



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

IGOR FERREIRA FIORAVANTE

**Criogel monolítico de PAAm-Alg-AGE-IDA: efeito dos íons metálicos
cobre e níquel na adsorção de IgG bovina**

CAMPINAS

2021

IGOR FERREIRA FIORAVANTE

**Criogel monolítico de PAAm-Alg-AGE-IDA: efeito dos íons metálicos
cobre e níquel na adsorção de IgG bovina**

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

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

Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pelo aluno Igor
Ferreira Fioravante e orientado pela
profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno.

CAMPINAS

2021

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

F511c Fioravante, Igor Ferreira, 1995-
Criogel monolítico de PAAm-Alg-AGE-IDA: efeito dos íons metálicos cobre e níquel na adsorção de IgG bovina / Igor Ferreira Fioravante. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

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

1. Imunoglobulina G. 2. Cromatografia. 3. Proteínas - Purificação. 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: Monolithic PAAm-Alg-AGE-IDA cryogel: effect of copper and nickel metal ions on bovine IgG adsorption

Palavras-chave em inglês:

Bovine immunoglobulin G

Chromatography

Proteins - Purification

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Sônia Maria Alves Bueno [Orientador]

Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

Ivanildo José da Silva Júnior

Data de defesa: 11-03-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4073-8780>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1254336421428144>

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado do aluno IGOR FERREIRA FIORAVANTE, e aprovada em 11 de março de 2021 pela comissão examinadora da defesa constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno - Presidente e Orientadora

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

UNIFESP/São Paulo

Videoconferência

Dr. Ivanildo José da Silva Junior

Universidade Federal do Ceará/Fortaleza

Videoconferência

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim por todo esforço e estudo realizados para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Kely Cristina Ferreira Fioravante e Antônio Fioravante Boaventura, por serem responsáveis por minha formação tanto pessoal quanto acadêmica também, pois sem o apoio deles eu não teria chegado aonde cheguei. Além disso, agradeço também pela educação que me deram que sempre priorizou os estudos acima de tudo. Amo vocês.

À professora Dra. Sônia Maria Alves Bueno, por ter confiado em mim desde o início aceitando ser minha orientadora. Além disso, agradeço também, pelos ensinamentos, orientação e conselhos, pois, cresci muito durante estes anos e me considero uma pessoa muito melhor que era antes.

Aos professores Dra. Ângela Maria Moraes e Dr. Everson Alves Miranda, por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios, e também, por todo conhecimento passado tanto pelo PED quanto em sala de aula. E todos os outros professores que de forma direta ou indireta contribuíram para realização desta pesquisa.

Aos amigos, Kaique, Larissa, Henrique, Zé Gabriel, Túlio, Olivia, Camila, Lorena, Duda, Séfora e Cristiane por estarem comigo praticamente desde o começo, por me propiciarem momentos incríveis que eu nunca irei me esquecer, desde grupo estudos em conjunto até em festas, por todo suporte e conselhos dados e principalmente por me aturarem com todos os meus defeitos, eu amo demais vocês. Além disso, agradeço por todos que fizeram parte dessa jornada presentes de alguma forma, principalmente da república Mary Jane. Por último, mas não menos importante, agradeço também aos demais colegas e ex-colegas que compartilhavam as mesmas instalações: Luiza, Mariana, Ana, Paula, Henrique, Rafael, Monize e Helbert pela convivência, risadas, cafés, bolos, ajudas, parcerias e por todos momentos de distração. Vocês são incríveis.

A todos os professores e funcionários da FEQ que, de uma forma ou outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo 2016/10855-1 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta tese.

RESUMO

Anticorpos (imunoglobulinas) são glicoproteínas expressas pelo sistema imunológico de vertebrados em resposta à agentes patógenos. Devido à sua especificidade em reconhecer um antígeno, anticorpos são empregados nas áreas analítica, diagnóstica, biossensores, proteômica e terapêutica. Seu uso tem crescido nas últimas décadas, movimentando um mercado de U\$ 130,9 bilhões em 2020. Na área terapêutica são requeridas grandes doses de preparações de anticorpos por paciente, portanto estudos de processos de purificação de baixo custo em larga escala são relevantes. Este trabalho visou o desenvolvimento de um monolito macroporoso, preparado pela técnica de crio-polimerização (criogel), para ser empregado como fase estacionária em cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) com a finalidade de purificar imunoglobulina G a partir do soro bovino (bIgG). O criogel foi sintetizado utilizando monômeros de acrilamida, bisacrilamida, alil diglídil éter e alginato de sódio, sendo denominado PAAm-Alg-AGE. Em seguida, foram derivatizados com o quelante tridentado ácido iminodiacético (IDA) e os íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} foram imobilizados, visando investigar (por eletroforese SDS-PAGE e imunodifusão radial) a capacidade de adsorver bIgG de forma seletiva. Quando na condição tamponante MOPS 25 mmol/L em pH 6,5, o criogel com Cu^{2+} imobilizado capturou bIgG com rendimento de 66%, pureza de 78% e fator de purificação de 5,57. Nas mesmas condições, o criogel controle (PAAm-Alg-AGE-IDA) adsorveu bIgG com 81% de rendimento, pureza de 84% e fator de purificação de 5,64. As curvas de ruptura indicaram que a seletividade não foi afetada após a saturação dos adsorventes, resultando em purezas de 75,31% e 88,06% e fatores de purificação de 6,91 e 9,55, para os criogéis IDA- Cu^{2+} e controle, respectivamente. A capacidade máxima de adsorção (q^*) e a constante de dissociação foram determinadas a partir das isotermas de adsorção, empregando os modelos matemáticos de Langmuir e Langmuir-Freundlich. Os resultados demonstraram afinidade característica de ligantes pseudobioespecíficos (10^{-6} mol/L) e q^* de $51,49 \pm 6,84$ e $129,69 \pm 6,44$ mg bIgG/g de criogel seco, para o criogéis sem e com Cu^{2+} imobilizado, respectivamente. Por experimentos cinéticos, foi observado a natureza da adsorção, sendo a taxa governada por efeitos difusivos para o adsorvente controle e, na presença de Cu^{2+} , a adsorção é governada pela formação do complexo IDA- Cu^{2+} -bIgG. Os resultados aqui descritos expressam o potencial dos adsorventes em capturar IgG do soro bovino, principalmente quando empregado em cromatografia de troca iônica, utilizando o agente quelante IDA como ligante.

Palavras-chave: Imunoglobulina G bovina, purificação, cromatografia, IMAC, criogel

ABSTRACT

Antibodies (immunoglobulins) are glycoproteins expressed by the immune system of vertebrates in response to the invasion of extracellular pathogens. Due to their specificity affinity for an antigen, antibodies are applied in analytical and therapeutic area, in diagnostic tests, as a biosensor, and in proteomics. Its use has grown over the last decades, moving an amount of U\$ 130,9 billion in 2020. In the therapeutic area, large doses of antibody are required per patient, therefore studies of low-cost purification processes for scale-up are relevant. This work aimed the development of a macroporous monolith synthesized by the cryopolymerization technique (cryogel) to be used as a stationary phase in Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC) in order to purify immunoglobulin G from bovine serum (bIgG). Depending on the conditions employed, the technique has high selectivity and low cost in comparison to the unit operations commonly employed. For the production of the cryogel, monomers of acrylamide, biscarylamide, allyl diglycil ether and sodium alginate was used and the monolith obtained was called PAAm-Alg-AGE. The tridentate agent IDA, Cu^{2+} and Ni^{2+} metals were immobilized to investigate the selectivity in IgG adsorption by SDS-PAGE electrophoresis and radial immunodiffusion. The results indicated that when MOPS 25 mmol/L at pH 6.5 was used, the cryogel with Cu^{2+} immobilized, captured bIgG with 66% yield, 78% purity and 5.57 purification factor. In the same conditions, the control cryogel (PAAm-Alg-AGE-IDA) adsorbed bIgG with 81% yield, 84% purity and 5.64 purification factor. The breakthrough curves showed that the selectivity of the cryogel was not affected by the saturation, resulting in purities of 75.31% and 88.06% and purification factors of 6.91 and 9.55 for PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} and the control, respectively. The maximum adsorption capacity (q^*) and the dissociation constant of the adsorbents were determined by the adsorption isotherms adjusting the Langmuir and Langmuir-Freundlich models. The results indicated affinity characteristic of pseudobiospecific ligands and (10^{-6} mol/L) and q^* of 46.51 ± 2.37 and 126.43 ± 4.03 mg bIgG / g of dry cryogel, for cryogels without and with immobilized Cu^{2+} , respectively. The adsorption kinetics allowed to determine the nature of bIgG adsorption in the adsorbents, showing that the rate is governed by diffusive effects for the control adsorbent, and in the presence of Cu^{2+} , is governed by the formation of the IDA- Cu^{2+} -bIgG complex. This set of results demonstrated the potential of the adsorbents to capture IgG from bovine serum, mainly when applied as ion exchange matrix, using IDA as a ligand.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas 1 e 2 Preparação e caracterização da fase estacionária.	22
Figura 2 - Etapa 3: Ensaio cromatográfico com soro bovino e quantificação.....	23
Figura 3 - Etapa 4: Capacidade dinâmica e cinética de adsorção de bIgG em concentrações diferentes	23
Figura 4 - Etapa 5: Determinação de isothermas de adsorção e obtenção dos parâmetros termodinâmicos	24
Figura 5 - Estrutura da imunoglobulina G.....	26
Figura 6 – Mecanismo de adsorção em IMAC.....	31
Figura 7 – Estrutura proposta da coordenação do agente quelante IDA imobilizado em uma matriz cromatográfica (M) e com um íon metálico (Me^{2+}) em meio aquoso	34
Figura 8 – Diferentes tipos de interação entre a proteína e o íon metálico quelatado.....	35
Figura 9 - Representação esquemática da formação de criogel.....	38
Figura 10 - Diferentes formatos de criogéis.	38
Figura 11 – Restauração da estrutura dos poros no criogel após compressão.....	39
Figura 12 - Estrutura química do alginato	41
Figura 13 - a) Polimerização do alginato na presença de cátions Ca^{2+} b) ampliação da região de reticulação.....	42
Figura 14 – Reticulação da PAAm, destacado a MBAm como agente reticulante, formando ligações covalentes entre os monômeros de acrilamida.	43
Figura 15 - Estrutura do hidrogel de PAAm/Alg	43
Figura 16 - Perfil típico de uma curva de ruptura.....	49
Figura 17 - a) Foto do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA; b) foto do criogel comprimido.	62
Figura 18- Cortes das seções (a) transversal, ampliada 250 vezes e (b) longitudinal, ampliada 1000 vezes do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA, analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	63
Figura 19 - Cortes da seção longitudinal do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA. Imagens obtidas por MEV, a) ampliada 250 vezes b) ampliada 1000 vezes	63
Figura 20 - Composição mássica do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA	65
Figura 21 - Foto dos criogéis: PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} (a) saturado com água e (b) em coluna cromatográfica e PAAm-Alg-AGE-IDA- Ni^{2+} (c) em coluna cromatográfica.	67
Figura 22 - Curva de titulação dos criogéis (a) PAAm-Alg-AGE-IDA e (b) PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+}	67

Figura 23 – Quantidade de bIgG adsorvida em colunas com 3 mL de PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem íon metálico quelatado. Injeção de 4 mg de bIgG /mL aproximadamente.....	68
Figura 24 - Proteínas totais do soro bovino adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ dos ensaios cromatográficos com injeção de soro bovino diluído 15 vezes	72
Figura 25 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE em 7,5% de acrilamida sob condições não redutoras) das frações cromatográficas das cromatografias realizadas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ com injeção de soro bovino diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes indicados.....	73
Figura 26 - Proteínas totais do soro bovino adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ dos ensaios cromatográficos com injeção de soro bovino diluído 15 vezes	75
Figura 27 - Perfís eletroforéticos (SDS-PAGE em 7,5% de acrilamida sob condições não redutoras) das frações cromatográficas das cromatografias realizadas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ com injeção de soro bovino diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes indicados.	76
Figura 28 - Cromatograma (a), perfil eletroforético (b) e balanço de massa (c) da cromatografia de soro bovino diluído 15 vezes em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 em criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min..	81
Figura 29 - Curva de ruptura do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA (♦) e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ (×). Vazão: 1,0 mL/min. Tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. Alimentação: 2,12 mL e 3,34 mL de soro bovino diluídos 15 vezes em tampão de adsorção (concentração de 3,90 e 3,86 mg/mL em termos de proteínas totais, volume total de 32 mL e 50 mL de solução de soro bovino, respectivamente, para o adsorvente sem e com o íon metálico quelatado.	80
Figura 30 - Perfís eletroforéticos SDS-PAGE sob condições não redutoras em 7,5% de acrilamida das frações cromatográficas referentes às curvas de ruptura realizadas em criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA (a) e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ (b).	83
Figura 31 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 0,5 mg de bIgG/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos () a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris	88
Figura 32 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 2,0 mg bIgG/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos () a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris	89

Figura 33 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 0,5 mg bIgG/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos () a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris	90
Figura 34 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 2,0 bIgG mg/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos () a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris	91
Figura 35 - Dados experimentais de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ a 25° C no equilíbrio (●) e curvas ajustadas dos modelos de a) Langmuir e b) Langmuir-Freundlich ...	95
Figura 36 - Dados experimentais de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA a 25° C no equilíbrio () e curvas ajustadas dos modelos de a) Langmuir e b) Langmuir-Freundlich	95
Figura A 1 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0.	121
Figura A 2 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5.	122
Figura A 3 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0.	123
Figura A 4 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5	124
Figura A 5 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,0.	125
Figura A 6 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese	

(b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,5	126
Figura A 7 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,0.	127
Figura A 8 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,5.	128
Figura A 9 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 7,0	129
Figura A 10 - - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0.	130
Figura A 11 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5	131
Figura A 12 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0	132
Figura A 13 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5	133
Figura A 14 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25	

mmol/L pH 7,0 .	134
Figura A 15 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,5	135
Figura A 16 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,0.	136
Figura A 17 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,5.	137
Figura A 18 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ , a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 7,0.....	138
Figura A 19 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5.	139
Figura B 1 – Experimento (I) e duplicata (II) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ com MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. Cromatograma (a), perfil eletroforético (b) e balanço de massa (c).	140
Figura B 2 - Experimento (I) e duplicata (II) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA com MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. Cromatograma (a), perfil eletroforético (b) e balanço de massa (c).	141
Figura C 1 – Curva de calibração de bIgG para os experimentos de imunodifusão radial ...	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração média de proteínas no soro, leite e colostro bovino.....	26
Tabela 2 - Comparação de IMAC com outras cromatografias de adsorção	29
Tabela 3 - Afinidade do complexo proteína-IDA-Me ²⁺ baseado nos resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície de proteínas.....	32
Tabela 4 - Capacidade de intumescimento de criogéis de poli(acrilamida-alginato) derivatizados ..	64
Tabela 5 - Balanço de massa da cromatografia em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição: acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 e regeneração com EDTA 100 mmol/L pH 7,0.	79
Tabela 6 – Balanço de massa da cromatografia do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição com MOPS 25 mmol/L contendo 0,5 mol/L de NaCl, pH 6,5.	81
Tabela 7 - Balanço de massa da curva de ruptura do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição: MOPS 25 mmol/L contendo 0,5 mol/L de NaCl, pH 6,5.	84
Tabela 8 - Balanço de massa da curva de ruptura do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição: acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 e regeneração com EDTA 100 mmol/L pH 7,0.	84
Tabela 9 – Quantidade adsorvida de bIgG (mg) em modo dinâmico.	85
Tabela 10 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA, concentração de 0,5 mg de bIgG/mL.....	88
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA, concentração 2,0 mg bIgG/mL	89
Tabela 12 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , concentração de 0,5 mg bIgG/mL.	90
Tabela 13 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da cinética da adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ , concentração de 2,0 bIgG mg/mL.	91
Tabela 14 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺	95
Tabela 15 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA	96

Tabela D 1 – Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em Tris-HCl nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	143
Tabela D 2 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MA nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	143
Tabela D 3 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MOPS nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	143
Tabela D 4 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em Tris-HCl nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ . Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	144
Tabela D 5 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MA nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ . Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	144
Tabela D 6 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MOPS nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺ . Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	144
Tabela D 7 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em Tris-HCl nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ . Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	145
Tabela D 8 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MA nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ . Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	145
Tabela D 9 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MOPS nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺ . Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).	145

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	18
1.1 COLOCAÇÃO DO PROBLEMA	18
1.2 OBJETIVO.....	21
1.3 ETAPAS REALIZADAS PARA ATINGIR O OBJETIVO PROPOSTO	21
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 IMUNOGLOBULINA G (IGG): ESTRUTURA, FUNÇÃO E TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS EMPREGADAS NA PURIFICAÇÃO	25
2.1.1 <i>Purificação de IgG bovina</i>	27
2.2 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC).....	28
2.2.1 <i>Princípios básicos da IMAC</i>	30
2.2.2 <i>Escolha dos íons metálicos</i>	31
2.2.3 <i>Escolha do agente quelante</i>	33
2.2.4 <i>Adsorção e dessorção de proteínas em IMAC e regeneração da matriz</i>	34
2.2.5 <i>Matriz cromatográfica em IMAC</i>	36
2.3 CRIOGÉIS MONOLÍTICOS MACROPOROSOS	37
2.4 ALGINATO COMO MATERIAL PARA SÍNTESE DE FASE ESTACIONÁRIA PARA USO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	40
2.4.1 <i>Criogéis de alginato/poliacrilamida</i>	42
2.5 OBTENÇÃO DOS DADOS TERMODINÂMICOS: ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	44
2.6 CINÉTICA DE ADSORÇÃO	46
2.6.1 <i>Pseudo-primeira-ordem</i>	47
2.6.2 <i>Pseudo-segunda-ordem</i>	47
<i>Weber e Morris</i>	48
2.7 CURVAS DE RUPTURA	48
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 MATERIAIS	51
3.1.1 <i>Reagentes</i>	51
<i>Equipamentos</i>	51
3.2 MÉTODOS	52
3.2.1 <i>Preparação do criogel (monolito)</i>	52

