93%, respectivamente.

Pitiot e colaboradores (2001) obtiveram resultados promissores ao utilizarem a técnica de cromatografia negativa e o adsorvente histidina-aminoetil–Sepharose 4B para purificação de proteínas do plasma humano, como a imunoglobulina G (IgG), visando aplicações biomédicas. Outros trabalhos reportados na literatura demonstram que o emprego da cromatografia negativa de troca iônica, em determinadas condições tamponante (valores de pH), possibilitou a purificação com elevadas taxas de recuperação e de grau de pureza, de vírus, enzimas, hemoglobinas e imunoglobulinas G (BROOKS; STOREY, 1996; LU *et al.*, 2004; WONGCHUPHAN *et al.*, 2011). Utilizando cromatografia negativa, Wang e colaboradores (2011) obtiveram valores de recuperação e pureza de IgG de origem animal superiores aos obtidos na purificação da mesma proteína por cromatografia positiva.

A cromatografia negativa de imunoafinidade é geralmente aplicada para remoção de traços de proteínas, bem como para separação de subclasses das imunoglobulinas humanas. Segundo Lee, Chan e Tey (2014), a purificação de IgG a partir de soro humano demonstra ser a aplicação mais promissora da técnica de cromatografia negativa. Além disto, essa técnica pode ser aplicada também com a finalidade de se obter soros que contenham somente uma subclasse de IgG humana, utilizando-se uma matriz com anticorpos monoclonais imobilizados de forma que estes interajam com somente três das quatro classes de IgG humana (PERSSON, 1987).

Percebe-se então que, apesar de ainda pouco estabelecida como método de biopurificação, a cromatografia negativa exibe um elevado potencial, principalmente no que se refere a purificação de IgG a partir de soro e plasma. A possibilidade de empregar esta técnica cromatográfica, ou outros modos de cromatografia que sejam também promissores, a suportes sólidos com ligantes imobilizados que resultem em matrizes adsorventes com características vantajosas em relação as matrizes comumente empregadas, no que se refere por exemplo a estabilidade química e mecânica, aos riscos de contaminação do produto final, a resistência a transferência de massa, a capacidade de adsorção e seletividade, ao emprego de altas vazões, a possibilidade de ampliação para larga escala, tem impulsionado assim os recentes estudos na área.

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os reagentes acrilamida, persulfato de amônio, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (Hepes), ácido morfolinopropanosulfônico (Mops), ácido (2[N-morpholino]etanesulfônico (Mes), dodecil sulfato de sódio (SDS), glicina, tris(hidroximetil)aminometano (Tris), sulfato de níquel (II) hexahidratado, gamaglobulina humana ($\geq 99\%$ por eletroforese, IgG), alil glicidil éter (AGE), ácido iminodiacético (IDA), solução de 50% (m/v) de polietilenoimina em água (PEI, Mw 750.000), borohidreto de sódio, 1,4-butanodiol diglicil éter (bisoxirano), albumina de soro bovino (BSA, 98% de pureza), glicerol e soro humano (esterilizado, filtrado; de plasma humano masculino de tipagem AB) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado, fosfato de sódio monobásico monohidratado, cloreto de sódio, nitrato de prata, álcool etílico absoluto, metanol, ácido cítrico, carbonato de sódio anidro e ácido fosfórico 85% foram adquiridos da Synth (Brasil). O ácido acético foi fornecido pela Êxodo Científica (Brasil). N,N-metileno-bis-acrilamida e N, N, N',N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) foram adquiridos da BioRad (EUA). Azul de comassie (brilliant blue G-250), glutaraldeído e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Vetec (Brasil). O marcador de alta massa molecular (HMW-SDS) foi fornecido pela GE Healthcare (EUA). Formaldeído, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e sulfato de cobre (II) pentahidratado foram adquiridos da MERCK (Alemanha). O azul de bromofenol e ditiotriol foram obtidos da PlusOne (Suécia).

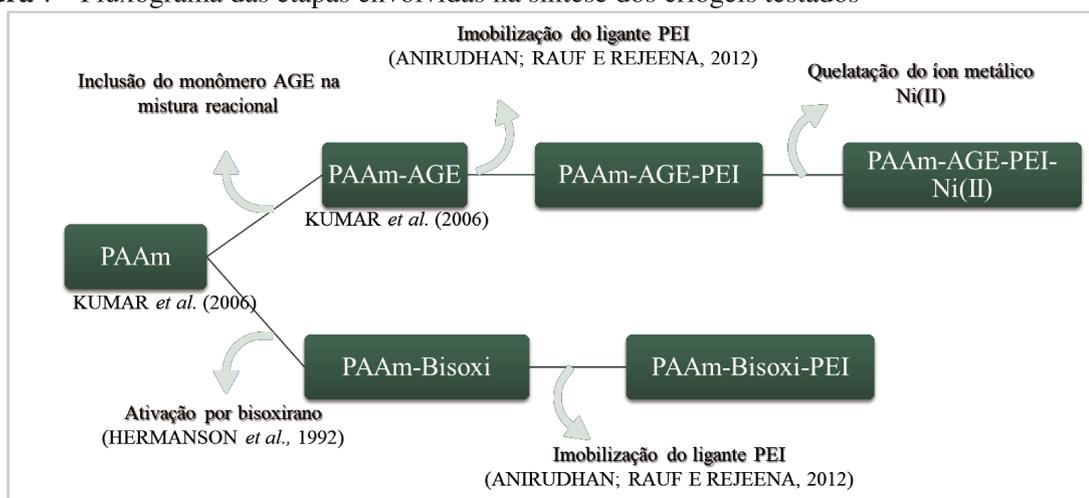
Empregou-se água purificada em equipamento Milli-Q (Millipore, EUA) para preparar todas as soluções e realizar lavagens diversas. As pesagens foram feitas em balança analítica Sartorius TE214S (Alemanha); o ajuste de pH, em pHmetro Oakton pH 510 series (Oakton, EUA) e a desgaseificação das misturas monoméricas, em cubas de banho ultrassônico Branson 3510 series (EUA). O cromatógrafo de baixa pressão utilizado foi o Biologic LP System da Biorad (EUA). As colunas vazias, preenchidas com os criogéis e utilizadas nos experimentos cromatográficos, foram as C10/20 (200 mm altura x 10 mm DI) da GE Healthcare.

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese dos criogéis

Os materiais adsorventes empregados neste trabalho foram sintetizados conforme esquematizado no fluxograma apresentado na Figura 7. Cada etapa envolvida encontra-se detalhada nos tópicos que seguem.

Figura 7 - Fluxograma das etapas envolvidas na síntese dos criogéis testados



PAAm: poliacrilamida Bisoxi: bisoxirano PEI: polietilenoimina AGE: Alil-diglicidil-éter

3.2.1.1. Criogel de poliacrilamida

A síntese do criogel de poliacrilamida foi realizada de acordo com a metodologia Kumar (KUMAR et al., 2006a). Previamente ao início do preparo do criogel, um recipiente contendo etanol foi armazenado no freezer, a temperatura de aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Monômeros de acrilamida (0,948 g) e de N,N-metileno-bis-acrilamida (0,254 g) foram dissolvidos em 19 mL de água (concentração de 6,3% m/v). Essa mistura foi então submetida a um processo de degaseificação, durante 20 min em banho ultrassônico, seguida de resfriamento em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), por aproximadamente 5 min.

A solução foi então retirada do freezer e a polimerização via radical livre foi iniciada adicionando-se 1,0 mL da solução de persulfato de amônio em água (22 mg/mL; 2,2% m/v) e TEMED (19 μL). A mistura reacional, de volume final 20,19 mL (concentração final de monômeros de 6% (m/v)), foi então fracionada entre seringas plásticas de capacidade 3,0 mL, nas quais se adicionou cerca de 1 mL em cada, e em colunas cromatográficas C10/20 (GE Healthcare, EUA), nas quais se adicionou 3,0 mL em cada.

Após serem preenchidas com a mistura reacional, as colunas e seringas foram imediatamente vedadas e imersas no recipiente contendo etanol a -20°C . Os criogéis em formação foram mantidos no freezer, em banho de etanol, por cerca de 16 h. Após esta etapa, iniciou-se o processo de descongelamento do criogel, o qual foi transferido para a geladeira e, após cerca de 1 h, foi deixado a temperatura ambiente. Depois de totalmente descongelado, o criogel foi lavado com cerca de 30 mL de água (cerca de 10 volumes de coluna), a fim de remover a porção da mistura que não reagiu. O criogel sintetizado foi denominado PAAm.

3.2.1.2. Criogel de poliacrilamida-AGE

A síntese do criogel de poliacrilamida-alil foi realizada de acordo com a metodologia Kumar (KUMAR et al., 2006a). Monômeros de acrilamida (0,948 g) e de N,N-metileno-bis-acrilamida (0,254 g) foram dissolvidos em 18 mL de água (concentração de 6,7% m/v).

Essa mistura foi então submetida a degaseificação durante 20 min em banho ultrassônico, seguida de resfriamento em freezer, por aproximadamente 5 min. Ao retirá-la do freezer, acrescentou-se o monômero funcional AGE (alil glicidil éter) (200 μL), seguido de água (800 μL). Em seguida a polimerização via radical livre foi iniciada adicionando-se 1,0 mL da solução de persulfato de amônio em água (22 mg/mL; 2,2% m/v) e TEMED (19 μL). A mistura reacional, de volume final 20,19 mL (concentração final de monômeros de 6% m/v), foi então fracionada entre seringas plásticas de capacidade 3,0 mL, nas quais se adicionou cerca de 1 mL em cada, e em colunas cromatográficas C10/20 (GE Healthcare, EUA), nas quais se adicionou 3,0 mL em cada.

As etapas de resfriamento, congelamento, descongelamento e lavagem foram feitas de maneira similar a aplicada na síntese do criogel de poliacrilamida. Este criogel sintetizado foi denominado PAAm-AGE.

3.2.2. Ativação do criogel PAAm com bisoxirano

Criogéis de poliacrilamida (PAAm) foram ativado com bisoxirano (1,4 butanediol diglicidil éter), conforme a metodologia proposta por Hermanson e colaboradores (1992). Inicialmente 20 mg de borohidreto de sódio foram dissolvidos em 10 mL de solução de NaOH 0,6 mol/L. O criogel PAAm foi retirado da coluna de vidro em que estava armazenado (volume de leito de 3 mL) e imerso nesta solução, à qual lentamente adicionou-se 10 mL de 1,4-butanodiol-diglicidil éter. O sistema foi mantido na capela sob agitação constante de 50 rpm em mesa agitadora e à temperatura ambiente por um período de 10 h.

Após ativação, a lavagem do criogel foi realizada imergindo-o em água, mantendo-o sob o mesmo sistema de agitação e trocando-se a água sucessivas vezes até que o pH da água pós-lavagem correspondesse ao da água, indicando remoção completa do excesso de reagentes. O criogel ativado foi denominado PAAm-Bisoxi.

3.2.3. Imobilização de PEI via ligação éter

A imobilização do PEI nos criogéis de poliacrilamida foi realizada com base no método descrito por Anirudhan, Rauf e Rejeena (2012). Uma mistura contendo 4,0 mL da solução de PEI e 6,0 mL de NaOH 1,25 mol/L (concentração final de PEI de 20% m/v e aproximadamente 22% v/v) foi recirculada nas colunas contendo o criogel de PAAm-AGE e PAAm-Bisoxi por 6 h e à 60 °C. Por fim, foi feita a lavagem com água durante 2 h e à 60 °C, para que o pH da solução de saída se igualasse ao pH da água na entrada, indicando remoção dos compostos não reagidos. Após a imobilização os criogéis foram denominados de PAAm-AGE-PEI e PAAm-Bisoxi-PEI, respectivamente.

3.2.4. Experimentos cromatográficos

Os experimentos cromatográficos foram conduzidos em sistema de cromatografia de fase líquida de baixa pressão (Biologic LP System – Biorad, EUA) à temperatura ambiente e com vazão de 0,5 mL/min. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.4.1. Cromatografia em coluna contendo o criogel de PAAm

A coluna cromatográfica C10/20 (GE Healthcare, EUA) contendo 3,0 mL de criogel PAAm foi equilibrada com tampão Hepes 25 mmol/L em pH 7,0 ou com fosfato de sódio (NaP) 10 mmol/L pH 6,0. Em seguida, a coluna foi alimentada com 1 mL de solução de IgG de alta pureza (1,8 a 2,2 mg/mL) ou de 1,5 a 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão Hepes 25 mmol/L em pH 7,0 ou em NaP 10 mmol/L pH 6,0. Posteriormente, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de adsorção. A etapa de eluição foi realizada utilizando os mesmos tampões de adsorção, porém acrescidos de NaCl 1,0 mol/L. Durante toda a cromatografia, foram coletados frações de 1,0 mL da corrente de saída. As frações foram quantificadas em termos de proteína total e as constituintes dos picos cromatográficos foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE. Ao final da cromatografia, a coluna foi regenerada com solução de NaOH 50 mmol/L e reequilibrada para um novo ciclo.

3.2.4.2. Cromatografia em coluna contendo os criogéis PAAm-AGE-PEI quelatado ao íon metálico Ni(II)

A coluna cromatográfica C10/20 (GE Healthcare, EUA) contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI foi alimentada com 10 volumes de coluna (VC) de solução de sulfato de níquel 50 mmol/L. Em seguida, foi lavada com água e com o tampão acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0, a fim de remover os íons metálicos fracamente quelatados. Após este processo, a coluna foi denominada PAAm-AGE-PEI-Ni(II).

O equilíbrio da coluna foi realizado com o tampão de adsorção a 25 mmol/L na faixa de valores de pH de 6,0 a 8,5, dependendo da faixa tamponante de cada tampão. Os tampões de adsorção utilizados foram Bis-Tris em valores de pH 6,0, 6,5 e 7,0; Hepes em pH 7,0, 7,5 e 8,0, e NaP em pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. Após a etapa de equilíbrio, a coluna foi alimentada com 1,0 mL de solução de IgG de alta pureza (1,8 a 2,2 mg/mL) ou de 1,5 a 2,0 mL da solução de soro humano diluído 15 vezes no tampão de adsorção. Em seguida, fez-se a lavagem com o mesmo tampão até que os valores de absorbância a 595 nm das amostras coletadas fossem próximas a zero.

A etapa de eluição foi realizada utilizando tampão acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0. Concluída a eluição, a coluna foi regenerada com solução de EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Durante toda a cromatografia, foram coletados frações de 1,0 mL a 2,0 mL da corrente de saída. As frações cromatográficas foram quantificadas em termos de proteína total e as constituintes dos picos cromatográficos foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

3.2.4.3. Cromatografia negativa em PAAm-Bisoxi-PEI e PAAm-AGE-PEI

O equilíbrio das colunas cromatográficas C10/20 (GE Healthcare, EUA) contendo 3,0 mL de criogéis PAAm-AGE-PEI e PAAm-Bisoxi-PEI foram realizados com os tampões de adsorção a 25 mmol/L na faixa de valores de pH de 5,5 a 7,0, dependendo da faixa tamponante de cada tampão. Os tampões de adsorção utilizados foram Mes em pH 5,5, 6,0 e 6,5, e Mops em pH 6,5 e 7,0, ambos são zwitteriônicos.

Após a etapa de equilíbrio, a coluna foi alimentada com 1,0 ou 1,5 mL da solução de soro humano diluído de 15 a 20 vezes no tampão de adsorção. Em seguida, fez-se a lavagem da coluna com o mesmo tampão até que os valores de absorbância a 595 nm das amostras coletadas fossem próximas a zero.

A etapa de eluição foi realizada utilizando tampão acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo NaCl 0,5 mol/L. Concluída a eluição, a coluna foi regenerada com solução de NaOH 50 mmol/L.

Durante toda a cromatografia, foram coletadas frações de 0,5 mL a 2,0 mL da corrente de saída. As frações cromatográficas foram quantificadas em termos de proteína total pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e as constituintes dos picos cromatográficos foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

3.2.5. Determinação da curva de ruptura

A determinação da curva de ruptura foi realizada alimentando-se continuamente a coluna com uma fase móvel de concentração constante (C_0). O soluto é adsorvido até o ponto em que a coluna satura, momento em que não há mais adsorção de proteínas e a quantidade de proteínas que sai do sistema equivale ao que está sendo alimentado, ou seja, a razão entre a concentração inicial (C_0) e a concentração final (C) é aproximadamente igual a um ($C/C_0=1$). Em seguida, procede-se as etapas de eluição e regeneração de modo similar a dos experimentos cromatográficos. Neste trabalho, o ponto de ruptura é considerado o ponto em que ocorre o início da não retenção de impurezas (proteínas do soro diferentes da IgG).

O experimento de curva de ruptura de IgG humana em criogel de PAAm-Bisoxi-PEI foi realizado em temperatura ambiente com o sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0 e alimentando-se soro humano vinte vezes diluído, tendo em vista que esta foi a condição que apresentou o melhor resultado durante os experimentos cromatográficos na mesma coluna. Detalhadamente, a curva de ruptura foi determinada da seguinte maneira:

Uma coluna cromatográfica modelo com 10 mm de diâmetro interno modelo C 10/20 (GE Healthcare, EUA) contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI foi acoplada ao sistema de cromatografia de baixa pressão (BioRad, EUA), equilibrada com tampão MES 25 mmol/L pH 6,0 e, em seguida, alimentada com 10 mL de soro humano diluído vinte vezes no tampão de adsorção (2,3 mg proteínas totais/mL) à vazão constante de 0,5 mL/min. Ao longo da alimentação, frações de 0,5 mL da corrente de saída foram coletadas e tiveram suas concentrações de proteínas monitoradas pelo método de Bradford (1976), a fim de garantir que a quantidade injetada no sistema tenha sido suficiente para saturar a coluna.

A lavagem da coluna foi feita com o mesmo tampão, coletando-se frações de 0,5 e de 1,5 mL, até que os valores de absorbância a 595 nm das amostras coletadas fossem próximas a zero. A etapa de eluição foi realizada utilizando tampão acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0

contendo NaCl 0,5 mol/L e coletam-se amostras de 4,0 mL. Por fim, a coluna foi regenerada com solução de NaOH 50 mmol/L.

As frações cromatográficas foram quantificadas em termos de proteína total pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As frações correspondentes aos picos cromatográficos durante o *flowthrough* (volume coletado durante a alimentação do adsorvente) e o pool da etapa de eluição foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

3.2.6. Métodos analíticos

3.2.6.1. Determinação da quantidade de proteínas total

A concentração de proteína total nas frações coletadas nos experimentos cromatográficos foi determinada pela Equação 1, a qual se baseia na metodologia de Bradford (1976).

$$C_{amostra}(mg/mL) = ABS_{595nm} * F_d * coef \quad (1)$$

Em que ABS_{595nm} e F_d correspondem, respectivamente, ao valor de absorbância à 595nm e ao fator de diluição de cada amostra; e *coef*, (mg/mL) ao coeficiente da curva linear de calibração construída utilizando BSA ou IgG humana como proteínas de referência.

A massa (mg) de proteína presente em cada amostra é então calculada pelo produto entre a concentração e o volume coletado em cada fração.

3.2.6.2. Eletroforese SDS-PAGE

A fim de avaliar a seletividade dos criogéis utilizados como adsorventes, de modo a reconhecer qualitativamente as proteínas obtidas em cada etapa da cromatografia, realizou-se eletroforeses em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE). Para isto, utilizou-se, além da amostra de injeção, as frações de maior concentração de proteína total das etapas de lavagem e eluição.

As eletroforeses foram realizadas em equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%, de acordo com o procedimento descrito em Laemmli (1970). O preparo das amostras foi feito com tampão contendo SDS e pela desnaturação através do aquecimento a 100°C por 7 min. Foram aplicadas no gel de 3 a 12 µL de cada amostra, marcador de alta massa molecular (GE Healthcare) e marcador de IgG humana (Sigma-Aldrich). O gel foi submetido à voltagem de 150 V em cuba vertical preenchida com

tampão de corrida. A coloração foi realizada com nitrato de prata, como descrito por Morrissey (1981).

3.2.6.3. Determinação da densidade dos íons metálicos imobilizados

A determinação da quantidade de íons metálicos Ni(II) e Cu(II) quelatados nos géis derivatizados com PEI foi realizada da seguinte maneira: a coluna cromatográfica contendo 3,0 mL de adsorvente foi alimentada com solução de sulfato de metal (Ni(II) ou Cu(II)) 50 mmol/L até a saturação do adsorvente. Em seguida o gel foi lavado com água e, posteriormente, com tampão acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0, a fim de retirar o íon metálico fracamente quelatado. A remoção do íon metálico do adsorvente foi feita utilizando solução de EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Durante essa última etapa, alíquotas de 1,0 mL foram coletadas e analisadas no espectrofotômetro UV-vis (DU-640, Beckman, EUA), empregando o comprimento de onda de 384 nm para o Ni(II) e de 733 nm para o Cu(II) (comprimento de onda de máxima absorvância determinado por varredura de espectro). Amostras foram coletadas até que os valores de absorvância fossem próximos a zero, indicando a ausência de metal nas amostras.

A quantidade de metal em cada amostra ($n_{amostra}$) foi calculada empregando-se a Equação 2:

$$n_{amostra}(mmol) = \frac{ABS_{\lambda} * F_d * V_{amostra}}{coef * 1000} \quad (2)$$

Em que ABS_{λ} , F_d e $V_{amostra}$ correspondem, respectivamente, ao valor de absorvância no comprimento de onda apropriado, fator de diluição e volume (mL) de cada amostra; e $coef$ (L/mmol) ao coeficiente da curva linear de calibração construída pelos valores de absorvância medidos a 384 nm, para Ni(II), e a 733 nm, para Cu(II), das soluções de 2, 4, 6, 8 e 10 mmol/L destes íons metálicos em EDTA 100 mmol/L pH 7,0.

A densidade de íons metálicos níquel ($\mu\text{mol/g_seca}$) foi então calculada pela razão entre o total de íons metálicos (μmol) removidos da coluna pela massa seca (g_seca) correspondente aos 3 mL de criogel utilizados (0,05 g).

3.2.6.4. Caracterização dos criogéis

Os criogéis sintetizados em seringas, depois de descongelados, foram transferidos para béqueres contendo água, sendo posteriormente caracterizados.

3.2.6.4.1. Capacidade de expansão

A medida da capacidade de expansão do criogel (S) foi feita com base no procedimento descrito por Plieva e colaboradores (2004). Primeiramente, os criogéis foram transferidos dos béqueres para placas de Petri (previamente pesadas) e deixados em estufa à aproximadamente 60 °C por tempo suficiente para que estivessem totalmente secos e não fossem observadas variações de massa. Registrou-se, então, as massas dos criogéis secos (m_d). Em seguida, as placas de Petri foram alocadas em um ambiente de atmosfera úmida (~90% de umidade), a qual consistiu de um recipiente hermético de vidro contendo solução saturada de cloreto de potássio, de forma que o monolito não tivesse contato direto com esta solução. Após não serem mais observadas variações de massa, registrou-se a massa do criogel úmido (m_w).

A metodologia descrita por Arvidsson e colaboradores (2003) para determinar a capacidade de expansão do criogel (S) também foi utilizada. As amostras de criogel, depois de lavadas, foram secas por filtração a vácuo em vidro sinterizado e depois pesadas (m_w). A massa seca (m_d) foi obtida após a secagem, em estufa à 60°, até se obter um valor constante. O cálculo da capacidade de expansão foi então calculado pela Equação 3:

$$S (g_{H_2O}/g_{gel_{seco}}) = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (3)$$

3.2.6.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da estrutura porosa e da morfologia dos criogéis PAAm e PAAm-Bisoxi-PEI foi feita por meio da microscopia eletrônica de varredura com detector de EDX.

Os criogéis foram liofilizados, utilizando-se nitrogênio gasoso, e entre as etapas de liofilização e análise, mantiveram-se armazenadas em dessecador. Fragmentou-se o criogel liofilizado e os pedaços foram colocados em um suporte e recobertos por uma cama de cerca de 20 nm de ouro (Sputter Coater EMITECH K450, Reino Unido). A análise foi feita por um microscópio eletrônico de varredura Leo 440i (LEO Electron Microscopy, Inglaterra) e foram utilizadas ampliações de 50, 250 e 1000 vezes. Estas análises foram conduzidas no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC – Unicamp/Campinas).

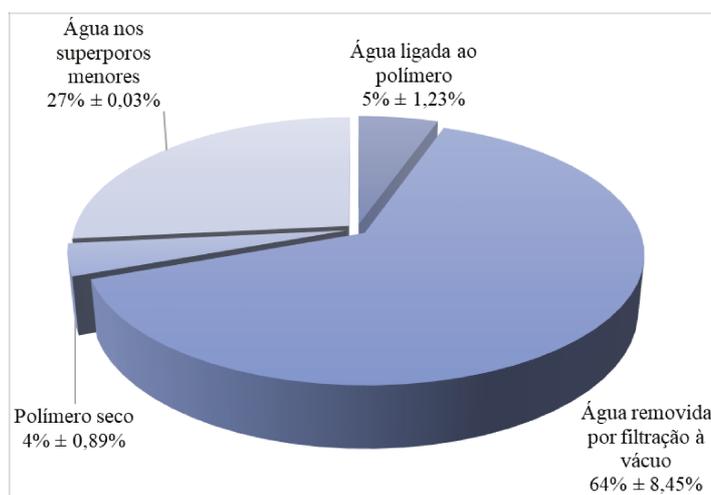
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo encontram-se os resultados e discussões referentes à avaliação do efeito de diferentes sistemas tamponantes e seus respectivos valores de pH, na purificação de IgG humana em criogéis de poliácridamida com PEI imobilizado, bem como os resultados das caracterizações destes criogéis. Este estudo foi fundamentado na recuperação de proteínas e seletividade, dados por meio da quantificação de proteína total nas frações cromatográficas e de perfis eletroforéticos.

4.1. Determinação da capacidade de expansão

O estudo de capacidade de expansão dos criogéis, conforme descrito no item 3.2.6.4 dos capítulo de materiais e métodos, revelou composições mássicas semelhantes para todos os criogéis sintetizados (PAAm, PAAm-AGE, PAAm-AGE-PEI e PAAm-Bisoxi-PEI). Estas composições mássicas médias, obtidas a partir de medições em triplicatas, estão apresentadas na Figura 8:

Figura 8 - Composições mássicas médias do criogéis



Os valores encontrados neste trabalho (Figura 8) estão de acordo com os apresentados por Plieva e colaboradores (2004b) para os criogéis PAAm e PAAm-AGE, em que 3-4% da massa total do criogel corresponde ao criogel seco, 4-5% é de água ligada diretamente ao polímero (vapor de água adsorvido), enquanto que os 90% restantes são de água livre no interior dos poros, sendo destes, cerca de 70% de água removível por compressão ou vácuo.

Os valores de capacidade de expansão média obtidos neste trabalho para os criogéis sintetizados são apresentados na Tabela 1.

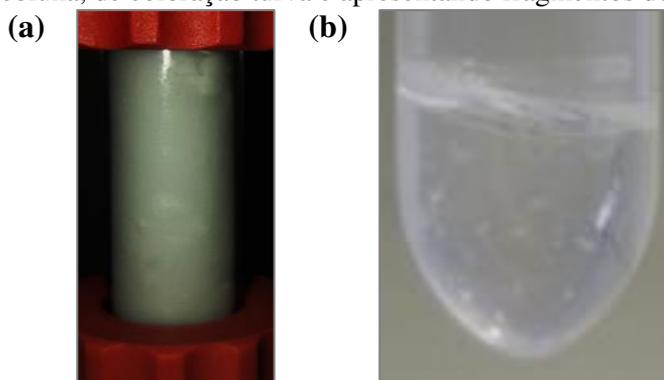
Tabela 1 – Capacidade de expansão dos criogéis PAAm e PAAm-AGE.

Matriz	Capacidade de Expansão (gH ₂ O/g criogel seco)	Referência
Criogel PAAm	5,97 3-5	Este trabalho ARVIDSSON et al., 2003
Criogel PAAm-AGE	6,61 6,84 5-6	Este trabalho DEMIRYAS et al., 2007 ARVIDSSON et al., 2003
Criogel PAAm-Bisoxi-PEI	8,05	Este trabalho
Criogel PAAm-AGE-PEI	7,23	Este trabalho

A partir da Tabela 1, percebe-se que os valores encontrados para os criogéis PAAm e PAAm-AGE são similares aos encontrados na literatura e são bastante próximos as capacidades de inchamentos encontradas para os criogéis PAAm-AGE-PEI e PAAm-Bisoxi-PEI.

Apesar de a literatura reportar uma maior estabilidade mecânica e resistência dos criogéis em relação aos géis comumente utilizados em cromatografia, observou-se uma progressiva degradação do criogel PAAm, na ausência do monômero funcional AGE, ao longo de alguns ciclos cromatográficos (em torno de 10). Observaram-se, conforme registros fotográficos (Figura 9), pontos mais esbranquiçados e heterogêneos na estrutura, bem como fragmentação e desprendimento de pedaços do criogel. Por esta razão, os experimentos cromatográficos com o criogel PAAm foram utilizados apenas como parâmetros de comparação (controle).

Figura 9 - Registro fotográfico (a) do criogel PAAm com estrutura não uniforme e (b) do líquido retirado do interior da coluna, de coloração turva e apresentando fragmentos do criogel.



4.2. Densidade de íon metálico quelatado ao PEI

O ligante PEI foi imobilizado covalentemente aos criogéis PAAm-AGE e PAAm-Bisoxi via ligação éter, conforme descrito no tópico 3.2.3 do capítulo de materiais e métodos, e a densidade de íons metálicos quelatados ao PEI foi comparada a de outros agentes quelantes e matrizes reportadas na literatura (Tabela 2).

Tabela 2 - Densidade de íons metálicos cobre e níquel complexados a agentes quelantes imobilizados em matrizes ativadas com epiclorigidrina e bisoxirano

Matriz	Agente quelante	Método de ativação	Densidade de ligantes ($\mu\text{mol/g}$ seca)		Método de quantificação do íon metálico	Referência
			Cu(II)	Ni(II)		
Gel de agarose ¹	IDA	Bisoxirano	137,1	110,4	Espectrometria de absorção atômica	Sharma e Agarwal, 2002a
Gel de agarose ¹	TREN ²	Bisoxirano	98,7	79,8	Espectrometria de absorção atômica	Sharma e Agarwal, 2002a
Membrana de PEVA	IDA	Epicloridrina	50,2	78,2	Espectrofotometria UV-Vis	Ribeiro, 2006
Membrana de PEVA	TREN ²	Epicloridrina	33,3	25,6	Espectrofotometria UV-Vis	Ribeiro, 2006
Criogel de PVA	PEI	Glutaraldeído	58,9	---	Espectrometria de absorção atômica	Göktürk <i>et al.</i> , 2016
Criogel PAAm-AGE	PEI		1.651,1	944,6	Espectrofotometria UV-Vis	Este trabalho ³
Criogel PAAm	PEI	Bisoxirano	2.162,6	1122,4	Espectrofotometria UV-Vis	Este trabalho ³

1: 1 mL de gel de agarose possui, geralmente, cerca de 0,33 g de massa seca (KLEIN, 1991)

2: TREN – tris(2-aminoetilamina)

3: 1 mL de criogel PAAm possui 0,055 g de massa seca e 1,1 g de massa úmida.

Em relação aos criogéis utilizados neste trabalho (Tabela 2), a capacidade de quelatar o íon metálico Cu(II) foi superior que a de quelatar Ni(II), fenômeno similar ao obtido por Sharma e Agarwal (2002b), que quelataram os mesmos íons metálicos em TREN e IDA imobilizados em gel de agarose e ao obtido por Ribeiro (2006), em TREN imobilizado membranas de PEVA. Percebe-se ainda (Tabela 2) que o criogel PAAm-Bisoxi-PEI quelatou uma quantidade 20% e 30% maior de Ni(II) e Cu(II), respectivamente, ao que foi obtido para o criogel PAAm-AGE-PEI.