3.2.2	<i>Imobilização covalente do ácido iminodiacético (IDA)</i>	52
3.2.3	<i>Determinação das quantidades de cobre e níquel quelatados</i>	53
3.2.4	<i>Experimentos cromatográficos</i>	53
3.2.5	<i>Cinética de adsorção de de adsorção de bIgG nos criogéis sintetizados</i>	54
3.2.6	<i>Isotermas de adsorção</i>	55
3.2.7	<i>Curva de ruptura de adsorção de bIgG</i>	56
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	56
3.3.1	<i>Capacidade de intumescimento</i>	56
3.3.2	<i>Quantificação da capacidade em se ligar à água presente no ar</i>	57
3.3.3	<i>Estimativa da porosidade (ϕ)</i>	57
3.3.4	<i>Morfologia do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA</i>	58
3.3.5	<i>Medida da densidade superficial de cargas</i>	58
3.3.6	<i>Medição de resistência ao fluxo</i>	59
3.3.7	<i>Dosagem de proteínas totais</i>	59
3.3.8	<i>Eletroforese SDS-PAGE</i>	59
3.3.9	<i>Quantificação de bIgG por imunodifusão radial</i>	59
	CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO MONOLITO PAAM-ALG-AGE-IDA	61
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS COBRE E NÍQUEL QUELATADOS AO CRIOGEL PAAM-ALG-AGE-IDA	66
4.3	ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS bIGG EM CRIOGEL PAAM-ALG-AGE-IDA COM E SEM ÍON METÁLICO QUELATADO	68
4.4	PURIFICAÇÃO DE IGG A PARTIR DO SORO BOVINO	71
4.4.1	<i>Efeito do quelato IDA-Cu²⁺ e do sistema tamponante na purificação de bIgG</i>	71
4.4.2	<i>Efeito do quelato IDA-Ni²⁺ e do sistema tamponante na purificação de bIgG</i>	74
4.4.3	<i>Avaliação da melhor condição de purificação em PAAm-Alg-AGE-IDA-Me²⁺</i>	77
4.5	PURIFICAÇÃO DE IGG A PARTIR DO SORO BOVINO EM PAAM-ALG-AGE-IDA	80
4.6	CURVAS DE RUPTURA DO SORO BOVINO EM CRIOGÉIS QUELATADOS E NÃO QUELATADOS A ÍONS CU²⁺	82
4.7	CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE bIGG	87
4.8	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE bIGG NOS CRIOGÉIS COM IDA E IDA-CU²⁺ IMOBILIZADOS	94
	CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO	99

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS E BALANÇO DE MASSA DOS ENSAIOS REALIZADOS COM PAAM-ALG-AGE-IDA-ME²⁺ E PAAM-ALG-AGE-IDA.....	121
APÊNDICE B: CURVAS DE RUPTURA.....	140
APÊNDICE C: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE IGG BOVINA PARA OS EXPERIMENTOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL.....	142
APÊNDICE D: BALANÇO DE MASSA DAS CROMATOGRAFIAS REALIZADAS COM IGG BOVINA PRÉ PURIFICADA	143
PAAM-ALG-AGE-IDA.....	143

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Colocação do Problema

Desde o primeiro anticorpo comercial ser aprovado em 1986 pela FDA (*Food and Drug Administration*) nos EUA com a finalidade de prevenir a rejeição no transplante de rins, o mercado mundial de bioprodutos farmacêuticos tem crescido anualmente, atingindo o valor de aproximadamente 325,17 bilhões de dólares em 2020, com expectativa de uma receita de 496,1 bilhões de dólares em 2026 (*Biopharmaceuticals Market - Growth, Trends, Covid-19 Impact, and Forecasts, 2021 - 2026*). O interesse em se obter novos anticorpos é crescente, devido, em parte, pelo avanço dos estudos de doenças em níveis moleculares, e também, por sua elevada demanda, principalmente pela indústria farmacêutica, uma vez que em detrimento aos fármacos existentes, anticorpos são bem tolerados pelo organismo e eficientes, por exemplo, no tratamento de doenças autoimunes e câncer. (ECKER *et al.*, 2015; KLIMATCHEVA *et al.* 2015; LAMBERT & BERKENBLIT, 2018).

Anticorpos consistem em imunoglobulinas encontradas no plasma sanguíneo, que atuam na defesa corporal dos animais vertebrados, promovendo imunidade celular (JANEWAY *et al.*, 2001). Anticorpos podem ser classificados como monoclonais ou policlonais. Os anticorpos policlonais são heterogêneos, produzidos por diferentes clones e apresentam afinidades diferentes, apesar de reconhecerem o mesmo antígeno. Por sua vez, anticorpos monoclonais são produzidos por células geneticamente idênticas, chamadas de clones, nas quais geram imunoglobulinas homogêneas que reconhecem partes idênticas de um mesmo antígeno (STRYER, 2012). Além de tratamento de doenças, anticorpos também são utilizados em métodos analíticos, como testes diagnósticos do tipo ELISA e *Western blotting*, reações de imuno-polimerase (IPCRs), biossensores e também como ligantes em cromatografia de afinidade (MARASCO & SUI, 2007; HAUGHEY *et al.*, 2012; SENGUPTA *et al.* 2019).

Em bovinos são encontrados três isotipos de imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM. A IgG ainda se divide em duas subclasses: IgG₁ e IgG₂. A IgG é uma glicoproteína utilizada pelo sistema imunológico para identificar antígenos, ligando-os e desencadeando um processo que neutraliza e posteriormente elimina a substância estranha do organismo (VLUG & REMORTEL, 1989). Muitos autores relatam similaridades presentes na atividade imunológica da IgG humana e bovina, presente em vacas imunizadas contra patógenos humanos, mostrando ser benéfico o uso da IgG bovina na dieta humana, sendo esta utilizada amplamente em suplementação alimentar infantil, por exemplo (GOLDMAN, 1989; GAPPER *et al.*, 2007).

Estudos relatam que a IgG bovina pode ser utilizada em seres humanos no tratamento de infecções na pele causadas por bactérias, como *Staphylococcus aureus*, sem que as mesmas desenvolvam resistência (FREEDMAN *et al.*, 1998; HEIDEBRECHT *et al.*, 2018); como redutor dos níveis do colesterol (EARNEST *et al.*, 2005); e em enteropatia, em pacientes com HIV (PETSCHOW *et al.*, 2014). Para os devidos fins, demanda-se que o produto esteja em elevada pureza, logo processos de purificação complexos e de alto custo são frequentemente utilizados, pois geralmente anticorpos são encontrados em meios contendo diferentes proteínas. Várias operações unitárias podem ser utilizadas nos processos de purificação de biomoléculas, explorando propriedades distintas entre elas. Dentre as diferentes operações unitárias, as comumente empregadas para a purificação de anticorpos são a precipitação, a filtração e a cromatografia adsortiva, comumente troca iônica e afinidade (AYYAR *et al.*, 2011).

A cromatografia de afinidade se baseia na interação reversível entre duas moléculas, a biomolécula alvo a ser purificada e uma denominada ligante, que é em geral imobilizada por ligações covalentes ao suporte sólido (matriz, fase estacionária). A matriz comumente empregada em cromatografia de afinidade é constituída por géis de agarose ou polímeros sintéticos. Devido às limitações apresentadas por esses suportes sólidos, como a transferência de massa difusional, a partir da década de 90, começaram a ser desenvolvidos membranas e monolitos porosos adsortivos (BUENO & MIRANDA, 2005, ARORA *et al.*, 2017).

Monolitos podem ser sintetizados a partir de monômeros, materiais orgânicos ou inorgânicos ou precursores poliméricos e apresentam uma estrutura sólida contínua. Quando monolitos são sintetizados à temperaturas abaixo do ponto de congelamento do solvente (normalmente entre -5 °C á -20 °C), eles são chamados de criogéis e apresentam macroporos interconectados. A formação de gelo, simultaneamente à reticulação dos monômeros de sua estrutura, é responsável pela porosidade e tamanho de poros do criogel, provendo-lhe vantagens como a possibilidade de operar em altas vazões e baixa resistência ao escoamento de fluidos (LOZINSKY *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2013; ERTURK & MATTIASSON, 2014; BAKHSHPOUR *et al.*, 2016).

Para emprego em cromatografia de afinidade, os criogéis monolíticos necessitam ser derivatizados com ligantes os quais reconhecem e interagem com resíduos ou regiões específicas da biomolécula alvo (BARROSO *et al.*, 2013). A especificidade dos ligantes, aliadas às propriedades dos monolitos, torna estes adsorventes uma fase estacionária adequada para purificação de bioprodutos como DNA, RNA, vírus, polissacarídeos, proteínas e peptídios (ARRUA & IGARZABAL, 2011).

Os ligantes em cromatografia de afinidade podem ser classificados como biospecíficos ou pseudobiospecíficos, e apesar de diversos terem sido estudados, poucos são realmente utilizados em escala industrial. Os ligantes biospecíficos são moléculas que possuem alta especificidade pela biomolécula alvo e são amplamente utilizados para purificação de anticorpos, como as proteínas A, G e L, apesar de seu alto custo e de apresentarem maior complexidade de imobilização, quando comparado aos pseudobiospecíficos. Outras desvantagens dos ligantes biospecíficos incluem alto risco de contaminação da biomolécula alvo em caso de desprendimento do ligante da matriz e ciclos de vida mais limitados (ARNOLD *et al.*, 2006; SHENG & KONG, 2012; ARORA *et al.*, 2017). Por outro lado, os ligantes pseudobiospecíficos compreendem moléculas de tamanho menor, de baixo custo e altamente estáveis, tornando-os candidatos promissores como alternativa aos biospecíficos (LOWE & PEARSON, 1984; VIJAYALAKSHMI, 1989; PRASANNA *et al.* 2015). Dentre os ligantes pseudobiospecíficos estudados para a purificação de anticorpos estão os tiofílicos (BAKSHPOUR *et al.*, 2014), os corantes (CHEN *et al.*, 2018; VENUGOPAL *et al.*, 2019), os aminoácidos e derivados de aminoácidos (BRESOLIN *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2015, PAVAN *et al.*, 2017) e os quelatos metálicos (VANÇAN *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2014; MOURÃO *et al.*, 2016).

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), introduzida por PORATH *et al.* (1975), tem sido reportada na literatura como técnica para purificação de biomoléculas, incluindo os anticorpos. IMAC baseia-se na interação entre um grupo doador de elétrons acessível na superfície de proteínas e um grupo receptor de elétrons, no caso os íons metálicos quelatados. A interação ocorre por ligação de coordenação entre o íon metálico quelatado e certos resíduos de aminoácidos expostos na superfície de proteínas, como imidazol da histidina e tiol da cisteína, mas também podem envolver ligações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (BRESOLIN *et al.*, 2009).

Os agentes quelantes também apresentam um efeito na adsorção da biomolécula, uma vez que quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estável será o complexo formado com o íon metálico, porém menos sítios estarão livres para interagir com a proteína, logo a mesma será adsorvida mais fracamente. Desde o primeiro estudo de IMAC, o agente quelante mais empregado é o tridentado ácido iminodiacético, ou IDA, porém há outros tetra e pentadentados também utilizados (UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009; CHUENG *et al.*, 2012). Já os íons metálicos podem interagir com grupamentos diferentes presentes nas proteínas, sendo os Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} e Fe^{3+} os mais utilizados em IMAC (SULKOWSKI, 1989; BRESOLIN *et al.*, 2009).

Quelatos metálicos, ao contrário dos ligantes bioespecíficos como a proteína A, G e L, proporcionam eluição da molécula alvo em condições brandas, minimizando o risco de desnaturação (GARBERC-POREKAR & MENART, 2001) Além disso, em muitos casos, IMAC propicia alto grau de pureza da biomolécula alvo, podendo ultrapassar os 90% (VANÇAN *et al.*, 2002; BRESOLIN *et al.*, 2009; BAKHSHPOUR *et al.*, 2016). Essas vantagens, aliadas ao seu baixo custo, tornam a IMAC um método excelente de purificação, e com as pesquisas e o desenvolvimento de novas matrizes, o interesse industrial por esta técnica tem crescido.

Apesar de muitos trabalhos reportados na literatura terem demonstrado o potencial da técnica de IMAC para purificação de IgG de diferentes fontes (BODEN *et al.*, 1995; VANÇAN *et al.*, 2002; SERPA *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008; BRESOLIN *et al.*, 2010; PRASANNA e VIJAYALAKSHMI, 2010, UYGUN *et al.*, 2012; PAVAN *et al.*, 2014; MOURÃO *et al.*, 2016), estudos envolvendo criogéis como matrizes de IMAC são escassos (BAKHSHPOUR *et al.*, 2016). Dessa forma, o estudo envolvendo matrizes compostas por criogéis, aliadas aos quelatos metálicos para purificação de IgG a partir do soro bovino, reveste-se de relevância.

1.2 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma fase estacionária a base de poliacrilamida (PAAm) e alginato (Alg) para emprego em cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), visando a purificação de IgG bovina. A fase estacionária consistiu de criogel monolítico PAAm-Alg que foram sintetizados, caracterizados e posteriormente derivatizados com o agente quelante IDA. O efeito dos íons metálicos de transição cobre e níquel foi investigado em termos de seletividade e rendimento, quanto o potencial de utilização em purificar IgG a partir do soro bovino.

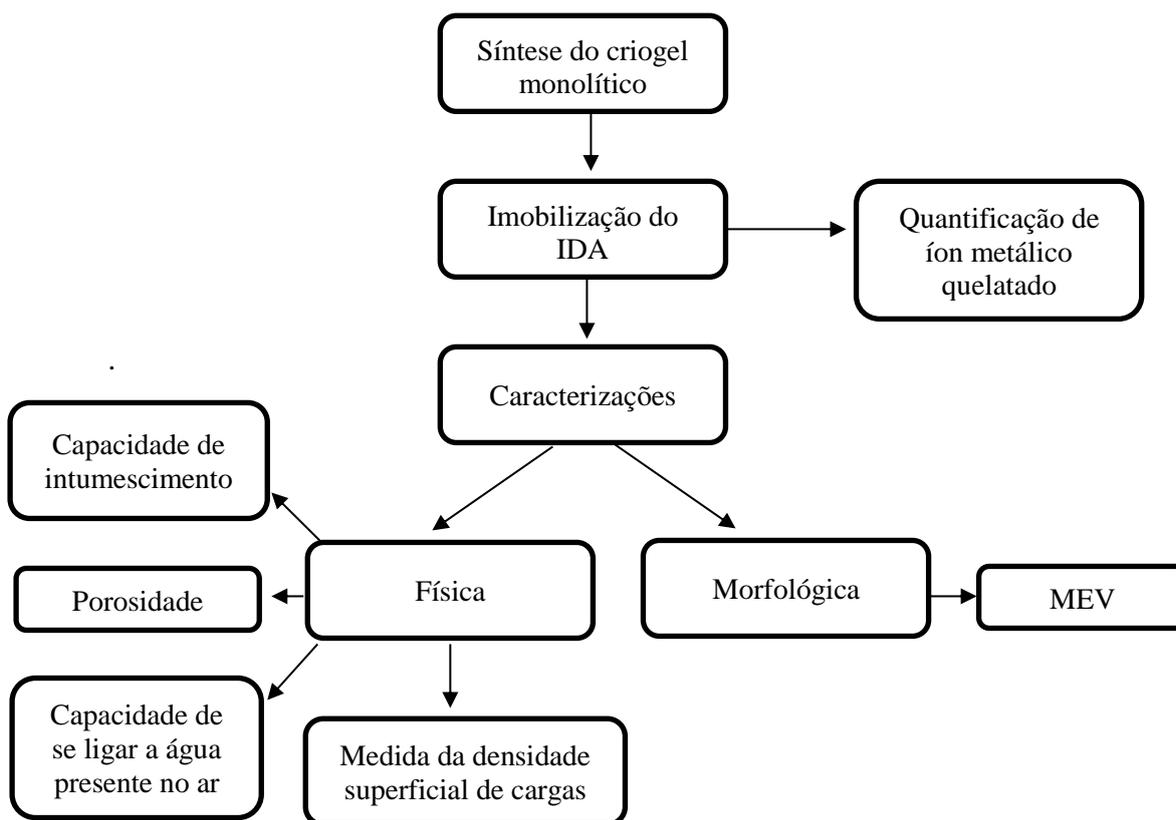
1.3 Etapas realizadas para atingir o objetivo proposto

A pesquisa foi dividida em cinco etapas: 1) preparação do criogel (monolito PAAm-Alg-AGE) e imobilização do agente quelante IDA; 2) Caracterização do criogel e medida da densidade de íons metálicos imobilizados; 3) Purificação de IgG a partir do soro bovino em criogéis quelatados com IDA-Cu²⁺ e IDA-Ni²⁺; 4) Determinação da cinética e da capacidade dinâmica de adsorção de bIgG no criogel com e sem o íon metálico quelatado 5) Obtenção de dados de adsorção de bIgG no equilíbrio para determinação de isothermas e de parâmetros termodinâmicos nas melhores condições encontradas na etapa anterior.

Na primeira etapa o criogel PAAm-Alg-AGE foi sintetizado e, em seguida o agente quelante IDA foi covalentemente imobilizado.

A segunda etapa teve como objetivo caracterizar o adsorvente. Para tanto, foram determinados: a) capacidade de absorção de água; b) porosidade; c) morfologia; d) determinação da quantidade de Cu^{2+} e Ni^{2+} quelatado.

Figura 1 - Etapas 1 e 2 Preparação e caracterização da fase estacionária.



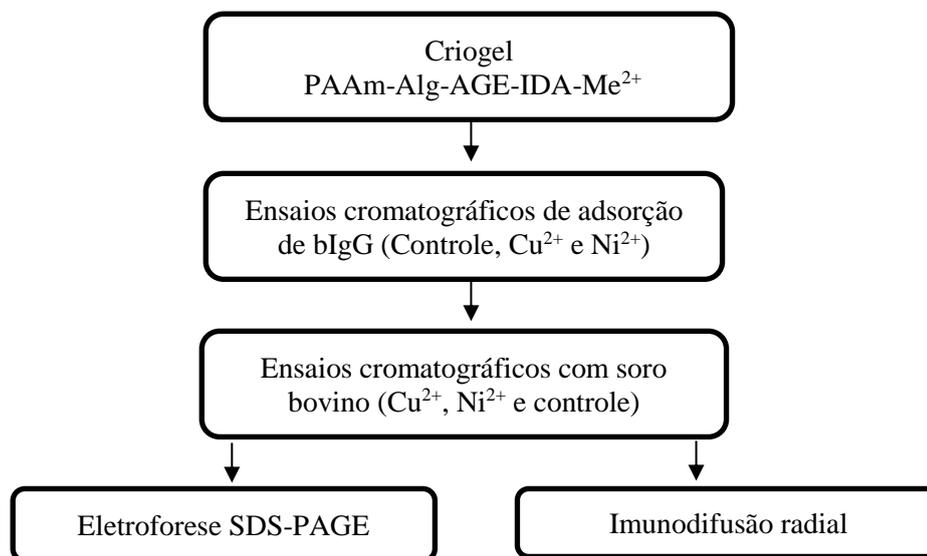
Fonte: Autor (2020)

Na terceira etapa foram realizados ensaios cromatográficos visando a purificação de IgG presente no soro bovino (Figura 2). Para isso, executou-se os seguintes passos: a) ensaios cromatográficos em PAAm-Alg-AGE-IDA- Me^{2+} (nos quais Me^{2+} são íons cobre ou níquel) alimentando soro bovino diluído em diferentes sistemas tamponantes. Experimento de controle foi realizado no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA (sem íon metálico quelatado) na melhor condição encontrada nos experimentos anteriores; b) análise qualitativa e quantitativa de bIgG nos *pools* das frações cromatográficas por eletroforese SDS-PAGE e imunodifusão radial. Foram determinados o grau de pureza e o fator de purificação.

Na quarta etapa (Figura 3) foram realizados ensaios para avaliar a capacidade dinâmica do criogel por meio das curvas de ruptura na melhor condição tamponante

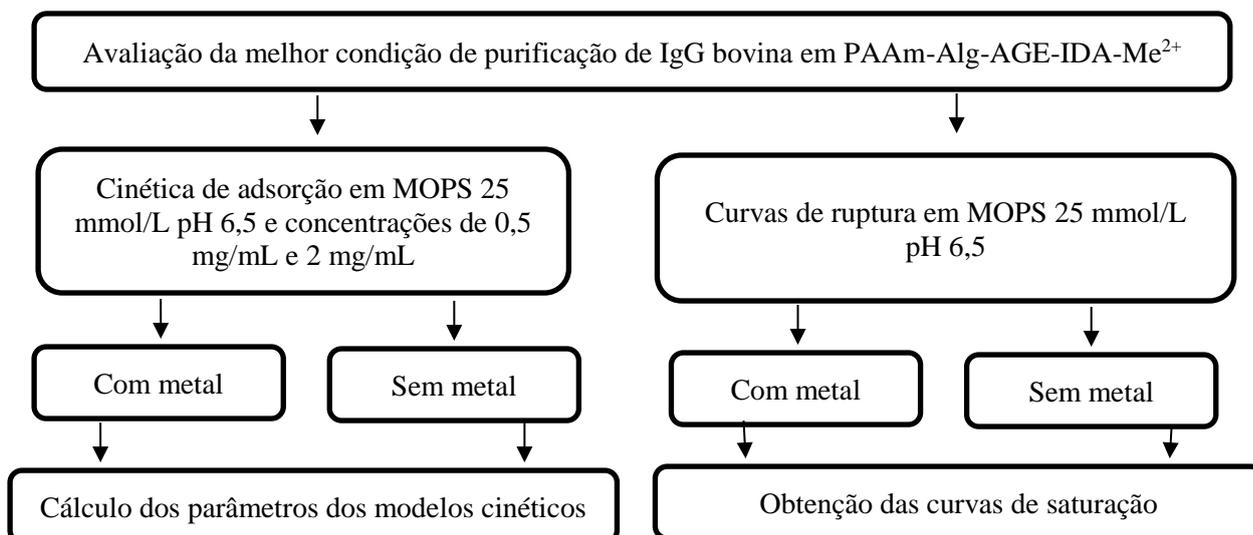
determinada na etapa anterior. Ensaios cinéticos de adsorção de bIgG em diferentes concentrações foram realizados visando cálculo de parâmetros de modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weber-Moris.

Figura 2 - Etapa 3: Ensaios cromatográficos com soro bovino e quantificação



Fonte: Autor (2020)

Figura 3 - Etapa 4: Capacidade dinâmica e cinética de adsorção de bIgG em concentrações diferentes

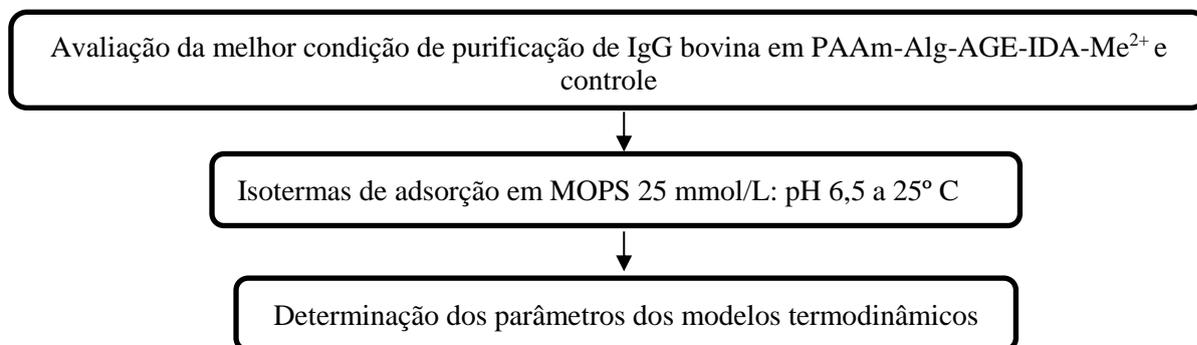


Fonte: Autor (2020)

Na quinta etapa foram efetuados experimentos de adsorção de bIgG no equilíbrio para determinação de isotermas de adsorção e obtenção de parâmetros dos modelos de Langmuir (capacidade máxima de adsorção, q^* e constante de dissociação, K_d) e Langmuir-Freundlich

(q^* , K_{dLF} e coeficiente de cooperatividade, n), parâmetros estes importantes para ampliação de escala (Figura 4).

Figura 4 - Etapa 5: Determinação de isotermas de adsorção e obtenção dos parâmetros termodinâmicos



Fonte: Autor (2020)

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica serão abordados os seguintes tópicos: estrutura e função da imunoglobulina G e alguns métodos empregados para sua purificação, incluindo IMAC, técnica descrita posteriormente, com seus fundamentos e aplicações. No tópico seguinte serão abordados fundamentos sobre criogéis monolíticos e seu emprego como fase estacionária em cromatografia de afinidade, além de estrutura, propriedades e a reticulação do alginato em condições criogênicas como forma de prover melhores características ao suporte sólido. Serão discutidos os fundamentos das isotermas de adsorção, dos modelos cinéticos e das curvas de ruptura. Este conjunto de conceitos são necessários para o melhor entendimento do trabalho.

2.1 Imunoglobulina G (IgG): estrutura, função e técnicas cromatográficas empregadas na purificação

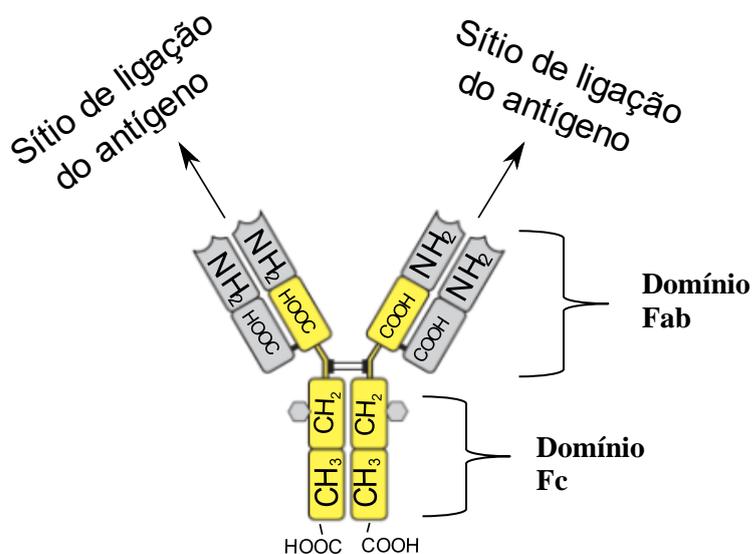
Imunoglobulinas (anticorpos) são glicoproteínas que constituem parte do sistema imunológico de vertebrados, expressas pelos linfócitos B em resposta a presença de antígenos específicos, atuando na inativação dos mesmos. Em sua estrutura estão presentes sítios de ligações, denominados epítomos, que possuem a função de reconhecer estes antígenos, formando complexos e posteriormente desencadeando sistemas efetores para sua eliminação (JANEWAY *et al.*, 2001; ALBERTS *et al.*, 2008).

Anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais. Os anticorpos policlonais são produzidos por diferentes clones de células, e os monoclonais são produzidos por um único clone, estes possuindo características idênticas entre si. O sistema imunológico bovino produz três isotipos de imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM que se diferem em estrutura, massa molar, em carga, em atividade biológica e composição de aminoácidos, apesar de serem constituídas de cadeias polipeptídicas leves (L) e pesadas (H) (BROOKS *et al.*, 2014; LE *et al.*, 2016).

Estudos indicam que as imunoglobulinas do soro humano e do soro bovino são similares estruturalmente e podem ser analisadas de forma análoga (BUTLER, 1985; LARSON, 1992). No plasma bovino, a IgG divide-se em duas subclasses a IgG₁ e a IgG₂, sendo a primeira a mais abundante chegando a 81% de sua composição, conforme demonstra a Tabela 1 (STELWAGEN *et al.*, 2008). A IgG bovina (bIgG) é uma glicoproteína de massa molar de 150 kDa (82 à 96% de aminoácidos e 4 a 18% de carboidratos), formada por duas cadeias pesadas, cada uma com 50 kDa, e duas cadeias leves de 25 kDa cada, unidas por meio de ligações dissulfeto e por interações não covalentes, o que proporciona a molécula uma conformação na

forma de “Y”, como demonstrado na Figura 5 (HAMILTON, 2001; HOLT *et al.*, 2003). As cadeias leves (L) e pesadas (H) possuem em comum um domínio variável (V_L e V_H), mas diferem no número de domínios constantes, um para a primeira e três para a segunda no qual cada domínio possui cerca de 110 aminoácidos. As cadeias leves se diferenciam em dois tipos κ (capa) ou λ (lambda), dependendo dos aminoácidos que constituem as regiões constantes (BROOKS *et al.*, 2014).

Figura 5 - Estrutura da imunoglobulina G



Fonte: Adaptado de JANEWAY, 2014

Tabela 1 - Concentração média de proteínas no soro, leite e colostro bovino

Proteína	Concentração em mg/mL			% total de proteínas		
	Soro	Leite	Colostro	Soro	Leite	Colostro
IgG₁	11,2	0,58	46,4	9,19	4,41	37,51
IgG₂	9,2	0,055	2,87	7,55	0,41	2,32
IgA	0,37	0,081	5,36	0,30	0,61	4,33
IgM	3,05	0,086	6,77	2,50	0,64	5,47
Albumina	33,4	0,036	2,2	27,40	0,26	1,78
Transferrina	64,7	12,3	60,1	53,06	93,67	48,59

Fonte: Adaptado de BUTLER, 1983

As cadeias polipeptídicas variáveis leves e pesadas juntas, em sua porção amino terminal, formam a região no qual o antígeno será reconhecido de forma complementar, chamada Fab, ou seja, constituem os sítios de ligação no qual o antígeno interage com o anticorpo. Por serem altamente dependentes dos aminoácidos que as constituem, adquirem a

característica de serem específicas e se diferenciarem por molécula. Ligado pela região flexível, encontra-se o domínio Fc, formado apenas por cadeias constantes pesadas, sendo responsável pela ativação dos sistemas efetores do sistema imunológico, que acarretarão a destruição posterior do antígeno (INDYK *et al.*, 2008; ALBERSTS, 2017).

As regiões Fab e Fc se diferem em funções, o domínio Fc é responsável por algumas atividades biológicas, como ativação do complemento, por outro lado o domínio Fab é o responsável por reconhecer antígenos (BROOKS *et al.*, 2014). Devido a essas funções, estudos reportam que a IgG proveniente do soro bovino possui vastas aplicações em seres humanos, desde tratamento de doenças entéricas causadas por vírus provenientes de suínos (SCHALLER *et al.*, 1992; SARKER *et al.*, 1998), no controle dos níveis de aminoácidos essenciais no plasma sanguíneo (Shaw *et al.*, 2016) até na dieta infantil com a finalidade de combater a gastrite (OONA *et al.*, 1997), infecções respiratórias e diarreia (UCHIDA *et al.*, 2010 SAAD *et al.*, 2016). Em adultos portadores do vírus HIV, Asmuth e colaboradores constataram em 2013, que a administração da IgG bovina oral aumentou o número de hemoglobina e células CD4+ no sangue, em outro estudo realizado no ano de 2015, Odong e colaboradores obtiveram o mesmo resultado, porém observaram além disso, um aumento no peso dos portadores.

2.1.1 Purificação de IgG bovina

A IgG bovina (bIgG) é comumente utilizada pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos, alimentícias e de diagnósticos médicos. Devido ao aumento da demanda ano após ano, são necessárias novas técnicas de separação de bIgG que exijam menos etapas, possuam menor custo e que atinjam uma pureza elevada. Em escala industrial, os métodos mais comumente utilizados para a purificação são a precipitação, por meio do ajuste de algumas propriedades da solução (OUTINEN *et al.*, 1996), filtração em membranas (ZYDNEY, 1998) e técnicas de adsorção seletiva (GURGEL *et al.*, 2000), porém todos são processos que exigem outras etapas subsequentes, o que eleva o custo e o tempo para sua produção.

Segundo dados do *Transparency Marketinkg Research*, a demanda de derivados do soro bovino deve ter um aumento anual de 5,8% no período de 2017 à 2025, passando de uma receita de US\$ 1.404,9 milhões em 2017 para US\$ 2.198,8 milhões no final de 2025, tendo a IgG como a fração mais comercializada. Este aumento, se deve principalmente, pela indústria alimentícia, impulsionado pela necessidade de alimentos mais nutritivos. Outro fator significativo é o avanço da tecnologia de coleta e processamento do sangue bovino.

Com a finalidade de atender essa demanda de bIgG foram desenvolvidos métodos de

purificação alternativos aos já aplicados industrialmente, uma vez que o soro bovino é um meio complexo composto por outras proteínas como albumina e transferrina. Alguns métodos reportados na literatura são: extração da bIgG através de micelas reversas (SU & CHIANG, 2003), cromatografia de troca-iônica (QI *et al.*, 2001; DOULTANI *et al.*, 2004), cromatografia de interação mista (YANG & GENG, 2011), cromatografia de interação hidrofóbica (KOISOR *et al.*, 2013) e de afinidade utilizando a proteína G como ligante (WU & XU, 2009).

Porém, alguns destes métodos de separação necessitam de um número grande de etapas gerando baixos rendimentos. Por exemplo, na cromatografia de troca iônica, a adsorção pode ser dificultada devido as subclasses (bIgG₁ e bIgG₂) encontradas da IgG no soro bovino e estas possuírem ponto isoelétrico entre 5,5 a 8,3 (HAHN *et al.*, 1998; DONG *et al.*, 2013). Na cromatografia de afinidade utilizando os ligantes bioespecíficos como a proteína A e G, que apesar de proporcionarem purezas elevadas de bIgG, chegando a 90% (CHEN & WANG, 1991), possuem custo também elevado (ARORA *et al.*, 2017).

Contudo, os métodos cromatográficos ainda são os mais utilizados para a purificação de IgG do soro bovino visando um número menor de etapas, ou até mesmo uma única etapa, e a cromatografia de afinidade mostra-se a mais promissora, mesmo que em escala laboratorial (BILLAKANTI *et al.*, 2014). Em busca de superar obstáculos e tornar o método ainda mais eficiente, simples, com menor custo e possibilitar sua ampliação para larga escala, estudos vêm sendo realizados, como por exemplo, substituindo os ligantes bioespecíficos pelos pseudobioespecíficos (KONECNY *et al.*, 1994; DAOUD-ATTIEH *et al.*, 2013; BILLAKANTI *et al.*, 2014).

Alguns ligantes pseudobioespecíficos reportados na literatura, como por exemplo os aminoácidos histidina e o imidazol (POURROSTAM-RAVADANAQ *et al.*, 2020), peptídeos (BILLAKANTI *et al.*, 2014) e os íons metálicos imobilizados (FUKUMOTO *et al.*, 1994) tem possibilitado capturar a IgG do soro bovino. Ligantes pseudobioespecíficos apresentam vantagens de possuírem menor tamanho, baixo custo, melhor estabilidade química e física sob condições de alta força iônica e alto e baixo pH (ROQUE *et al.*, 2007; PRASANNA *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2017).

2.2 Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

IMAC foi introduzida por Porath e colaboradores em 1975, decorrente dos resultados de um estudo de separação de metaloproteínas em um adsorvente utilizando íons metálicos quelatados ao agente quelante IDA. A IMAC baseia-se no princípio de separação que explora

a formação de ligações de coordenação entre os íons metálicos imobilizados em um suporte sólido e resíduos de aminoácidos expostos na superfície de biomoléculas em solução. Os íons metálicos são imobilizados por meio de um agente quelante acoplado à matriz por ligações covalentes que atuam como ácidos de Lewis (PORATH, 1992; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009; CHEUNG *et al.*, 2012).

Desde que foi introduzida, IMAC tem sido amplamente utilizada, sendo eficiente na purificação de peptídios, proteínas recombinantes e não recombinantes (LI *et al.*, 2014), na remoção de endotoxinas (ZIMMERMAN *et al.*, 2006) e na purificação de células (TETALA *et al.*, 2013) e hormônios (MOONEY *et al.*, 2014). Suas diversas aplicações estão ligadas às suas vantagens e versatilidade; a Tabela 2 apresenta algumas características da IMAC em comparação a outros métodos de purificação.

Tabela 2 - Comparação de IMAC com outras cromatografias de adsorção

Propriedade	IMAC	Afinidade	IEC	HIC
Capacidade	alta (média)	baixa	Alta	alta (média)
Recuperação	alta	média	Alta	Média
Injeção	branda	branda	Branda	pode ser drástica
Eluição	branda	drástica	Branda	Branda
Regeneração	completa	incompleta	Completa	Incompleta
Seletividade	média-alta	alta	baixa-média	baixa-média
Custo	baixo	alto	Baixo	Baixo

IEC: Cromatografia de Troca Iônica

HIC: Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Fonte: Adaptado de CHAGA, 2001.

Para alcançar a alta seletividade com esta técnica, deve-se escolher adequadamente o íon metálico, o valor de pH do meio, o agente quelante, a concentração e a força iônica do tampão utilizado (UYGUN *et al.*, 2012). Uma vantagem dessa técnica é a possibilidade de imobilizar diferentes íon metálicos que possuem afinidades distintas pelos resíduos de aminoácidos presentes na superfície da proteína. Outra vantagem está na possibilidade da coluna ser regenerada completamente após o uso, permitindo novos ciclos de purificação com diferentes íons metálicos. Além do apresentado na Tabela 2, IMAC também possui a vantagem de poder ser utilizada em diferentes etapas do processo de recuperação e purificação de biomoléculas, da captura ao polimento final (PORATH, 1988; CHAGA, 2001).

Apesar de possuir propriedades vantajosas, IMAC apresenta algumas limitações como a possibilidade de desprendimento do íon metálico quelatado, podendo contaminar a proteína

de interesse, devido a toxicidade destes elementos (CHEUNG *et al.*, 2012). Há também risco da proteína capturar o íon metálico, influenciando na sua função biológica negativamente. Este fenômeno ocorre quando há uma intensa afinidade entre o íon metálico imobilizado e a proteína, processo denominado MIT (*Metal Ion Transfer in Protein*) (PORATH, 1992; BRESOLIN *et al.*, 2009).