Não é possível estabelecer uma comparação direta da capacidade de quelação de íons metálicos para os agentes quelantes IDA e PEI, tendo em vista que a afinidade do agente quelante para com íons metálicos depende tanto da natureza do agente quelante quanto do próprio íon metálico em questão (SHARMA; AGARWAL, 2002b). Neste trabalho, a comparação é também dificultada pelo fato de a relação massa seca/volume e massa seca/massa úmida, para criogéis, ser muito superior a encontrada para partículas esféricas, como agarose, e para membranas. Além disso, o PEI é um polímero altamente ramificado, diferenciando-o dos outros ligantes comumente empregados e aumentando consideravelmente sua capacidade de quelatação de metal (BAKSHPOUR et al., 2016).

No caso das membranas, 30% da massa total se refere ao polímero e 70% ao espaço intersticial; enquanto que para géis tradicionais 70% é massa do gel e 30% é espaço intersticial, de forma que 0,33 g de gel seco corresponde a 1 mL de gel úmido (KLEIN, 1991). Para os criogéis, somente 5% do criogel PAAm correspondente a massa do polímero (vide Figura 8), resultando na relação média de 0,055 g de criogel seco/1 mL de criogel úmido.

Se os valores da Tabela 2 forem dados por volume (mL) da matriz adsorvente, os resultados obtidos para a matriz PAAm-Bisoxi-PEI utilizada neste trabalho (Cu(II), 108,1 $\mu\text{mol/mL}$; Ni(II), 56,1 $\mu\text{mol/mL}$) são, aproximadamente, o dobro dos encontrados para a matriz agarose-bisoxirano-IDA (Cu(II), 45,7 $\mu\text{mol/mL}$; Ni(II), 36,8 $\mu\text{mol/mL}$) (SHARMA; AGARWAL, 2002b). Sabendo que a matriz de agarose com IDA imobilizado é frequentemente empregada em IMAC, a qual baseia-se na interação entre íons metálicos quelatados a esta matriz e as biomoléculas de interesse, verifica-se que a matriz desenvolvida neste trabalho, devido a sua elevada capacidade de quelatar reversivelmente íons metálicos como cobre e níquel, é passível de ser aplicada para os mesmos fins, ou seja, em técnicas de purificação de biomoléculas envolvendo íons metálicos imobilizados.

4.3. Experimentos cromatográficos no criogel PAAm (controle)

4.3.1. Adsorção de IgG humana em PAAm

Nestes experimentos, avaliou-se a adsorção de IgG de alta pureza por cromatografia em coluna contendo criogel PAAm (controle). O tampão HEPES e NaP foram escolhidos com base em trabalhos que empregaram poliaminas para purificação de IgG e seus fragmentos por cromatografia (CARMIGNOTTO, 2015; DA SILVA, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014).

Os ensaios cromatográficos, utilizando três réplicas do mesmo criogel (conforme descritos nos Apêndice A), resultaram nos dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Quantificação de IgG nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas em criogel de PAAm, alimentando IgG (2 mg/mL) em NaP 10 mmol/L e Hepes 25 mmol/L.

Tampão	Frações	Massa (mg) ^a	Recuperação (%) ^b
NaP 10 mmol/L pH 6,0	Injeção	1,94 ± 0,03	100 ± 0
	<i>pool</i> Lavagem	1,67 ± 0,05	86 ± 4
	<i>pool</i> Eluição	0,30 ± 0,05	15 ± 2
	<i>pool</i> Regeneração	0,03 ± 0,01	1 ± 1
	Recuperação total (%)	102,8 ± 2	
Hepes 25 mmol/L pH 7,0	Injeção	2,04 ± 0,11	100 ± 0
	<i>pool</i> Lavagem	1,77 ± 0,09	85 ± 1
	<i>pool</i> Eluição	0,39 ± 0,07	19 ± 3
	<i>pool</i> Regeneração	0,05 ± 0,03	3 ± 1
	Recuperação total (%)	105,9 ± 2	

^a Massa de IgG estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG como proteína de referência

^b Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG na injeção x 100

Volume de leito: 3 mL; 1 mL de criogel PAAm equivale a 0,05 g seca

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, verifica-se que, independente do sistema tamponante empregado, maior parte da IgG injetada é obtida nas etapas de lavagem, ou seja, há uma baixa adsorção dessas proteínas no criogel PAAm.

4.3.2. Adsorção de proteínas do soro humano no criogel PAAm (controle)

Apesar da massa de proteínas adsorvidas no criogel PAAm (cerca de 0,14 mg/mL_{gel}) nos experimentos cromatográficos com IgG descritos no item anterior, a cromatografia com soro humano foi realizada a fim de se obter valores de controle, investigar se o criogel PAAm a IgG ainda seria adsorvida frente a mudança de composição da solução de injeção, bem como identificar se haveria alguma seletividade na porção adsorvida.

Para tal finalidade, realizou-se cromatografia no criogel PAAm empregando-se soro humano diluído 15 vezes em tampão NaP 10 mmol/L pH 6,0. A escolha deste tampão teve como propósito manter, a título comparativo, um sistema tamponante anteriormente empregado nos experimentos com IgG de alta pureza (vide tópico 4.3.1). O balanço de massa da cromatografia e o perfil eletroforético estão apresentados na Tabela 4 e Figura 10, respectivamente.

Tabela 4 - Quantificação de proteínas totais nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas em criogel PAAm, a partir da injeção de soro humano diluído 15 vezes em NaP 10 mmol/L, pH 6,0.

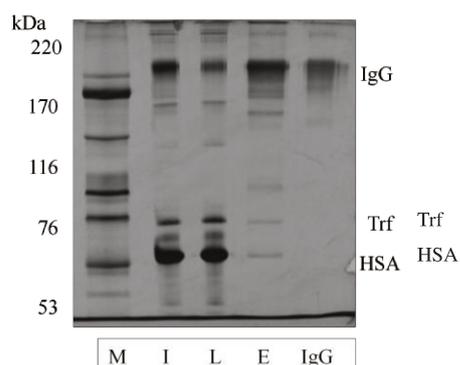
Tampão	Frações	Massa (mg) ^a	Recuperação (%) ^b
NaP 10 mmol/L pH 6,0	Injeção	5,71 ± 1,20	100 ± 0
	<i>pool</i> Lavagem	5,25 ± 0,96	92 ± 3
	<i>pool</i> Eluição	0,29 ± 0,00	5 ± 1
	<i>pool</i> Regeneração	0,02 ± 0,00	0 ± 0
	Recuperação total (%)		97,9 ± 4

^a Massa de IgG estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG como proteína de referência

^b Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG na injeção x 100

Volume de leito: 3 mL; 1 mL de criogel PAAm equivale a 0,05 g seca

Figura 10 – Perfil eletroforético das frações obtidas da cromatografia no criogel PAAm com injeção de 2 mL de soro humano diluído 15 vezes em NaP 10 mmol/L pH 6,0: SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: *pool* das frações de lavagem com tampão de adsorção; E: *pool* das frações de eluição (tampão de adsorção contendo 1,0 mol/L NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.



O balanço de massa (Tabela 4) demonstrou que o criogel PAAm também apresentou uma baixa adsorção de proteínas quando o soro humano foi alimentado na coluna, sendo a maior parte das proteínas totais injetadas (>90%) recuperadas nas frações de lavagem. Por esta razão, optou-se por não realizar os mesmos experimentos empregando tampão Hepes.

De acordo com o perfil eletroforético (Figura 10), a maior parte da albumina (HSA) e da transferrina (Trf) presentes no soro foram obtidas nas frações de lavagem, havendo bandas de leve intensidade dessas e de outras proteínas do soro nas frações de eluição. Conclui-se que a matriz sem ligante imobilizado não foi seletiva para IgG.

Portanto, os resultados obtidos na coluna PAAm, para os experimentos com IgG e com soro humano diluído, demonstram que a matriz apresenta baixa seletividade e capacidade de adsorção de IgG. A literatura relata que os géis de poli(acrilamida) são materiais estáveis e quimicamente inertes e sendo, por esta razão, frequentemente empregados, por exemplo, como

géis na técnicas de eletroforeses, como SDS-PAGE, nativa e eletrofocalização (PANG *et al.*, 2006; STANEY, 2002).

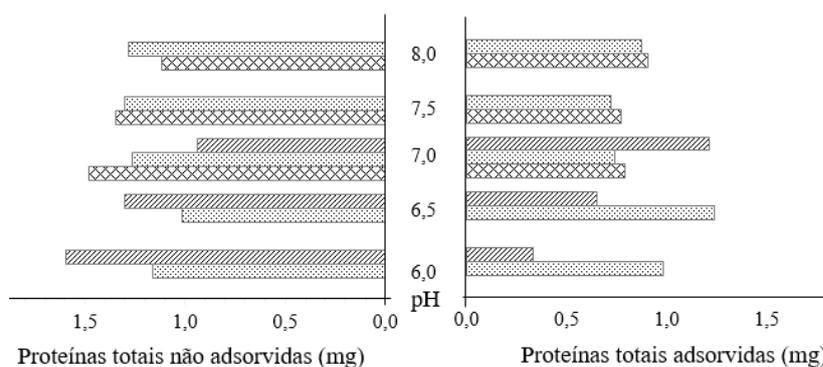
4.4. Purificação de IgG em PAAm-AGE-PEI

4.4.1. Purificação de IgG em PAAm-AGE-PEI-Ni(II)

Com base nos resultados promissores de trabalhos reportados na literatura, os quais empregaram criogéis contendo PEI com íons metálicos quelatados na purificação de proteínas do plasma humano (BAKSHPOUR *et al.*, 2016; GÖKTÜRK *et al.*, 2016), foi avaliado o potencial do criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) na purificação de IgG a partir do soro humano.

Os sistemas tamponantes empregados neste estudo foram: Bis-Tris 25 mmol/L ($6,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$), NaP 25 mmol/L ($6,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$) e Hepes 25 mmol/L ($7,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$), sendo estes os tampões reportados na literatura para purificação de fragmentos Fab de IgG em PEI imobilizado em gel de agarose (CARMIGNOTTO, 2015). Inicialmente avaliou-se a adsorção de IgG de alta pureza em PAAm-AGE-PEI-Ni(II) (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Bis-Tris 25 mmol/L (▨), NaP 25 mmol/L (▩) e Hepes 25 mmol/L (▧) na adsorção de IgG de alta pureza em criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II).



Segundo Bresolin e colaboradores (2009), nem sempre é possível determinar as contribuições relativas de cada interação envolvida na adsorção de uma biomolécula no quelato metálico, estando presentes as ligações de coordenação, interações eletrostáticas e hidrofóbicas e de van der Waals. Os resultados de adsorção de IgG nesta matriz (Figura 11) indicam que, para os sistemas tamponantes Hepes e NaP, a quantidade de IgG adsorvida não variou muito nos valores de pH avaliados, sendo em torno de 0,90 mg de IgG adsorvida para todas condições testadas (cerca de 41% do valor total alimentado).

Para o tampão Hepes (zwiteriônico, pKa 7,5) foi observado um pequeno aumento da quantidade adsorvida quando este tampão estava negativamente carregado (pH 8,0), resultando em valores semelhantes aos obtidos ao se empregar NaP (pKa 2,1;7,2;12,7, carga negativa em todos pHs avaliados). No caso do Bis-Tris (pKa 6,5), observa-se um aumento de 3,6 vezes na quantidade de IgG adsorvida quando o tampão está neutro (pH 7,0), quando comparado ao valor de pH igual a 6,0, em que este está positivamente carregado.

A avaliação do efeito do sal NaCl na retenção de IgG em IMAC não pôde ser realizada devido a desestruturação do criogel em presença de sal (1,0 mol/L), além do desprendimento do íon metálico. O desprendimento de níquel foi observado pela descoloração do criogel nas etapas de equilíbrio da coluna, formando pontos heterogêneos esbranquiçados. Provavelmente o sal afetou a estrutura do criogel de PAAm-AGE-PEI-Ni(II), tendo em vista que a poliacrilamida apresenta uma tendência a se deformar com a mudança de força iônica do meio (HERMANSON; MALLIA; SMITH, 1993).

A seletividade do criogel de PAAm-AGE-PEI-Ni(II) foi avaliada realizando-se ensaios cromatográficos com soro humano (100 uL) diluído 15 vezes no tampão de equilíbrio, nas condições que mais e que menos adsorveram IgG: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0 e 7,0 e NaP 25 mmol/L pH 6,5 (Figura 11). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e, os perfis eletroforéticos dos *pools* das frações de cada etapa, na Figura 12.

Tabela 5 - Proteínas totais nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas em criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II), no sistemas tamponantes Bis-Tris 25 mmol/L e NaP 25 mmol/L, a partir da injeção de soro humano diluído 15x.

Tampão	Frações	Massa (mg) ^a	Recuperação (%) ^b		
Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0	Injeção	4,86 ± 0,01	100	±	0
	<i>pool</i> Lavagem	2,82 ± 0,24	58	±	5
	<i>pool</i> Eluição	1,49 ± 0,03	31	±	1
	<i>pool</i> Regeneração	0,40 ± 0,04	8	±	1
	Recuperação total (%)	96,9 ± 4			
Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0	Injeção	4,79 ± 0,04	100	±	0
	<i>pool</i> Lavagem	2,11 ± 0,11	44	±	2
	<i>pool</i> Eluição	1,95 ± 0,04	41	±	0
	<i>pool</i> Regeneração	0,55 ± 0,01	11	±	0
	Recuperação total (%)	96,2 ± 2			
NaP 25 mmol/L pH 6,5	Injeção	4,85 ± 0,00	100	±	0
	<i>pool</i> Lavagem	3,77 ± 0,10	78	±	2
	<i>pool</i> Eluição	0,78 ± 0,04	16	±	1
	<i>pool</i> Regeneração	0,50 ± 0,08	10	±	2
	Recuperação total (%)	104,0 ± 1			

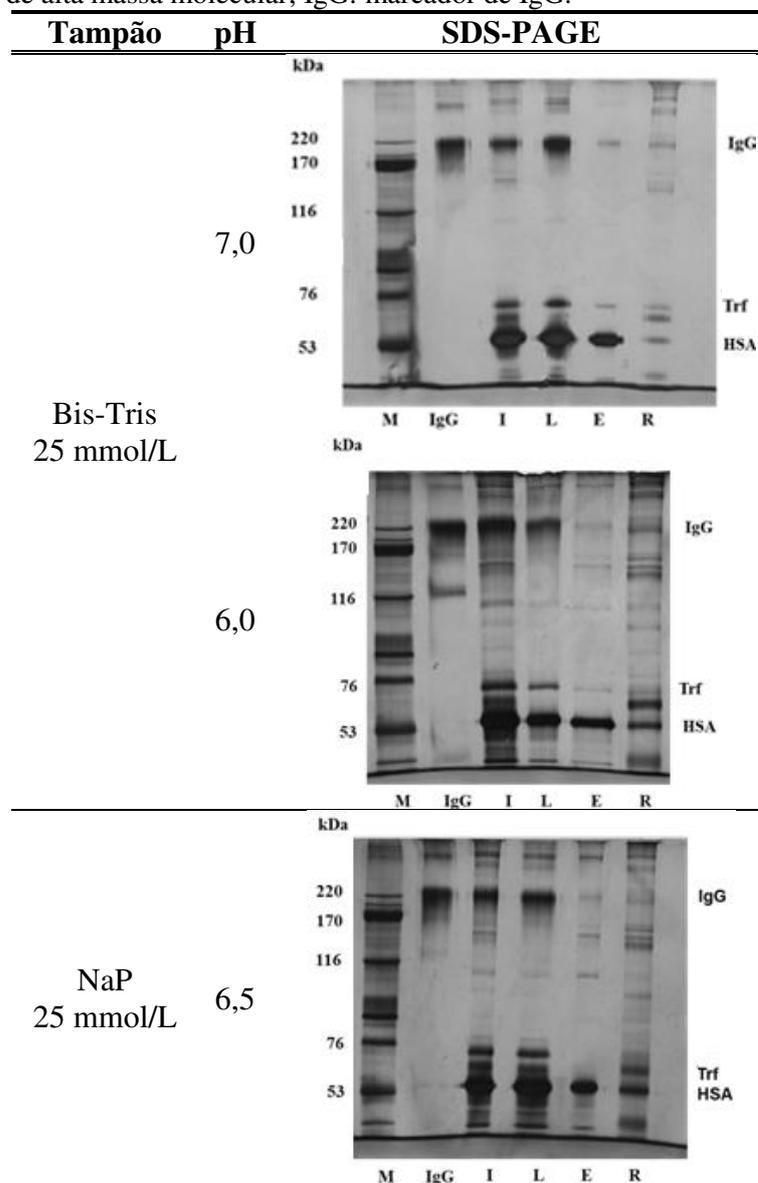
^a Massa de IgG estimada pelo método de Bradford (1976), IgG como proteína de referência

^b Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG na injeção x 100

Volume de leito: 3 mL; 1 mL de criogel PAAm equivale a 0,05 g seca

Densidade de íon metálico: 51,9 µmol Ni(II)/mL (análise de espectroscopia UV-VIS)

Figura 12 - Perfis eletroforéticos das frações cromatográficas da cromatografia de soro humano diluído 15x em PAAm-AGE-PEI-Ni(II). SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: *pool* das frações de lavagem; E: *pool* das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.



Os perfis eletroforéticos apresentados (Figura 12) permitem concluir uma ineficiência da matriz proposta (PAAm-AGE-PEI-Ni(II)) em purificar a IgG a partir do soro humano, já que não se obteve seletividade em nenhuma das etapas cromatográficas. Com o propósito de verificar a influência do íon metálico no adsorvente proposto e na busca por uma condição mais seletiva para este processo de purificação, optou-se em não realizar cromatografias com o íon metálico Cu(II), tendo em vista que este é geralmente menos seletivo que o íon Ni(II) (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009), e dar continuidade ao trabalho realizando-se ensaios cromatográficos na matriz PAAm-AGE-PEI, na ausência de íon metálico quelatado.

4.4.1. Purificação de IgG em PAAm-AGE-PEI

A adsorção e a seletividade do adsorvente PAAm-AGE-PEI foram avaliadas por meio dos experimentos cromatográficos do soro humano diluído nos seguintes tampões: Mes e Mops, em valores de pH na faixa de 5,5 a 7,0, de acordo com a faixa tamponante de cada tampão (Figura 13). Os sistemas tamponantes e diluição do soro (20 vezes) foram selecionados com base na literatura, em que autores empregaram estes sistemas tamponantes em cromatografia para purificação de IgG humana (BRESOLIN, 2010; DE SOUZA, 2009).

As amostras mais concentradas da lavagem, bem como a amostra de injeção e os *pools* das frações de eluição foram submetidos a eletroforese SDS-PAGE e resultaram nos perfis eletroforéticos apresentados na Figura 14.

Figura 13 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Mes 25 mmol/L (▨) e Mops 25 mmol/L (■) na adsorção de proteínas do soro humano em criogel PAAm-AGE-PEI.

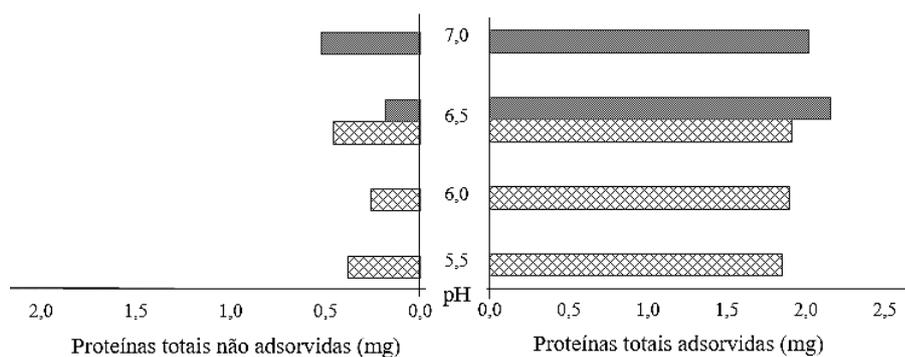


Figura 14 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-AGE-PEI com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.

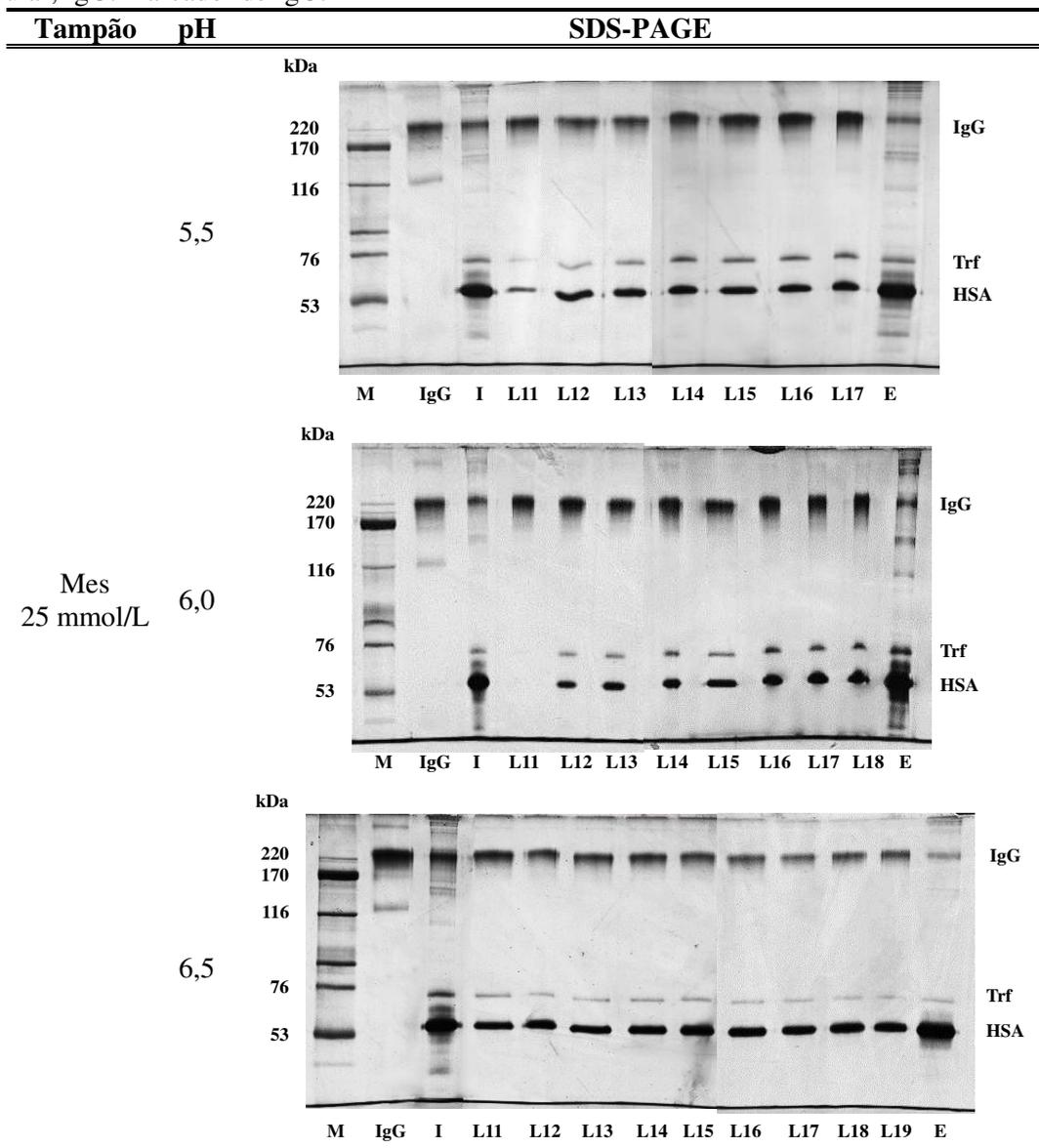
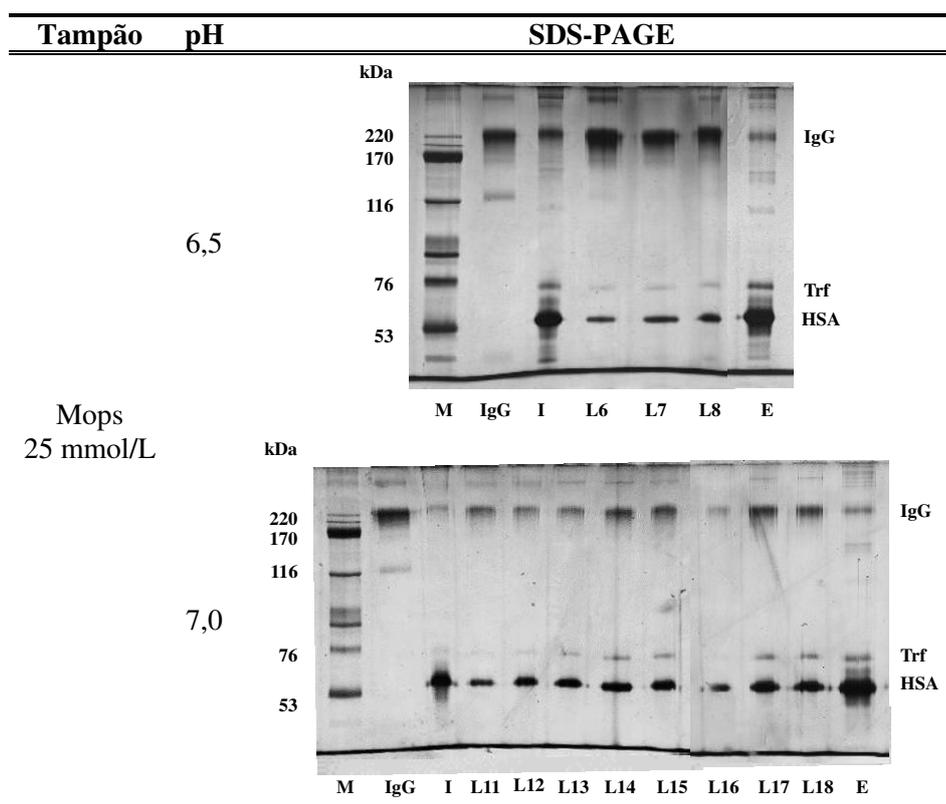


Figura 14 (Continuação)



O balanço de massa permite inferir que a quantidade de proteínas adsorvidas no criogel PAAm-AGE-PEI independe do sistema tamponante e do valor de pH empregado, sendo cerca de 1,97 mg de proteínas adsorvidas em todas condições experimentadas. Nenhuma das condições tamponantes demonstrou um resultado satisfatório em termos de seletividade para purificação de IgG (Figura 14); impurezas são observadas nas frações de lavagem e eluição (HSA, Trf e outras proteínas do soro humano).

Quando soro humano diluído em Mes a pH 6,0 foi alimentado em PAAm-AGE-PEI, pôde-se obter uma banda homogênea de IgG na primeira fração de lavagem (L11, Figura 14). Apesar do baixo rendimento, este resultado indica potencial do PEI imobilizado em PAAm para a purificação de IgG por cromatografia negativa. Visando este potencial, e com base no que é reportado na literatura, optou-se por empregar o método de ativação por bisoxirano na matriz PAAm a fim de incluir um braço espaçador entre o suporte e o ligante com o propósito de otimizar essa purificação.

4.5. Purificação de IgG em PAAm-Bisoxi-PEI: cromatografia negativa

O efeito da adição de braços espaçadores para distanciar o ligante da matriz em cromatografia de afinidade tem sido reportado por vários autores. Gala (2002) ao estudar a adsorção da enzima L-asparaginase na matriz ativada Sepharose 4B na presença de diaminas alifáticas como braços espaçadores, observou que a presença do braço espaçador aumenta a capacidade de adsorção da matriz, bem como que o comprimento do espaçador tem grande efeito sobre a especificidade de adsorção. De Souza e colaboradores (2010) purificaram IgG a partir de soro humano por cromatografia negativa utilizando matrizes de gel de agarose ativadas com bisoxirano (1,4 butanodiol diglicidil éter) e com brometo de cianogênio (CNBr) na presença do ligante ω -aminohexil imobilizado via ligação éter, todavia o grau de pureza obtido foi superior empregando-se a matriz ativada via grupamento epóxi. Assim, com o propósito de alcançar resultados similares de adsorção das proteínas do soro humano e seletividade, optou-se por ativar o criogel PAAm com bisoxirano, introduzindo na matriz o braço espaçador de 12 átomos, conforme descrito no item 3.2.2 do capítulo de materiais e métodos.

Neste trabalho são exibidos os dados coletados para três colunas PAAm-Bisoxi-PEI sintetizadas, as quais foram nomeadas de PAAm-Bisoxi-PEI-1 (sintetizada em 06/2017), PAAm-Bisoxi-PEI-2 (sintetizada em 02/2018) e PAAm-Bisoxi-PEI-3 (sintetizada em 04/2018).

Os resultados do efeito da introdução deste braço espaçador na captura de proteínas do soro humano e não-retenção de IgG, em função dos sistemas tamponantes Mes e Mops e dos valores de pH, obtidos com a coluna PAAm-Bisoxi-PEI-1 estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Mes 25 mmol/L (▨) e Mops 25 mmol/L (■) na adsorção de proteínas do soro humano em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1.

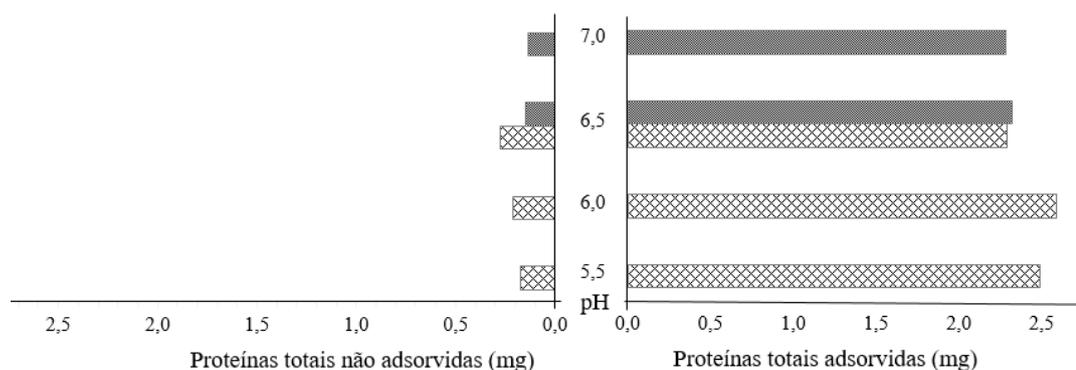


Figura 16 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.