2.2.1 Princípios básicos da IMAC

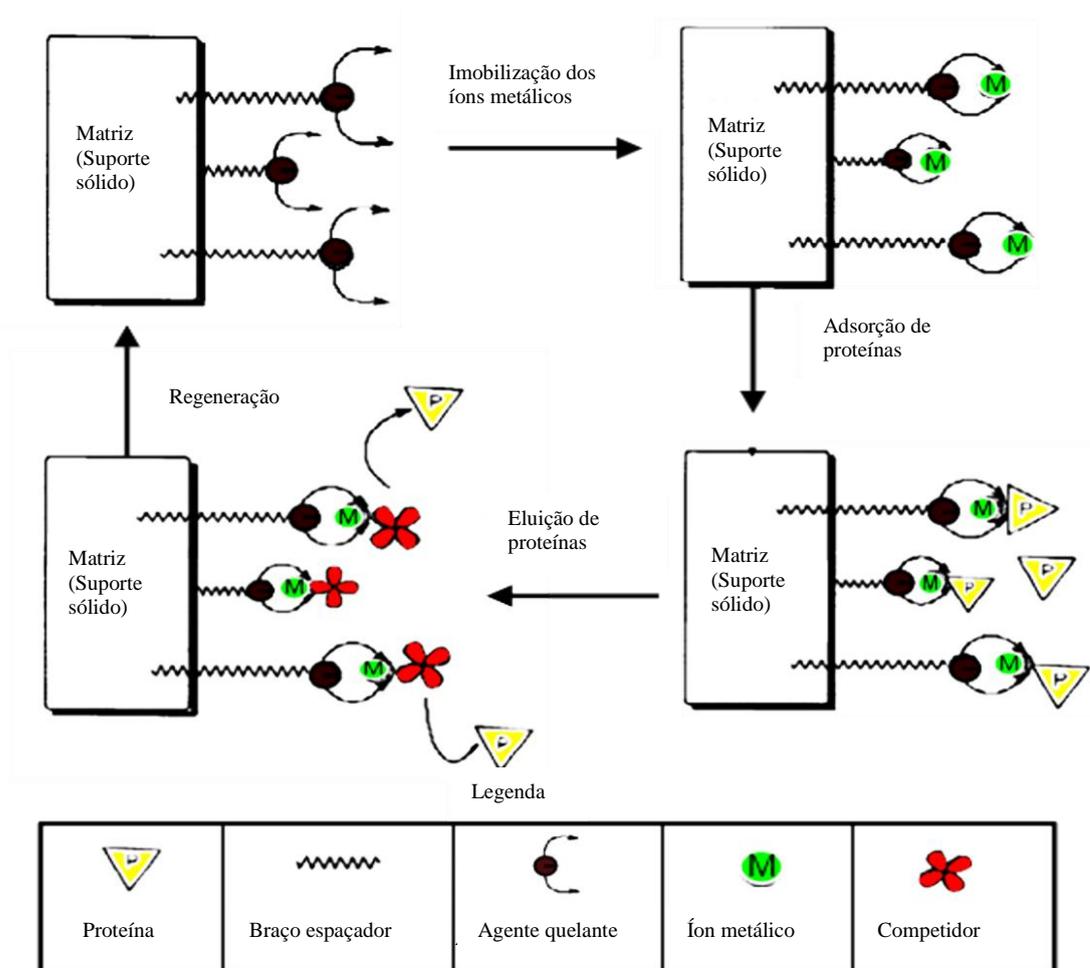
IMAC é uma técnica de separação no qual tem como princípio a diferença de afinidade de grupamentos doadores de elétrons localizados na superfície das proteínas por íons metálicos imobilizados em um suporte sólido derivatizado com um agente quelante. Essa afinidade depende dos sítios de coordenação disponíveis para ligação nos íons metálicos quelatados (receptores de elétrons) e dos resíduos de aminoácidos presentes na proteína (doadores de elétrons), sendo os principais os grupamentos imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do tripofano (PORATH *et al.*, 1975; CHAGA, 2001; BRESOLIN *et al.*, 2009; CHUENG *et al.*, 2012; SPRIESTERSBACH *et al.*, 2015).

O complexo agente quelante e íon metálico é formado quando íons metálicos em solução são alimentados na coluna. Estes íons metálicos possuem maior afinidade pelos sítios de coordenação presentes no agente quelante, deslocando os íons e contra-íons do sistema tamponante que estavam ligados fracamente a essas moléculas. Assim, forma-se o complexo agente quelante-íon metálico, capaz de promover a interação. A força de ligação entre o íon metálico e a proteína é variável dependendo da molécula, e essa característica pode ser explorada para uma separação mais efetiva (PORATH *et al.*, 1975; CHAGA, 2001; BRESOLIN *et al.*, 2009; CHEUNG *et al.*, 2012). A Figura 6 esquematiza o procedimento cromatográfico em IMAC.

Em IMAC, a etapa de adsorção é realizada em condições tamponantes específicas, de diferentes naturezas, faixas de pH e força iônica. Devem ser evitados os sistemas tamponantes que possuem alta afinidade por íons metálicos, como tricina e citrato, pois podem desprendê-los da matriz. Na etapa de adsorção, uma solução proteica é alimentada na coluna, na qual as moléculas que possuírem afinidade pelos íons metálicos serão adsorvidas, e as que não interagiram ou interagiram fracamente serão retiradas na etapa de lavagem, realizada posteriormente, em geral com o mesmo sistema tamponante que promoveu a adsorção. Para a eluição das moléculas adsorvidas, podem ser utilizados agentes competidores, como o imidazol, ou também por meio do abaixamento de pH, protonando os grupos doadores de elétrons da

proteína. Para a regeneração da coluna é comumente utilizado um agente quelante mais forte, como o EDTA, removendo todo o íon metálico quelatado da coluna, permitindo a realização de um novo ciclo (UEDA *et al.*, 2003; GUITERREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009).

Figura 6 – Mecanismo de adsorção em IMAC



Fonte: Adaptado de UEDA *et al.*, 2003

2.2.2 Escolha dos íons metálicos

O maior limitante para a escolha de um íon metálico em IMAC é ele possuir a capacidade de interagir com proteínas. Com base no princípio de ácidos e bases duros e moles (HSAB – *hard and soft acids and bases*), descrito por Pearson em 1973, pode-se classificar os íons metálicos em três categorias, tendo base sua capacidade de interagir com nucleófilos,

sendo: duros (K^+ , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Al^{3+}), intermediários (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) e moles (Cu^+ , Hg^{2+} , Ag^+). Íons metálicos classificados como ácidos duros coordenam de forma estável bases duras, por exemplo átomos de oxigênio e nitrogênio alifático, os intermediários coordenam de forma estável bases intermediárias, como o nitrogênio e enxofre, e os moles coordenam de forma estável bases moles, preferencialmente átomos de enxofre. De forma geral, os íons metálicos mais utilizados em IMAC são Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} (CHAGA, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009; CHUENG *et al.* 2012).

No estudo realizado por Sulkowski em 1989, foi demonstrado que quando íons metálicos são quelatados ao ácido iminodiacético (IDA), estes interagem preferencialmente com resíduos de histidina por meio do par doador de elétrons presentes no anel imidazol de sua estrutura, e que também, o grau de interação é ampliado com o crescente número de resíduos de histidinas expostos na superfície da proteína. Os resíduos de triptofano e cisteína também contribuem para a interação, porém de forma mais restrita, com o primeiro tendo seu efeito minimizado caso haja também a presença de histidina na estrutura, e o último com a interação limitada à sua forma reduzida. Foi analisado também a força de retenção de proteínas em íons metálicos de transição, que seguem a ordem: $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} \cong Co^{2+}$, porém em termos de seletividade, pode ou não seguir nessa ordem. A Tabela 3 apresenta a interação dos íons metálicos de transição pelos resíduos de aminoácidos presentes na superfície da proteína (UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Afinidade do complexo proteína-IDA- Me^{2+} baseado nos resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície de proteínas

Ocorrência de resíduos histidina ou triptofano na superfície de proteínas	Retenção de proteínas nos quelatos IDA- Me^{2+}
Ausência de histidina ou triptofano	Não há
Uma histidina	Cu^{2+}
Mais de uma histidina	Cu^{2+} , Ni^{2+}
Cluster de histidina	Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}
Vários triptofanos, ausência de histidina	Cu^{2+}

Fonte: Adaptado de BRESOLIN *et al.*, 2009

Agindo como ácidos de Lewis em meio aquoso, os íons metálicos formam um complexo de coordenação com um agente quelante, devido aos seus pares de elétrons disponíveis para interação. Este complexo é chamado de centro de adsorção em IMAC, e é influenciado pela

polarição das moléculas envolvidas, eletronegatividade, tipo de ligação, disponibilidade de elétrons entre outros. Com isso, além do íon metálico, a escolha do agente quelante correto é também requerida para a fase estacionária, uma vez que suas propriedades influenciam o complexo formado, bem como a adsorção de proteínas (PORATH *et al.*, 1975; BEITLÉ & ATAAI, 1992; WONG *et al.*, 1991; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009).

2.2.3 Escolha do agente quelante

Devido à presença de átomos doadores de elétrons em sua estrutura (nitrogênio, oxigênio e, menos frequente, o enxofre), os agentes quelantes acoplados à matriz cromatográfica são capazes de coordenar íons metálicos, atuando como bases de Lewis, formando os quelatos metálicos (PORATH, 1988; GABERC-POREKAR & MENART, 2001). Em meio aquoso, os sítios de coordenação não quelatados pelos íons metálicos serão ocupados por moléculas de água, podendo ocorrer alguma interação com a proteína (PORATH, 1975; CHAGA, 2001).

Os sítios de coordenação também são responsáveis pela classificação dos agentes quelantes. Moléculas com três sítios disponíveis para quelatar um metal são chamados de tridentados, com quatro, tetradentados e com cinco, pentadentados. Quanto maior o número de átomos disponíveis para doar elétrons, ou seja, quanto maior o número de “dentes”, mais estável será o centro de adsorção formado pelo agente quelante e íon metálico, porém menor será a interação do íon metálico com as proteínas, uma vez que um menor número de sítios de ligação estarão disponíveis para interação (PORATH, 1975; PORATH & OLIN, 1983; CHUENG *et al.*, 2012).

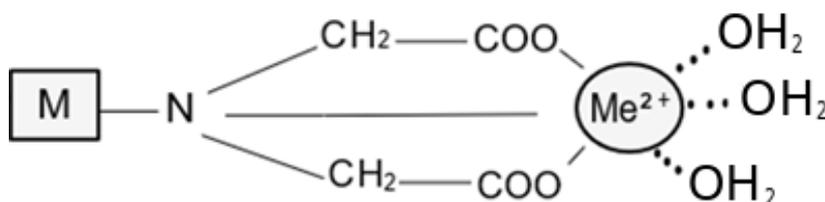
Os agentes quelantes mais utilizados em IMAC são o tridentato IDA (ácido iminodiacético) (UEDA *et al.*, 2003; AQUINO *et al.*, 2006; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007), os tetradentados TREN (tris-2-(aminoetil)amina), NTA (ácido nitrilotriacético), CM-Asp (ácido aspártico carboximetilado) (HART *et al.*, 2002; BRESOLIN *et al.*, 2010; PAVAN *et al.*, 2014; MOURÃO *et al.*, 2017) e o pentadentado TED (tris(carboximetil)etilenodiamina) (BRESOLIN *et al.*, 2010; GÓES *et al.*, 2010). De acordo com PORATH (1988) a seguinte ordem de afinidade do quelato à proteína é observada: $IDA-Me^{2+} > NTA-Me^{2+} \geq CM-Asp-Me^{2+} \geq TED-Me^{2+}$, já que a capacidade de adsorção segue a ordem contrária. Com isso, quanto maior a afinidade do ligante à proteína, menor será a capacidade de adsorção do quelato metálico (CHAGA, 2001; BRESOLIN *et al.*, 2009).

O agente quelante IDA (Figura 7) foi introduzido por Porath em 1975, e continua sendo

bastante empregado atualmente devido ao seu baixo custo e fácil disponibilidade (GUITERREZ *et al.*, 2007). Por ser tridentado (um átomo de nitrogênio e dois de oxigênio disponíveis para coordenação), ocupa três sítios do íon metálico, deixando livre, geralmente, outros três sítios para interação com a proteína.

Sharma & Agarwal (2002), estudaram a influência de fatores como a força iônica, pH e a concentração dos íons metálicos sobre o IDA e outros agentes quelantes, e segundo o estudo, para o Cu^{2+} a capacidade de quelatação do IDA atingiu o máximo em pH igual a 4,0 (45,7 $\mu\text{mol/mL}$ gel), e para pH igual a 5,0 houve uma redução significativa (31,1 $\mu\text{mol/mL}$ gel). Foi constatado que a capacidade de imobilização do quelato está diretamente ligada a sua estabilidade. Para o Ni^{2+} , a capacidade máxima foi encontrada no pH igual a 7,0, e valores menores de pH reduziram a capacidade de imobilização. Segundo os autores, a competição entre o íon de hidrogênio e o íon metálico em meio ácido pode ter sido responsável por este comportamento. A força iônica, por sua vez, quando elevada pode diminuir também as ligações de coordenação entre o íon metálico e o agente quelante.

Figura 7 - Estrutura proposta da coordenação do agente quelante IDA imobilizado em uma matriz cromatográfica (M) e com um íon metálico (Me^{2+}) em meio aquoso



Fonte: Adaptado de GABERC-POREKAR e MENART, 2001.

2.2.4 Adsorção e dessorção de proteínas em IMAC e regeneração da matriz

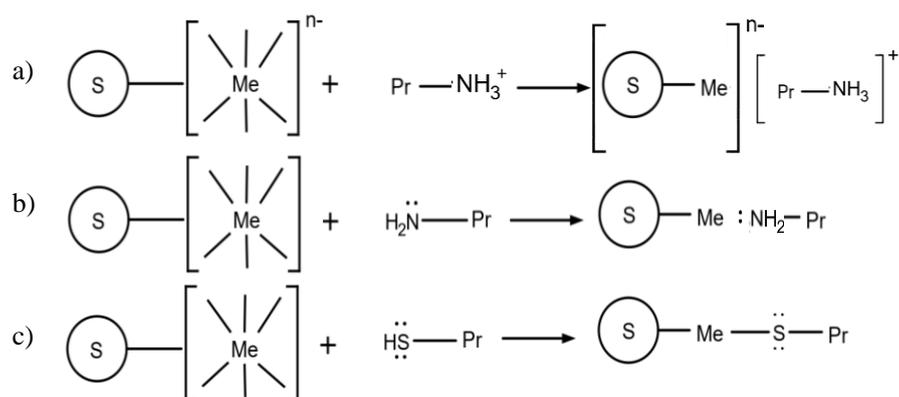
Em IMAC a interação entre proteína e quelato metálico pode ocorrer de formas diferentes (Figura 8), envolvendo além das interações de coordenação, as eletrostáticas, de carga induzida e hidrofóbicas. Essas interações são influenciadas pelo sistema tamponante escolhido como fase móvel, dependendo também da sua força iônica e do seu valor de pH (SHARMA & AGARWAL, 2001; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009).

Adição de sais em altas concentrações faz com que as ligações de coordenação se sobressaiam sobre as eletrostáticas, uma vez que essas interações ocorrem entre as regiões carregadas positivamente na superfície da proteína e a nuvem de cargas negativas provenientes

da solvatação dos quelatos metálicos pela água (PORATH & OLIN, 1983). Por outro lado, quanto menor a força iônica do tampão, mais intensas serão as interações eletrostáticas em relação às de coordenação (GUITERREZ, 2007).

Em relação ao sistema tamponante, em IMAC, com exceção dos tampões que possam interagir com íons metálicos fortemente como a tricina e o citrato, pode-se utilizar todos os tampões tradicionalmente utilizados na cromatografia líquida. Porém, os mais empregados são os zwitteriônicos, ácido 3-[N-morfolino]propanossulfônico (MOPS), ácido e-[N-morfolino]etanossulfônico (MES) e ácido N-[2-hidroximetil]piperazina-N'-[2-etanolssulfônico] (HEPES) (WINZERLING *et al.*, 1992), o positivamente carregado Tris-HCl e o negativamente carregado fosfato de sódio (NaP) (TODOROVA & VIJAYALAKSHMI, 2006).

Figura 8 – Diferentes tipos de interação entre a proteína e o íon metálico quelatado.



(a) interação eletrostática e de carga induzida, (b) ligação de coordenação e (c) ligação covalente. Me: íon metálico; S: Matriz cromatográfica (suporte sólido); Pr: Proteína.

Fonte: Adaptado de VIJAYALAKSHMI, (1989) e HAMACEK, (2020).

A etapa de eluição das proteínas adsorvidas à coluna pode ser realizada adicionando agentes competitivos, alterando o valor de pH, pela adição de um agente quelante mais forte à fase móvel, como por exemplo o EDTA e pelo aumento da força iônica da fase móvel (KAGEDAL, 2011). Quando realizada com um agente competidor como histidina, histamina, glicina ou imidazol, a dessorção ocorre pela maior afinidade do tampão ao sítio de ligação que a proteína está adsorvida. Neste processo, o tampão deslocará a proteína e esta será dessorvida, não ocorrendo mudanças no pH, preservando a atividade da biomolécula retida. Contudo, requer uma etapa a mais no processo de purificação para remover o agente competitivo (WONG *et al.*, 1991; BEITL & ATAHI, 1992).

Quando realizada por abaixamento de pH, a dessorção é controlada pelo

enfraquecimento da ligação quelato metálico e proteína, por meio da protonação dos grupos doadores de elétrons dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície da molécula adsorvida. Situação não recomendada para proteínas sensíveis a baixos valores de pH (PRASANNA e VIJAYALAKSHMI, 2010). Normalmente o deslocamento entre o complexo íon metálico-proteína feito por um agente quelante mais forte, por exemplo o EDTA, é utilizado para etapa de regeneração da coluna, etapa posterior a eluição, que prepara a coluna para um novo ciclo cromatográfico. Porém pode haver casos em que a interação entre proteína-íon metálico é tão forte que a única forma de remove-la da fase estacionária é utilizando um agente quelante ainda mais forte como o DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético) (WONG *et al.*, 1991; BEITLÉ e ATAAI, 1992; BRESOLIN *et al.*, 2009).

2.2.5 Matriz cromatográfica em IMAC

As matrizes cromatográficas clássicas de IMAC são baseadas em partículas esféricas porosas que consistem em uma estrutura porosa permeável à biomoléculas, sendo comumente empregado géis de agarose (UEDA *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009). A principal exigência na escolha de uma matriz cromatográfica é que ela seja hidrofílica para que não haja adsorção não específica de biomoléculas (GABERC-POREKAR & MENART, 2001). Outras características essenciais para a fase estacionária são a presença de grupos funcionais para ativação e posterior imobilização dos ligantes, além de alta resistência mecânica, área superficial, porosidade elevadas e estabilidade em amplas faixas de pH (PORATH & OLIN, 1983; PORATH, 1988; UEDA *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009).

As primeiras matrizes cromatográficas utilizadas em IMAC foram partículas esféricas de agarose. Neste tipo de matriz, a biomolécula a ser purificada é transportada até o sítio de adsorção por difusão e, ainda, quando estes géis são operados a altas vazões, podem formar caminhos preferenciais, dificultando o seu uso em escala industrial (WONG *et al.*, 1991; GAGNON, 2012). Para contornar esses problemas, outras matrizes alternativas foram propostas, como as membranas e os monolitos, pois suportam vazões mais elevadas, favorecendo a transferência de massa convectiva e permitem uma permeação mais homogênea, minimizando a formação de caminhos preferenciais (RIBEIRO *et al.*, 2008; GAGNON, 2012, ORR *et al.*, 2013; SVEC & LV, 2015; MEMIC *et al.*, 2019; BOI *et al.*, 2020; LALLI *et al.*, 2020).

Nos últimos anos os monolitos macroporosos têm sido bastante empregados, uma vez que,

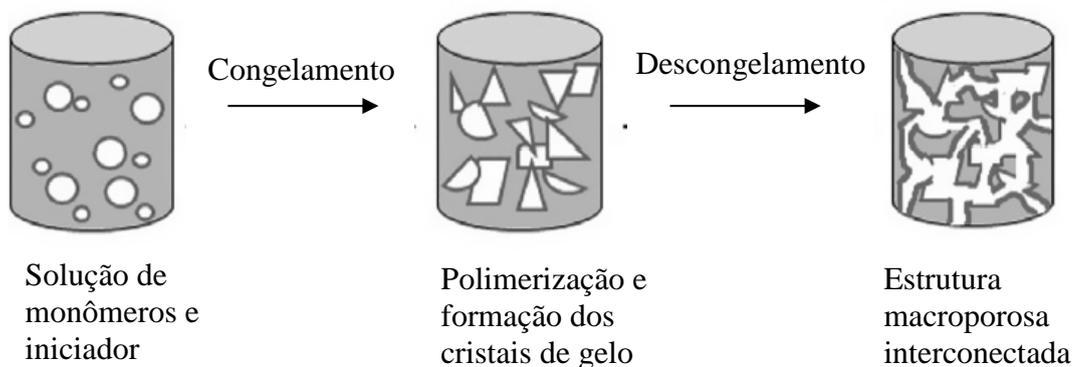
em comparação às membranas, possuem maior capacidade de adsorção volumétrica por ciclo utilizado, diminuindo o tempo do processo, além de que, devido a alta porosidade, a perda de carga é quase desprezível (PRASANNA & VIJAYALAKSHMI, 2010; CELEBI, 2017). A síntese dos monolitos pode ser realizada a partir de diferentes materiais, sendo reportados o uso de polímeros orgânicos como glicidil metacrilato até materiais inorgânicos como a sílica (BAKSHPOUR *et al.*, 2019) e também por técnicas distintas como resinas, xerogéis e os criogéis (PODGORNIK & KRAJNC, 2012). Os criogéis apresentam características relevantes para uso como fase estacionária em cromatografia para a purificação de proteínas, como poros mais largos e suas melhores características mecânicas em comparação as matrizes convencionais, como os materiais particulados e as membranas (VERGARA-BARBERÁN *et al.*, 2019).

2.3 Criogéis monolíticos macroporosos

Monolitos têm sido utilizados como fase estacionária na separação de biomoléculas devido à sua baixa resistência à transferência de massa, que fez com que suas aplicações aumentassem consideravelmente a partir dos anos 90 (PFAUNMILLER *et al.*, 2013). Os criogéis, com sua estrutura macroporosa, são de grande interesse para as indústrias de biomedicina, biotecnologia e farmacêutica, uma vez que permitem a purificação por fluxo majoritariamente convectivo, tornando assim nos últimos anos grande alvo de estudos (BAKSHPOUR *et al.*, 2019).

Criogéis são materiais no qual a gelificação ou polimerização acontece em condições criogênicas, em temperaturas entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A estrutura se forma através da parte congelada (moléculas de água ou solvente formadoras de poros) e da parte descongelada (monômeros, agente de reticulação ou iniciadores) Na síntese do material, a mistura de monômeros e iniciadores de polimerização é levada para um *freezer* ou banho termostático no interior de tubos (Figura 9); a polimerização ocorre na fase descongelada sob temperaturas abaixo de zero, assim, na parte formada por água ou solvente vão formando-se cristais de gelo a medida que esta se solidifica. Após o tempo de reação total, o criogel é exposto à temperatura ambiente para o descongelamento de todos os cristais de gelo formados, deixando poros no criogel, permitindo a formação dos macroporos interconectados (LOZINSKY *et al.*, 2003; BAKSHPOUR *et al.*, 2019; ERTURK & MATTIASSON, 2014).

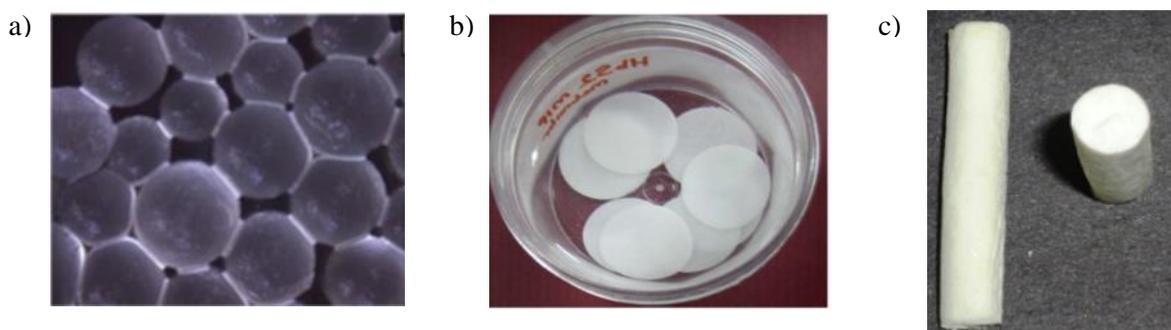
Figura 9 - Representação esquemática da formação de criogel.



Fonte: Adaptado de HIXON *et al.*, 2017.

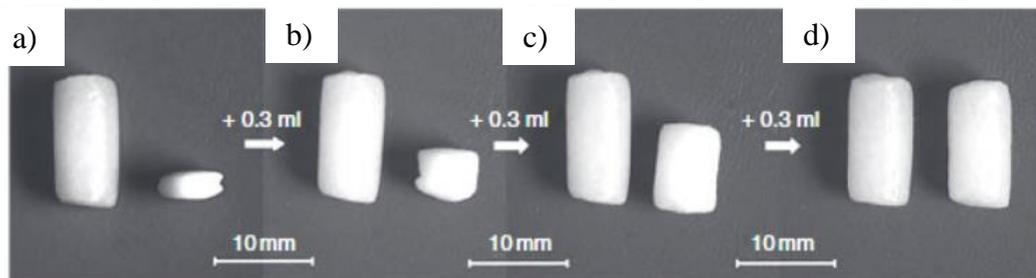
Criogéis possuem propriedades que os permitem assumir diferentes formatos para adaptar-se em diferentes aplicações, podendo ser membranas, monolitos ou esferas porosas (Figura 10). Criogéis se diferenciam por suportarem altas vazões, possuírem uma estrutura esponjosa e grande elasticidade. A Figura 11 demonstra a característica elástica do criogel, no qual foi comprimido em 90% do seu tamanho e depois ao ser adicionado 0,3 ml de água em cada etapa, retornou ao estado inicial. Essas propriedades, por sua vez, são fortemente influenciadas por parâmetros como composição e temperatura de gelificação (ERTURK & MATTIASSON, 2014; BAKHSHPOUR *et al.*, 2019).

Figura 10 - Diferentes formatos de criogéis.



a) criogéis em forma de esferas, adaptado de LOZINSKY, 2014; b) criogéis em forma de membranas, adaptado de SAYLAN & DENIZLI, 2019; c) criogéis em forma de monólitos adaptado de SHARMA *et al.*, 2015.

Figura 11 – Restauração da estrutura dos poros no criogel após compressão



a) criogel comprimido em 10% do tamanho inicial; b) criogel reidratado em 40% do tamanho inicial; c) criogel reidratado em 70%; d) criogel restaurado. Adaptado de SAVINA & D'HOLLANDER, 2007.

A porosidade dos criogéis é uma característica essencial, uma vez que o tamanho, a densidade e a espessura dos poros influenciam diretamente em sua aplicação como suporte sólido. Outras propriedades como alta estabilidade e resistência mecânica, os diferenciam das matrizes comumente utilizadas, tornando-os grandes atrativos na cromatografia líquida (ERTURK & MATTIASSON, 2014; BAKHSHPOUR *et al.*, 2019).

Para que seja possível a aplicação do criogel como matriz em cromatografia de afinidade, o criogel precisa ser funcionalizado, ativando-o para introduzir grupos reativos que irão permitir a imobilização covalente do ligante no suporte sólido. Na literatura são reportadas diferentes formas de introdução de grupos reativos, um exemplo é a ativação por divinil sulfona (DVS) (BAKSHPOUR *et al.*, 2014) que introduz no suporte sólido grupamentos sulfona. Outro exemplo, é a introdução de grupos epóxi que é comumente feita por meio da ativação por bisoxirano (MOURÃO *et al.*, 2019), ou epicloridrina (CÖMERT & ODABAŞI, 2014).

Outra forma também empregada para introdução de grupos epóxi é por meio da adição de monômeros de AGE (alil diglicidil éter) durante a síntese do criogel, tornando desnecessária a etapa de ativação, uma vez que o suporte sólido já está preparado para posteriores modificações químicas. Apesar da adição direta deixar menos grupos epóxi reativos disponíveis para imobilização, demonstra-se vantajosa, pois alguns métodos de ativação podem ser demorados, podem afetar a estrutura porosa do criogel, além de requerem cuidados devido a toxicidade, podendo representar perigo à saúde humana (ERTÜRK & MATTIASSON, 2014).

Bakhshpour e colaboradores em 2016, por exemplo, sintetizaram um criogel de poli(hidroxietil) metacrilato utilizando poli(etileno imina) [PHEMA/PEI] como o agente quelante para imobilização de íons cobre com a finalidade de separar IgG do plasma humano. As moléculas de PEI foram imobilizadas covalentemente no criogel PHEMA por meio da

ligação entre os grupamentos hidroxila do poli(hidroxietyl)metacrilato e os grupamentos amina do poli(etileno imina). Variando a concentração do agente quelante, diferentes quantidades de Cu^{2+} foram quelatadas, tendo o valor máximo de 150 mg/L. Com a isoterma de adsorção foi possível obter a quantidade máxima de IgG retida na fase estacionária, que alcançou o valor de 72,28 mg/g do criogel.

Carvalho e colaboradores em 2014, utilizaram monômeros de acrilamida e de bisacrilamida para a síntese do criogel de poliacrilamida como fase estacionária para uso em IMAC, com o quelato IDA- Cu^{2+} imobilizado. A finalidade deste estudo foi capturar lactoferrina do permeado de soro de leite. Os autores observaram que variando a concentração de acrilamida e bisacrilamida, houve alteração na quantidade e estrutura dos poros do criogel. Analisaram também o efeito da presença de grupamentos epóxi, por meio do alil-diglicidil-éter (AGE) adicionados na síntese, concluindo que o criogel com AGE produz estruturas mais rígidas, além de alterar também a morfologia dos poros.

As propriedades do criogel também podem ser alteradas por meio da utilização de diferentes monômeros em sua síntese. Em busca de prover melhores características ao monolito para ser utilizado como suporte sólido em cromatografia, foram reportados na literatura criogéis sintetizados a partir de monômeros de poli(hidroxietyl metacrilato) (PHEMA) (BAKSHPOUR *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018), poli(ácido metacrilato) (BIBI *et al.*, 2013), N-metacrilóil-(l)-histidina éster metílico com 2-hidroxietyl metacrilato (TEKINER *et al.*, 2012), nano partículas de ferro (NOIR, 2007; SAVINA *et al.*, 2011), polipirrola/poli(vinil álcool) (BOBER *et al.*, 2019), acrilamida/bisacrilamida (PAAm) (DEMIRYAS *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2014), acrilamida/bisacrilamida e alginato de sódio (PAAm-Alg) (MOURÃO *et al.*, 2019; MARCUZ *et al.*, 2021).

A adição de monômeros de alginato na síntese de criogéis monolíticos de poliacrilamida foi reportada na literatura por Mourão *et al.* (2019) e Marcuz *et al.* (2021). Os monolitos sintetizados apresentaram boas características para o emprego como matriz cromatográfica na separação de IgG proveniente do soro humano. A partir disso, a seguir serão discutidas algumas características deste polissacarídeo, que tornam seus monômeros interessantes para a síntese de fase estacionária em cromatografia líquida.

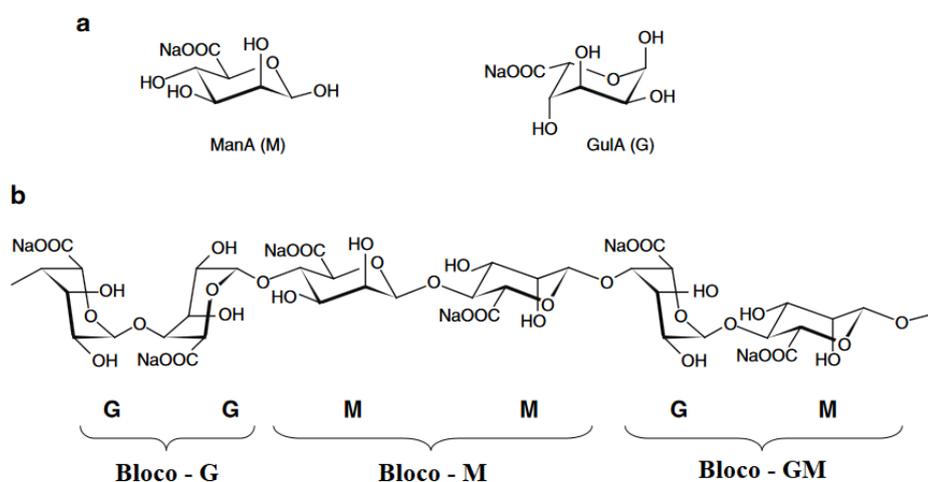
2.4 Alginato como material para síntese de fase estacionária para uso em cromatografia líquida

Alginato (Alg) é um termo denominado para uma família de polissacarídeos produzidos

por algas marrons e bactérias, no qual é composto por blocos interconectados de (1,4) ácido β -D-manurônico (estrutura M) e ácido α -L-gulurônico (estrutura G), formando diferentes sequências, sendo elas GG, MM ou MG. A distribuição dos blocos M e G dependem do tipo e do meio cultivado (no caso das bactérias) nas quais foi extraído, e para algas depende também da sua idade. A Figura 12 apresenta as conformações assumidas pela estrutura do alginato (DONATI & PAOLETTI, 2009; JEJURIKAR, *et al.*, 2012).

É conhecido que os sais monovalentes de alginato se reticulam na presença de cátions divalentes e trivalentes criando uma estrutura denominada “caixa de ovo” (Figura 13), pois em condição de temperatura ambiente, os blocos G tendem a alocar estes cátions em seu centro, criando cavidades eletronegativas, resultando em uma estrutura organizada (YUGUSHI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2017; GURIKOV & SMIRNOVA, 2018). A partir disso, sabe-se que o alginato pode se gelificar de duas formas, tanto por meio do abaixamento do pH para valores menores do que os respectivos valores de pKa de suas cadeias, 3,4 (Bloco M) e 3,6 (Bloco G) quanto pela presença de cátions, a chamada gelificação ionotrópica (GURIKOV & SMIRNOVA, 2018). Em valores de pH menores do que o pKa dessas espécies, os grupamentos COO^- decrescem em número, diminuindo a expansão das cadeias do polímero e o grau de ionização, dando lugar a precipitados por forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio (ZHAO *et al.*, 2016; WALSTRA, 2003).

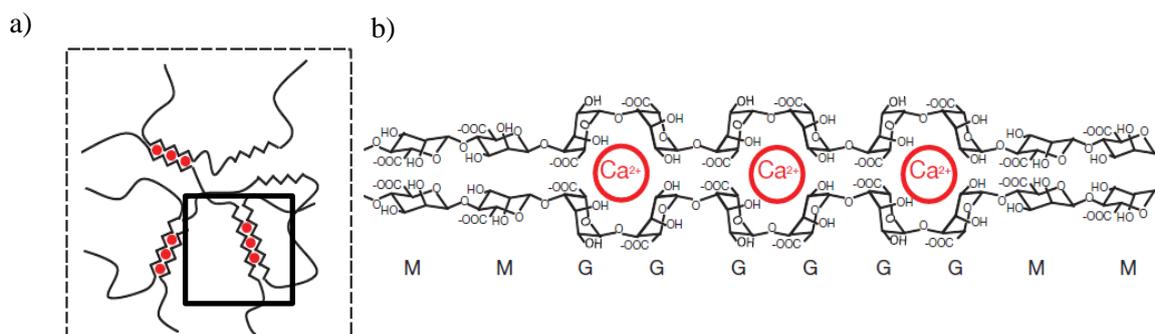
Figura 12 - Estrutura química do alginato



a) Conformação 4C_1 do ácido β -D-manuronato (M) de sódio e a conformação 1C_4 do ácido α -L-guluronato (G) de sódio. b) a composição em blocos do alginato, G, M e GM. Adaptado de DONATI & PAOLETTI, 2009.

A criogelificação do alginato de sódio foi reportada pela primeira vez por Florián-Algarín e Acevedo em 2010, porém, somente em 2016 que Zhao e colaboradores reportaram a síntese de um gel por técnicas criotrópicas, que suportava melhores condições de temperatura, pressão e vazão, apesar de ainda constituírem uma estrutura frágil e muito dependente do pH.

Figura 13 - a) Polimerização do alginato na presença de cátions Ca^{2+} b) ampliação da região de reticulação



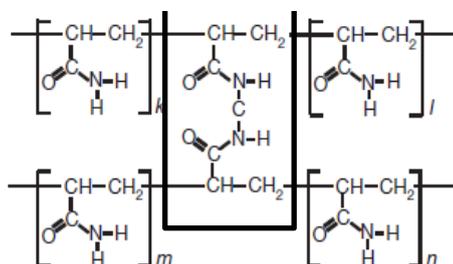
Fonte: Adaptado de SUN *et al.*, 2012.

Na literatura, outras formas de criogelificação do alginato foram propostas, incluindo misturas de diferentes biomoléculas, como ácido hialurônico e pectinas (GURIKOV & SMIRNOVA, 2018). Com base nisso, estudou-se também polimerizar o alginato junto à outras moléculas, em busca de melhores características, principalmente mecânicas, uma vez que materiais híbridos sintetizados a partir de misturas proporcionam, em sua maioria, propriedades melhores em relação ao polímero natural isolado (SAMANTA & RAY, 2014).