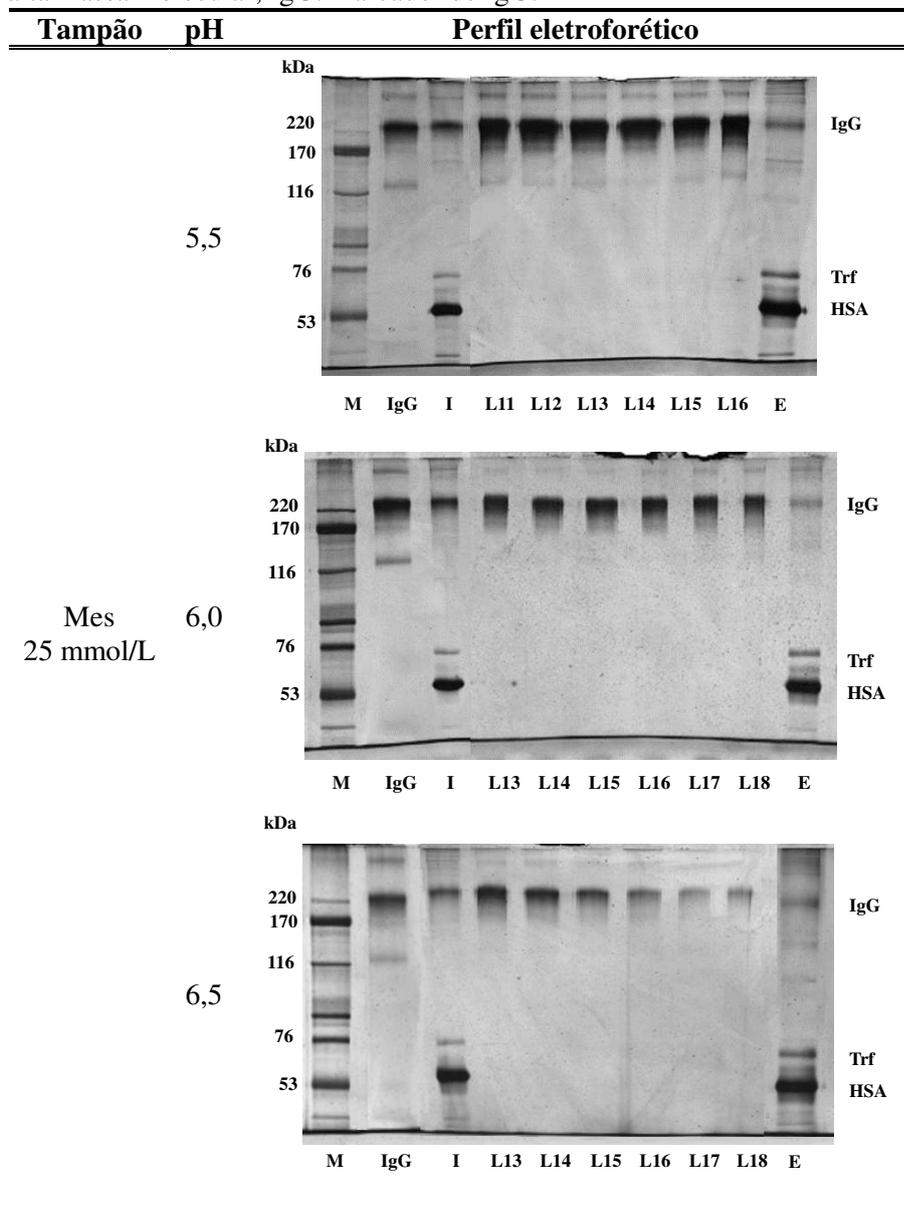
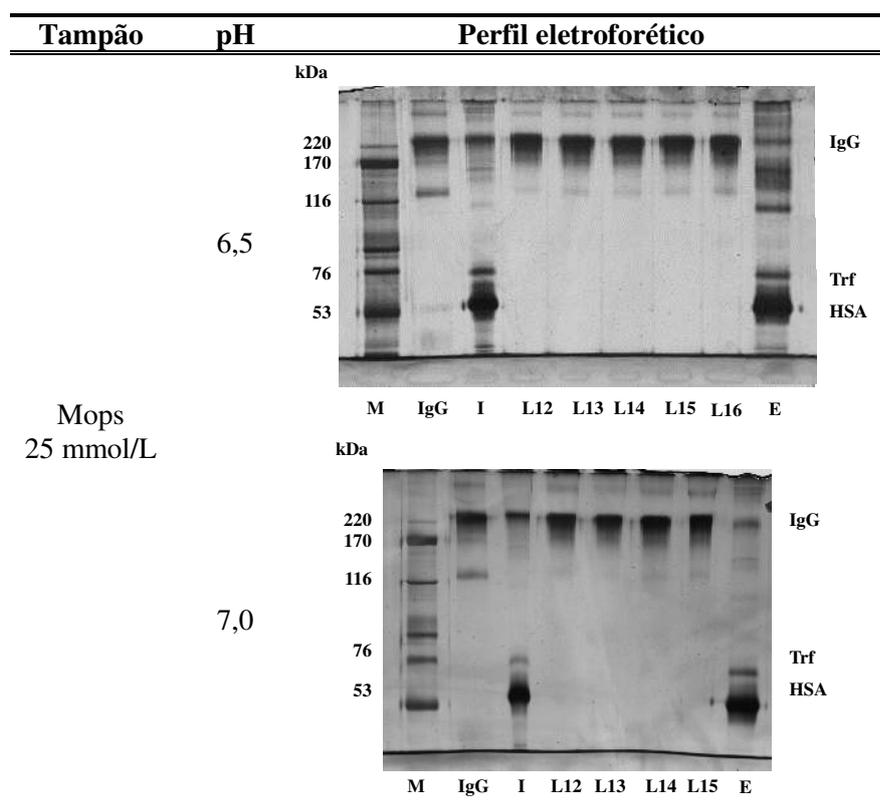


Figura 16 (Continuação)



Para o volume de 1mL de solução soro humano diluído 20x no tampão de adsorção (2,6 mg/mL) alimentado na coluna PAAm-Bisoxi-PEI-1, a massa de proteína total adsorvida (Figura 15) não variou consideravelmente em função do sistema tamponante e valor de pH utilizado, mantendo-se em torno de $2,39 \pm 0,14$ mg de proteína adsorvida.

Este valor é apenas 22% superior à média obtida para a coluna na ausência do braço espaçador (PAAm-AGE-PEI), indicando não haver grande aumento na capacidade de adsorção de proteínas da matriz quando ativada com bisoxirano. Já em termos de seletividade, os perfis eletroforéticos (Figura 16) indicam a presença de IgG com poucas impurezas nas frações de lavagem em todos os sistemas tamponantes e valores de pH estudados, sendo o perfil destas frações similares ao do marcador de IgG utilizado.

Nos valores de pH avaliados, as impurezas como albumina (pI 4,7) e transferrina ($5,2 < pI < 5,9$), negativamente carregadas, tendem a interagir eletrostaticamente com os grupamentos amino PAAm-Bisoxi-PEI-1 (carregados positivamente), enquanto que as moléculas de IgG carregadas positivamente são repelidas pela carga positiva do criogel, e, conseqüentemente, a proteína alvo é obtida na etapa de lavagem.

O grau de pureza da IgG obtido nos experimentos realizados em PAAm-Bisoxi-PEI-1 aumentou (observada visualmente por eletroforese), comparativamente aos resultados obtidos em PAAm-AGE-PEI, possivelmente devido a inserção do braço espaçador, que minimizou os impedimentos estéricos e possibilitou melhor distribuição das cargas positivas na matriz e, conseqüentemente, melhorou o acesso das proteínas aos sítios de adsorção (LEE; CHAN; TEY, 2014; DE SOUZA; BRESOLIN; BUENO, 2010; JAGER *et al.*, 2012).

Apesar dos resultados promissores obtidos utilizando criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 para purificação de IgG a partir de soro humano, a produção de réplicas do criogel proposto resultou em materiais que não exibiram resultados similares, como os que são apresentados na Figura 17 e 18, referentes a coluna PAAm-Bisoxi-PEI-2 sintetizada em 02/2018.

Figura 17 - Efeito do pH e dos sistemas tamponantes Mes 25 mmol/L (▨) e Mops 25 mmol/L (▩) na adsorção de proteínas do soro humano em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2.

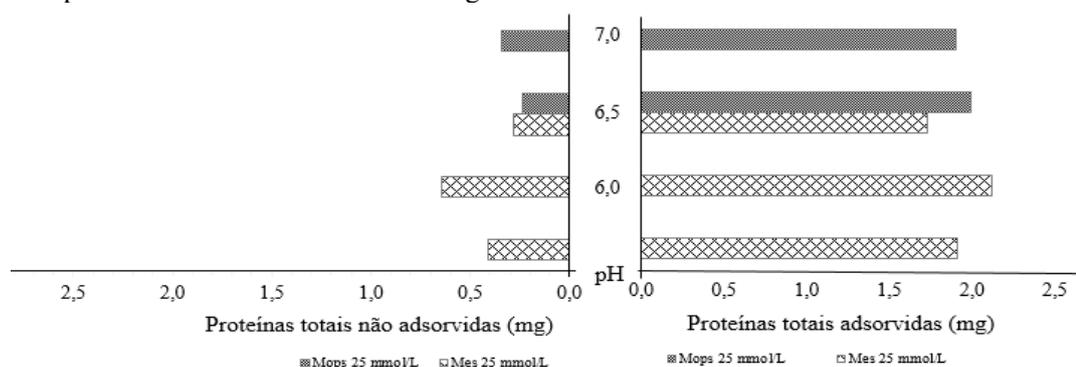


Figura 18 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção; L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.

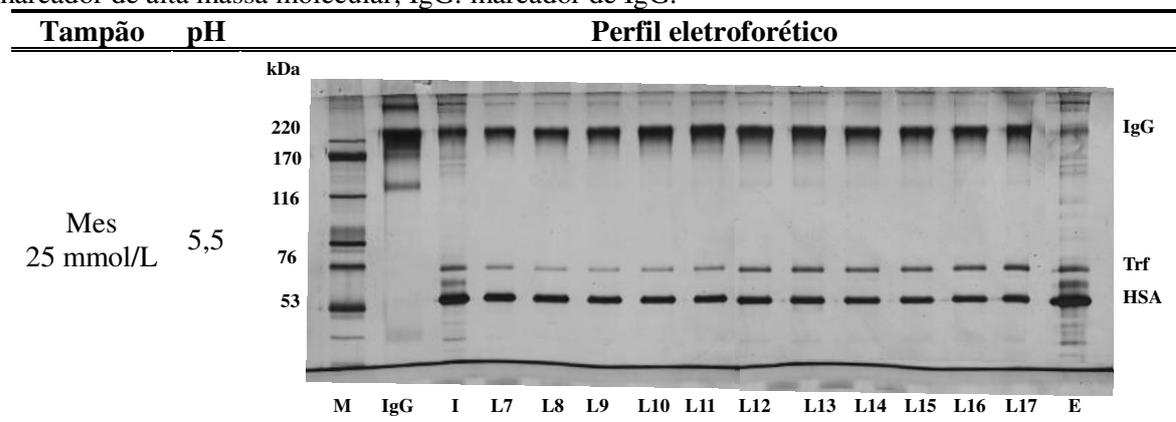
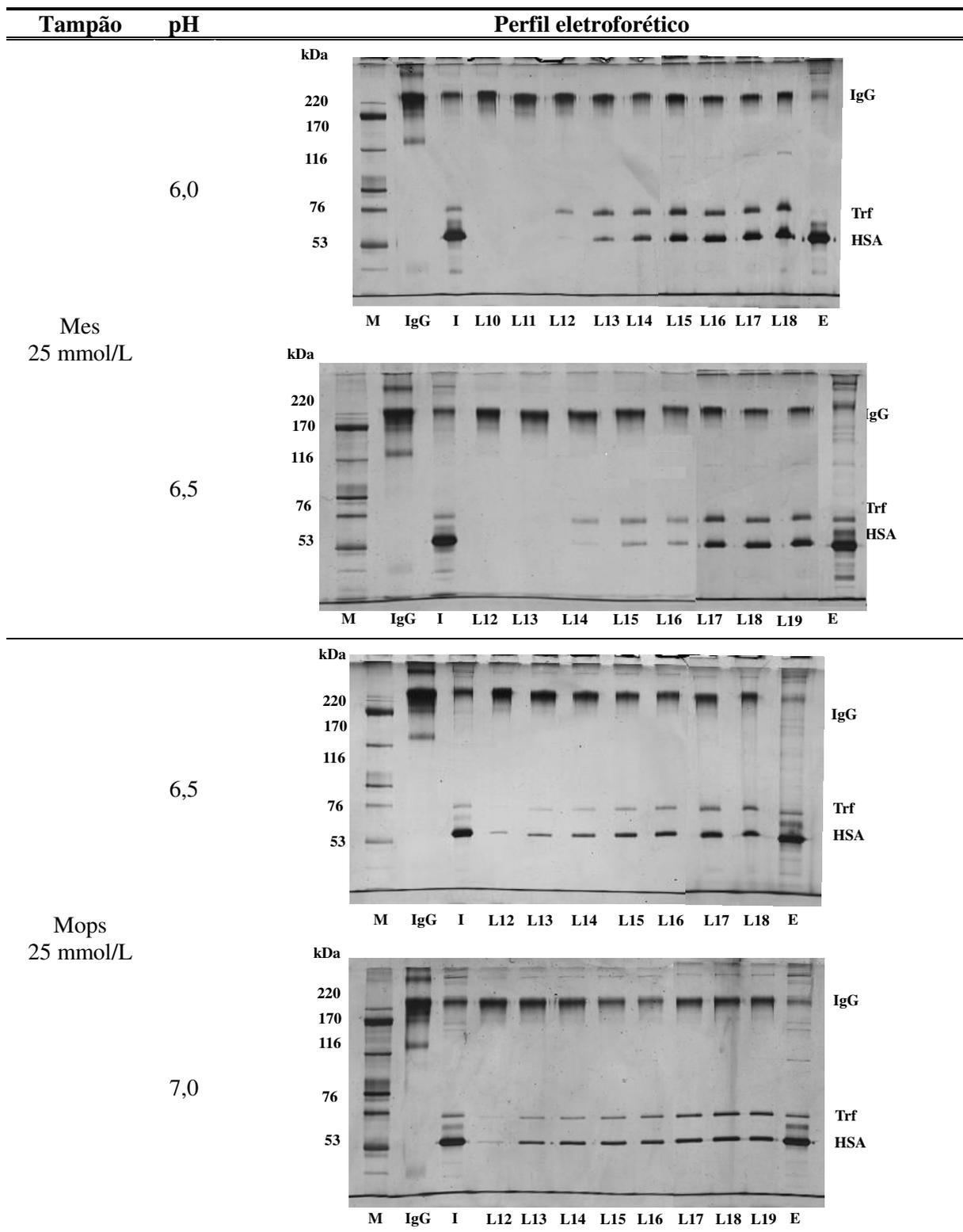


Figura 18 (Continuação)



Para um mesmo volume de soro humano 20x diluído (1,0 mL, 2,6 mg/mL) alimentado em PAAm-Bisoxi-PEI-2, a massa de proteína total adsorvida (Figura 17) não variou consideravelmente em função do sistema tamponante e valor de pH utilizado, mantendo-se em torno de $1,93 \pm 0,14$ mg de proteína adsorvida, valor 25% inferior ao obtido para o criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1.

A diferença mais evidente entre estes dois criogéis de poliacrilamida ativados com bisoxirano e com ligante PEI imobilizado encontra-se, de fato, nas eletroforeses apresentadas, tendo em vista que, para o criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 (Figura 18), impurezas (HSA, Trf e outras proteínas do soro humano) são observadas nas frações de lavagem e eluição, ou seja, este adsorvente não apresentou resultado satisfatório em termos de seletividade para purificação de IgG. É notável também que na condição de se alimentar soro humano diluído 20 vezes em tampão Mes a pH 6,0 e em tampão Mes a pH 6,5, as duas primeiras frações de lavagem (Figura 18) apresentam bandas homogêneas de IgG, o que é um indicador do potencial dessa matriz.

A fim de explorar este potencial e investigar a possível fonte desta variação, um terceiro criogel, o PAAm-Bisoxi-PEI-3, foi sintetizado em 05/2018. Tendo sido o tampão MES 25 mmol/L pH 6,0 uma das melhores condições observadas (vide Figura 18), esta foi testada e os resultados, comparados às colunas anteriores, encontra-se na Tabela 6. Além disso, os picos eletroforéticos de lavagem e o *pool de* eluição encontrados na cromatografia realizada na coluna PAAm-Bisoxi-PEI-3 foram analisados via eletroforese SDS-PAGE conforme apresentados na Figura 19.

Tabela 6 - Proteínas totais nas frações cromatográficas das etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias realizadas nos criogéis de PAAm-Bisoxi-PEI em sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0, a partir da injeção de 1mL de soro humano diluído 20x.

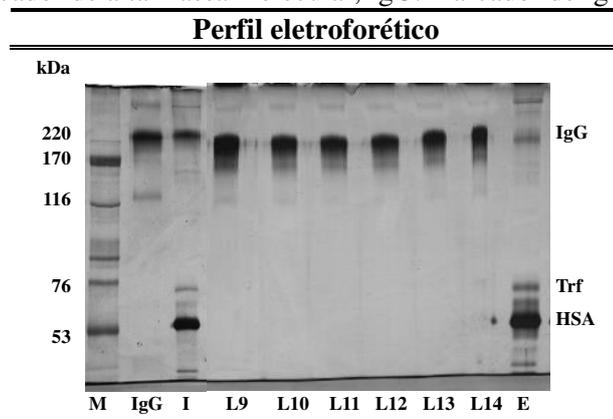
Frações	PAAm-Bisoxi-PEI-1		PAAm-Bisoxi-PEI-2		PAAm-Bisoxi-PEI-3	
	Massa (mg) ^a	Recuperação (%) ^b	Massa (mg) ^a	Recuperação (%) ^b	Massa (mg) ^a	Recuperação (%) ^b
Injeção	2,55	100,00%	2,75	100,00%	2,58	100,00%
<i>pool</i> Lavagem	0,17	6,82%	0,64	23,44%	0,19	7,46%
<i>pool</i> Eluição	1,94	76,29%	2,07	75,48%	1,78	68,77%
<i>pool</i> Regeneração	0,19	7,50%	0,05	1,89%	0,44	16,90%
Recuperação total (%)		90,61%		100,81%		93,13%

^a Massa de IgG estimada pelo método de Bradford (1976), com IgG como proteína de referência

^b Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG na injeção x 100

Volume de leito: 3 mL; 1 mL de criogel PAAm equivale a 0,05 g seca

Figura 19 - Perfil eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção Mes 25 mmol/L pH 6,0. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.

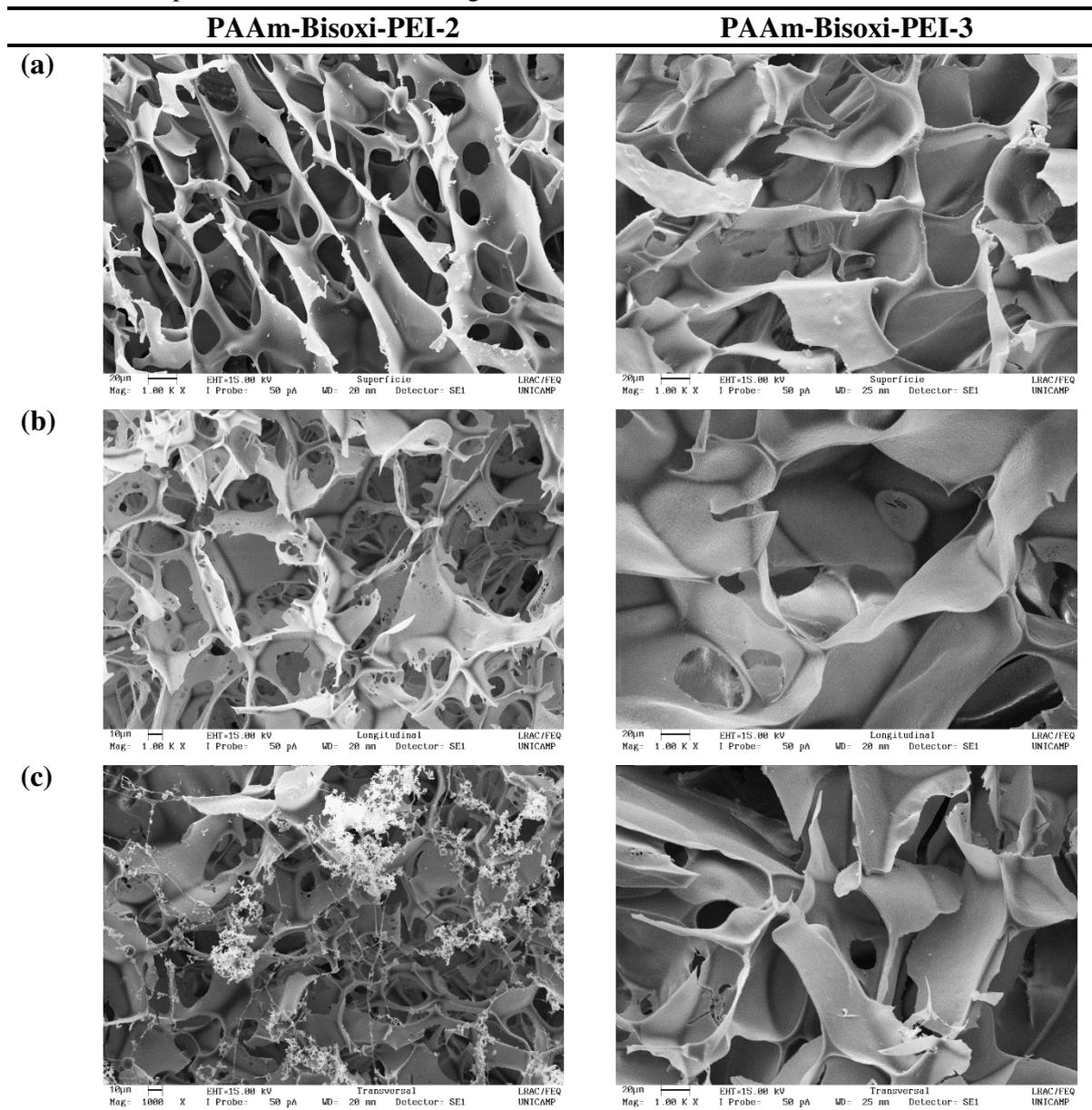


Comparando-se os dados quantitativos (Tabela 6) e qualitativos (Figuras 16 e 19) percebe-se que as colunas PAAm-Bisoxi-PEI-1 e PAAm-Bisoxi-PEI-3 exibiram resultados similares, entretanto diferentes do que fora observado na coluna PAAm-Bisoxi-PEI-2.

A fim de investigar as razões estruturais que levaram a esta diferença de resultados obtidos com a coluna PAAm-Bisoxi-PEI-1 e -3 com a PAAm-Bisoxi-PEI-2, quantificou-se os íons metálicos Cu(III) quelatados conforme metodologia descrita no capítulo de materiais e métodos. Para os 3 mL de criogel em cada coluna, a quantidade de íons Cu(II) quelatados (0,31 mmol) a matriz PAAm-Bisoxi-PEI-3 foi próxima ao que havia sido obtida em PAAm-Bisoxi-PEI-1 (0,36 mmol), enquanto que quantidade 25% inferior (0,27 mmol) foi obtida para o criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2, indicando que uma menor quantidade de ligante PEI foi efetivamente imobilizada à esta matriz polimérica.

As imagens MEV dos criogéis PAAm-Bisoxi-PEI-2 e PAAm-Bisoxi-PEI-3 também revelaram diferenças morfológicas que são exibidas na Figura 20. Não foi possível a realização de MEV para a coluna PAAm-Bisoxi-PEI-1 tendo em vista que esta passou a apresentar sinais de degradação após sua utilização nos experimentos durante aproximadamente um semestre.

Figura 20 – Imagens produzidas por MEV das (a) superfícies, (b) secções longitudinais e (c) secções transversais ampliadas 1000 vezes dos criogéis PAAm-Bisoxi-PEI-2 e PAAm-Bisoxi-PEI-3.



A partir da Figura 20 nota-se que ambos os criogéis apresentam estrutura supermacroporosa, com poros heterogêneos de diferentes tamanhos interconectados, entretanto nas imagens obtidas para o criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 é possível observar pontos de rompimento do material (identificado por inúmeros pontos vazados, Figura 20b) bem como a presença de estruturas heterogêneas (Figura 20), evidenciando a ausência de homogeneidade ao longo do criogel ativado com bisoxirano.

Avaliações mais aprofundadas, principalmente no que se refere ao processo de síntese deste criogel, são necessários para justificar este resultado indesejado, tendo em vista que, por terem sido todos sintetizados conforme descrito no capítulo de material e métodos, não há

razões óbvias para tal ocorrido. Entretanto a heterogeneidade observada nos criogéis após estes serem ativados com bisoxirano pode ser uma das razões para esta variação nos resultados obtidos, tendo em vista que afeta diretamente a quantidade de ligante PEI imobilizado à coluna.

Apesar destes resultados variáveis obtidos, o potencial da matriz proposta é evidenciado pela presença de bandas eletroforéticas de lavagem similares a do marcador de IgG obtidos a partir das cromatografias realizadas nos três criogéis (PAAm-Bisoxi-PEI-1, -2 e -3), principalmente no que se refere a cromatografia em que foi empregado o sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Desta maneira, demonstrado realizou-se a curva de ruptura para esta condição (Mes 25 mmol/L pH 6,0) a fim de explorar este potencial.

4.5.1.1. Curva de ruptura

Na cromatografia negativa, o ponto de ruptura ocorre quando a coluna cromatográfica deixa de reter as impurezas e são detectadas proteínas do soro diferentes de IgG na saída da coluna. A sua determinação é de grande utilidade para a purificação industrial de proteínas de alto valor, já que a alimentação é realizada até atingir o ponto de ruptura, minimizando assim as perdas de produtos na linha de saída. Além disso, este valor também é considerado em aplicações médico-terapêuticas, sendo ideal que a adsorção do patógeno ocorra até que a matriz esteja praticamente saturada (CHARCOSSET et al., 1995).

A determinação do ponto de ruptura foi realizada no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3, tendo em vista a similaridade dos resultados obtidos entre o criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1. A curva foi determinada conforme descrito no item 3.2.5 do capítulo de materiais e métodos e o balanço de massa, a curva de ruptura e as eletroforeses realizadas estão apresentadas nas Figuras 21, 22 e 23.

Figura 21 – Balanço de massa do ensaio de curva de ruptura em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 em sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0.

Frações	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	23,75	100,00%
Lavagem	18,59	78,27%
Eluição	2,25	9,46%
Regeneração	0,67	2,80%
Recuperação	21,50	90,53%
Proteínas totais adsorvidas (mg)	2,91	13,55% ^c
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,97	-

Figura 22 – Curva de ruptura de IgG em criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 para proteínas totais. Volume de alimentação: 10,0 mL de solução de soro humano diluído 20x em tampão Mes 25 mmol/L pH 6,0.

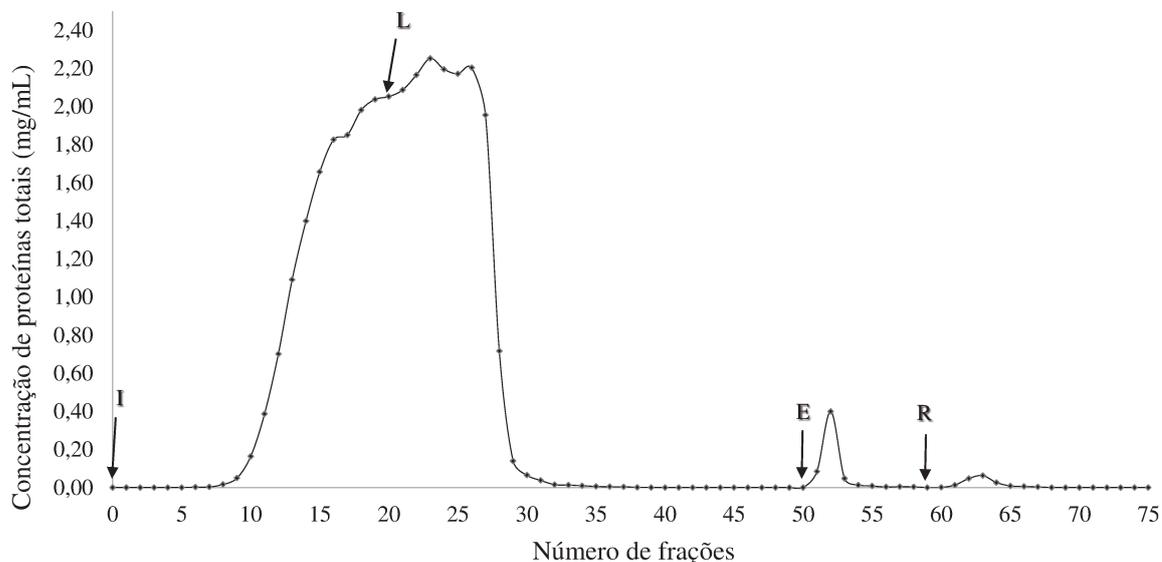
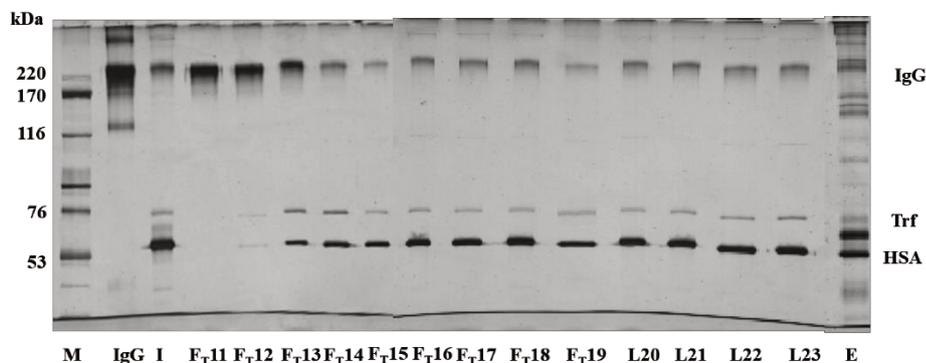


Figura 23 - Perfis eletroforéticos das frações obtidas da curva de ruptura no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 com injeção de soro humano diluído 20 vezes no tampão de adsorção. SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras. I: solução de injeção. F_T: frações da etapa de *flowthrough*. L: frações de lavagem com tampão de adsorção; E: pool das frações de eluição (acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L de NaCl); M: marcador de alta massa molecular; IgG: marcador de IgG.



Apesar de nas cromatografias no criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 terem sido obtidas frações de lavagem com pureza similar ao marcador de IgG (IgG da Sigma) (Figura 19), os resultados obtidos na determinação da curva de ruptura demonstraram uma baixa capacidade de adsorção deste criogel, uma vez que as impurezas foram detectadas já na segunda fração de do *flowthrough*. O ponto de ruptura foi calculado como sendo de 6,0 mL, já que este foi o volume coletado do início da alimentação até a amostra de *flowthrough* contendo IgG eletroforeticamente sem impurezas (F_T11, Figura 23), tendo sido recuperada apenas 0,31 mg de IgG (cerca de 0,1 mg_{proteína}/mL_{criogel}), valor este inferior aos encontrados na literatura como, por exemplo, os 13,52 mg (4,51 mg_{proteína}/mL_{gel}) obtido por Bresolin, De Souza e

Bueno (2010) ao determinar o ponto de ruptura de uma coluna com 3 mL de gel de ω -aminohexil-agarose utilizando soro humano vinte vezes diluído.

Diferentemente do que ocorre nos experimentos cromatográficos, para determinação da curva de ruptura é injetado um volume de solução de alimentação (10 mL) superior ao volume de leito (3 mL), não ocorrendo diluição desta solução ao longo da coluna. Por outro lado, nos experimentos cromatográficos, se injeta um volume 1/3 menor que o do leito cromatográfico. Por este motivo, na curva de ruptura não foram obtidos um mínimo de 6 amostras de lavagem com pureza similar ao marcador de IgG como as que foram obtidas na cromatografia sob mesmas condições tamponantes.

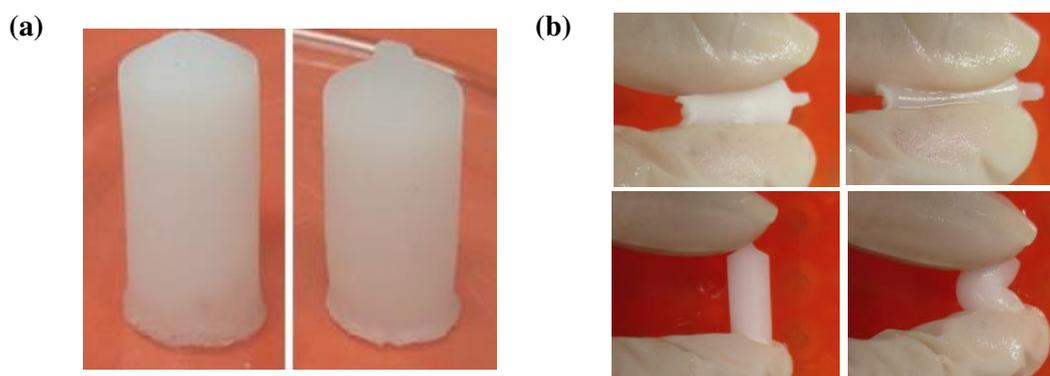
Ainda que a curva de ruptura tenha demonstrado uma baixa capacidade dinâmica do criogel proposto (PAAm-Bisoxi-PEI), os resultados anteriormente obtidos com essa matriz que revelam seu potencial para purificação de IgG, bem como suas características estruturais e mecânicas ainda a tornam de interesse na área, possibilitando que novos estudos, por exemplo que variem o sistema tamponante utilizado, sejam desenvolvidos com este material no propósito de modificar seu ponto de ruptura e aumentar sua empregabilidade.

4.6. Caracterização dos criogéis sintetizados

4.6.1. Estrutura e morfologia

Os criogéis de poliacrilamida (PAAm e PAAm-AGE) sintetizados segundo Kumar (KUMAR et al., 2006a) conforme descrito no item 3.2.1 do capítulo de materiais e métodos e utilizados nos ensaios cromatográficos, encontram-se ilustrados na Figura 24a, no seu estado intumescido.

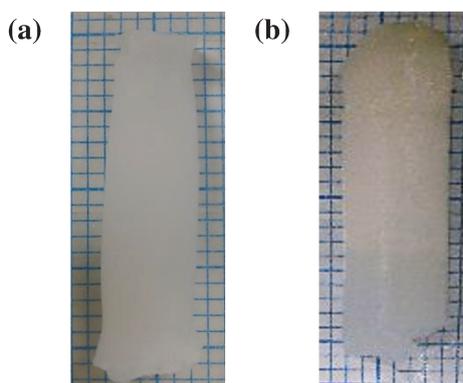
Figura 24 - Registro fotográfico dos criogéis PAAm e PAAm-AGE (a) após sintetizados (b) sendo submetidos a compressão manual.



Visualmente, estes criogéis consistem de uma estrutura homogênea e uniforme, opaco, de coloração esbranquiçada. Sua estrutura esponjosa possibilita que seja comprimido e que retorne imediatamente a sua configuração original (Figura 24b). As possibilidades de reidratação instantânea do gel seco por compressão manual ou por secagem em estufa, sem que haja danos à estrutura supermacroporosas, e de armazenagem do criogel seco por longos períodos, representam vantagens na utilização dos criogéis de poliacrilamida na área de cromatografia (PLIEVA et al., 2004b).

Após ter sido ativado com bisoxirano, o criogel PAAm perceptivelmente sofreu modificações na sua estrutura, vide registros fotográficos apresentados na Figura 25.

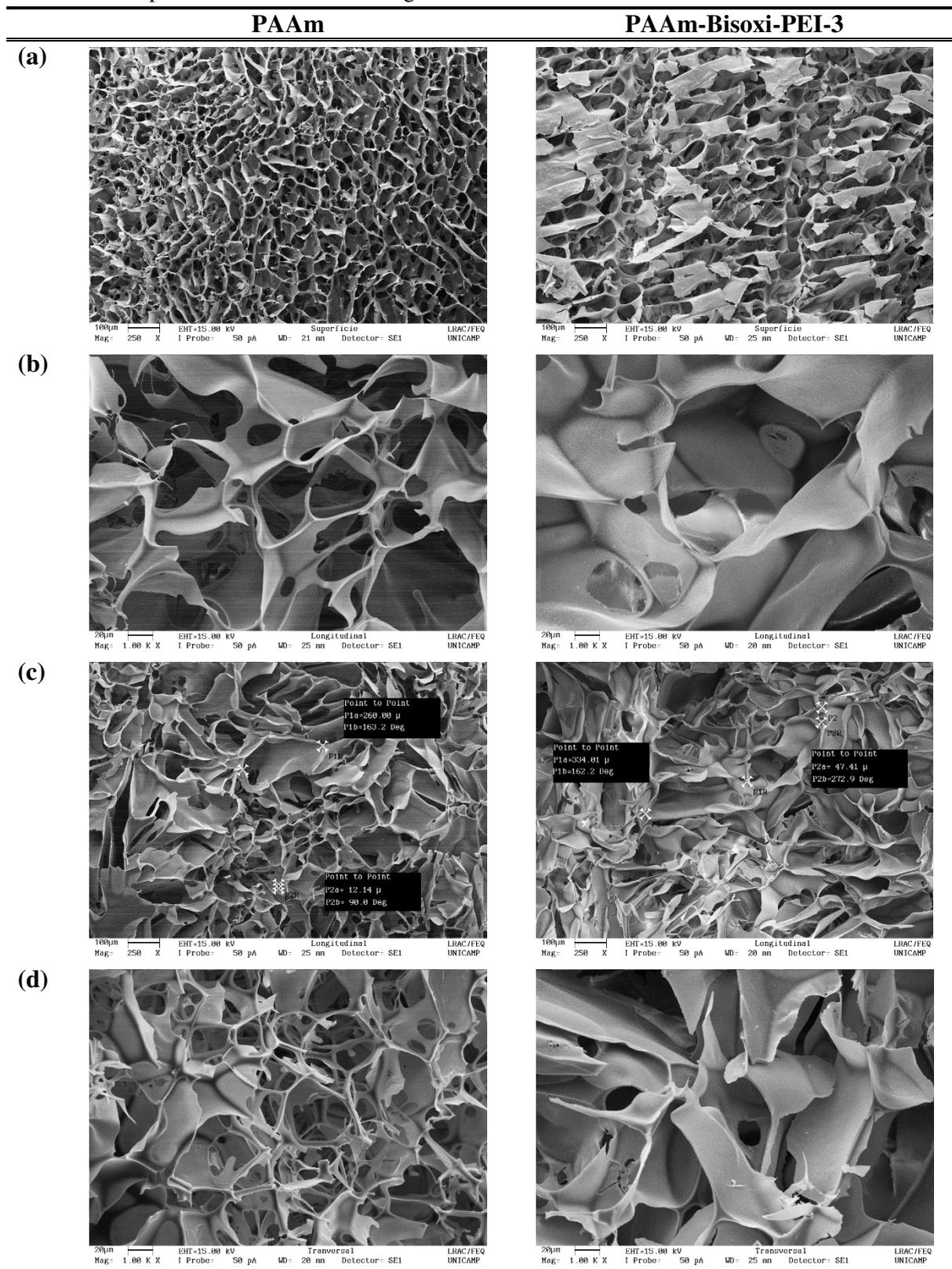
Figura 25 – Registro fotográfico dos criogéis (a) PAAm e (b) PAAm-Bisoxi-PEI.



Notou-se o aumento do seu volume, uma maior opacidade na sua coloração esbranquiçada, uma maior heterogeneidade ao longo da sua forma cilíndrica e uma maior rigidez de sua estrutura, não sendo mais comprimível na mesma intensidade e tornando-se muito mais quebradiço quando seco ou submetido à compressão manual de alta intensidade.

As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os criogéis PAAm e PAAm-Bisoxi-PEI sintetizados estão apresentadas na Figura 26.

Figura 26 – Imagens produzidas por MEV das (a) superfícies ampliadas 250 vezes, (b) secções longitudinais ampliadas 250 vezes (c) secções longitudinais ampliadas 1000 vezes e (d) secções transversais ampliadas 1000 vezes dos criogéis PAAm e PAAm-Bisoxi-PEI.



A Figura 26 permite observar a estrutura macroporosa, com poros não uniformes altamente interconectados, característico dos criogéis e que são também visualizados em imagens MEV reportados na literatura para diferentes criogéis (DAOUD-ATTIEH et al., 2013; EROL et al., 2016). A análise MEV demonstrou ainda que os poros são bastante heterogêneos e variam de 10 a 330 μm , dado semelhante ao encontrado na literatura, que aponta o tamanho dos poros dos criogéis entre 1 e 300 μm (GUN'KO; SAVINA; MIKHALOVSKY, 2013).

Comparando-se as imagens MEV obtidas, percebe-se que o criogel PAAm apresenta paredes de poros mais uniformes e lisas, enquanto que as do criogel PAAm-Bisoxi-PEI são mais rugosas e heterogêneas. Além disso, através da Figura 26a, nota-se uma certa regularidade no direcionamento dos poros na superfície do criogel contendo PEI, diferente do que é visto para o criogel de controle.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados experimentos cromatográficos com os adsorventes PAAm, PAAm-AGE-PEI-Ni(II), PAAm-AGE-PEI, PAAm-Bisoxi-PEI empregando os tampões Mops, Mes, NaP, Bis-Tris, Hepes, Tris-HCl, em valores de pH na faixa de 6,0 a 9,0, a fim de avaliar a purificação de IgG a partir de uma solução de soro humano.

Primeiramente, estudos com o adsorvente de poliacrilamida (PAAm) resultaram em uma baixa adsorção das proteínas do soro humano, atendendo a característica fundamental para ser aplicado como matriz em cromatografia e servindo, assim, como controle.

Os adsorventes PAAm-AGE-PEI-Ni(II) e PAAm-AGE-PEI não se mostraram capazes de, nas condições estudadas, purificar a IgG a partir do soro humano, fato constatado pela presença de impurezas (bandas de proteínas do soro humano) em todas frações cromatográficas avaliadas por eletroforese SDS-PAGE. Além disso, os ensaios cromatográficos com PAAm-AGE-PEI também permitiram concluir que esse material se degrada na presença NaCl em altas concentrações (1,0 mol/L), não tendo sido exploradas as razões para este fenômeno.

As cromatografias negativas realizadas nos adsorventes PAAm-AGE-PEI e PAAm-Bisoxi-PEI resultaram em valores próximos de adsorção de proteínas totais, de modo que, para uma média de $2,81 \pm 0,24$ mg de proteínas totais injetadas nas colunas, obteve-se em uma adsorção de $2,39 \pm 0,14$ mg e $1,97 \pm 0,12$ mg para as colunas com e sem braço espaçador, respectivamente. Por outro lado, os perfis eletroforéticos obtidos para cada uma dessas colunas foram distintos, uma vez que na ausência de braço espaçador (PAAm-AGE-PEI), as frações não retidas mais concentradas de lavagem exibiram bandas de IgG juntamente com outras proteínas do soro humano (albumina, transferrina, etc), enquanto que dois dos adsorventes contendo o braço espaçador (PAAm-Bisoxi-PEI-1 e PAAm-Bisoxi-PEI-3), resultaram em frações não retidas com perfis eletroforéticos semelhantes ao do marcador de IgG humana utilizado (IgG da Sigma-Aldrich).

Apesar dos resultados promissores encontrados para os criogéis PAAm-Bisoxi-PEI-1 e PAAm-Bisoxi-PEI-3 é necessário atentar-se ao fato de que o processo de síntese, da forma como conduzido, está susceptível a oscilações, podendo resultar réplicas não exatas destes criogéis que geram resultados não tão promissores como os apresentados nas Figuras 16 e 19. Além disso, a curva de ruptura realizada nestes criogéis revelou baixa capacidade de adsorção das proteínas do soro humano, fazendo com que sejam necessários mais estudos a fim de aumentar esta capacidade e possibilitar sua aplicabilidade em processos de purificação de IgG humana.

De modo geral, os resultados obtidos nas condições cromatográficas estudadas revelam o efeito do braço espaçador na pureza da IgG por cromatografia negativa, evidenciando também a potencialidade do ligante PEI imobilizado para purificação de IgG proveniente do soro humano.

A síntese dos criogéis de poliacrilamida também se revelou prática, a medida em que nenhuma técnica de maior nível de dificuldade está envolvida, consistindo de um processo simples e de poucas etapas. Além disso, associada a esta praticidade, as características estruturais e morfológicas dos criogéis sintetizados também são bastante promissoras, tendo em vista que são materiais flexíveis e resistentes, constituídos de inúmeros macroporos interconectados, que permitem, conforme a literatura consultada, uma transferência de massa regida por convecção, possibilitando assim o processamento de um maior volume de fase móvel quando comparado as matrizes tradicionais, sendo portanto mais passíveis de serem empregados na purificação em larga escala.

CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Em vista aos resultados obtidos, que demonstram o potencial do criogel proposto (PAAm-Bisoxi-PEI) para purificação de IgG a partir de soro humano por cromatografia negativa, bem como os outros resultados promissores envolvendo a utilização de criogéis e de ligantes de poliaminas para este fim, seria relevante a continuidade da pesquisa no que se refere principalmente ao processo de síntese, a fim de reduzir as variações de estrutura dos materiais obtidos, tornando-os replicáveis, e de maximizar a capacidade de adsorção de proteínas do soro humano no criogel proposto. Desta forma, sugere-se:

- 1) Avaliar outros agentes de ativação que resultem em materiais mais homogêneos e, de preferência, sem que haja perdas da característica esponjosa do criogel.
- 2) Realizar estudos do efeito do tipo de PEI empregado (massa molecular e índice de dispersão) e da concentração da solução de PEI em NaOH que é recirculada na coluna durante a etapa de imobilização, bem como o tempo em que esta é mantida recirculando.
- 3) Realizar estudos do efeito da concentração de monômeros precursores e da temperatura de criopolimerização nas propriedades do adsorvente proposto e na sua capacidade de purificação.
- 4) Realizar estudos do efeito da diluição do soro humano na seletividade do adsorvente.

CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKAN, H.; BERELI, N.; BAYSAL, Z.; DENIZLI, A. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 201–208, 2009.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 11, p. 845–867, 2002.

ANIRUDHAN, T. S.; RAUF, T. A.; REJEENA, S. R. Removal and recovery of phosphate ions from aqueous solutions by amine functionalized epichlorohydrin-grafted cellulose. **Desalination**, v. 285, p. 277–284, 2012.

ARORA, S.; SAXENA, V.; AYYAR, B. V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, v. 116, p. 84–94, 2016.

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, n. 2, p. 275–290, fev. 2003.

AXÉN, R.; PORATH, J.; ERNBACK, S. Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. **Nature**, v. 214, n. 5095, p. 1302–1304, 24 jun. 1967.

BABAC, C.; YAVUZ, H.; GALAEV, I. Y.; PIŞKIN, E.; DENIZLI, A. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 11, p. 1263–1271, 2006.

BAKSHPOUR, M.; DERAZSHAMSHIR, A.; BERELI, N.; ELKAK, A.; DENIZLI, A. [PHEMA/PEI]-Cu(II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 824–831, 2016.

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.

BRESOLIN, I. R. A. P.; BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Negative chromatography on agarose-TREN as a technique for purification of protein spiked in soybean seeds extract. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2255–2261, 2012.

BRESOLIN, I. T. L. **Agentes quelantes e poliamidas como grupos ionogênicos para a purificação de IgG humana por cromatografia**. [s.l.] Unicamp, 2010.

BRESOLIN, I. T. L.; DE SOUZA, M. C. M.; BUENO, S. M. A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto w-aminodecyl-agarose. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 23, p. 2087–2093, 2010.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.

BROOKS, S. P.; STOREY, K. B. Purification and characterization of a protein phosphatase that dephosphorylates pyruvate kinase in an anoxia tolerant animal. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 38, n. 6, p. 1223–1234, 1996.

BRUICE, P. Y. **Organic Chemistry**. [s.l.] Prentice Hall, 2003.

BURGESS, R. R. **Chapter 20 Protein Precipitation Techniques**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 463

BURNOUF, T. Modern Plasma Fractionation. v. 21, n. 2, p. 101–117, 2007.

CARMIGNOTTO, G. P. **Separação de fragmentos Fab humano por cromatografia negativa em poliaminas ω -aminohexil e poli(etilenoimina) imobilizadas em gel de agarose**. [s.l.] Unicamp, 2015.

CARMIGNOTTO, G. P.; MOURÃO, C. A.; BUENO, S. M. A. Separation of human Fab fragments by negative chromatography on ω -aminohexyl- and poly(ethyleneimine)-agarose. **Process Biochemistry**, v. 52, n. 4, p. 267–275, jan. 2017a.

CARMIGNOTTO, G. P.; MOURÃO, C. A.; BUENO, S. M. A. Separation of human Fab fragments by negative chromatography on w-aminohexyl- and poly(ethyleneimine)-agarose. **Process Biochemistry**, v. 52, n. 4, p. 267–275, jan. 2017b.

CASTILHO, L. R.; MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. New York: Taylor & Francis Group, 2008.

CERNIGOJ, U.; VIDIC, U.; NEMEC, B.; GASPERSIC, J.; VIDIC, J.; LENDERO KRAJNC, N.; STRANCAR, A.; PODGORNIK, A. Characterization of methacrylate chromatographic monoliths bearing affinity ligands. **Journal of Chromatography A**, v. 1464, p. 72–78, 2016.

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 49, n. 1–3, p. 313–334, 2001.

CHARCOSSET, C.; SU, Z.; KAROOR, S.; DAUN, G.; COLTON, C. K. Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin G purification: Experimental characterization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, n. 4, p. 415–427, 20 nov. 1995.

DA SILVA, L. C. A. **Purificação de fragmentos Fab a partir de solução de clivagem enzimática de IgG humana: cromatografia de pseudoafinidade com quelatos metálicos e fenil boronato como ligantes.** [s.l.] Unicamp, 2014.

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, abr. 2014.

DAOUD-ATTIEH, M.; CHAIB, H.; ARMUTCU, C.; UZUN, L.; ELKAK, A.; DENIZLI, A. Immunoglobulin G purification from bovine serum with pseudo-specific supermacroporous cryogels. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 816–822, 2013.

DE SOUZA, M. C. M. **Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose.** [s.l.] Unicamp, 2009.

DE SOUZA, M. C. M.; BRESOLIN, I. T. L.; BUENO, S. M. A. Purification of human IgG by negative chromatography on w-aminoethyl-agarose. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 5–6, p. 557–566, 2010.

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, 15 ago. 2007.

DURU, P. E.; BEKTAS, S.; GENÇ, Ö.; PATİR, S.; DENIZLI, A. Adsorption of heavy-metal ions on poly(ethylene imine)-immobilized poly(methyl methacrylate) microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 81, n. 1, p. 197–205, 5 jul. 2001.

EROL, K.; KÖSE, K.; UZUN, L.; SAY, R.; DENIZLI, A. Polyethyleneimine assisted-two-step polymerization to develop surface imprinted cryogels for lysozyme purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 567–576, out. 2016.

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

FAN, M. (KE K. **Global Markets for Research Antibodies**. Disponível em: <<http://www.giiresearch.com/report/bc323442-global-markets-research-antibodies.html>>.

FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A.; MARINO, M. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1–3, p. 481–490, 2001.

FILIPPIDOU, N.; KRASHIAS, G.; PERICLEOUS, C.; RAHMAN, A.; IOANNOU, Y.; GILES, I.; DEMETRIOU, C.; ANATOLITOU, A.; CHRISTODOULOU, C.; PANTZARIS, M.; LAMBRIANIDES, A. The association between IgG and IgM antibodies against cardiolipin, B-glycoprotein I and Domain I of B2-glycoprotein I with disease profile in patients with multiple sclerosis. **Molecular Immunology**, v. 75, p. 161–167, 2016.

FLOREA, B. I.; MEANEY, C.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. **AAPS PharmSci**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2002.

GALA, M. A. Effect of the Spacer Arm in Affinity Chromatography : Determination of Adsorption Characteristics and Flow Rate Effect. **Society**, p. 2296–2304, 2002.

GÖKTÜRK, I.; DERAZSHAMSHIR, A.; YILMAZ, F.; DENIZLI, A. Poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine (PVA/PEI) blended monolithic cryogel columns for the depletion of haemoglobin from human blood. **Separation Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 1787–1797, 23 jul. 2016.

GUN'KO, V. M.; SAVINA, I. N.; MIKHALOVSKY, S. V. Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 187–188, p. 1–46, 2013.

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: [s.n.].

HANORA, A.; PLIEVA, F. M.; HEDSTROM, M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Capture of bacterial endotoxins using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. **Journal of Biotechnology**, v. 118, n. 4, p. 421–433, 2005.

HERMANSON, G. T.; MALLIA, K. A.; SMITH, P. K. **Immobilized affinity ligand techniques**. San Diego: [s.n.]. v. 11

HJERTÉN, S. The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects**, v. 79, n. 2, p. 393–398, 1964.

HORTIN, G. L.; SVIRIDOV, D.; ANDERSON, N. L. High-Abundance Polypeptides of the Human Plasma Proteome Comprising the Top 4 Logs of Polypeptide Abundance. **Clinical Chemistry**, v. 54, p. 1608–1616, 2008.

HOUEN, G. Aminoalkyl affinity matrices. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1–3, p. 189–197, 2001.

HUSE, K.; BÖHME, H. J.; SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 51, n. 3, p. 217–231, 2002.

IYER, G.; RAMASWAMY, S.; ASHER, D.; MEHTA, U.; LEAHY, A.; CHUNG, F.; CHENG, K.-S. Reduced surface area chromatography for flow-through purification of viruses and virus like particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 26, p. 3973–3981, jul. 2011.

JAGER, M.; SCHUBERT, S.; OCHRIMENKO, S.; FISCHER, D.; SCHUBERT, U. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. **Chem Soc Rev**, v. 41, p. 4755–4767, 2012.

KANEKO, M.; OHHASHI, M.; MINEMATSU, T.; MURAOKA, J. Maternal immunoglobulin G avidity as a diagnostic tool to identify pregnant women at risk of congenital cytomegalovirus infection. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 23, n. 3, p. 173–176, 2017.

KLEIN, E. **Affinity Membranes: Their Chemistry and Performance in Adsorptive Separation Processes**. New York: [s.n.].

KUMAR, A.; BANSAL, V.; ANDERSSON, J.; ROYCHOUDHURY, P. K.; MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n. 1, p. 35–42, 2006a.

KUMAR, A.; BANSAL, V.; NANDAKUMAR, K. S.; GALAEV, I. Y.; ROYCHOUDHURY, P. K.; HOLMDAHL, R.; MATTIASSON, B. Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 4, p. 636–646, 2006b.

KUMAR, A.; MISHRA, R.; REINWALD, Y.; BHAT, S. Cryogels: Freezing unveiled by thawing. **Materials Today**, v. 13, n. 11, p. 42–44, 2010.

KUMAR, A.; RODRÍGUEZ-CABALLERO, A.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; NANDAKUMAR, K. S.; KAMIHIRA, M.; HOLMDAHL, R.; ORFAO, A.; MATTIASSON, B. Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: Effect of ligand coupling and matrix architecture. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, n. 1, p. 84–93, 2005.

LAEMMLI, S. SDS-PAGE. p. 12–13, 1970.

LEE, M. F. X.; CHAN, E. S.; TEY, B. T. Negative chromatography: Progress, applications and future perspectives. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1005–1011, 2014.

LEVISON, P. R. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins: Comparison of different formats. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 790, n. 1–2, p. 17–33, 2003.

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, p. 445–451, 2003.

LU, X.; ZHAO, D.; MA, G.; SU, Z. Polyethylene glycol increases purification and recovery , alters retention behavior in flow-through chromatography of hemoglobin. v. 1059, p. 233–237, 2004.

LU, X.; ZHAO, D.; SU, Z. Purification of Hemoglobin by Ion Exchange Chromatography in Flow-Through Mode with PEG as an Escort. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 209–227, 11 jan. 2004.

MAES, P.; DONADIO-ANDRÉL, S.; LOUWAGIE, M.; COUTÉ, Y.; PICARD, G.; LACOSTE, C.; BRULEY, C.; GARIN, J.; ICHAI, P.; FAIVRE, J.; JAQUINOD, M.; BRUN, V. Introducing plasma/serum glycodepletion for the targeted proteomics analysis of cytolysis biomarkers. **Talanta**, v. 170, n. January, p. 473–480, 2017.

MAKETON, W.; ZENNER, C. Z.; OGDEN, K. L. Removal efficiency and binding mechanisms of copper and copper - EDTA complexes using polyethyleneimine. **Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 2124–2129, 2008.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. Review Affinity monolith chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1686–1704, 2006.

MINOIS, N.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; MADEO, F. Polyamines in aging and disease. **Aging**, v. 3, n. 8, p. 716–732, 2011.

MITZNER, S.; SCHNEIDEWIND, J.; FALKENHAGEN, D.; LOTH, F.; KLINKMANN, H. Extracorporeal Endotoxin Removal by Immobilized Polyethylenimine. **Artificial Organs**, v. 17, n. 9, p. 775–781, 1993.

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

MURAKAMI, Y.; RIKIMURA, S.; SUGO, K.; KAWAMURA, K.; OGAWA, T.; MASAHIRO, H.; OKUYAMA, T. Preparation of polyethylenimine-hydroxyapatite and its chromatographic use. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 32, n. 3, p. 407–417, 2009.

PANG, X.; CHENG, G.; ZHANG, Y.; LU, S. Soft-wet polyacrylamide gel beads with the imprinting of bovine serum albumin. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, n. 10, p. 1182–1188, 2006.

PANG, Y.; ZENG, G.; TANG, L.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LEI, X.; LI, Z.; ZHANG, J.; XIE, G. PEI-grafted magnetic porous powder for highly effective adsorption of heavy metal ions. **Desalination**, v. 281, n. 1, p. 278–284, 2011.

PARIJA, S. C. **Textbook of Microbiology & Immunology**. [s.l.] Elsevier India Pvt. Limited, 2009.

PEREZ, E. E. et al. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 3, p. S1–S46, 2016.

PERSSON, M. A. A. Preparation of human sera containing one single IgG subclass using affinity chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v. 98, p. 91–98, 1987.

PHILLIPS, A. P.; MARTIN, K. L.; HORTON, W. H. The choice of methods for immunoglobulin IgG purification: Yield and purity of antibody activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 74, n. 2, p. 385–393, 1984.

PITOT, O.; NEDONCHELLE, E.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Protein adsorption on histidyl-aminoethyl-Sepharose 4B: II. Application to the negative one-step affinity purification of human β 2-microglobulin and Immunoglobulin G. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 758, n. 2, p. 173–182, 2001.

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.; KARLSSON, M.; AGUILAR, M.-R.; GOMEZ, D.; MIKHALOVSKY, S. V.; GALAEV, I. Y. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. **Soft Matter**, v. 1, n. 4, p. 303, 2005.

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: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 129–137, 2004b.

PRIN, C.; BENE, M. C.; GOBERT, B.; MONTAGNE, P.; FAURE, G. C. Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes. **BBA - General Subjects**, v. 1243, n. 2, p. 287–289, 1995.

RIBEIRO; MARIANA BORSOI. **Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(ii) e Ni(ii) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp.** [s.l.] Unicamp, 2006.

ROCHE, S.; TIERS, L.; PROVANSAL, M.; SEVENO, M.; PIVA, M. T.; JOUIN, P.; LEHMANN, S. Depletion of one, six, twelve or twenty major blood proteins before proteomic analysis: The more the better? **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 6, p. 945–951, 2009.

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, n. 1–2, p. 44–55, 2007.

SAHINER, N.; DEMIRCI, S. Poly ionic liquid cryogel of polyethyleneimine: Synthesis, characterization, and testing in absorption studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 22, p. 1–13, 2016.

SAVANE, T. S.; KUMAR, S.; JANAKIRAMAN, V. N.; KAMALANATHAN, A. S.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Molecular insight in the purification of immunoglobulin by pseudobiospecific ligand l-histidine and histidyl moieties in histidine ligand affinity chromatography (HLAC) by molecular docking. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1021, p. 129–136, 2016.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Adsorption equilibrium and kinetics of egg-white proteins on immobilized metal ion affinity gels for designing fractionation. **Adsorption**, v. 8, n. 3, p. 203–213, 2002a.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 37, n. 15, p. 3491–3511, 11 jan. 2002b.

STRAATHOF, A. J. J. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. In: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 811–814.

SUN, K.; SEHON, A. H. The use of polyacrylamide gels for chromatography of proteins. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 969–976, 1965.

TORRES, R.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Supports coated with PEI as a new tool in chromatography. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 711–716, 2006.

TRIER, N. H.; HOUEN, G. **Peptide Antibodies in Clinical Laboratory Diagnostics**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

TSCHELIESSNIG, A.; SATZER, P.; HAMMERSCHMIDT, N.; SCHULZ, H.; HELK, B.; JUNGBAUER, A. Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. **Journal of Biotechnology**, v. 188, p. 17–28, 2014.

TÜRKMEN, D.; YAVUZ, H.; DENIZLI, A. Synthesis of tentacle type magnetic beads as immobilized metal chelate affinity support for cytochrome c adsorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, n. 2, p. 126–133, 2006.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 71–76, 1989.

WANG, F.; LIU, P.; NIE, T.; WEI, H.; CUI, Z. Characterization of a polyamine microsphere and its adsorption for protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 17–29, 2013.

WANG, Y.; ZHANG, P.; LIU, S.; ZHANG, Y.; ZHAO, T. Purification of IgG from Sera of Rabbit and Guinea Pig by Flow-Through Mode Ion-Exchange Chromatography using DEAE Sepharose Fast Flow Column. p. 209–214, 2011.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

WONGCHUPHAN, R.; TEY, T.; SIANG, W.; KUMAR, S.; SALEENA, F.; CHUAN, T. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G using anion exchangers. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 101–107, 2011.

YAO, Y.; LENHOFF, A. M. Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, n. 1–2, p. 273–282, 2004.

ZANDER, N. E. **Chelating Polymers and Environmental Remediation**. Phoenix: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA495762>>.

ZÖCHLING, A.; HAHN, R.; AHRER, K.; URTHALER, J.; JUNGBAUER, A. Mass transfer characteristics of plasmids in monoliths. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10–11, p. 819–827, 2004.

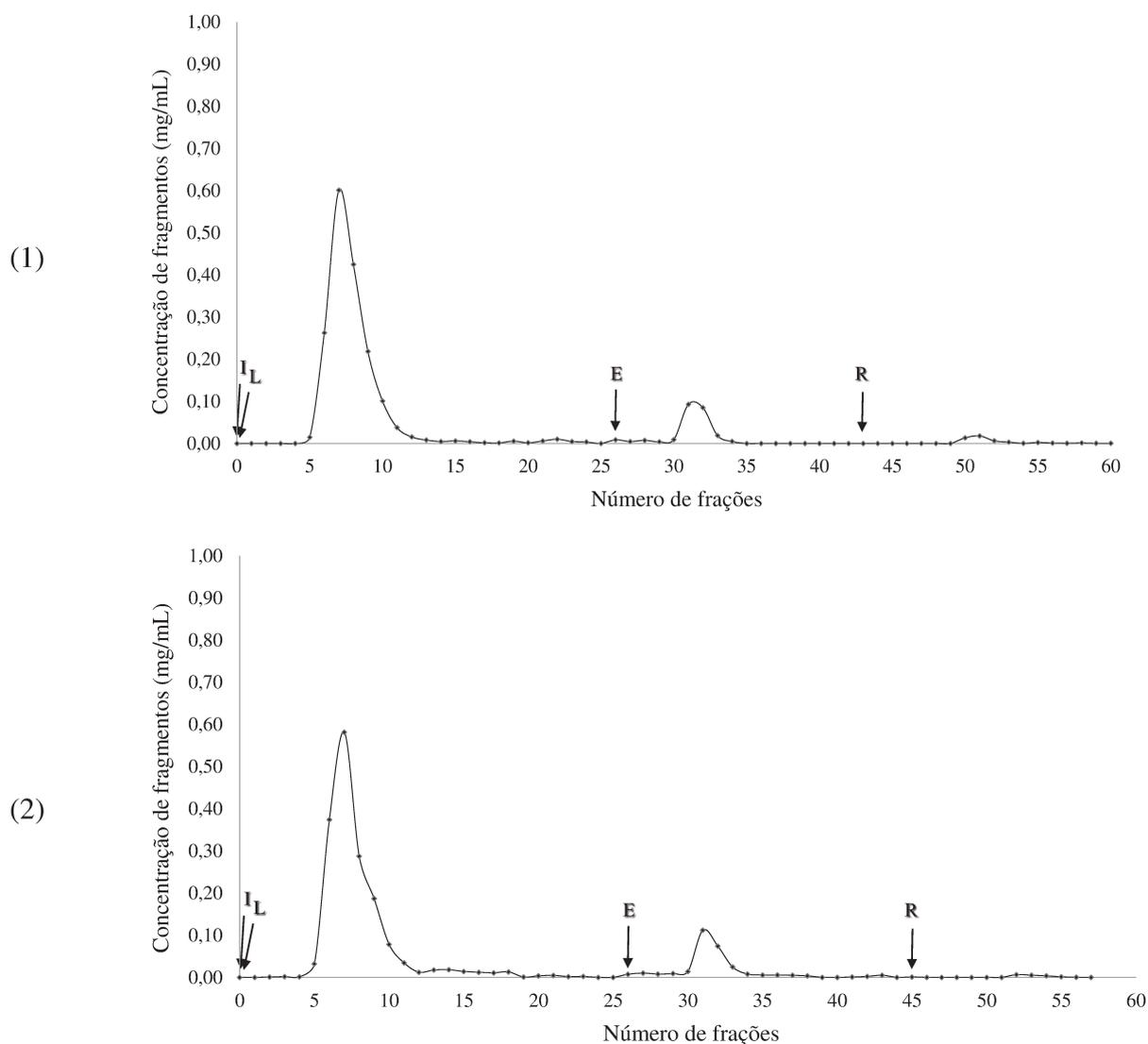
APÊNDICE A

Perfis cromatográficos e eletroforéticos para os ensaios cromatográficos realizados a partir de IgG de alta pureza e de soro humano diluído nas colunas contendo os criogéis PAAM.