2.4.1 Criogéis de alginato/poliacrilamida

A polimerização da acrilamida já é bem elucidada na literatura, principalmente quando se trata de estrutura como hidrogéis (YANG *et al.*, 2019). A estrutura polimerizada do hidrogel e do criogel de poliacrilamida (PAAm) (Figura 14) segue a mesma tendência, porém, devido à polimerização do segundo ocorrer em baixa temperatura, a reticulação acontece mais lentamente, conduzindo a uma maior densidade e tamanho de poros. A reação é comumente iniciada pelo iniciador persulfato de amônio (APS) e o agente reticulante N,N-metilenobisacrilamida (MBA) na presença de um catalisador, formando uma cadeia de ligações covalentes cruzadas (SUN *et al.*, 2012).

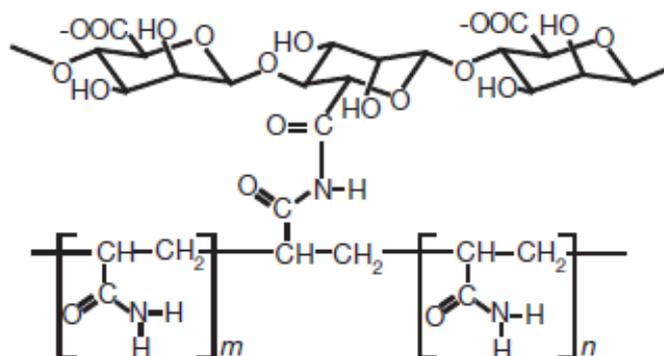
Figura 14 – Reticulação da PAAm, destacado a MBAm como agente reticulante, formando ligações covalentes entre os monômeros de acrilamida.



Fonte: Adaptado de SUN *et al.*, 2012

Os primeiros estudos de polimerização da PAAm com o Alg presente, no caso dos hidrogéis, seguiam o método no qual, a poliacrilamida e o alginato são misturados ao APS e o catalisador, na presença dos íons cálcio, adicionados por meio de uma solução de CaSO_4 hidratada, como agente de reticulação iônico do alginato (Figura 15). Essa mistura é exposta a luz ultravioleta na temperatura de 50°C , para iniciar a reação, com a MBAm responsável por ligar covalentemente as cadeias de alginato e acrilamida. A adição do alginato resulta em uma estrutura com propriedades mecânicas melhoradas, bem como sua elasticidade (SUN *et al.*, 2012).

Figura 15 - Estrutura do hidrogel de PAAm/Alg



Fonte: SUN *et al.*, 2012

Atualmente, a literatura já reporta a síntese de hidrogéis de poliacrilamida alginato por meio da polimerização iônica, sem a presença dos raios ultravioletas e de altas temperaturas (LEI *et al.*, 2020). O mesmo se aplica ao criogel de PAAm/Alg, desenvolvido primeiramente por Mourão *et al.* (2019) e posteriormente aprimorado por Marcuz e colaboradores em 2021. Apesar de nenhum mecanismo de reação ter sido proposto pelas autoras, levanta-se a hipótese de que a estrutura formada é decorrente de ligações covalentes entre as aminas da PAAm e os

grupamentos carboxílicos das cadeias do Alg.

O monolito apresentado por Mourão e colaboradores em 2019, foi sintetizado por meio da crio-copolimerização da poliacrilamida/alginato com N,N'-metileno-bis-acrilamida e íons cálcio como agentes reticuladores, APS como iniciador e TEMED como catalisador, na temperatura de -20 °C. Em seguida, o criogel foi então ativado com bisoxirano (Bix), que adiciona ao suporte sólido grupos epóxi, tornando possível a imobilização covalente do ligante, no caso o-fosfo-L-tirosina (P-Tyr) e denominado PAAm-Alg-Bix-P-Tyr. O material desenvolvido apresentou características que possibilitaram a aplicação como fase estacionária em cromatografia de afinidade.

Em busca de diminuir etapas e custo do processo, Marcuz *et al.* (2021), acrescentaram na síntese do monolito proposto anteriormente por Mourão e colaboradores (2019) o alil diglicidil éter (AGE), agente introdutório de grupos epóxi, eliminando assim, a etapa de ativação. O criogel sintetizado foi chamado PAAm-Alg-AGE. No estudo, Marcuz variou a quantidade de AGE, APS e TEMED adicionada à composição do PAAm-Alg-AGE na ausência e presença de CaCl₂, para avaliar a concentração na qual o monolito apresentaria boa permeabilidade e boas características mecânicas. A composição de 4,74% (m/v) de AAm, 1,26% (m/v) de MBAm, 1% (m/v) de alginato, 2% (v/v) de AGE, 0,2% (v/v) de TEMED e 0,04% (m/v) de CaCl₂ proveu a fase estacionária as características necessárias para purificar biomoléculas por meio da cromatografia de afinidade.

Com o intuito de comparar o desempenho de uma matriz cromatográfica e obter mais informações para uma possível escala industrial, além do que já foi discutido no texto, alguns parâmetros adicionais do sistema precisam ser analisados, como os parâmetros cinéticos, obtidos pela cinética de adsorção, a capacidade máxima de adsorção do sistema (q^*) e a constante de dissociação da molécula-alvo-quelato metálico (K_d), calculados por meio de regressão não linear de modelos de isothermas de adsorção.

2.5 Obtenção dos dados termodinâmicos: isothermas de adsorção

As isothermas de adsorção fornecem dados de equilíbrio que permitem avaliar quantitativamente a capacidade de adsorção e a força pela qual as proteínas se ligam ao adsorvente, no caso o monolito. Tais parâmetros podem ser frequentemente fornecidos pelo modelo de Langmuir (SHARMA & AGARWAL, 2001; SERPA, 2002). CHASE em 1984 descreveu de forma completa a transferência de massa do soluto em solução até o ligante imobilizado, conforme a Equação 2.1:

$$\frac{dq}{dt} = k_1 C (q_m - q) - k_2 q \quad (2.1)$$

no qual, q é a concentração de soluto adsorvido à matriz, q_m é a capacidade máxima de soluto adsorvido à matriz, t é o tempo e C é a concentração de soluto na solução. As constantes k_1 e k_2 representam, respectivamente, as constantes das taxas de adsorção e dessorção do soluto na matriz contendo o ligante imobilizado e também as contribuições da limitação da transferência de massa.

Partindo-se da Equação (2.1), e admitindo que a adsorção é reversível e limitada a uma camada, que a superfície interna do sólido é homogênea e apresenta um número finito de sítios ativos e que os sítios de adsorção possuem a mesma energia e são independentes entre si não havendo adsorção competitiva, chega-se a isoterma de adsorção de Langmuir representada pela Equação 2.2:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{(K_d + C^*)} \quad (2.2)$$

no qual K_d é a constante de dissociação no estado de equilíbrio (*).

Uma forma de estabelecer uma validade ao modelo de Langmuir é linearizá-lo na forma do gráfico q^*/C^* em função de q^* (Gráfico de Scatchard – Equação 2.3). Este método é sensível à efeitos de cooperação das ligações e interações não homogêneas além de se mostrar particularmente sensível também como indicativo dos desvios do modelo de Langmuir.

$$\frac{q^*}{C^*} = \frac{q_m}{K_d} - \frac{q^*}{K_d} \quad (2.3)$$

O perfil do gráfico de Scatchard obtido da linearização da isoterma de Langmuir pode indicar se há cooperatividade positiva (curva assintótica ou côncava), onde cada molécula adsorvida aumenta a probabilidade de outra ser adsorvida no sítio vizinho, ou o contrário chamada de cooperatividade negativa (curva convexa). Se a curva apresentar comportamento linear é um indicativo de que as proteínas não interagem entre si (SHARMA & AGARWAL, 2001; BOLSTER & HORNBERGER, 2007).

A complexidade dos mecanismos de adsorção de macromoléculas, principalmente em IMAC, faz com que o sistema não se comporte dentro da idealidade proposta por Langmuir, ou seja, possui comportamento não linear não satisfazendo as considerações assumidas pelo

modelo. Isto pode ser causado pela adsorção irreversível, provocada pela forte interação entre matriz-proteína, pela heterogeneidade da superfície da matriz e pela cooperatividade entre as proteínas (HUTCHENS *et al.*, 1988; SHARMA & AGARWAL, 2001).

Neste caso, um dos modelos indicados é o de Langmuir-Freundlich (Equação 2.4). Este modelo leva em conta a heterogeneidade da superfície do adsorvente e as interações entre proteína-proteína.

$$q^* = \frac{q_m(C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (2.4)$$

em que $K_{d(LF)}$ é a constante de dissociação aparente que inclui as contribuições de cooperatividade de ligações entre monômeros, monômeros-dímeros, e outras formas de associação da proteína e n é o coeficiente de Langmuir-Freundlich. Por apresentar três termos, com a inclusão do parâmetro n , esta equação possui maior representatividade em descrever a natureza heterogênea da adsorção e as interações cooperativas (YANG & CHEN, 2002). O parâmetro n é classicamente um indicativo do tipo de cooperatividade presente no mecanismo de adsorção e pode ser empregado como um coeficiente empírico, no qual, se $n = 1$ não há cooperatividade entre proteínas, ou os sítios são independentes, se $n > 1$, uma cooperatividade positiva é sugerida e quando $0 < n < 1$, uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo (SHARMA & AGARWAL, 2001).

2.6 Cinética de adsorção

De forma geral, o estudo cinético relaciona a evolução da capacidade de adsorção com o tempo. A cinética de adsorção, ou capacidade dinâmica é determinada por: (1) difusão externa das moléculas da fase contínua para a superfície externa do adsorvente, (2) difusão entre partículas, da face externa dos poros até a superfície da reação e (3) as reações na superfície (DABROWSKI, 2001; GOLIKOV *et al.*, 2020).

Para simplificar a análise do comportamento cinético, geralmente, assume-se que uma dessas etapas seja limitante, ou seja, controle a velocidade de reação. Alguns modelos propostos para expressar os mecanismos de reação são os de pseudo-primeira ordem de Lagergren e de pseudo-segunda ordem. Estes modelos descrevem que a adsorção é uma pseudo reação química, sendo assim, assumem que reações que ocorrem na superfície são a etapa limitante, podendo ser descritas pelas equações de taxa de primeira e segunda ordem (QIU *et al.*, 2009).

2.6.1 Pseudo-primeira-ordem

O modelo de pseudo-primeira ordem foi um dos primeiros modelos conhecidos que descreviam a taxa de adsorção tendo como base a capacidade de adsorção de um sólido. Geralmente, este modelo se aplica em sistemas que ocorrem predominantemente resistência à transferência de massa (QIU *et al.*, 2009). A equação que representa a taxa de adsorção foi descrita por Lagergren em 1898 e está representada pela Equação 2.5:

$$q_t = q_e (1 + e^{-k_1 t}) \quad (2.5)$$

em que q_e e q_t são as quantidades adsorvidas na fase sólida (mg/g) em equilíbrio e em qualquer instante de tempo t (min), respectivamente, e k_1 é a constante cinética para adsorção de pseudo-primeira-ordem.

2.6.2 Pseudo-segunda-ordem

O modelo de pseudo-segunda ordem foi descrito por Ho & Mackay, em 1999. O estudo avaliou alguns trabalhos da literatura que utilizavam adsorventes e bioadsorventes no tratamento de poluentes contendo tintas, produtos orgânicos ou íons metálicos e, foi constatado que em 70 trabalhos, somente em 43 o modelo de pseudo-primeira ordem foi ajustado satisfatoriamente.

Partindo do estudo de adsorção de cobre em um material orgânico chamado turfa e assumindo que a capacidade de adsorção é proporcional ao número de sítios ativos ocupados pelo adsorvente, Ho & Mackay chegaram no modelo descrito pela Equação 2.6, já na sua forma integrada, e o chamaram de pseudo-segunda ordem.

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{(1 + k_2 q_e t)} \quad (2.6)$$

em que q_e e q_t representam a quantidade de soluto adsorvida (mg/g) no equilíbrio e no tempo t , respectivamente, t é o tempo (min); e k_2 (g/mg.min) é a constante cinética de pseudo-segunda-ordem

Segundo os autores, quando este modelo se ajusta ao dados obtidos é um indicativo de que a reação limitante é governada pela ligação química, envolvendo forças de valência entre o adsorvente e o adsorvato por meio do compartilhando ou cedendo elétrons.

A partir da constante cinética k_2 obtida pelo ajuste do modelo de pseudo-segunda-ordem aos dados e do q_t calculado por esta equação, é possível também calcular o tempo gasto para atingir metade da quantidade adsorvida no equilíbrio, $t_{1/2}$ (min), e a taxa inicial de adsorção h (mg/g.min), dadas pelas Equações (2.7) e (2.8), respectivamente.

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_2 Q_{eq}} \quad (2.7)$$

$$h = k_2 Q_{eq}^2 \quad (2.8)$$

Entretanto, estes modelos foram propostos para sistemas particulados. No caso de monolitos macroporosos, modelos mais complexos podem ser necessários caso não haja um bom ajuste das equações, uma vez que eles consideram mais de uma etapa limitante para descrição das curvas cinéticas (GOLIKOV *et al.*, 2020). Contudo, alguns autores reportaram com sucesso o uso destes modelos em monolitos macroporosos (DAOUD-ATTIEH *et al.*, 2013; ELVIRO *et al.*, 2019).

Outros modelos propostos, como o de Weber-Morris, por sua vez, consideram as etapas de difusão como fator determinante da cinética de adsorção, demonstrando se a velocidade da reação é controlada pela difusão intrapartícula ou pela difusão intrafilme.

Weber e Morris

Weber e Morris desenvolveram em 1963 um modelo cinético no qual é possível concluir se a etapa determinante da velocidade de adsorção é a difusão intrapartícula ou intrafilme. Para isso, é feito um estudo do comportamento da quantidade do que é adsorvido em função do tempo, no qual a quantidade adsorvida (q_t) varia em função da raiz quadrada do tempo (t), dado pela Equação 2.9:

$$q_t = K_{di} t^{1/2} + C \quad (2.9)$$

em que K_{di} é o coeficiente de difusão ($\text{mg/g}\cdot\text{min}^{-1/2}$) e C (mg/g) é uma constante relacionada com a resistência à difusão.

A partir da inclinação e da intersecção da curva do gráfico gerado por q_t contra $t^{1/2}$, é possível obter os valores de K_{di} e C respectivamente. A constante C está relacionada à espessura do filme de solvente que envolve o adsorvente de forma que, quanto maior o valor, maior a espessura do filme e consequentemente maior será sua influência na taxa de adsorção. Sendo assim conclui-se que a velocidade de adsorção é controlada pela difusão intrafilme, porém, se o valor da constante C for igual ou próximo de zero, a etapa limitante então é a difusão intrapartícula. Se a reta plotada do gráfico q_t contra $t^{1/2}$ passar pela origem, é possível afirmar também, que o mecanismo de adsorção é controlado pela difusão intrapartícula (YANG & AL-DURI, 2005).

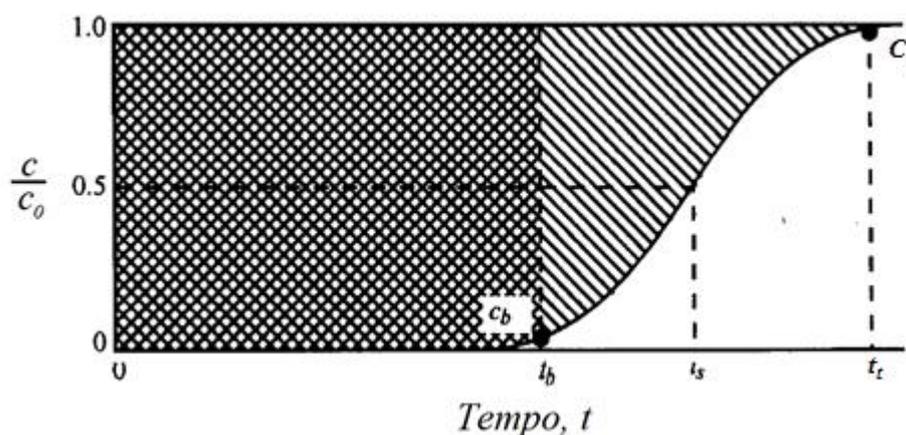
2.7 Curvas de ruptura

As curvas de ruptura (*breakthrough*) representam a dinâmica de adsorção de uma coluna

de leito fixo, sendo obtidas por meio da análise da concentração da solução de alimentação e de saída da coluna cromatográfica. O principal objetivo de se realizar ensaios em regime contínuo, como a curva de ruptura, é modelar a adsorção de um soluto em um leito fixo ao longo do tempo, uma vez que este processo considera possíveis efeitos de dispersão axial e transferência de massa, além de ocorrer em estado não estacionário. Assim, a eficiência do processo é determinada não só pelas considerações de equilíbrio, mas também pela dinâmica do sistema (GEANKOPLIS, 1993; PERRY, GREEN & MALONEY, 1997; MORENO-CASTILLA, 2004).

Alguns parâmetros que influenciam as curvas de ruptura são, a geometria da coluna, as condições operacionais, os dados de equilíbrio, porosidade e a concentração de soluto na corrente de alimentação (BORBA, 2006; MELO, 2007). Em um modelo ideal, a curva de ruptura deveria apresentar um comportamento do tipo degrau, no qual ao longo do tempo de adsorção a concentração de soluto na saída (C) é nula, indicando que o soluto está percorrendo o leito e ocupando os sítios de adsorção até que em um determinado momento (t_b) a saturação fosse atingida. A partir deste instante, a concentração deveria saltar instantaneamente para a concentração de alimentação. Entretanto, como demonstrado pela Figura 16, a curva é suavizada, provavelmente devido aos processos de transferência de massa e dispersão axial presentes em situações não ideais (MELO, 2007).

Figura 16 - Perfil típico de uma curva de ruptura



Fonte: GEANKOPLIS, 1993

Representada entre os intervalos t_b e t_t , a zona de transferência de massa, indica a não idealidade do sistema. C_b é o ponto de ruptura, o momento exato no qual o leito está saturado, C é a concentração de saída da coluna e C_0 a concentração da alimentação. A partir do perfil de uma curva de ruptura é possível também calcular a capacidade total da coluna, dada por (1 –

$\frac{C_t}{C_0}$) (GEANKOPLIS, 1993).

De acordo com McCabe *et al.* (1993) o tempo de ruptura, caracterizado pelo instante de tempo no qual a concentração de saída é diferente de zero, é proporcional a eficiência da coluna e corresponde a 5% da concentração inicial, apesar de existirem referências que elevam este valor até 50% (UNUABONAH *et al.*, 2010; MONDAL *et al.*, 2016). Portanto, conclui-se que quanto maior o tempo decorrido para atingir a saturação maior será a eficiência da coluna (GUIMARÃES, 2010).