IgG de alta pureza

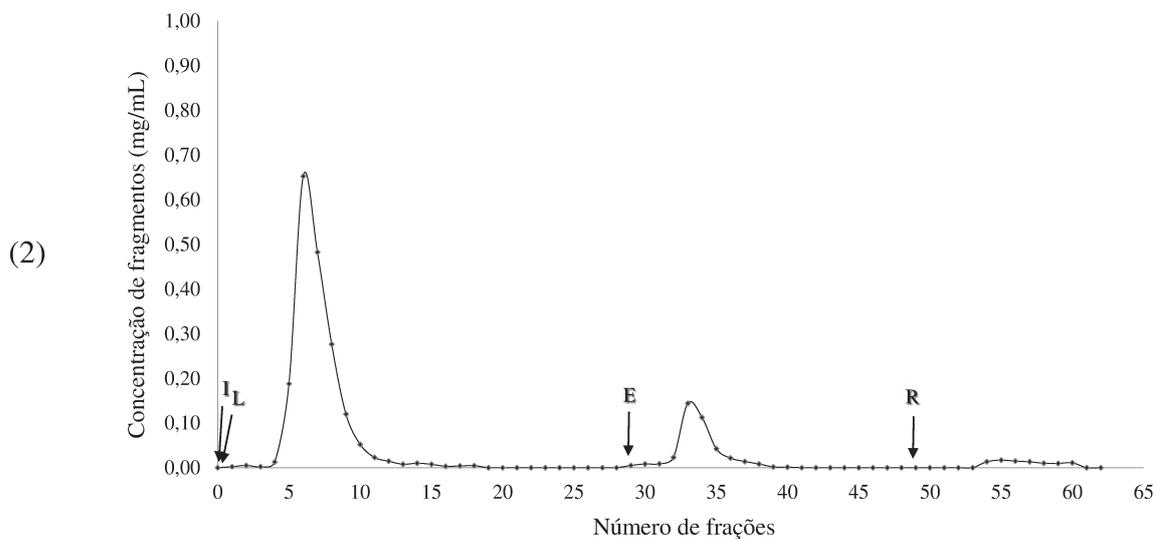
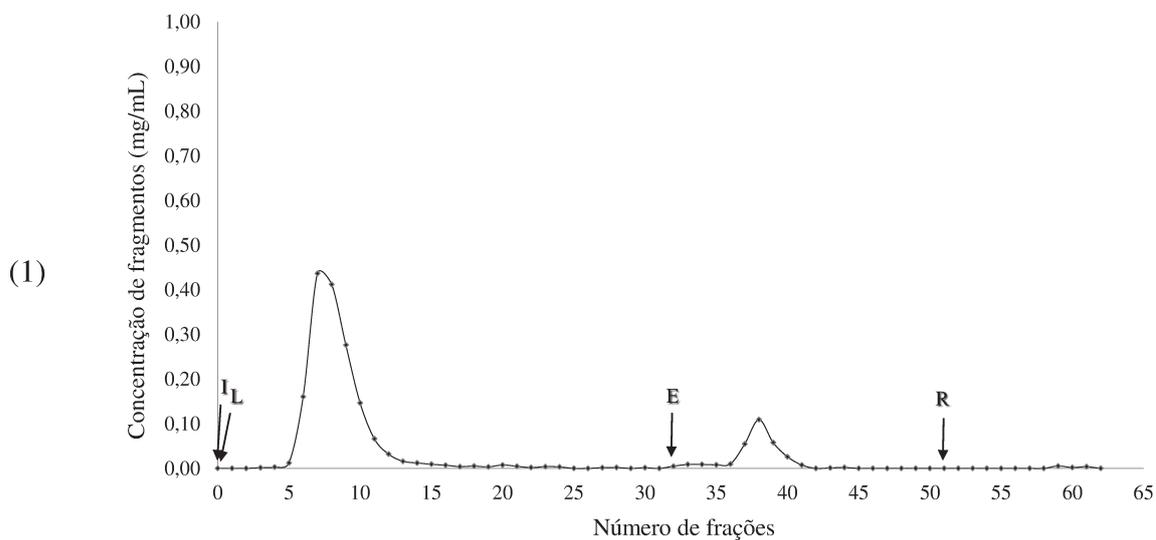
1) NaP 10 mmol/L pH 6,0

Figura A. 1 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM utilizando sistema tamponante NaP 10 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,96 mg/mL e (2) 1,89 mg/mL. L- Lavagem: NaP 10 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: NaP 10 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl pH 6,0. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L.



2) Hepes 25 mmol/L pH 7,0

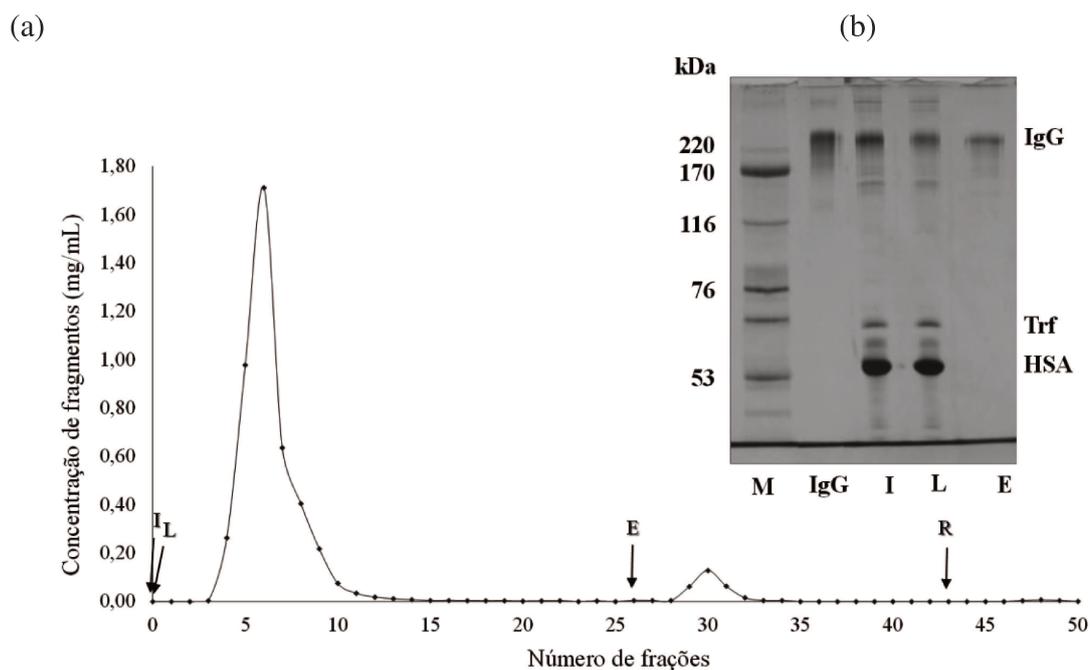
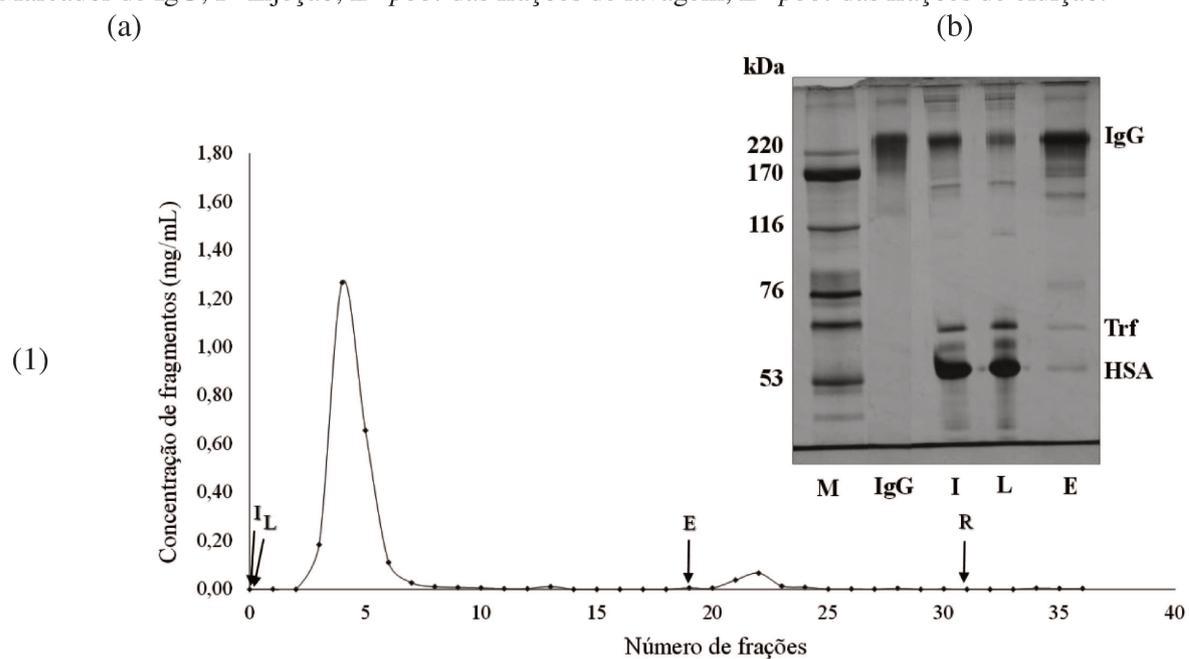
Figura A. 2 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,90 mg/mL e (2) 2,21 mg/mL. L- Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Hepes 25 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl pH 7,0. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L.



Soro humano 15x diluído

1) NaP 10 mmol/L pH 6,0

Figura A. 3 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm utilizando sistema tamponante NaP 10 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de (1) 1,5 mL e (2) 2,0 mL de solução contendo soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,24 mg/mL e (2) 3,28 mg/mL. L- Lavagem: NaP 10 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: NaP 10 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl pH 6,0. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição.



APÊNDICE B

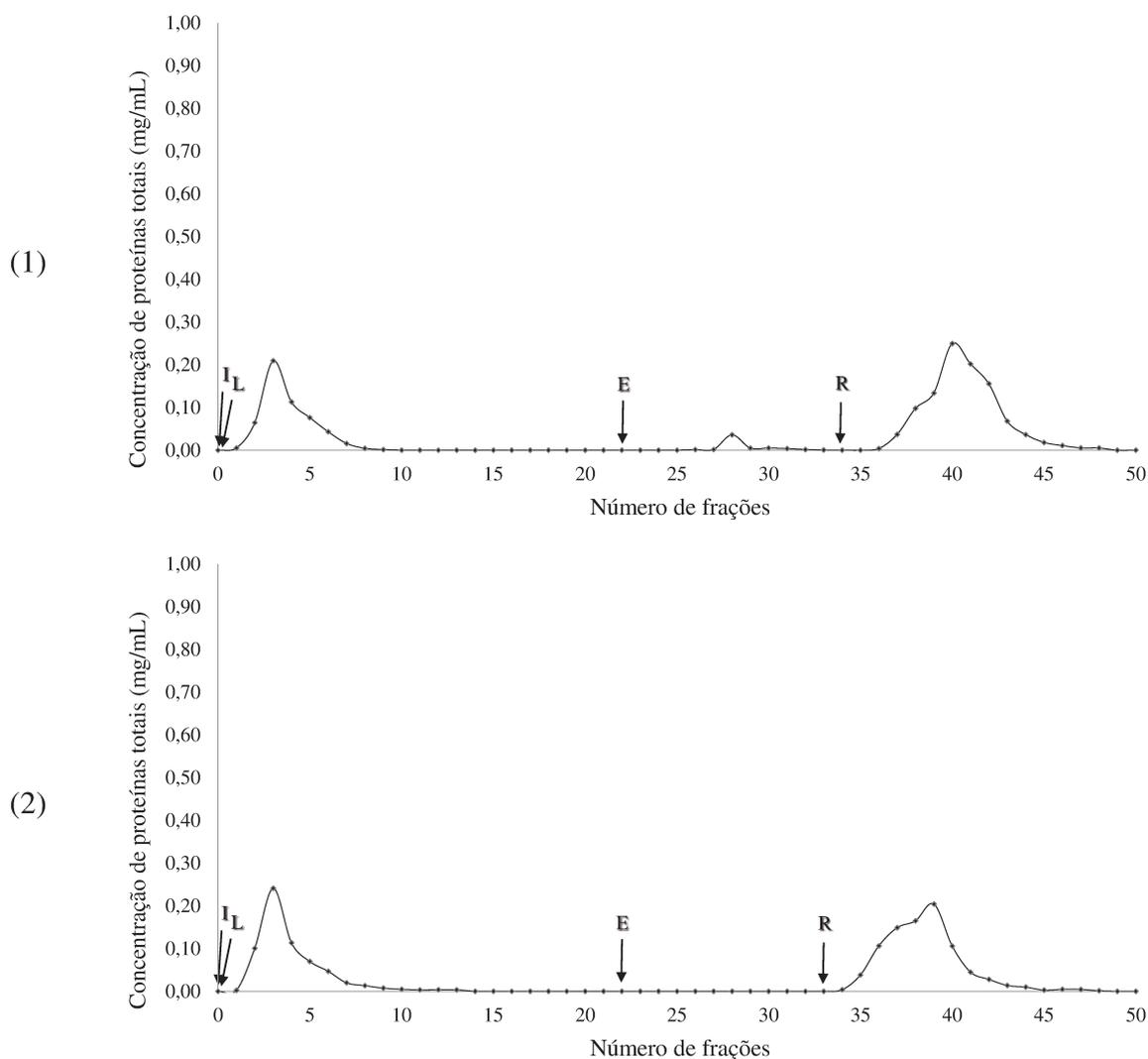
Perfis cromatográficos e eletroforéticos para os ensaios cromatográficos realizados a partir de IgG de alta pureza e de soro humano diluído nas colunas contendo os criogéis PAAM-AGE-PEI-Ni(II).

IgG de alta pureza

❖ Fosfato de Sódio (NaP)

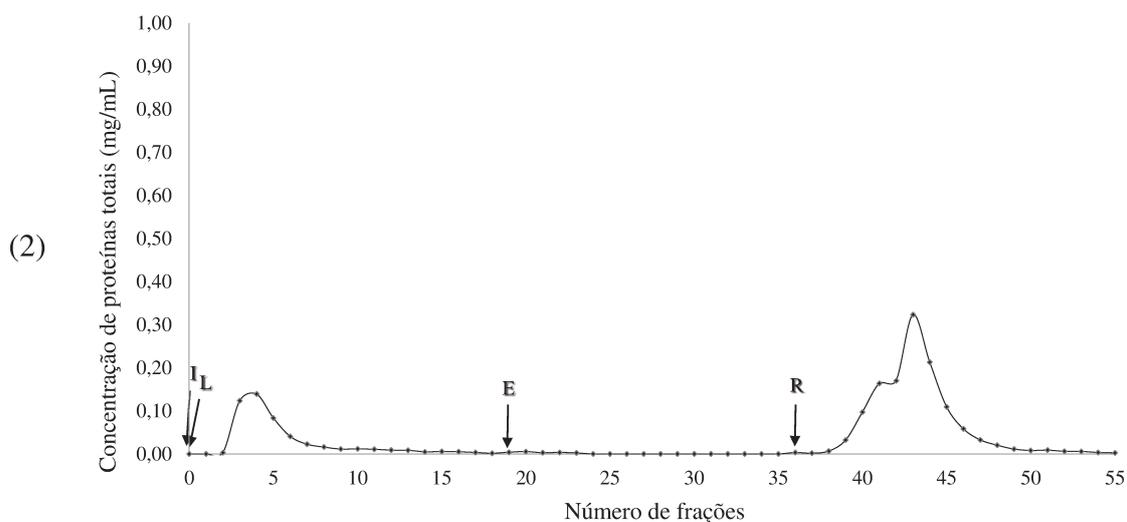
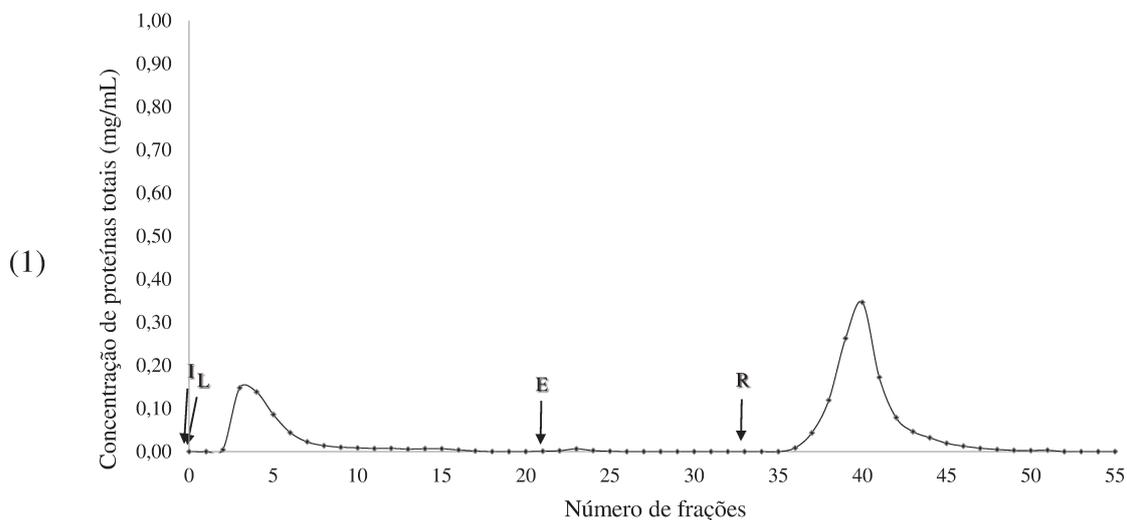
1) NaP 25 mmol/L pH 6,0

Figura B. 1 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,07 mg/mL e (2) 2,02 mg/mL. L- Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



2) NaP 25 mmol/L pH 6,5

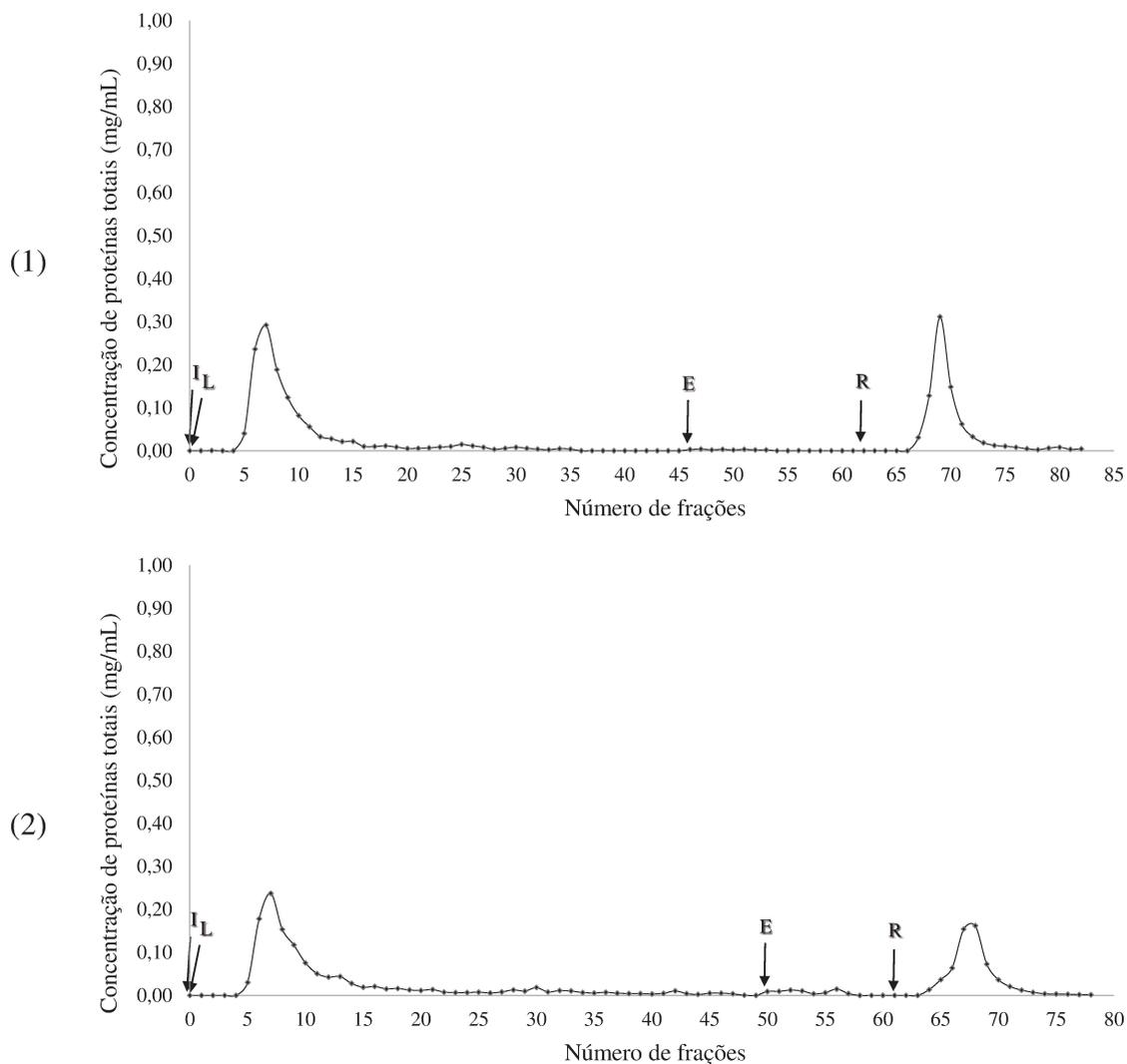
Figura B. 2 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,05 mg/mL e (2) 2,09 mg/mL. L- Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

3) NaP 25 mmol/L pH 7,0

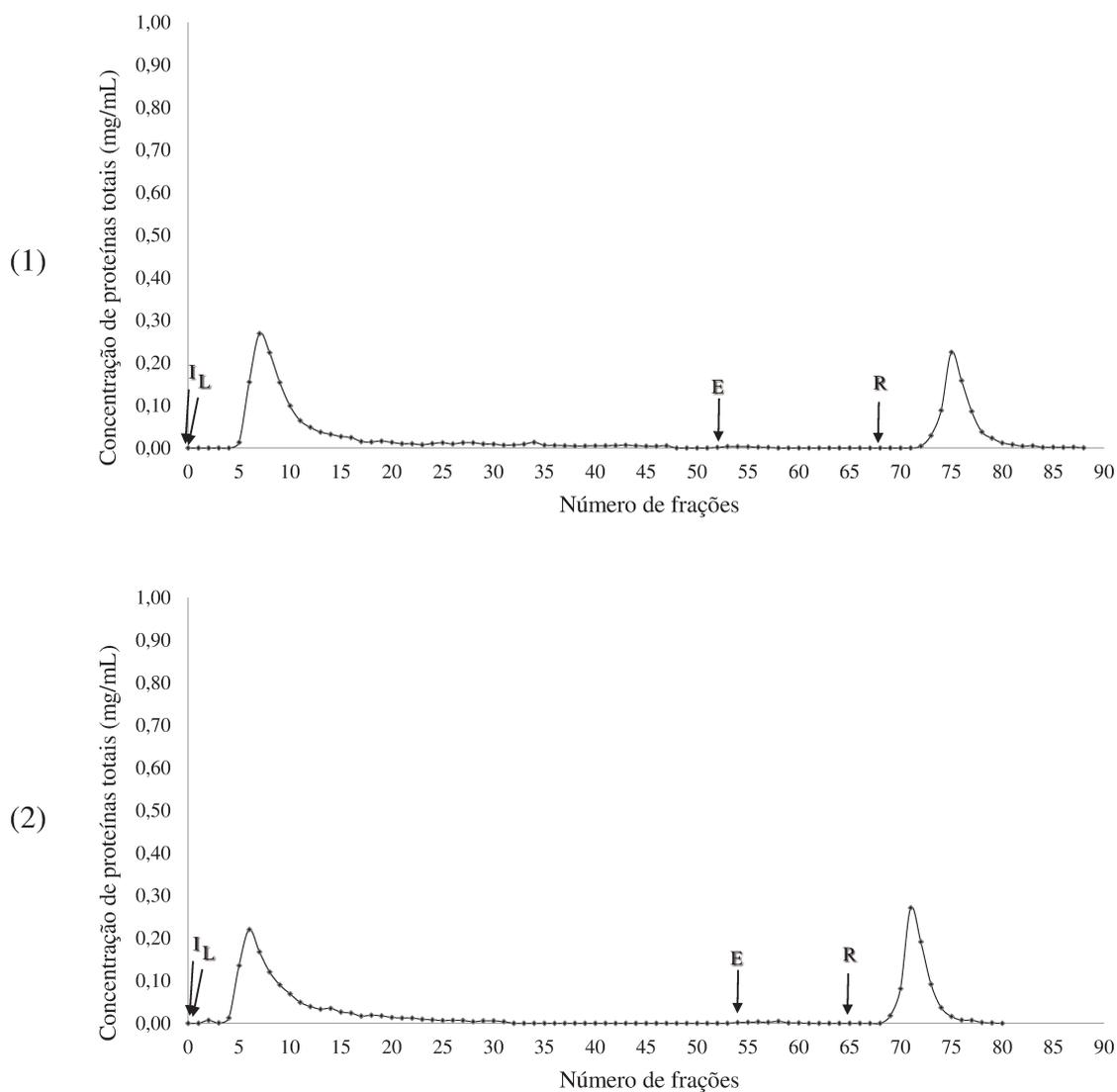
Figura B. 3 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,07 mg/mL e (2) 1,92 mg/mL. L- Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 1 mL em todas etapas cromatográficas

4) NaP 25 mmol/L pH 7,5

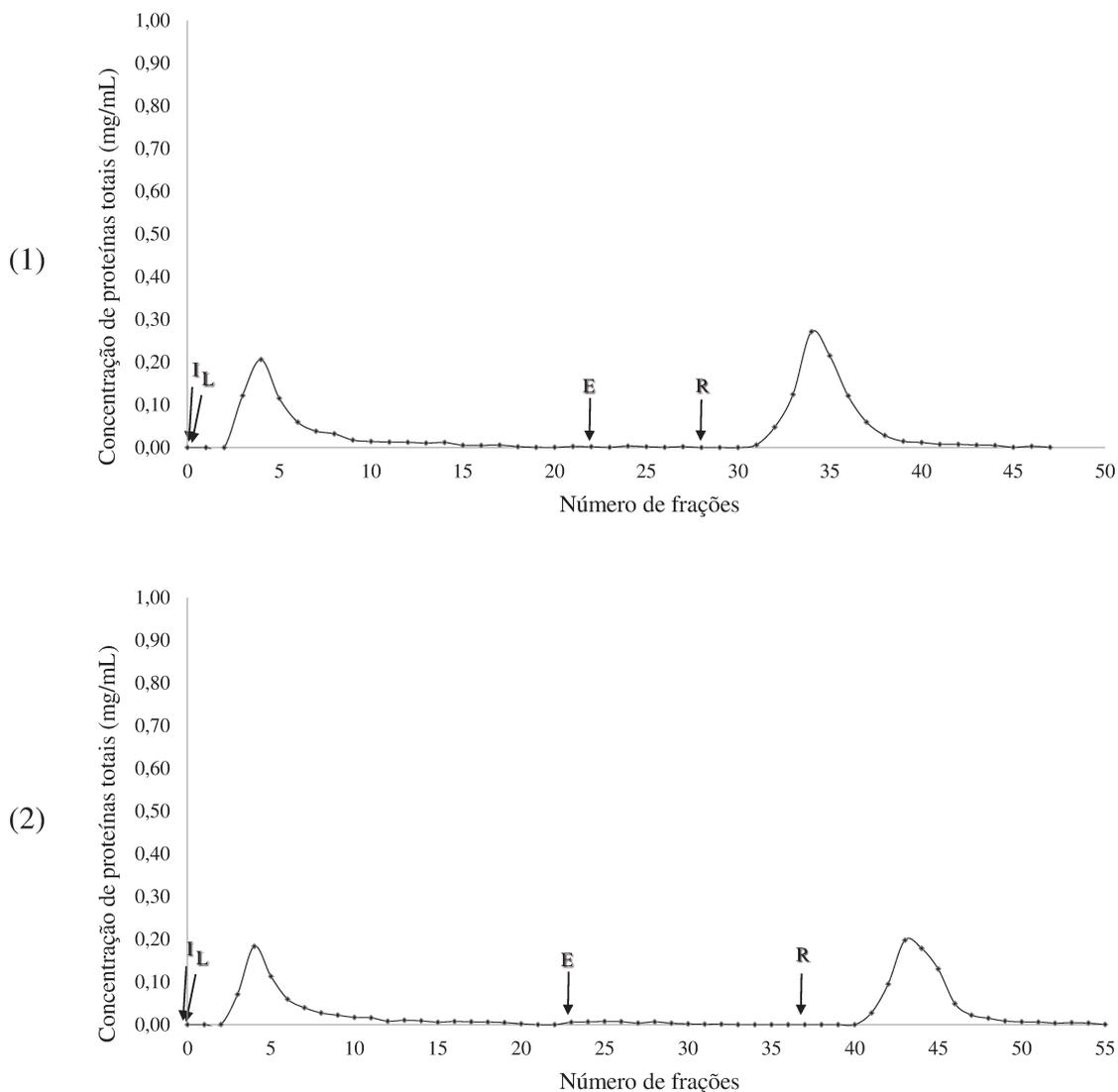
Figura B. 4 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,12 mg/mL e (2) 1,91 mg/mL. L- Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 7,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 1 mL em todas etapas cromatográficas

5) NaP 25 mmol/L pH 8,0

Figura B. 5 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 8,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,15 mg/mL e (2) 1,87 mg/mL. L- Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 8,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.

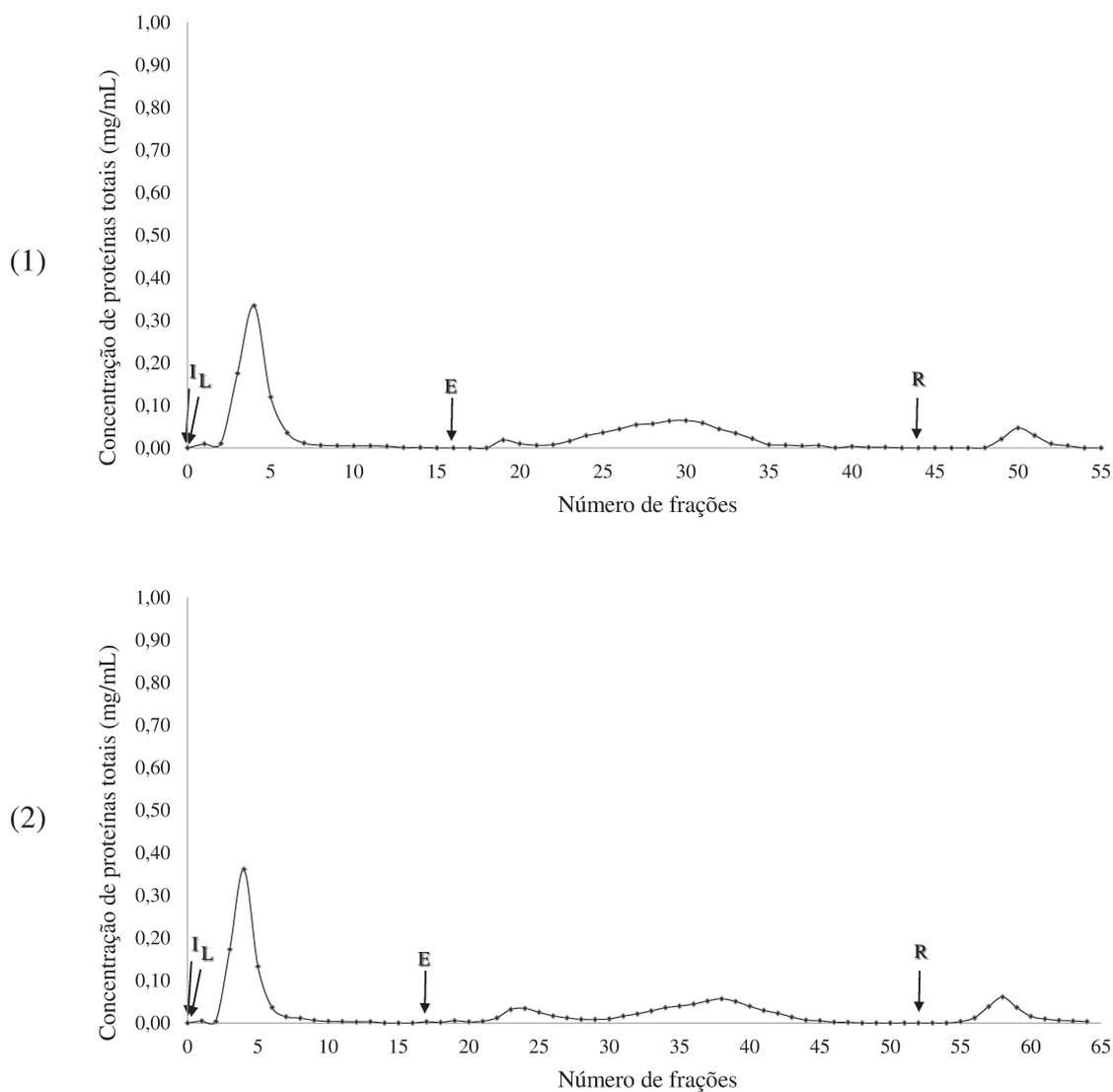


Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem; 2 mL (1) e 1 mL (2) nas de Eluição e 2 mL nas de Regeneração

❖ HEPES

1) HEPES 25 mmol/L pH 7,0

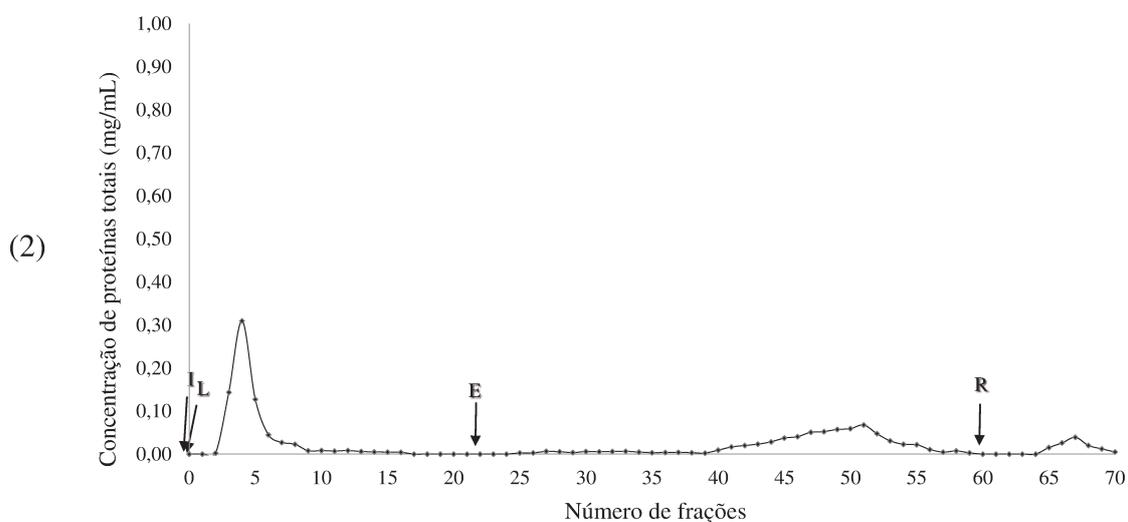
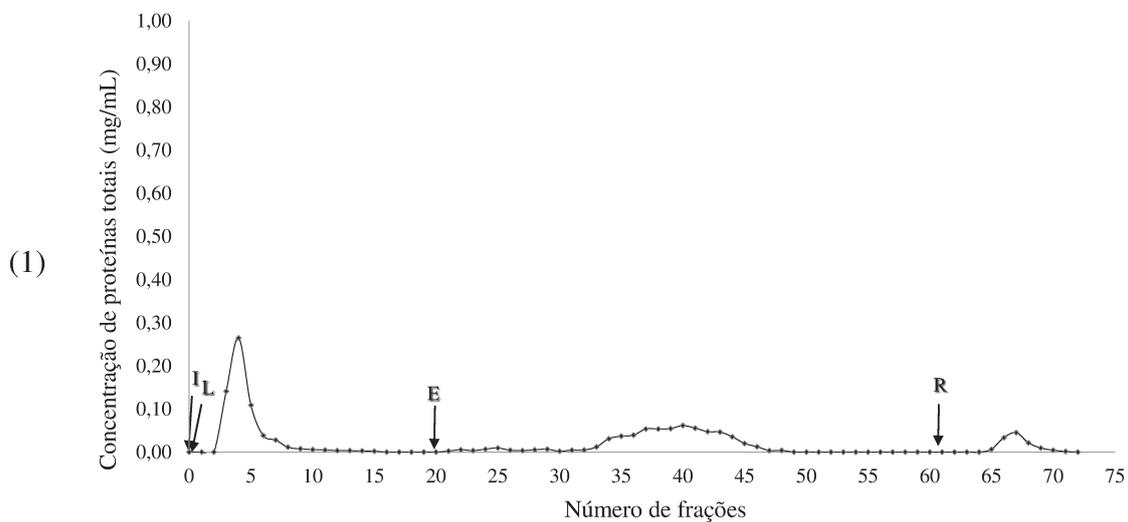
Figura B. 6 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante HEPES 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana ultrapura na concentração de (1) 2,00 mg/mL e (2) 2,16 mg/mL. L- Lavagem: HEPES 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

2) Hepes 25 mmol/L pH 7,5

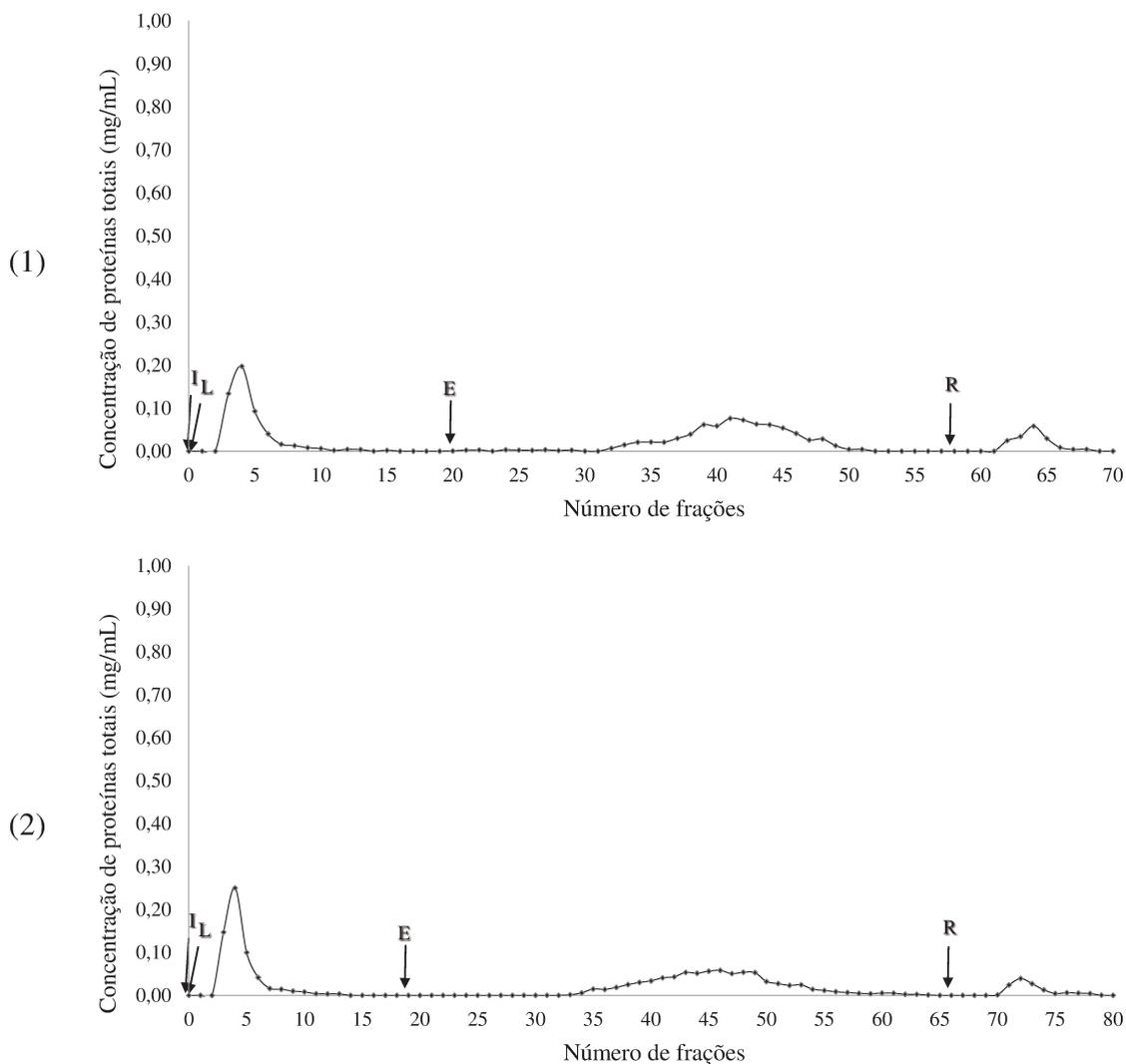
Figura B. 7 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,94 mg/mL e (2) 2,06 mg/mL. L- Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,5. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

3) Hepes 25 mmol/L pH 8,0

Figura B. 8 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Hepes 25 mmol/L pH 7,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,97 mg/mL e (2) 1,94 mg/mL. L- Lavagem: Hepes 25 mmol/L pH 7,5. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.

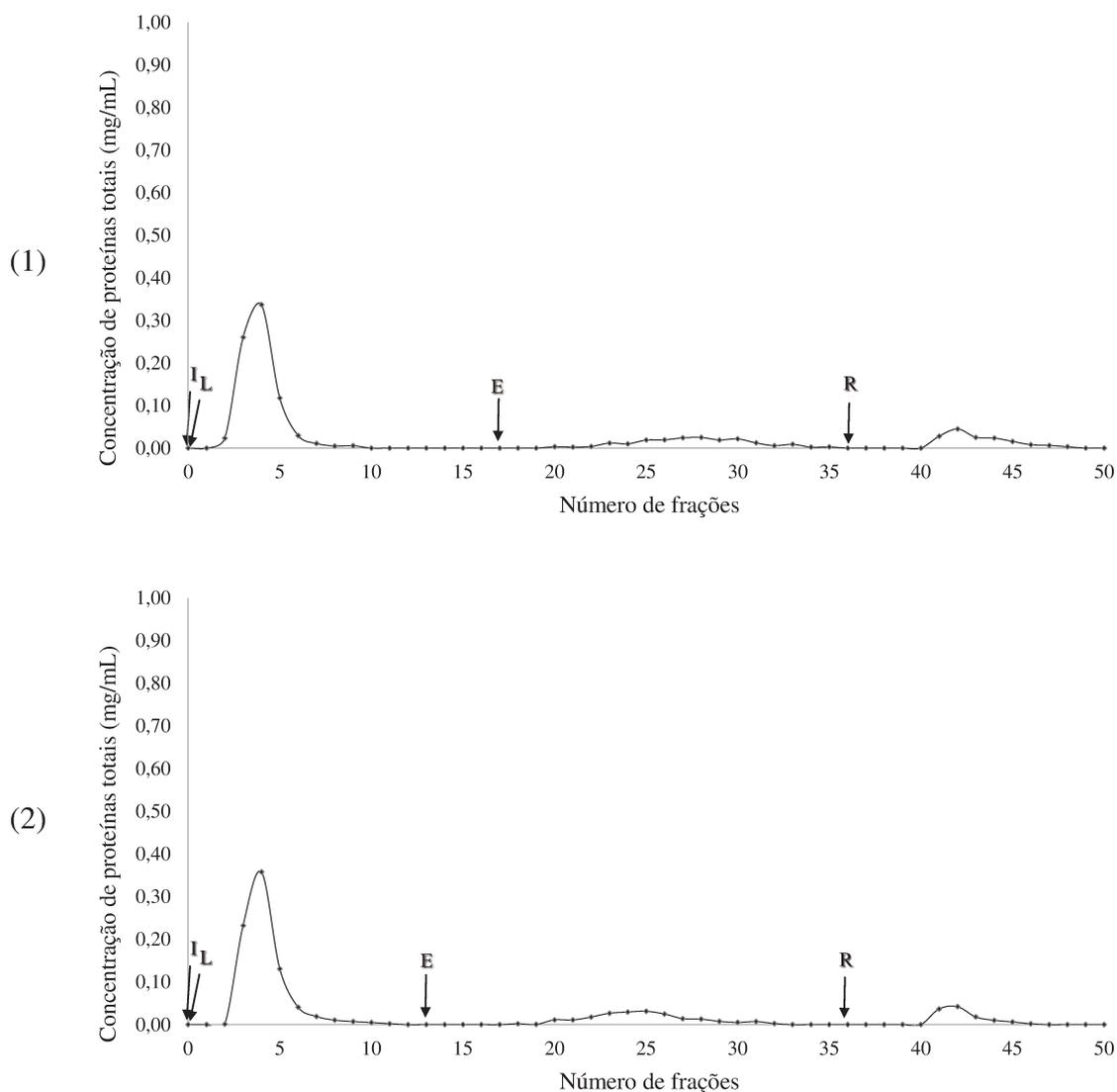


Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

❖ Bis-Tris

1) Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0

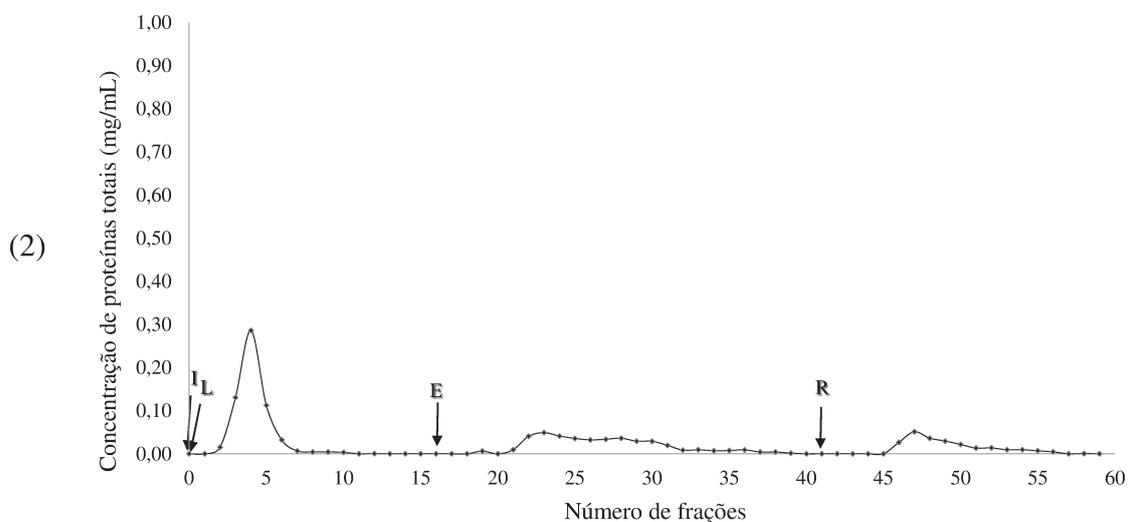
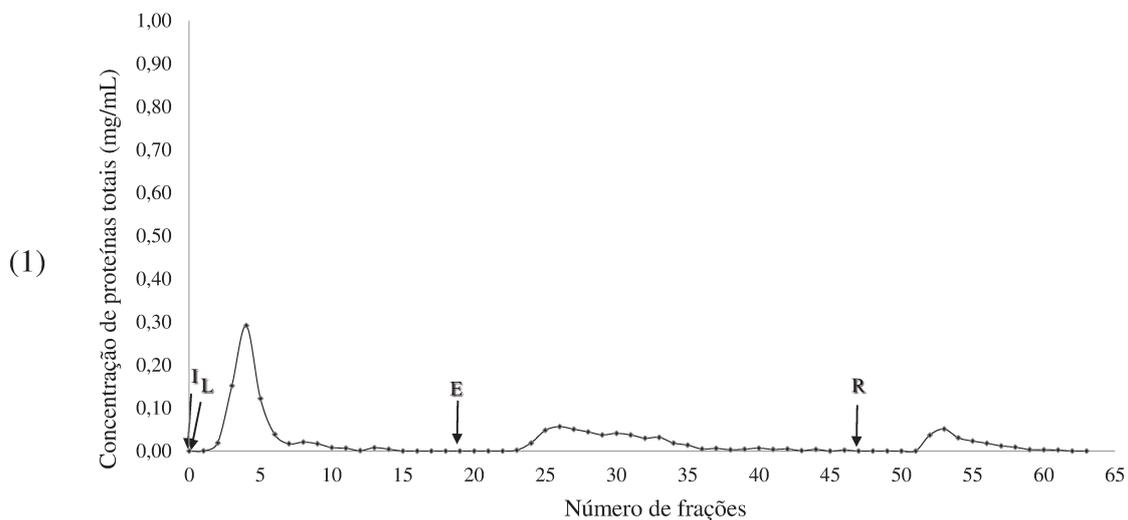
Figura B. 9 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,98 mg/mL e (2) 1,94 mg/mL. L- Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

2) Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,5

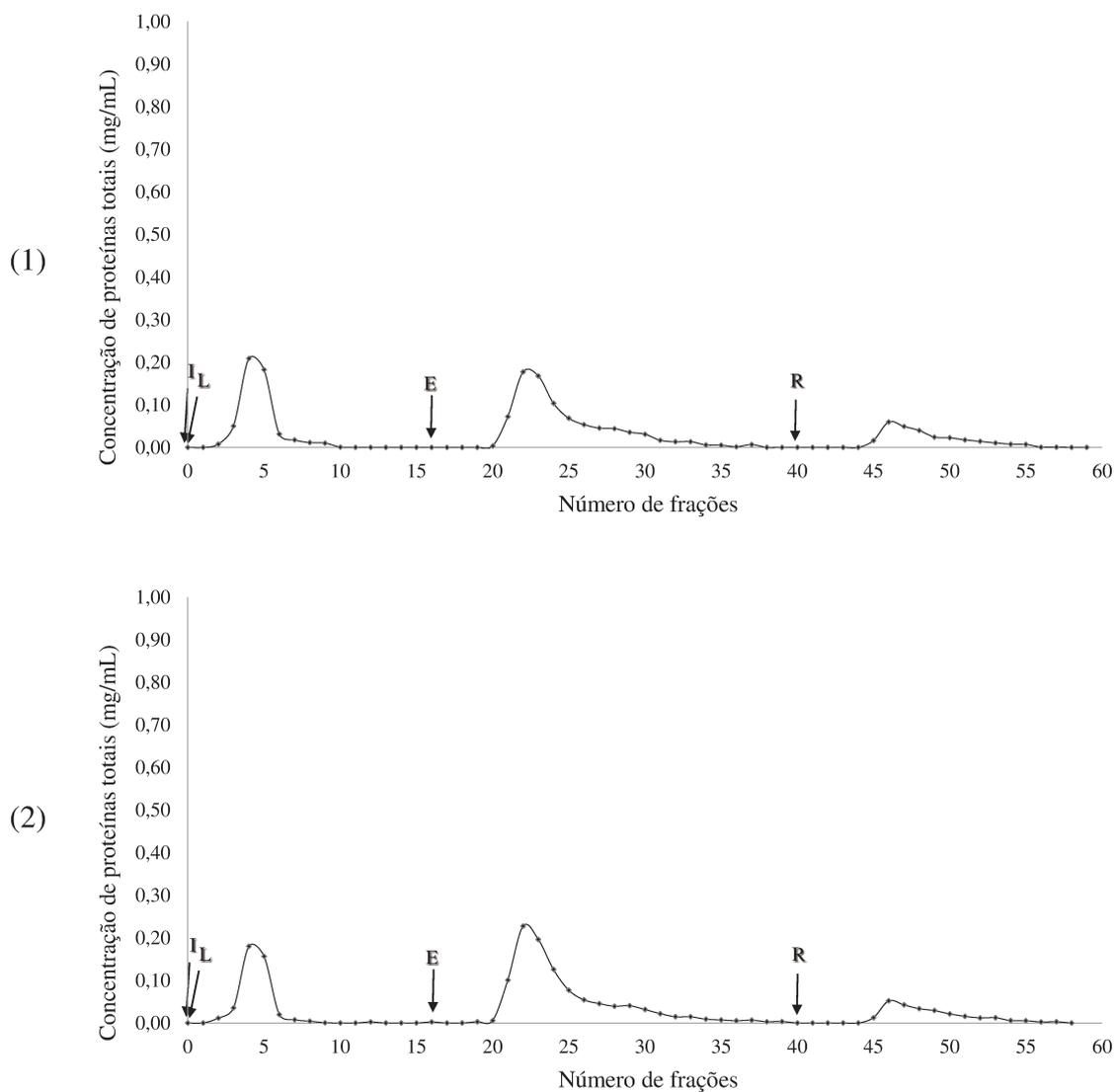
Figura B. 10 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 1,89 mg/mL e (2) 1,99 mg/mL. L- Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

3) Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0

Figura B. 11 - Perfil cromatográfico da adsorção de IgG a partir de solução de IgG de alta pureza em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução contendo IgG humana pré-purificada na concentração de (1) 2,00 mg/mL e (2) 1,99 mg/mL. L- Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0.



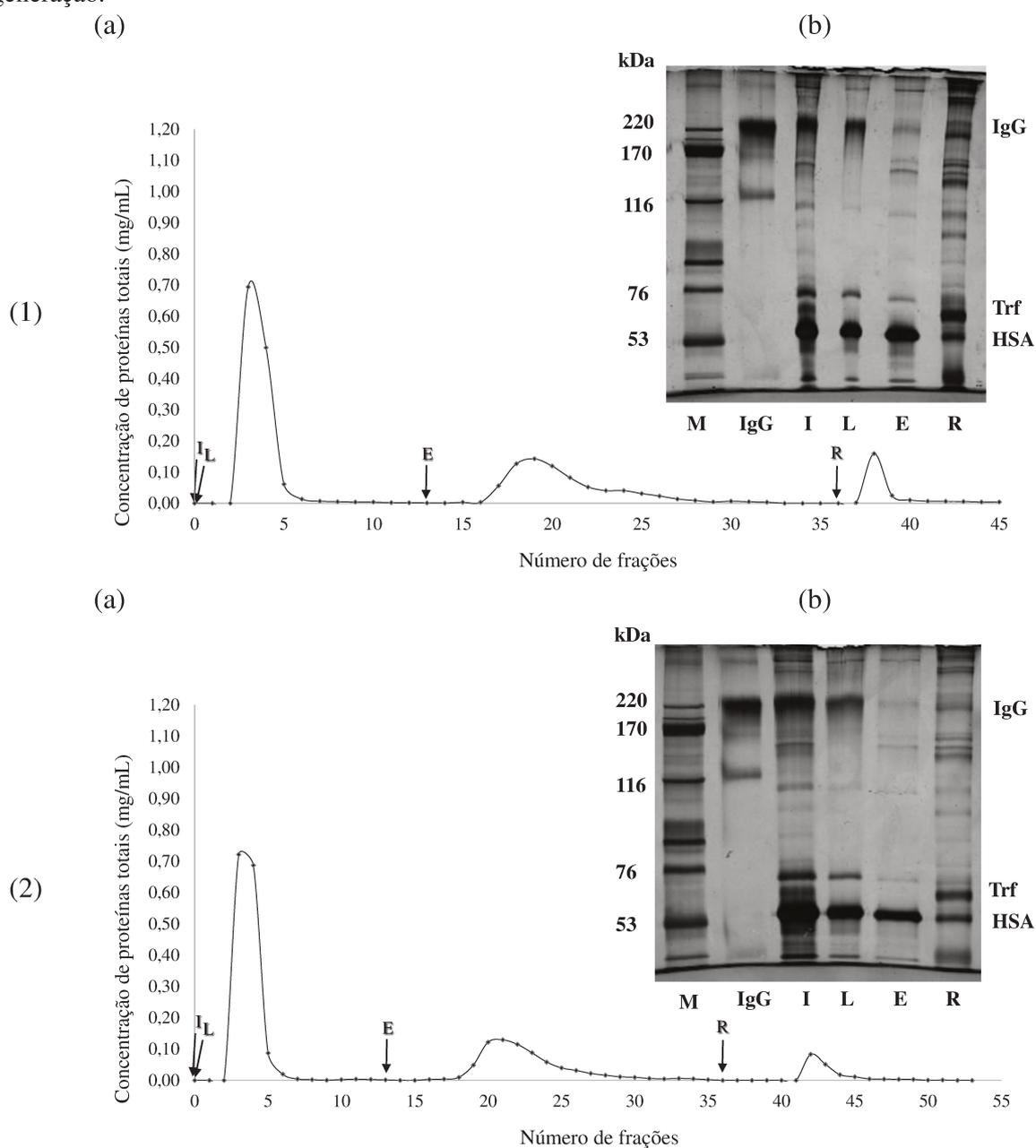
Volume das frações: 2 mL nas de Lavagem e 1 mL nas de Eluição e Regeneração

Soro humano 15x diluído

❖ Bis-Tris

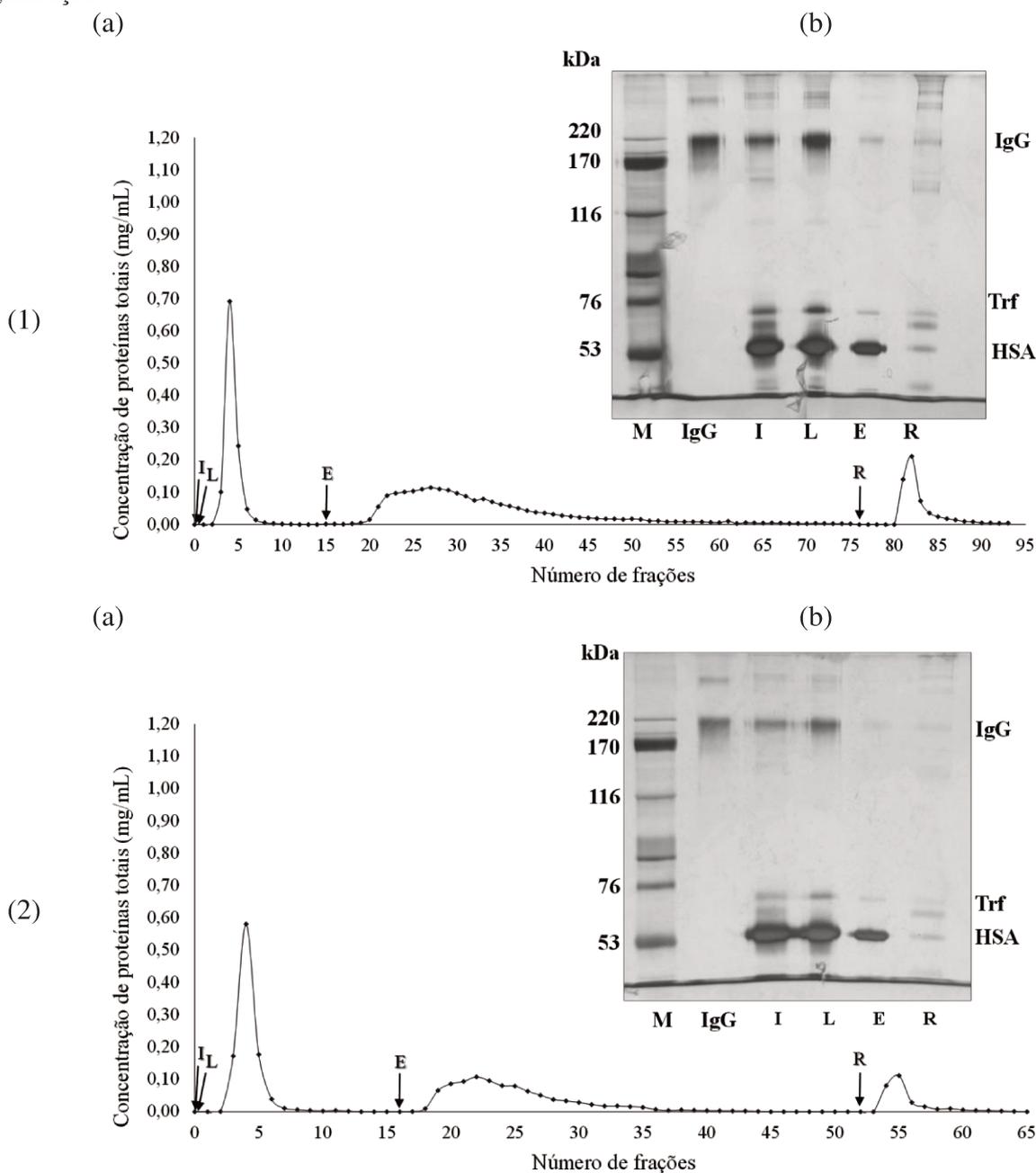
1) Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0

Figura B. 12 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,5 mL de solução de soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,25 mg/mL e (2) 3,24 mg/mL. L- Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



2) Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0

Figura B. 13 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,5 mL de solução de soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,22 mg/mL e (2) 3,17 mg/mL. L- Lavagem: Bis-Tris 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.