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é destinado à apresentação dos materiais e procedimentos que foram realizados para o desenvolvimento do trabalho. Envolve os reagentes, equipamentos e os métodos utilizados.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil]-etanosulfônico (Hepes), Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), ácido iminodiacético (IDA), carbonato de sódio anidro, comassie brilliant blue G-250, alginato de sódio (Alg), gama globulina bovina (bIgG), albumina bovina sérica (BSA), persulfato de amônio (APS), alil glicidil éter (AGE), imidazol, agarose para eletroforese, ácido etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico (EDTA), formaldeído, sulfato de cobre, sulfato de níquel, cloreto de sódio, poli(etilenoglicol) (PEG 6.000), ácido (3-(N-morpholino) propanosulfônico (MOPS), anticorpos de cabra anti-bIgG e soro bovino adulto foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). TEMED (N,N,N',N'-tetra-metilenodiamina), SDS (dodecil sulfato de sódio), ditiotreitol e marcadores de massa molar para eletroforese foram adquiridos da Cytiva (EUA). Acrilamida (AAm) e N,N'-metileno bisacrilamida (bis-acrilamida, MBAm) foram obtidos da Bio-Rad (EUA). Nitrato de prata, álcool etílico, ácido cítrico e ácido fosfórico foram adquiridos da Synth (Brasil). Ácido acético glacial e glicerol foram fornecidos pela Êxodo Científica (Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Água ultrapura Milli-Q da Millipore (EUA) foi utilizada nas sínteses e preparo das soluções.

Equipamentos

Realizou-se as pesagens em balança analítica Sartorius TE214S (Alemanha); para medir o pH, foi utilizado medidor de pH Oakton pH 510 series (Oakton, EUA) e a degaseificação das misturas monoméricas foram realizadas em cubas de banho ultrassônico Branson 3510 series (EUA). As colunas cromatográficas são do modelo C10/10 (GE Healthcare, EUA) e o cromatógrafo de baixa pressão utilizado foi o Biologic LP System (Bio-Rad, EUA). As medidas de absorvância das amostras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (DU-640, Beckman, EUA). Para realização das eletroforeses empregou-se o equipamento da Mini Protean III, da Bio-Rad (EUA). Para a realização das isotermas de adsorção foram necessários os equipamentos Unimax 1010, Heidolph,

Alemanha, TE-165, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil, TE-4200, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil e Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação do criogel (monolito)

O criogel PAAm-Alg-AGE foi preparado como descrito por Marcuz *et al.* (2020). Inicialmente foram preparadas duas soluções, a primeira contendo monômeros de acrilamida (AAm) (0,474 g), *N,N'*-metileno bis(acrilamida) (MBAAm) (0,126 g) em 4 mL de água e a segunda, de alginato de sódio (0,1 g) em 4 mL de água. Os reagentes dissolvidos foram misturados, obtendo uma razão w/v de 6%. Em seguida a solução foi degaseificada à vácuo por 20 minutos a fim de eliminar todo o oxigênio solubilizado. Depois desta etapa, a solução foi levada a geladeira e resfriada a 4 °C por 5 minutos.

Em seguida foram adicionados, a temperatura ambiente e sob agitação, 600 µL de água Milli-Q, 200 µL de solução aquosa de cloreto de cálcio a 2% (m/v), 1,0 mL de solução de persulfato de amônio (20 mg/ml), 200 µL de AGE e, posteriormente, para acelerar a reação, foi adicionado à solução 20 µL de TEMED. Desta mistura foram adicionados cerca de 3 mL em 3 colunas cromatográficas de vidro (C10/10, GE Healthcare, EUA) com suas extremidades devidamente fechadas, e levadas à -20 °C por 16 horas. Após o tempo de gelificação, o criogel foi descongelado em temperatura ambiente, e com os adaptadores colocados na coluna, foi lavado por 2 horas com água ultrapura a uma vazão de 1,0 mL/min para a remoção dos monômeros não reagidos. Feito isso, a coluna foi armazenada na geladeira a 4 °C. O criogel obtido foi denominado PAAm-Alg-AGE.

3.2.2 Imobilização covalente do ácido iminodiacético (IDA)

A imobilização do IDA foi realizada como descrito por Porath e Olin (1983). Equilibrou-se a coluna contendo o monolito com uma solução de 10,6 g de carbonato de sódio dissolvidos em 50 mL de água Milli-Q; paralelamente 4 g de IDA foi adicionado a um recipiente contendo 10 mL de solução de NaOH 2,0 mol/L e pH foi ajustado para 10,0. Uma solução de 4,24 g de carbonato de sódio dissolvidos em 10 mL de água ultrapura foi misturada à solução de IDA e NaOH. Esta solução foi recirculada na coluna cromatográfica contendo o criogel a uma vazão 0,5 mL/min por 24 horas, com a temperatura mantida a 60°C. Terminada a reação de imobilização, a coluna foi lavada com água Milli-Q até que o valor do pH fosse igual ao da

água ultrapura. O criogel obtido foi denominado de PAAm-Alg-AGE-IDA e foi armazenado em geladeira a 4°C até o uso.

3.2.3 Determinação das quantidades de cobre e níquel quelatados

A quantificação de íons cobre e níquel quelatados no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi determinada alimentando-se a coluna cromatográfica até a saturação com uma solução de sulfato de cobre e sulfato de níquel, ambas com concentração de 50 mmol/L. Posteriormente a coluna foi lavada com água, seguido de tampão acetato de sódio a 25 mmol/L pH 4,0 para remoção dos íons metálicos que interagiram fracamente com o criogel. Para remoção dos íons metálicos restantes, foi alimentada na coluna solução de EDTA a 100 mmol/L pH 7,0. Frações de 2 mL foram coletadas e mediu-se absorvância à 733 nm para o íon cobre e 384 nm para o íon níquel. A concentração de íon metálico quelatado foi calculada a partir do coeficiente obtido pela curva analítica do número de moles de íon metálico em solução de EDTA 100 mmol/L pH 7,0 no mesmo comprimento de onda, como descrito na Equação 3.1:

$$n_{\text{Cu(II) e Ni(II)}}(\mu\text{mol}) = \text{Coef} * \text{ABS}_{733, 384 \text{ nm}} * F_d * V_{\text{amostra}} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Onde Coef é a constante correspondente ao coeficiente linear da curva, $\text{ABS}_{733; 384 \text{ nm}}$ é o valor medido da absorvância de cada fração; F_d é o fator de diluição e V_{amostra} é o volume (em mL) de cada fração coletada e $n_{\text{Cu(II) e Ni(II)}}(\mu\text{mol})$ é o número de mols de íon metálico quelatado.

3.2.4 Experimentos cromatográficos

As cromatografias foram realizadas em duplicata, em coluna cromatográfica C10/10 (GE Healthcare, EUA) contendo 3 ml do monolito PAAm-Alg-AGE-IDA acoplada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão Biologic LP System (Bio-Rad, EUA), a vazão de 1,0 mL/min e a 25 °C. Para os experimentos com íon metálico quelatado, primeiramente saturou-se o criogel com solução de sulfato de cobre ou de níquel a 50 mmol/L. Posteriormente a coluna foi lavada com água seguido de tampão de eluição a pH 4,0 para remover o íon metálico fracamente quelatado. A etapa seguinte, primeira para os experimentos sem o íon metálico quelatado, foi o equilíbrio da coluna com o tampão de adsorção. Os tampões de adsorção estudados foram: o zwitteriônico MOPS e o negativamente carregado MA (MOPS

contendo acetato de sódio) nas faixas de pH 6,5 a 7,5 e o positivamente carregado Tris-HCl na faixa de pH 7,0 à 8,0. Logo após, para experimentos de purificação de bIgG do soro bovino, 75 uL de soro bovino diluído quinze vezes no tampão de adsorção (1,05 mL, 3,8 mg/mL em média) foi alimentado na coluna, já para os ensaios de adsorção de bIgG pré-purificada, foram alimentados na coluna 1 mL de solução de bIgG diluída no tampão de adsorção com a concentração de 4 mg/mL. Terminada a alimentação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão, até que todas proteínas não adsorvidas fossem removidas. Posteriormente, para os experimentos contendo quelatos metálicos imobilizados, a eluição foi realizada por abaixamento de pH (tampão de eluição com pH igual a 4,0 ou adição de 0,5 mol/L de NaCl no tampão de adsorção). Para os experimentos sem íon metálico quelatado (IDA livre de metal), a eluição foi realizada por adição de 0,5 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. Concluída a eluição, para experimentos com quelatos metálicos imobilizados, a coluna foi regenerada com EDTA a 50 mmol/L em pH 7,0 até a remoção total do íon metálico quelatado, seguido de lavagem com água e posteriormente armazenada na geladeira até a realização de novos experimentos. Para colunas sem íon metálico quelatado, a regeneração foi realizada com NaOH 10 mmol/L. As frações cromatográficas de 1 mL coletadas durante o experimento foram quantificadas em termos de proteína total pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e as amostras mais concentradas foram agrupadas (*pool*) e analisadas por eletroforese SDS-PAGE e imunodifusão radial.

3.2.5 Cinética de adsorção de de adsorção de bIgG nos criogéis sintetizados

Os experimentos para determinação da cinética de adsorção de bIgG foram realizados em duplicata, de acordo com Elviro *et al.* (2019), em PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem íon metálico quelatado. Inicialmente a coluna contendo 3 mL do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi alimentada com uma solução aquosa de sulfato de cobre até a saturação, seguido de lavagem com água e, por último, com tampão acetato de sódio a pH 4,0 com intuito de remover os íons metálicos fracamente quelatados. Para os ensaios realizados com a coluna sem íon metálico quelatado, a etapa de saturação com sulfato de cobre não foi efetuada. A coluna foi equilibrada com o tampão de adsorção 25 mmol/L MOPS a pH 6,5, a uma vazão 1,0 mL/min. Foram preparadas 50 mL de bIgG de alta pureza no tampão de adsorção em duas concentrações diferentes, 0,5 mg/mL e 2,0 mg/mL, as quais foram mantidas em agitação e recirculadas na coluna em sistema fechado até que a concentração no reservatório ficasse constante (atingido equilíbrio). Em tempos determinados (10, 20, 30 segundos e 1, 2, 5 e 10 min) foram retirados

20 μL da solução do reservatório, tomando o cuidado de não ultrapassar 10% do volume total, e a concentração de proteína das amostras foi determinada em duplicata pelo método de Bradford (1976). Atingido o equilíbrio, a coluna foi lavada com o tampão de adsorção e, em seguida, eluída com tampão acetato de sódio a pH 4,0 para o experimento com o íon metálico quelatado e com 25 mmol/L MOPS contendo 0,5 mol/L de NaCl em pH 6,5 para aquele que foi realizado sem íon metálico quelatado. As frações das etapas de lavagem e eluição foram medidas usando o método de Bradford (1976). Por fim, a coluna foi restaurada para realização de novos experimentos.

Foram aplicados três modelos matemáticos para análise dos experimentos cinéticos: o modelo de pseudo-primeira-ordem, o de pseudo-segunda ordem e o de Weber-Morris, representados pelas Equações 2.5, 2.6, 2.9 respectivamente. Os parâmetros foram ajustados aos dados cinéticos experimentais usando método de regressão não linear.

3.2.6 *Isotermas de adsorção*

Os experimentos para determinação das isotermas de adsorção de bIgG foram realizados em batelada e em duplicata, à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foi escolhida a melhor condição tamponante de adsorção, conforme descrito por Mol *et al.* (2017) e Mourão *et al.* (2019). Em tubos do tipo Eppendorf® de 2 mL foram introduzidos 20 mg de massa seca de fragmentos do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem íon metálico quelatado. Em seguida, os tubos contendo os criogéis foram equilibrados com 1 ml do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L em pH 6,5, em agitação à 120 rpm em plataforma orbital (Unimax 1010, Heidolph, Alemanha) por 1 hora. Na sequência, foram adicionados a cada tubo, solução de bIgG diluída em tampão de adsorção em concentrações entre 0,10 a 7,00 mg/mL. Posteriormente os frascos foram fixados em um agitador de tubos (TE-165, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil) e inserido dentro de um shaker (TE-4200, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil) para garantir que a temperatura fosse mantida em $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Depois disso, foi iniciada a agitação a $10 \pm 3\text{ rpm}$ 0,0014 G até que o equilíbrio fosse atingido 8h (determinado por cinética de adsorção de bIgG, item 3.2.5). Decorrido o tempo de equilíbrio, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ na centrífuga (Centrifuge 5804 R, eppendorf, Alemanha) e a concentração de bIgG no equilíbrio (sobrenadante) foi determinada em duplicata pelo método de Bradford (1976). Pela diferença entre a concentração inicial (C) e a final (C*), foi calculado a quantidade de bIgG adsorvida. A capacidade de adsorção do criogel (Q*) foi expressa em mg de bIgG por grama de massa

seca do adsorvente. Para obtenção e ajuste dos parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, (Equações 2.2 e 2.4) por regressão não linear, foi utilizado o *software* Origin® (Microcal, EUA). Os ajustes dos parâmetros do modelo resultaram em uma aproximação para a capacidade máxima de adsorção (q_m) e constante de dissociação (K_d) e (K_{dLF}), do modelo de Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente. O coeficiente de cooperatividade (n) foi estimado pelo modelo de Langmuir-Freundlich.

3.2.7 Curva de ruptura de adsorção de bIgG

As curvas de ruptura foram realizadas na melhor condição de purificação encontrada no item 3.2.4, MOPS 25 mmol/L em pH 6,5, com Cu^{2+} e sem o íon metálico quelatado. Nesses experimentos, as etapas cromatográficas procederam como descritas anteriormente no item 3.2.4, porém, após o equilíbrio da coluna de 3 mL, a alimentação foi feita com 50 mL e 34 mL de solução de soro bovino diluída quinze vezes no tampão de adsorção (concentração aproximada de 4 mg/mL de proteínas totais) para os experimentos com e sem o íon metálico, respectivamente, a fim de garantir a saturação do monolito. O ponto de saturação foi obtido quando a relação entre a concentração de proteínas totais de saída da coluna (C) ficou próxima à concentração de proteínas totais alimentadas (C_o), ou seja, C/C_o próximo a 1. Finalizada esta etapa, a coluna foi lavada com o tampão de adsorção e posteriormente eluídas com o tampão de eluição, acetato 25 mmol/L pH 4,0 e por adição de 0,5 mol/L de NaCl no tampão de adsorção para os experimentos com e sem o íon metálico quelatado, respectivamente.

Diferentemente dos experimentos cromatográficos do item 3.2.4, na curva de ruptura, foram coletadas frações de 2 mL em cada etapa, devido à alta quantidade de proteínas totais alimentadas. Todas as frações foram monitoradas a 280 nm e quantificadas pelo método de Bradford (1976). E por último, foi feito *pools* com as frações mais concentradas das diferentes etapas para a análise qualitativa (eletroforese SDS-PAGE) e quantitativa (Imunodifusão Radial - RDI).

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Capacidade de intumescimento

A capacidade de intumescimento é caracterizada pela capacidade do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA de reter água em seus poros. Esta medida foi realizada como descrito em Marcuz

et al. (2021). As amostras de criogel foram lavadas com água Milli-Q® por 24 horas e, em seguida, com papel de filtro, a superfície do monolito foi seca cuidadosamente para pesagem e obtenção da massa saturada (m_s). Posteriormente, os criogéis foram transferidos para uma placa Petri para secagem em estufa, à 60 °C por 16 horas, até atingir uma massa constante (m_d). Após obtidos os valores de massa saturada e seca, a capacidade de intumescimento foi calculada pela Equação 3.6.

$$S = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

No qual S é a capacidade de absorção de água (g água/g de adsorvente seco).

3.3.2 Quantificação da capacidade em se ligar à água presente no ar

Este método analítico foi realizado com base no protocolo descrito por Plieva *et al.* (2004) e Mourão *et al.* (2019). Amostras do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foram secas por 24 horas em estufa a 60 °C e posteriormente pesadas (m_s). Em seguida os criogéis secos foram introduzidos em recipiente de vidro fechado hermeticamente contendo solução saturada de cloreto de potássio (KCl) em água (umidade relativa de 90%), sem ter contato direto com a solução. Em seguida, o acréscimo da massa dos criogéis foi monitorado até atingir massa constante (14 dias) e essa foi medida (m_u). A massa de água retida ($m_{\text{água}}$) foi calculada pela Equação 3.7:

$$m_{\text{água}}(\text{em g}) = m_u - m_s \quad (\text{Eq. 3.7})$$

No qual m_u e m_s são as massas do adsorvente úmido e seco (dado em gramas), respectivamente.

3.3.3 Estimativa da porosidade (ϕ)

A porosidade foi estimada conforme o protocolo descrito por Sun *et al.* (2012) e Mourão *et al.* (2019). Amostras do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA de 1 mL foram saturadas com água e, em seguida, foram colocadas em uma proveta graduada com volume de água conhecido (V_i) e seu volume deslocado foi medido (V_f). Após a obtenção destes dados, estimou-se o volume ocupado (V_o) pelo criogel, calculado pela diferença entre V_f e V_i . Os criogéis saturados com água foram pesados (m_{sat}) e posteriormente toda sua água foi removida por uma simples

compressão e uma nova pesagem foi realizada (m_u). Para o cálculo aproximado da porosidade (φ), utilizou-se a Equação 3.8 com base na água expelida pelos poros:

$$\varphi = \frac{m_s - m_u}{\rho_{\text{água}} * V_o} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

Sendo $\rho_{\text{água}}$ a densidade da água Milli-Q à 25 °C.

3.3.4 Morfologia do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA

A análise morfológica do criogel para determinação da estrutura e tamanho de poros foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da UNICAMP, no equipamento MEV/EDS: LEO Electron Microscopy (Oxford, Inglaterra).

3.3.5 Medida da densidade superficial de cargas

O ponto de carga nula foi determinado por titulação potenciométrica como descrito por Davranche *et al.* (2003) e adaptado por este trabalho. Primeiramente, 2 amostras dos criogéis secos PAAm-Alg-AGE-IDA e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ de 0,30 g cada foram colocadas em um béquer que continha 20 mL de uma solução de CH₃COONH₄ 0,1 mol/L (eletrólito) e o pH dessa solução foi medido até que atingisse um valor constante (ponto de carga nula). Após isso, aos béqueres foram adicionados com uso de uma pipeta volumétrica, uma das soluções titulantes em volumes conhecidos (CH₃COOH 0,3 mol/L e NH₄OH 0,25 mol/L) e a cada volume adicionado o pH foi medido.

A carga superficial de um sólido S pode ser determinada pela Equação 3.9:

$$S = \frac{C_a - C_b + [OH^-] - [H^+]}{C_m} \quad \text{Eq (3.9)}$$

Em que C_a é a concentração do ácido corrigida (mol/L), C_b é a concentração de base corrigida (mol/L); C_m é a concentração de sólido em suspensão (g/L). Para o ácido e a base tituladas, é possível simplificar a Equação 3.9, nas Equações 3.10 e 3.11:

$$S = \frac{C_a - [H^+]}{C_m} \quad \text{Eq (3.10)}$$

$$S = \frac{[OH^-] - C_b}{C_m} \quad \text{Eq (3.11)}$$

A partir dos valores da carga superficial S , pode ser plotado um perfil para o comportamento das cargas superficiais totais em função do pH, no qual o ponto de carga nula cruza o eixo x, apresentando densidade de cargas igual a zero.