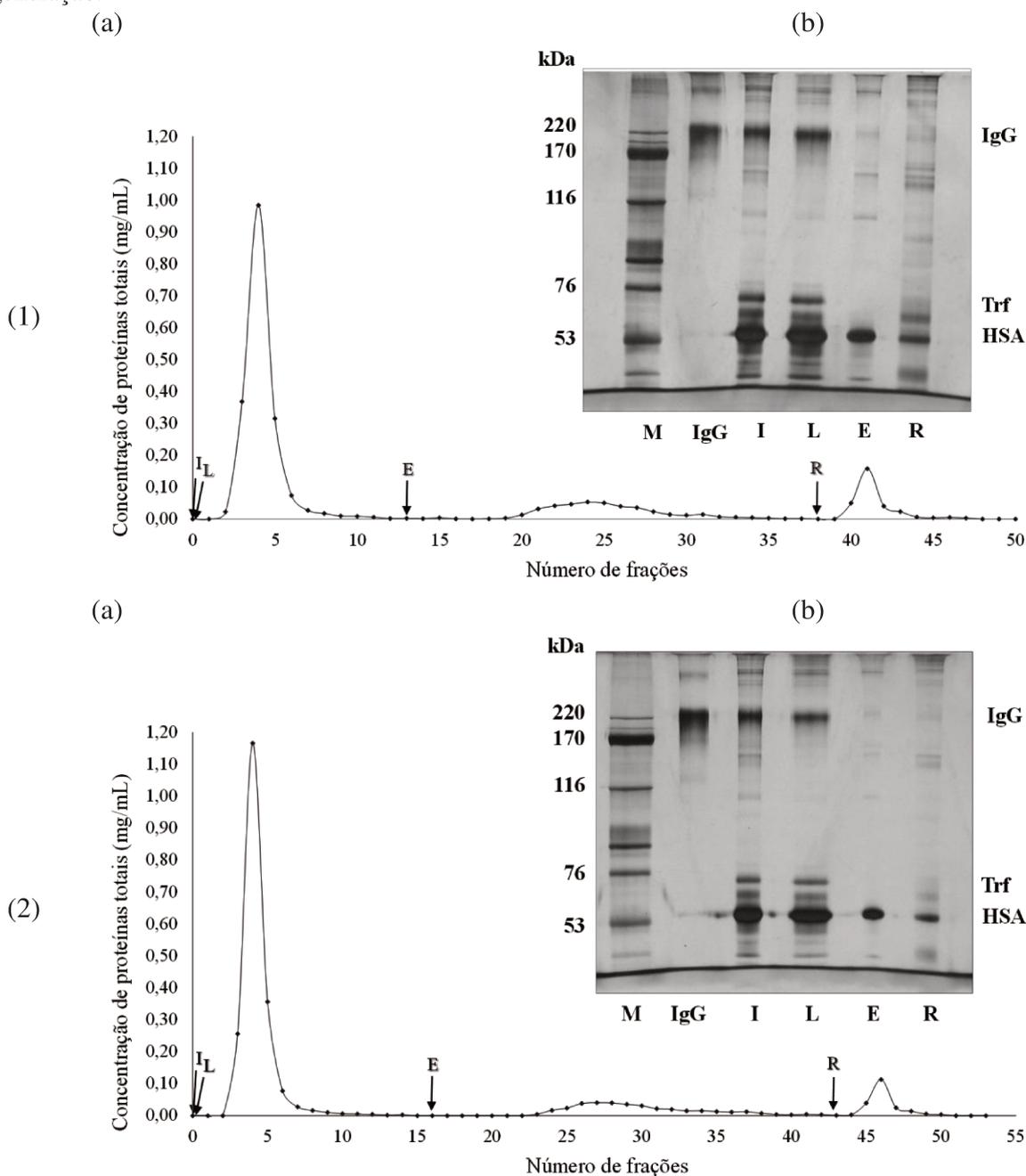


Volume das frações: 2 mL em todas etapas cromatográficas

❖ NaP

1) NaP 25 mmol/L pH 6,5

Figura B. 14 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-AGE-PEI-Ni(II) utilizando sistema tamponante NaP 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,5 mL de solução de soro humano 15x diluído na concentração de (1) 3,23 mg/mL e (2) 3,23 mg/mL. L- Lavagem: NaP 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0. R- Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- pool das frações de lavagem; E- pool das frações de eluição; R- pool das frações de regeneração.



Volume das frações: 2 mL em todas etapas cromatográficas

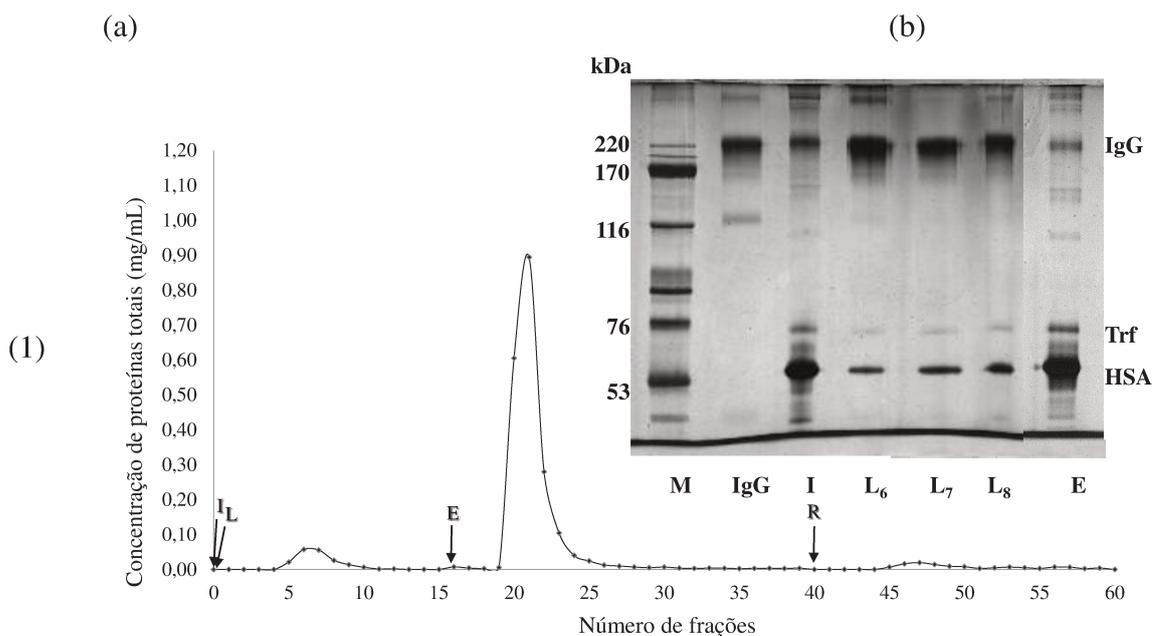
APÊNDICE C

Perfis cromatográficos e eletroforéticos para os ensaios cromatográficos realizados a partir de soro humano 20x diluído nas colunas contendo os criogéis PAAM-AGE-PEI.

❖ Mops 25 mmol/L

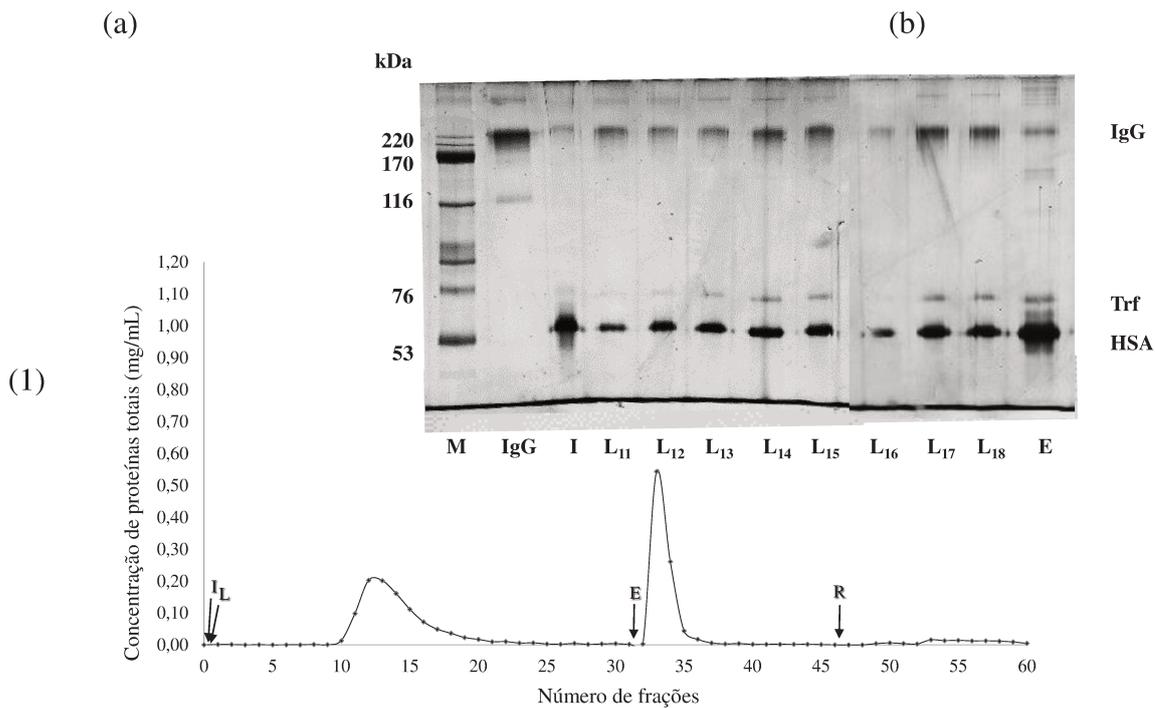
1) Mops 25 mmol/L pH 6,5

Figura C. 1 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,85 mg/mL. L- Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



2) Mops 25 mmol/L pH 7,0

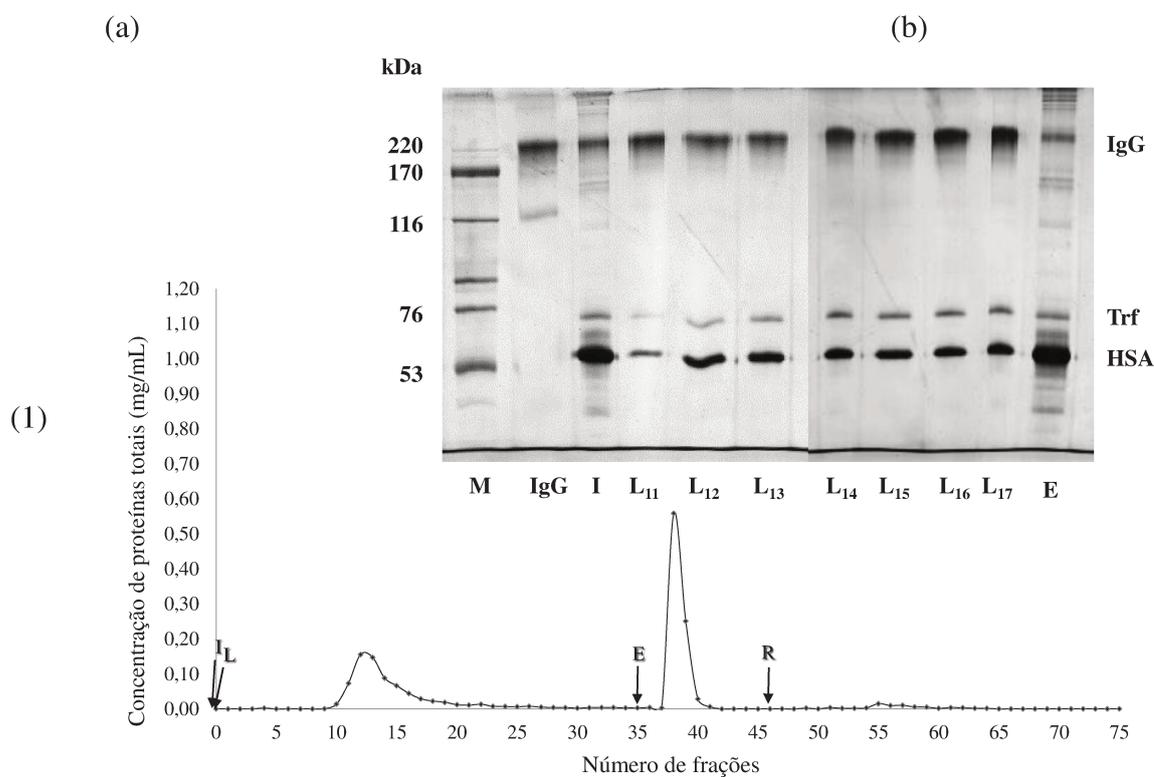
Figura C. 2 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,80 mg/mL. L- Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 7,0. E- Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



❖ Mes 25 mmol/L

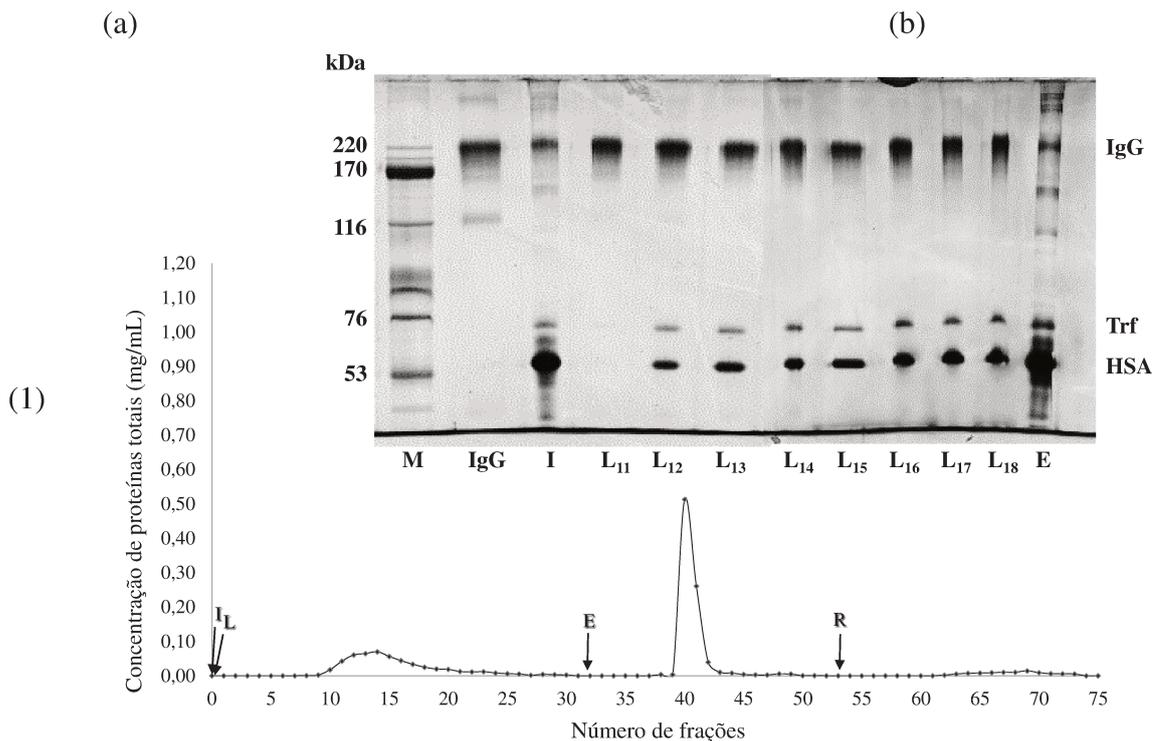
1) Mes 25 mmol/L pH 5,5

Figura C. 3 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 5,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,4 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 5,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



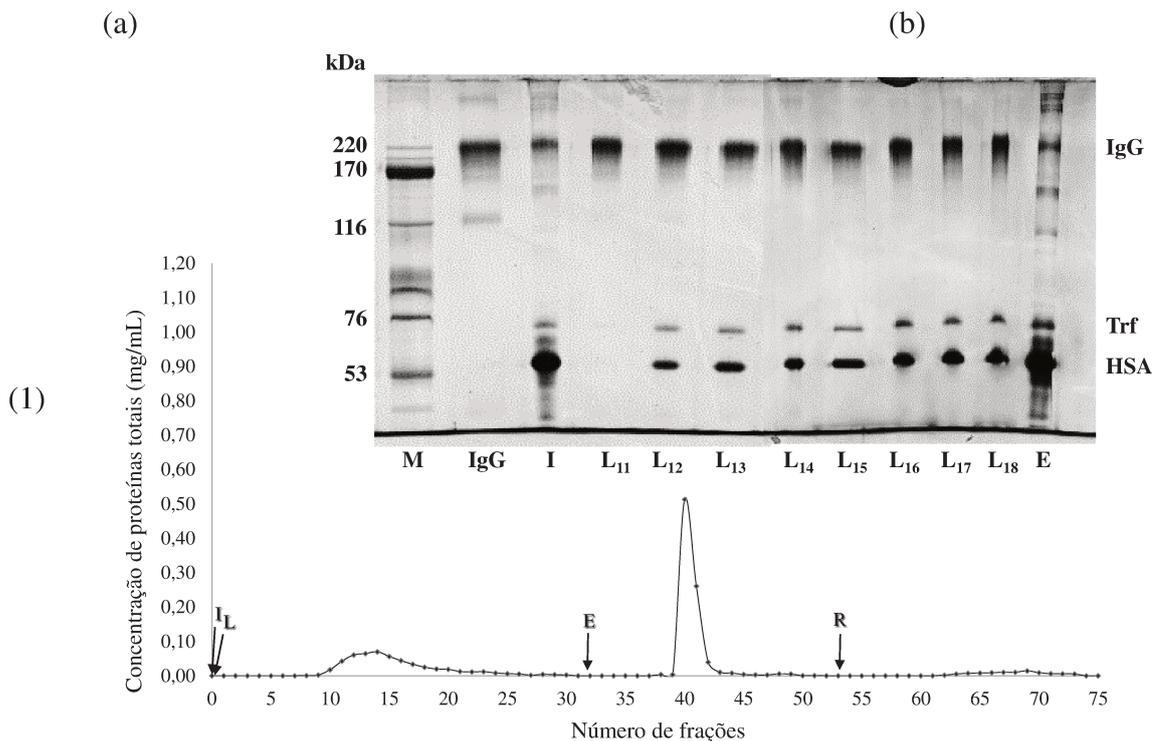
2) Mes 25 mmol/L pH 6,0

Figura C. 4 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,4 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



3) Mes 25 mmol/L pH 6,5

Figura C. 5 - Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-AGE-PEI utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de 2,4 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



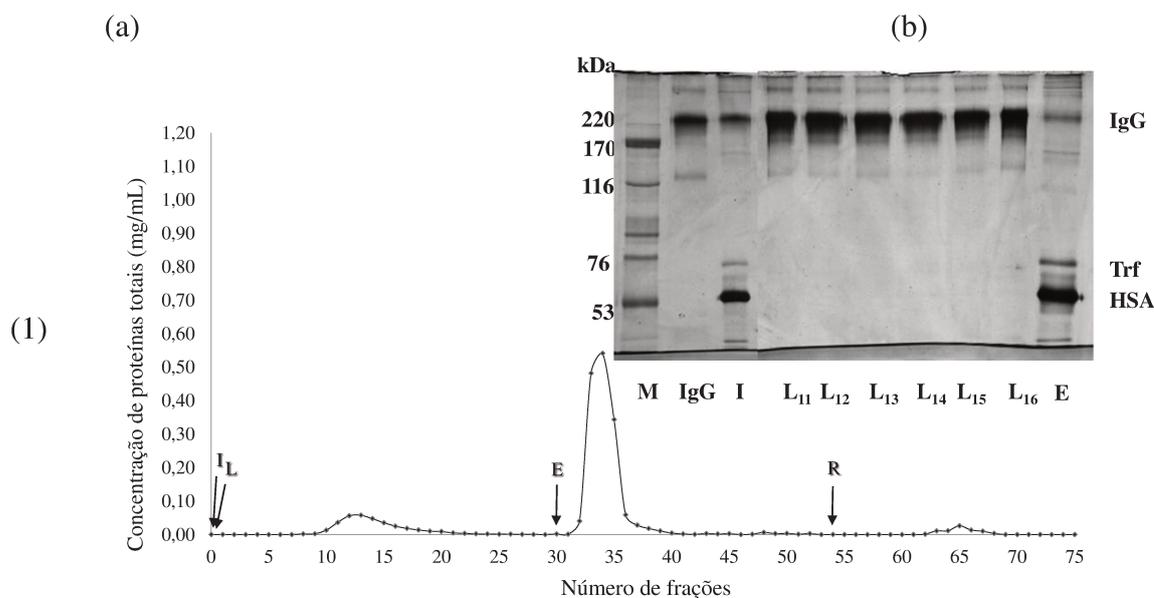
APÊNDICE D

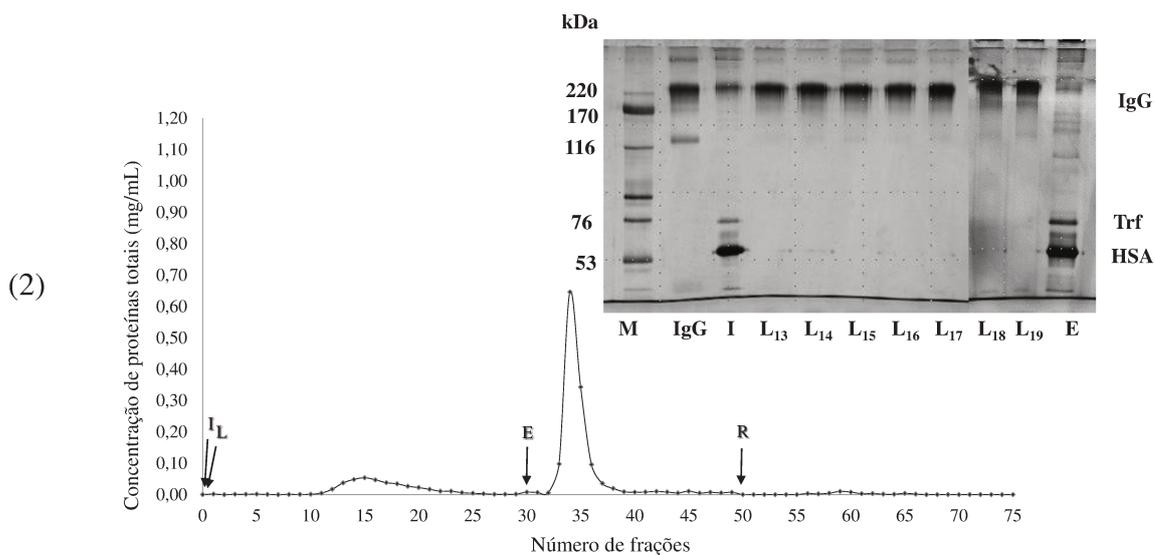
Perfis cromatográficos e eletroforéticos para os ensaios cromatográficos realizados a partir de soro humano 20x diluído nas colunas contendo os criogéis PAAM-Bisoxi-PEI-1.

❖ Mes 25 mmol/L

1) Mes 25 mmol/L pH 5,5

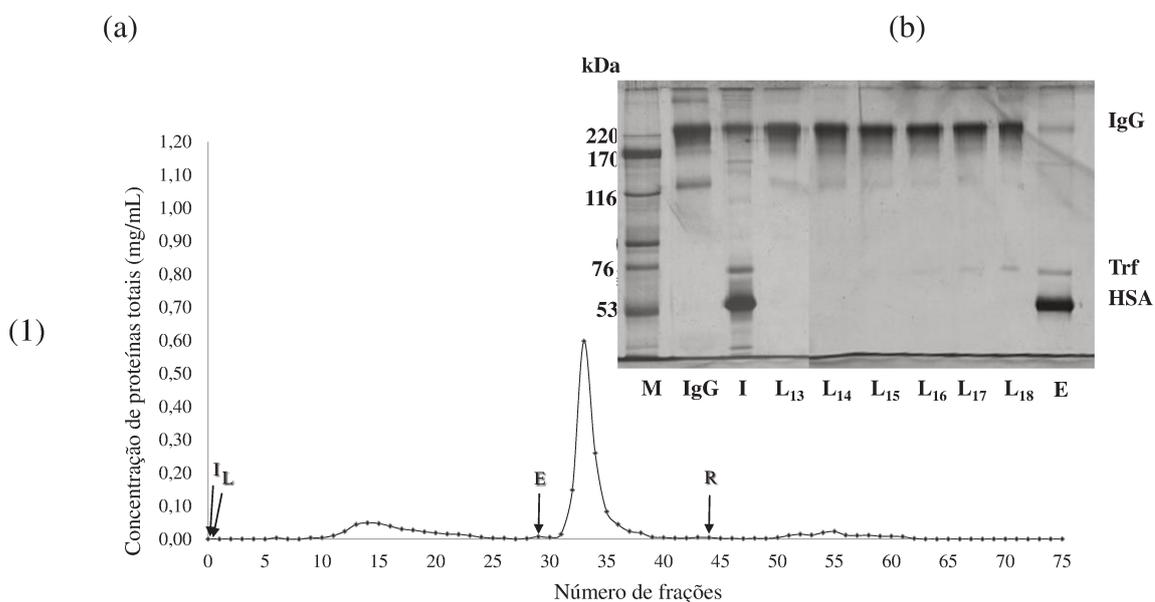
Figura D. 1- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 5,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,57 mg/mL e (2) 2,47 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 5,5. E– Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.

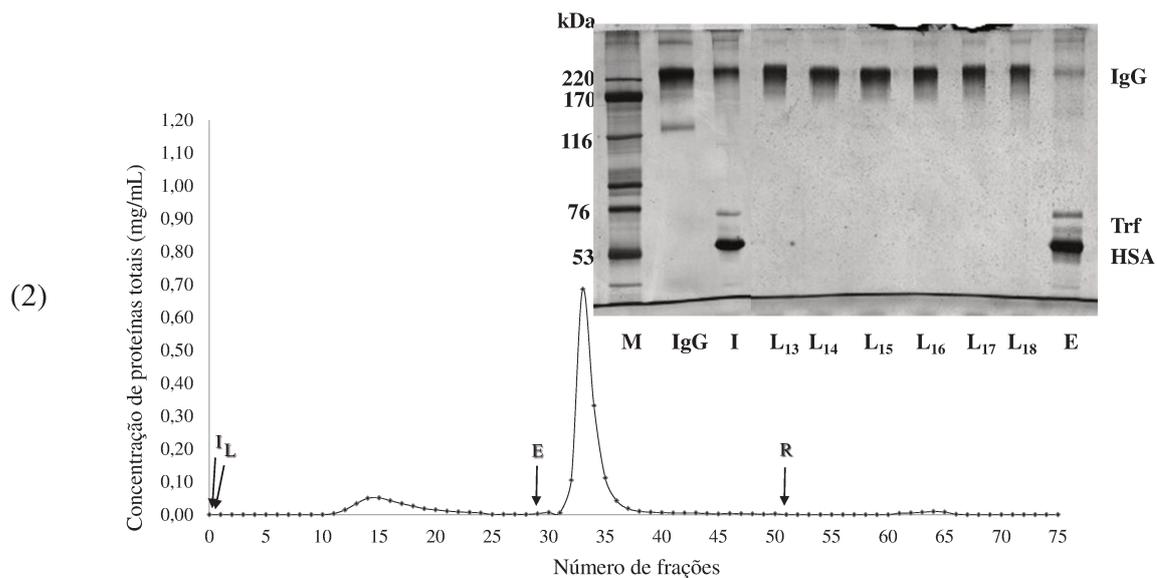




2) Mes 25 mmol/L pH 6,0

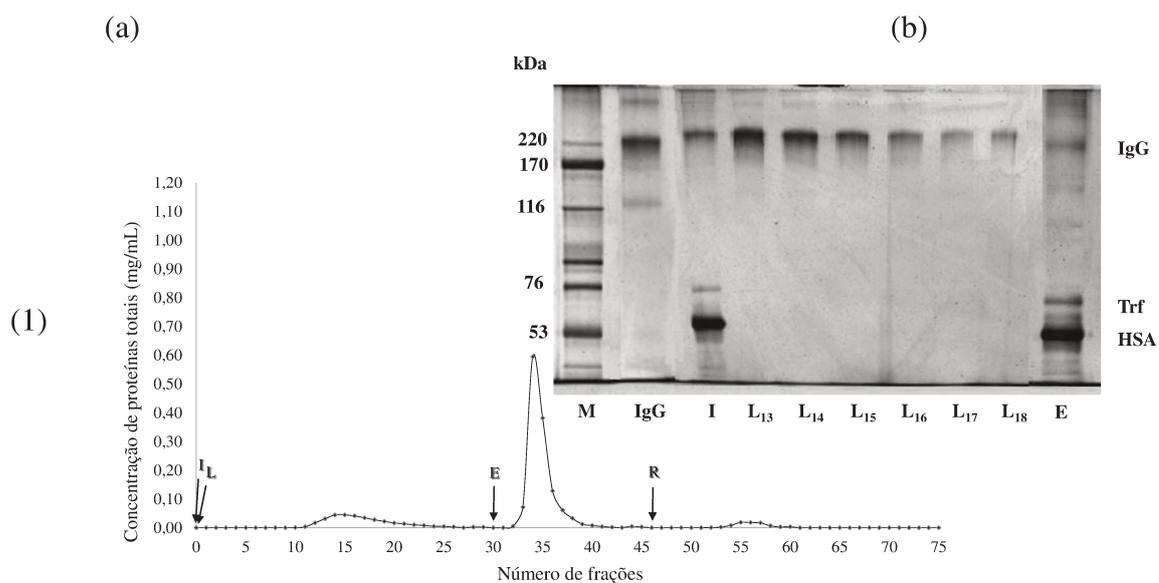
Figura D. 2- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,59 mg/mL e (2) 2,51 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.

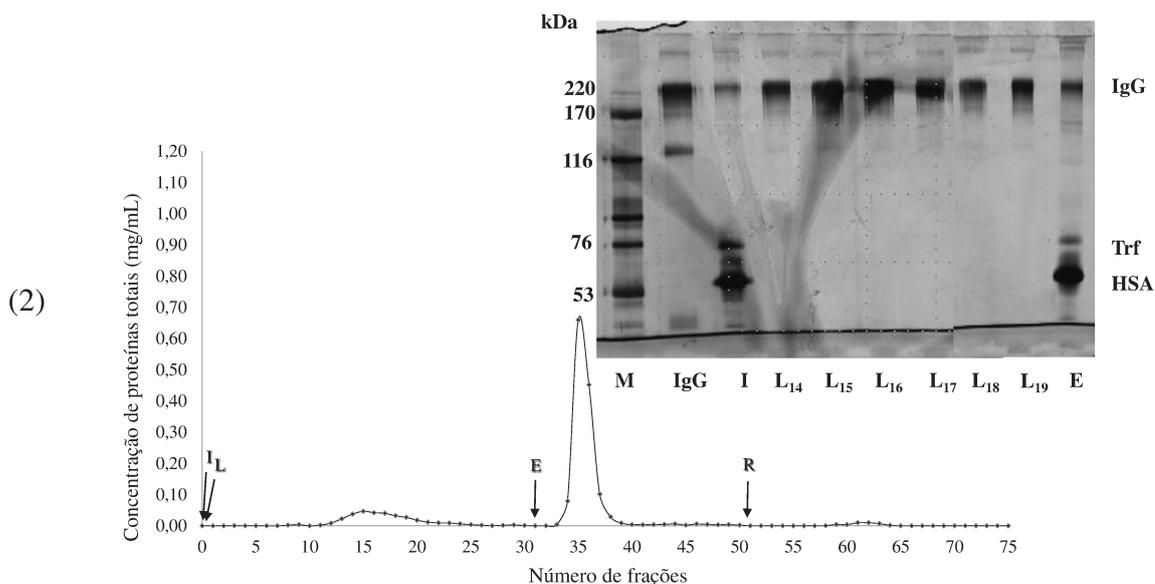




3) Mes 25 mmol/L pH 6,5

Figura D. 3- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,51 mg/mL e (2) 2,47 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.

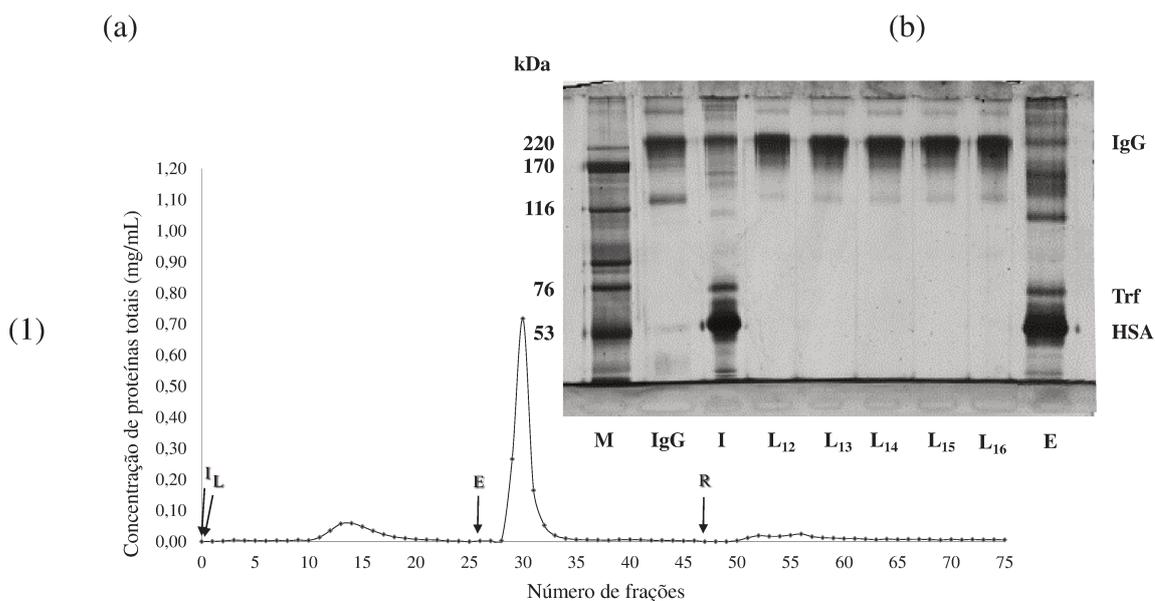


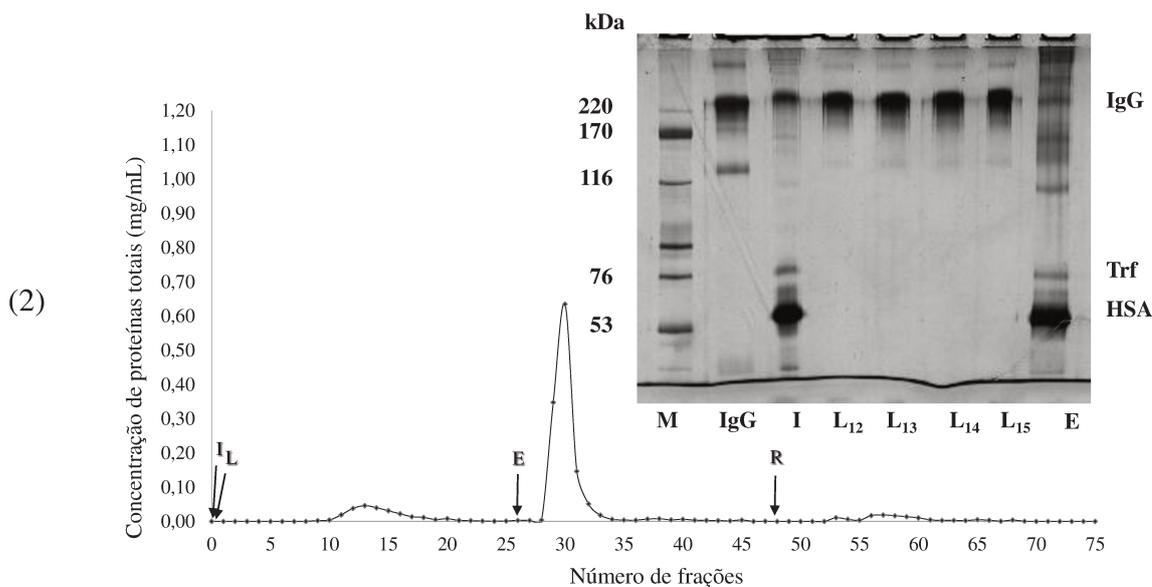


❖ Mops 25 mmol/L

1) Mops 25 mmol/L pH 6,5

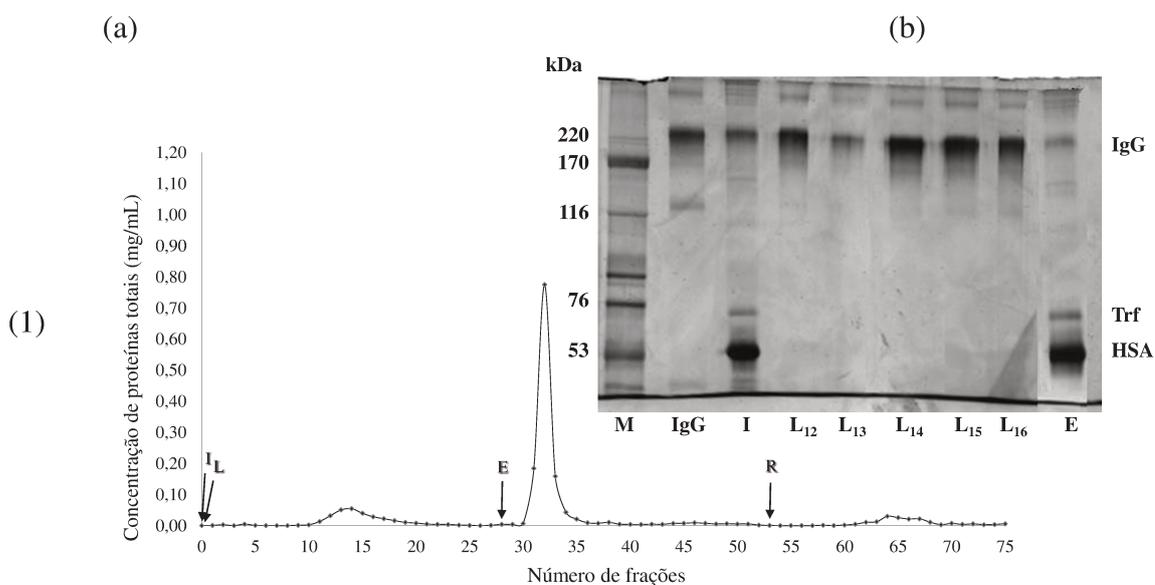
Figura D. 4- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,69 mg/mL e (2) 2,53 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.



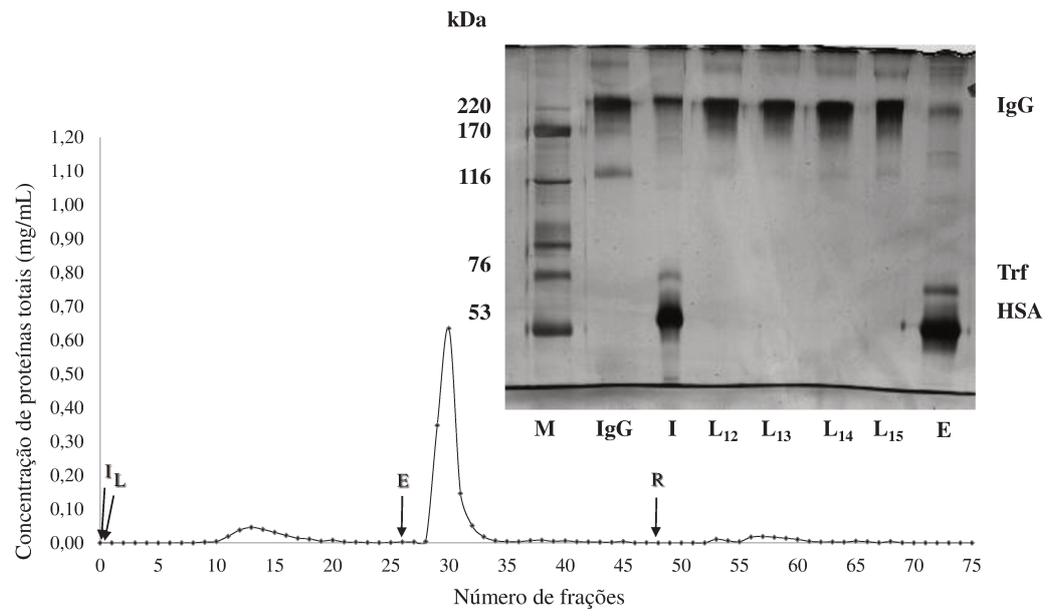


2) Mops 25 mmol/L pH 7,0

Figura D. 5- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-1 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,74 mg/mL e (2) 2,63 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



(2)



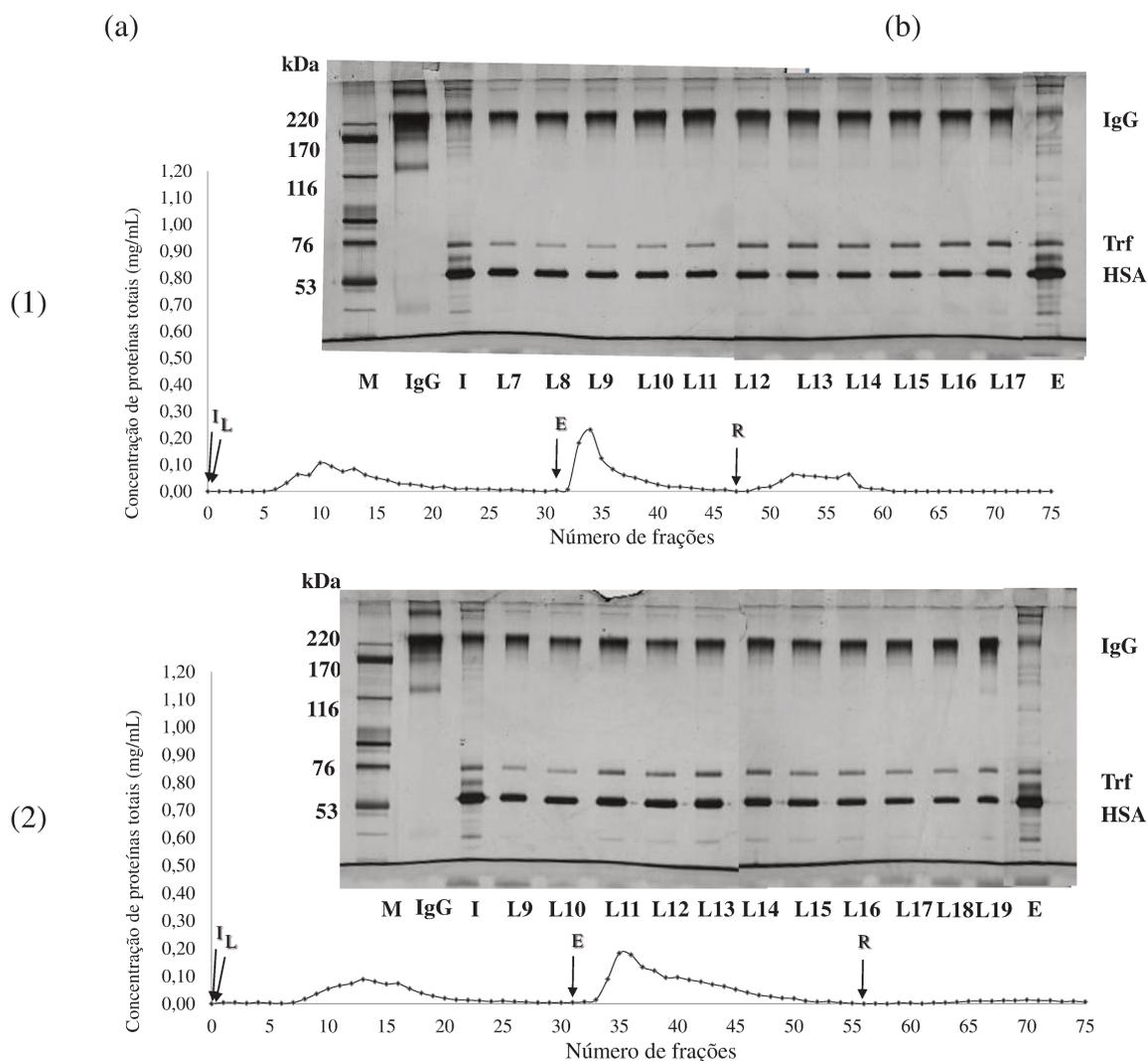
APÊNDICE E

Perfis cromatográficos e eletroforéticos para os ensaios cromatográficos realizados a partir de soro humano 20x diluído nas colunas contendo os criogéis PAAM-Bisoxi-PEI-2.

❖ Mes 25 mmol/L

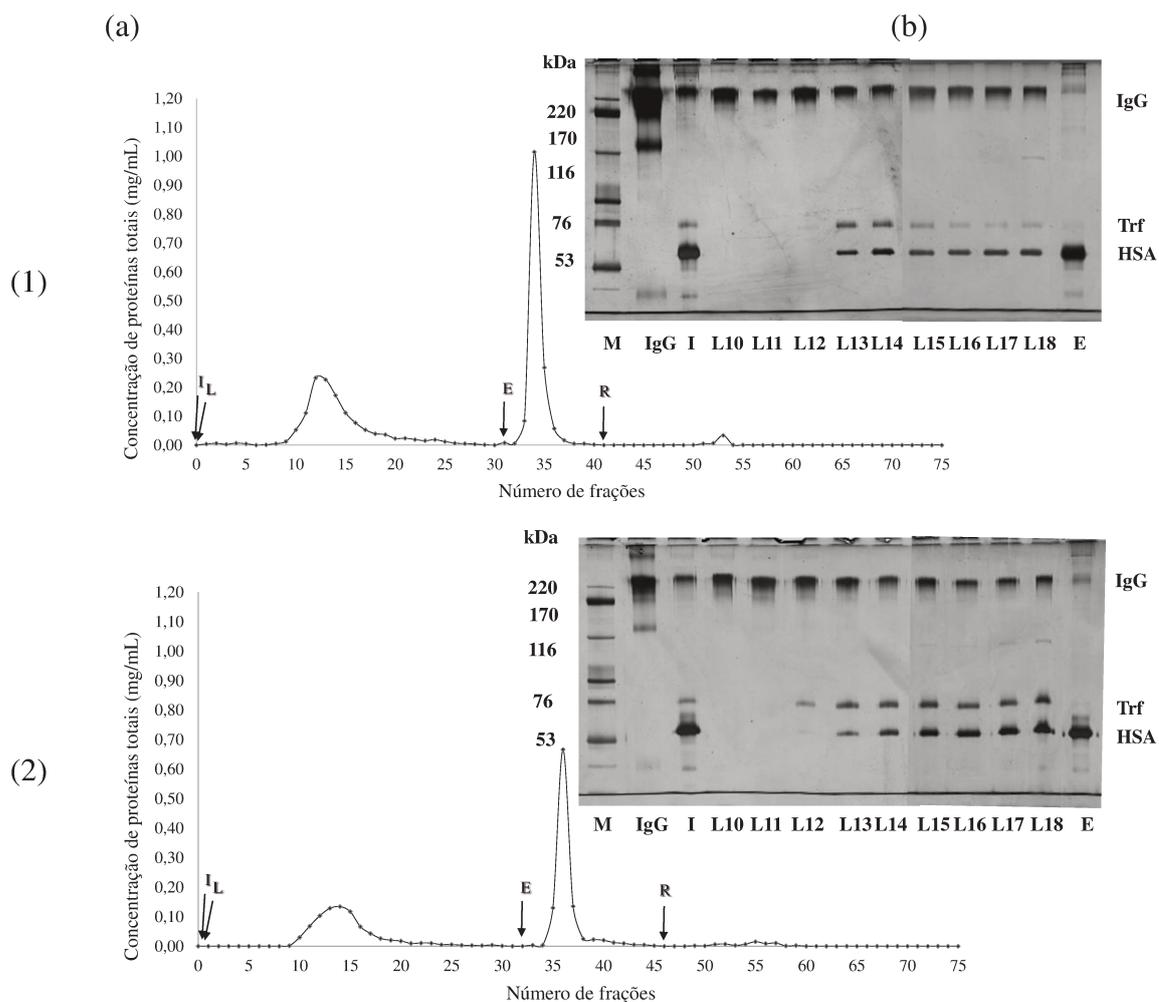
1) Mes 25 mmol/L pH 5,5

Figura E. 6- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 5,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,32 mg/mL e (2) 2,25 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 5,5. E– Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.



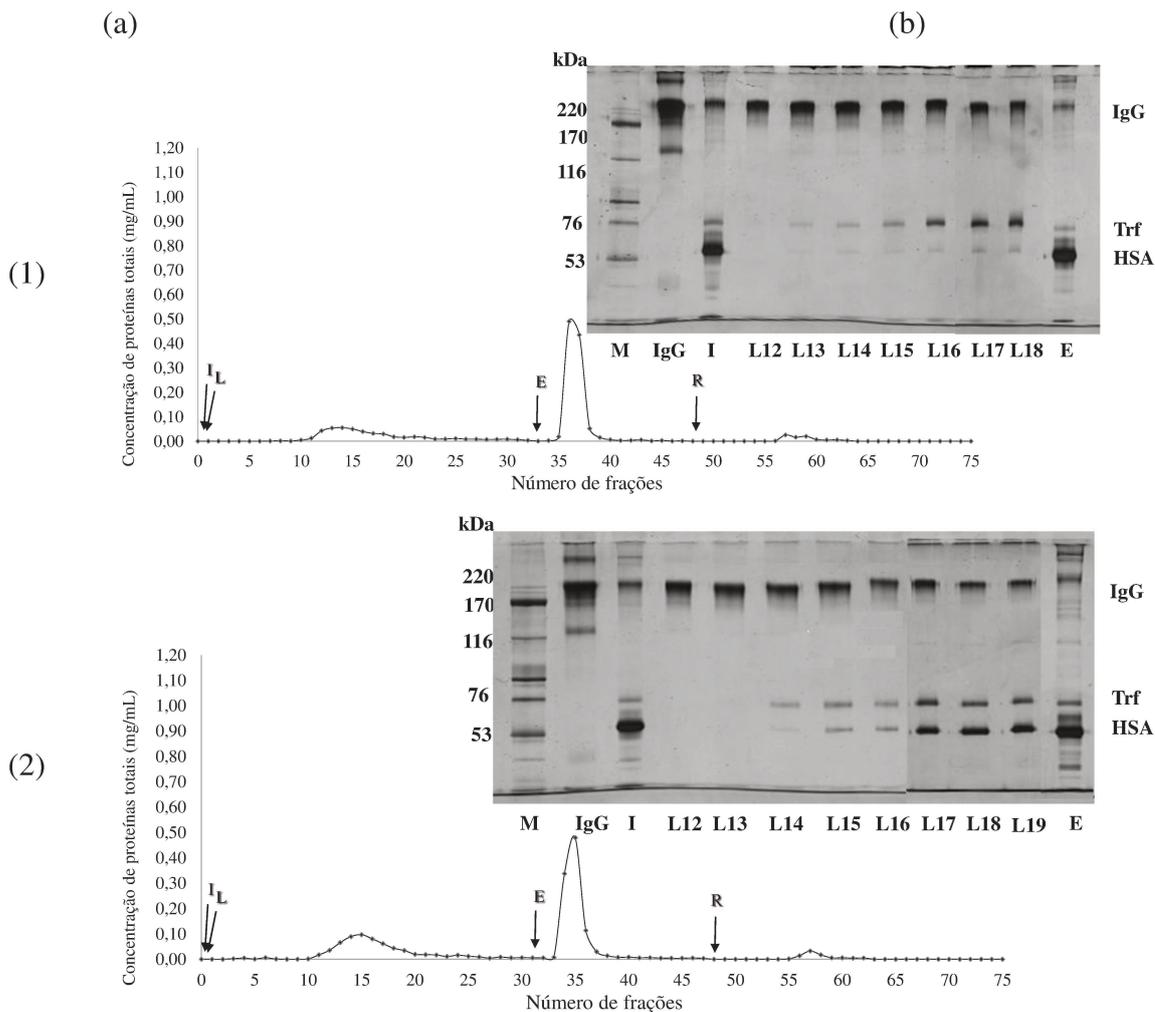
2) Mes 25 mmol/L pH 6,0

Figura E. 7- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,70 mg/mL e (2) 2,79 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.



3) Mes 25 mmol/L pH 6,5

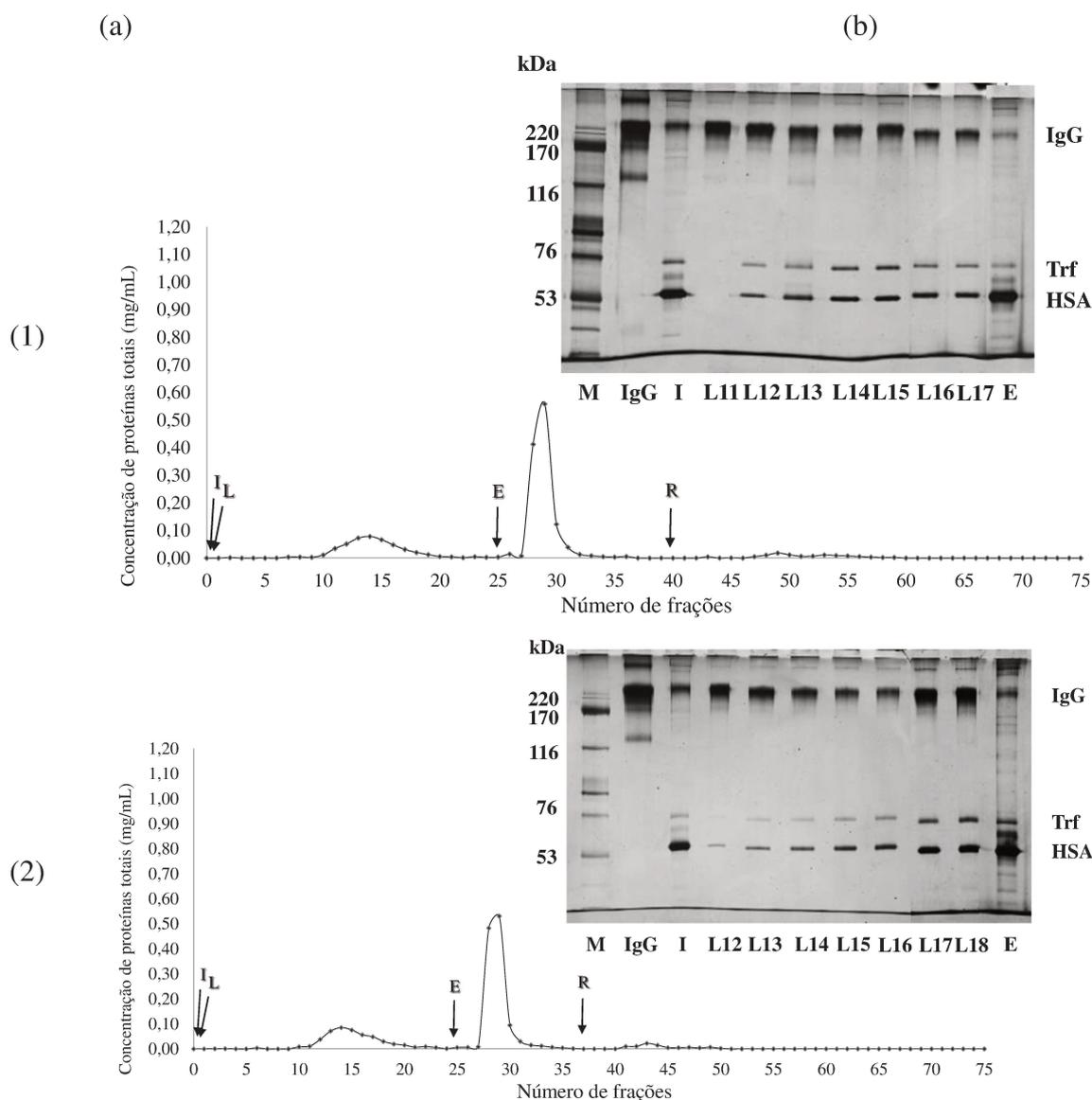
Figura E. 8- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I- Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,17 mg/mL e (2) 2,23 mg/mL. L- Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5. E- Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R- Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M- Marcador de alta massa molecular; IgG- Marcador de IgG; I- Injeção; L- *pool* das frações de lavagem; E- *pool* das frações de eluição; R- *pool* das frações de regeneração.



❖ Mops 25 mmol/L

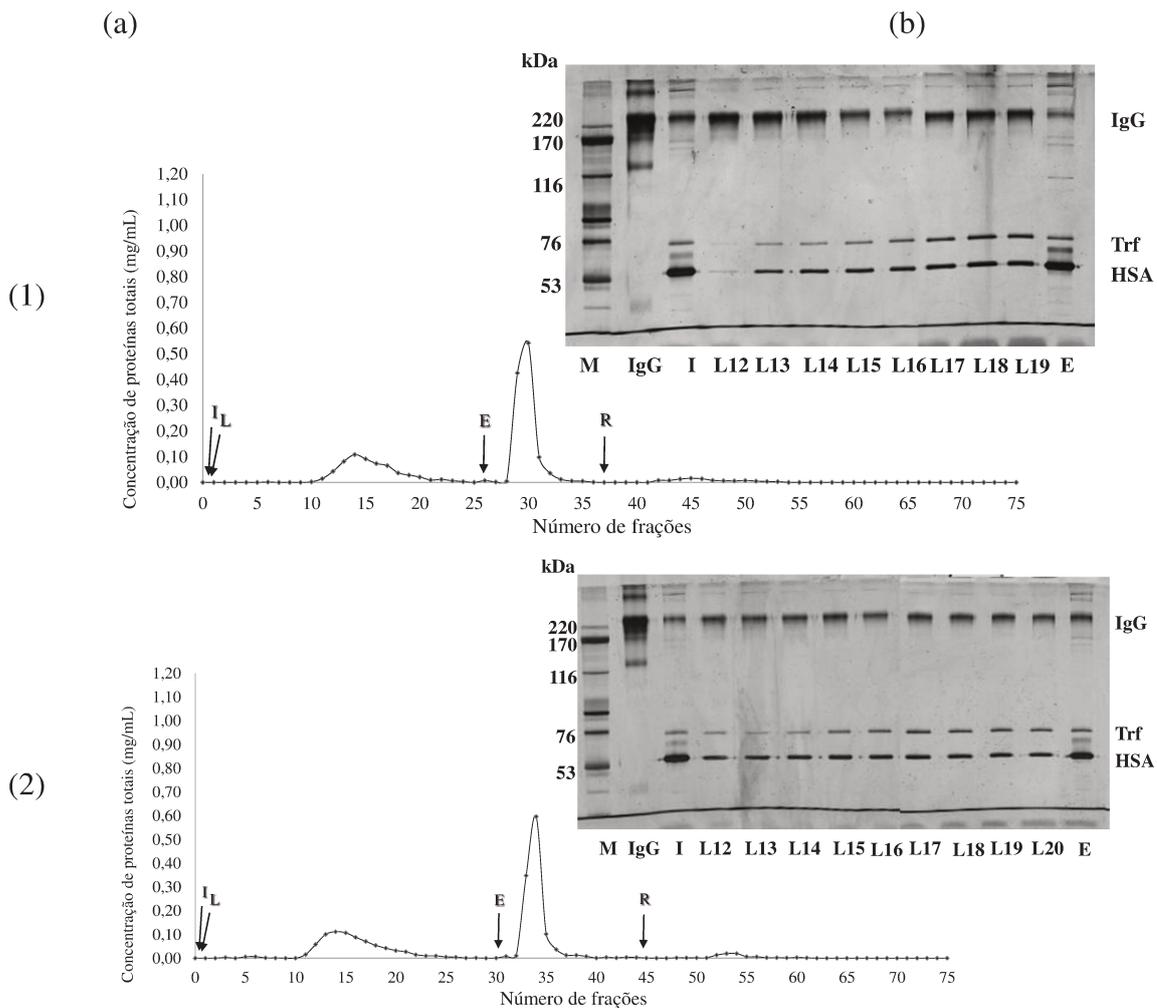
1) Mops 25 mmol/L pH 6,5

Figura E. 9- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 6,5. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,46 mg/mL e (2) 2,46 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 6,5. E– Eluição: Acetato de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.



2) Mops 25 mmol/L pH 7,0

Figura E. 10- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAM-Bisoxi-PEI-2 utilizando sistema tamponante Mops 25 mmol/L pH 7,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,43 mg/mL e (2) 2,49 mg/mL. L– Lavagem: Mops 25 mmol/L pH 7,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– *pool* das frações de lavagem; E– *pool* das frações de eluição; R– *pool* das frações de regeneração.

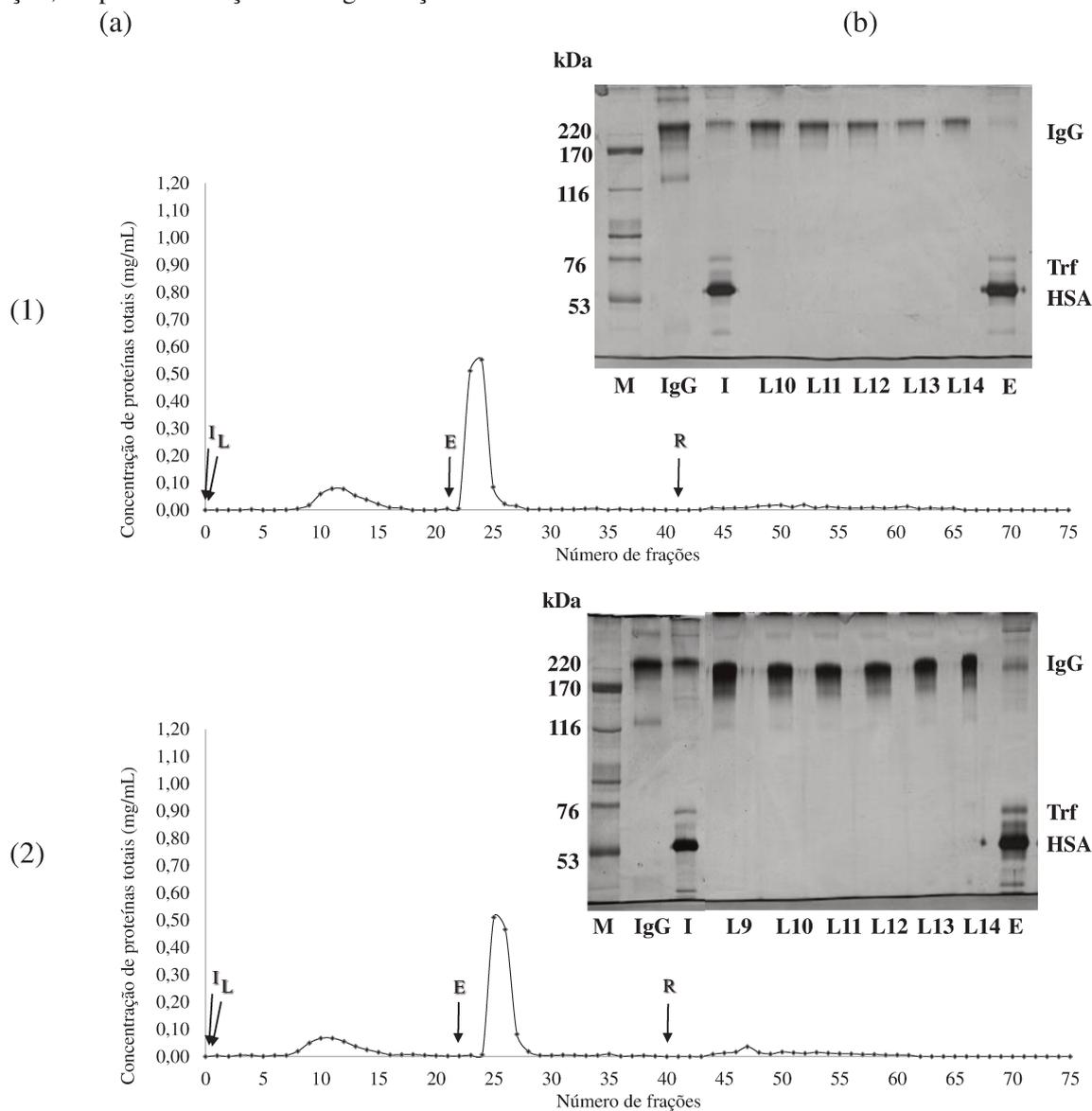


APÊNDICE F

Perfis cromatográficos, eletroforéticos e curva de ruptura para os ensaios cromatográficos realizados a partir de soro humano 20x diluído nas colunas contendo os criogéis PAAm-Bisoxi-PEI-3.

1) Mes 25 mmol/L pH 6,0 (Cromatografia)

Figura F. 1- Perfil cromatográfico (a) e eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução de soro humano diluído em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 1,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,61 mg/mL e (2) 2,55 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– pool das frações de lavagem; E– pool das frações de eluição; R- pool das frações de regeneração.



2) Mes 25 mmol/L pH 6,0 (Curva de Ruptura)

Figura F. 2- Curva de ruptura (a) e perfil eletroforético (b) da separação de IgG a partir de solução 20x diluída de soro humano em coluna contendo 3,0 mL de criogel PAAm-Bisoxi-PEI-3 utilizando sistema tamponante Mes 25 mmol/L pH 6,0. Vazão: 0,5 mL/min. I– Injeção de 10,0 mL de solução de soro humano 20x diluído na concentração de (1) 2,26 mg/mL e (2) 2,37 mg/mL. L– Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,0. E– Eluição: Acetado de Sódio 25 mmol/L pH 4,0 contendo 0,5 mol/L NaCl. R– Regeneração: NaOH 50 mmol/L. Gel de eletroforese SDS-PAGE: M– Marcador de alta massa molecular; IgG– Marcador de IgG; I– Injeção; L– pool das frações de lavagem; E– pool das frações de eluição; R- pool das frações de regeneração.