3.3.6 *Medição de resistência ao fluxo*

Diferentes vazões foram testadas utilizando água como fase móvel em coluna contendo 3 mL de criogel (diâmetro interno de 1,0 cm), conectada a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (ÄKTA Purifier, Cytiva, EUA).

3.3.7 *Dosagem de proteínas totais*

A concentração de proteína total e de bIgG purificada nas frações coletadas durante os experimentos cromatográficos foi determinada por meio da metodologia de Bradford (1976). A curva padrão foi feita com BSA e bIgG diluída em diferentes concentrações, para os experimentos realizados com soro bovino e bIgG pré purificada, respectivamente. O coeficiente linear obtido por regressão linear foi utilizado para o cálculo da concentração de proteínas das amostras.

3.3.8 *Eletroforese SDS-PAGE*

As frações de cada etapa dos experimentos cromatográficos foram agrupadas (“pools”) e desnaturadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 100 °C por 7 minutos. As amostras foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA), seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), em condições não redutoras, a 100 V e gel a 7,5% de acrilamida. A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme protocolo desenvolvido por Morrissey (1981).

3.3.9 *Quantificação de bIgG por imunodifusão radial*

A técnica de imunodifusão radial foi realizada baseado no procedimento desenvolvido por Lu e Miller (1996) e Marcuz *et al.* (2021) com a finalidade de quantificar a bIgG presente nas frações das etapas cromatográficas (adsorção, lavagem e eluição). Inicialmente foi preparado

um gel de agarose composto por uma solução a 1,2% de agarose e 3% de polietilenoglicol (PEG 6000 Da) em tampão TBE (Tris-HCl 90 mmol/L, ácido bórico 90 mmol/L e EDTA 3 mmol/L) e, em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria a 90 °C até a dissolução completa da agarose. A solução foi resfriada até a temperatura de 50 °C, para adição do antissoro (anticorpo de cabra anti-IgG bovina), na proporção de 1 uL para 1 mL de gel, e a solução resultante foi depositada em um molde retangular para completa gelificação.

Após a formação do gel, foram feitos pequenos orifícios de 2 mm de diâmetro simetricamente espaçados com auxílio de conta gotas. Em cada orifício foi aplicado 10 µL da solução da injeção e dos *pools* das frações de lavagem, eluição e regeneração da cromatografia. A curva analítica foi construída com soluções de bIgG em concentrações na faixa de 75 ug/mL à 500 ug/mL. Posteriormente, o gel contendo as amostras foi incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por 48 h. Decorrido esse tempo, o gel foi retirado da câmara úmida e seco a temperatura ambiente durante 24 h. Depois de seco, o gel foi corado, por 30 minutos, com solução de etanol (45%), ácido acético (45%) e Coomassie brilliant blue R-250 (0,5%) e para descoloração, foram realizadas repetitivas lavagens com solução de etanol (30%), ácido acético (7%) e água (63%), até que foi possível visualizar os halos de precipitação.

Após a lavagem, o diâmetro de cada halo foi medido com auxílio de um paquímetro e convertidos em concentração de bIgG, com base na curva analítica que relaciona de forma linear o diâmetro dos halos com o logaritmo da concentração de bIgG (Apêndice C).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão discutidos os resultados obtidos, partindo da caracterização do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA (aspectos físicos e morfológicos), seguido dos ensaios cromatográficos. Nestes ensaios foram estudados o efeito dos íons metálicos cobre e níquel e de diferentes sistemas tamponantes e valores de pHs na adsorção de IgG bovina pré-purificada e partir do soro bovino. Na melhor condição de purificação alcançada com e sem o íon metálico quelatado, foram realizados experimentos para obtenção de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, além das curvas de ruptura para determinação da capacidade dinâmica, ajustando os modelos aos dados experimentais.

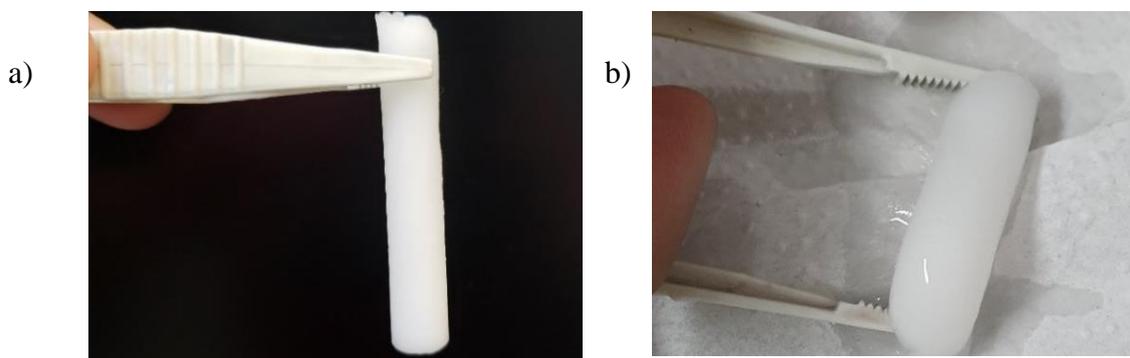
4.1 Síntese e caracterização do monolito PAAm-Alg-AGE-IDA

O monolito PAAm-Alg-AGE foi obtido pela técnica de criocopolimerização de monômeros de acrilamida, alginato e AGE com bisacrilamida, e Ca^{2+} como agentes de reticulação conforme descrito por Mourão *et al.* (2019) e Marcuz *et al.* (2021). A introdução do AGE na mistura reacional possibilitou obter um polímero contendo um grupo epóxi reativo, enquanto que os agentes de reticulação covalente bisacrilamida e o iônico Ca^{2+} , promoveram, respectivamente, a formação de ligações covalentes entre acrilamida e bisacrilamida e a interação com grupos carboxílicos das cadeias do alginato, resultando em uma configuração tipo caixa de ovos (“*egg-box*”). O criogel sintetizado apresentou estrutura homogênea, elástica e característica esponjosa.

O agente quelante IDA foi imobilizado no criogel PAAm-Alg-AGE por ligação covalente éter estável entre o grupo epóxi do criogel e o grupo amino do IDA. O criogel obtido, PAAm-Alg-AGE-IDA (Figura 17a), possui carga negativa a pH neutro (Figura 21a) devido aos grupos carboxílicos presentes no agente quelante e no alginato, que continuaram livres após a imobilização do IDA.

Como demonstrado na Figura 17, o monolito PAAm-Alg-AGE-IDA apresentou coloração branca e opaca, além de ser visualmente homogêneo. Foi possível também, tanto comprimir o criogel quanto secá-lo sem o comprometimento da estrutura, que após descompressão e reidratação, retornou ao estado inicial não apresentando qualquer rachadura ou deformação visual.

Figura 17 - a) Foto do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA; b) foto do criogel comprimido.



Fonte: Autor (2019)

Segundo Carvalho e colaboradores (2014), um criogel de PAAm pode ter 50% do seu volume alterado por compressão sem sofrer deformações permanentes. Capacidade semelhante observada por Mourão *et al.* (2019) para criogéis de PAAm-Alg e também por Marcuz *et al.* (2021) para monolitos sintetizados na presença de AGE. No estudo mais recente, a autora observou também que a adição de AGE na síntese do criogel em concentrações acima de 2% (até 4% (v/v)), resultava em uma estrutura com maior rigidez e forte odor. Sendo assim, a concentração de 2% foi escolhida, a mesma utilizada neste trabalho.

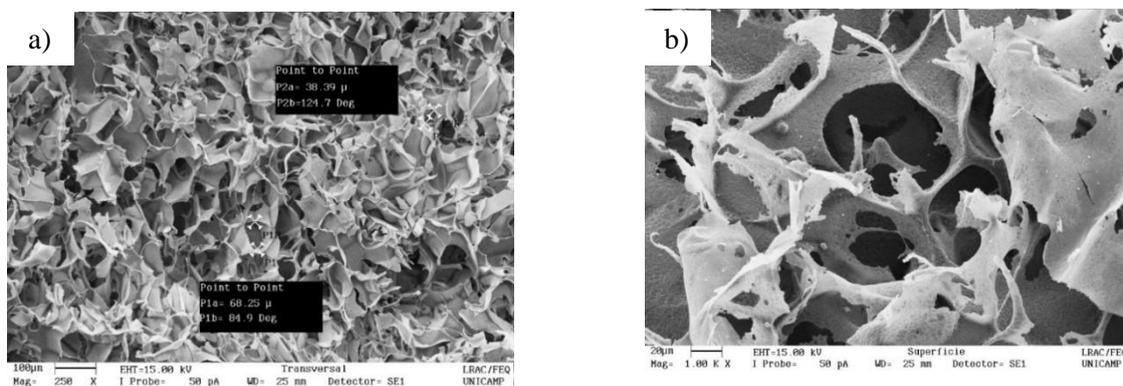
A morfologia do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi analisada pelas imagens obtidas por MEV (Figuras 18 e 19). Observou-se a presença de macroporos interconectados de tamanho aproximado entre 20 μm a 180 μm e formatos diferentes. Segundo a literatura consultada, o tamanho dos poros de criogéis pode variar entre 10 μm e 200 μm (ÖZGÜR *et al.*, 2011; BARROSO *et al.*, 2013; SAYLAN & DENIZLI, 2019).

De acordo com Lozinsky (2008), dentre os fatores que controlam o tamanho dos poros do criogel, os principais são a temperatura de criogelificação e a concentração do agente de reticulante. Segundo o autor, quanto menor a temperatura de criogelificação, menor o tamanho dos poros, o que acontece também com a concentração de agente reticulante. Com isso, os poros de tamanho intermediário encontrados neste trabalho provavelmente estão relacionados à temperatura utilizada para criogelificação do monolito e a concentração proposta de (bis) acrilamida (agente de reticulação).

Plieva *et al.* (2005) e Carvalho *et al.* (2014) demonstraram que a estrutura macroporosa interconectada do criogel é vantajosa para ser empregada como matriz cromatográfica, pois os macroporos interconectados favorecem o fluxo convectivo, minimizando a resistência a

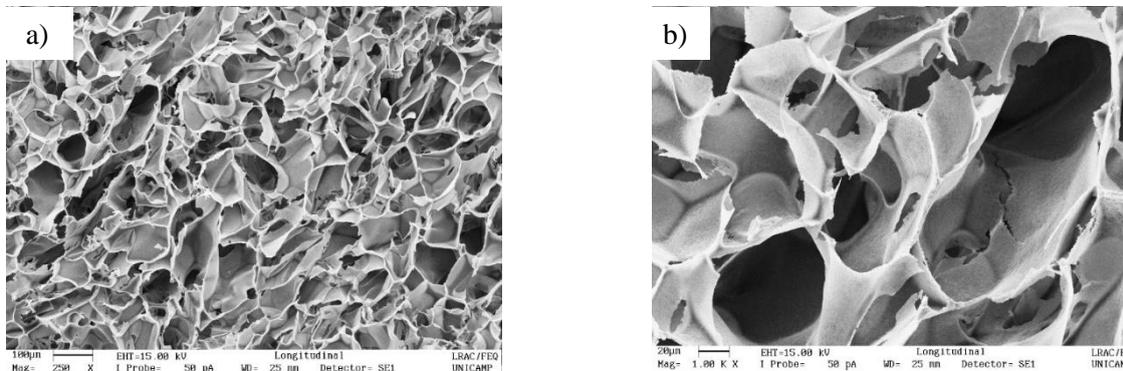
transferência de massa, que é um dos principais problemas em cromatografia líquida em fases estacionárias tradicionais.

Figura 18- Cortes das seções (a) transversal, ampliada 250 vezes e (b) longitudinal, ampliada 1000 vezes do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA, analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: Autor (2019)

Figura 19 - Cortes da seção longitudinal do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA. Imagens obtidas por MEV, a) ampliada 250 vezes b) ampliada 1000 vezes



Fonte: Autor (2019)

A capacidade de intumescimento do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi calculada conforme a Equação 3.6, com a finalidade de determinar a composição mássica do criogel. A Tabela 4 apresenta o valor encontrado para o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA e a comparação com outros criogéis de PAAm-Alg publicados na literatura.

Tabela 4 - Capacidade de intumescimento de criogéis de poliacrilamida-alginato derivatizados

Criogel	Capacidade de intumescimento (gH ₂ O/g criogel seco)	Referência
Criogel PAAm-Alg-ECH-P-Tyr	27,79 ± 7,7	MARCUZ <i>et al.</i> , (2021)
Criogel PAAm-Alg-AGE-P-Tyr^b	14,29 ± 0,06	MARCUZ <i>et al.</i> , (2021)
Criogel PAAm-Alg-AGE-IDA	16,89 ± 0,87	Este trabalho
Criogel PAG^c	14,00 ± 1,53	Yavaser & Karagözle (2021)

^bP-Tyr: orto-fosfo-tirosina

^c PAG: criogel de poliacrilamida/alginato e glicidil metacrilato (GMA)

Fonte: Autor (2019)

A capacidade de intumescimento encontrada para o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi igual a 16,89 ± 0,87 g de H₂O/g de criogel seco, valor maior que o encontrado para PAAm-Alg-AGE-P-Tyr determinado por Marcuz *et al.* (2021) e o criogel PAG estudado por Yavaser & Karagözle (2021). Em comparação ao PAAm-Alg-ECH-P-Tyr, também proposto por Marcuz *et al.* (2021), a capacidade de intumescimento foi menor. A redução nos valores de capacidade de intumescimento em relação ao do monólito PAAm-Alg-ECH-P-Tyr, pode estar ligada à diferença entre os métodos utilizados para síntese dos criogéis. O primeiro foi ativado com epícloridrina para introdução de grupamentos epóxi e posterior imobilização do P-Tyr, diferentemente dos demais, que para esta finalidade adicionou-se AGE e GMA na sua síntese, tornando desnecessária a ativação.

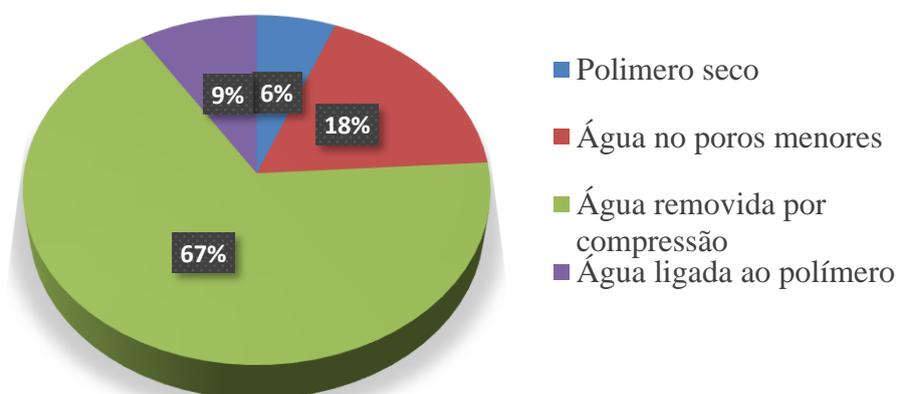
Plieva e colaboradores (2004a e 2004b) também estudaram várias composições de criogel de poliacrilamida e reportaram que altas concentrações do agente reticulante, no caso MBAm, acarretaram em maior resistência mecânica do material, ou seja, maior grau de reticulação da estrutura, que implicou na redução da capacidade de intumescimento. Monômeros de alginato, por sua vez, já são conhecidos por reticularem iônicamente os íons Ca²⁺, formando a estrutura caixa de ovos (*egg box*) em hidrogéis (ZHAO *et al.* 2016; GURIKOV & SMIRNOVA, 2018). Acredita-se que possa estar ocorrendo o mesmo para o criogel de poliacrilamida/alginato, logo aumentando também o grau de reticulação do material. Valores intermediários encontrados para criogéis sintetizados com AGE são desejados, uma vez que taxas de intumescimento muito elevadas, indicam uma alta expansão do leito, prejudicando suas características mecânicas para cromatografia (ARVIDSSON *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2014).

A porosidade do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA foi estimada de acordo com a Equação 3.8, sendo encontrado o valor de 70,8%. Este valor está dentro da faixa de valores encontrada na literatura (72,2 e 88,3%) (Carvalho et al., 2014). O valor de porosidade PAAm-Alg-AGE-IDA foi menor que o determinado por Marcuz *et al.* (2021) para o criogel PAAm-Alg-AGE-P-Tyr (82%), talvez pelo fato destes autores terem imobilizado uma quantidade menor de ligantes (52,72 $\mu\text{mol/g}$) . O valor de porosidade de 70,9% encontrado neste trabalho pode estar relacionado à densidade de IDA imobilizado no criogel (a ser discutido no item 4.2).

Segundo Arvidsson e colaboradores (2003), a porosidade do criogel influencia diretamente na resistência do material ao escoamento. Valores de porosidade elevados implicam que o monolito irá suportar taxas de fluxo mais altas, porém resultam também, em materiais mais frágeis, comprometendo seu uso como fase estacionária em cromatografia. Plieva *et al.* (2005) reportaram que criogéis com porosidade entre 70%-90% são capazes de interagir com biomoléculas eficientemente em cromatografia.

Os valores de composição mássica do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA (Figura 20) estão próximos aos encontrados por Plieva e colaboradores (2004a), por Mourão *et al.* (2019) e por Marcuz *et al.* (2021) para criogéis de PAAm, PAAm-Alg e PAAm-Alg-AGE, respectivamente. Segundo os estudos reportados na literatura, o valor da porcentagem em massa de polímero seco em estufa corresponde de 5% a 6% do criogel; os autores também constataram que a porcentagem de água removida do criogel por compressão pode ser superior a 50% e que a porcentagem de água ligada ao polímero pode variar entre 6% e 7% (vapor saturado). Neste trabalho, os valores de porcentagem de água removida por simples compressão e ligada no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi de 67% e 9%, respectivamente.

Figura 20 - Composição mássica do criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA



Fonte: Autor (2019)

4.2 Quantificação de íons cobre e níquel quelatados ao criogel PAAm-Alg-AGE-IDA

A imobilização covalente do IDA ao monolito permitiu que esse agente quelante se complexasse com íons metálicos em solução.

A quantificação de íons cobre e níquel quelatados ao IDA foi realizada conforme procedimento descrito no item 3.2.3. Foram obtidos valores de 267,67 e 72,64 μmol para Cu^{2+} e Ni^{2+} respectivamente, por grama de criogel seco e em termos de volume, 18,96 e 5,15 μmol para Cu^{2+} e Ni^{2+} , respectivamente, por mL de criogel. O valor de níquel quelatado ao IDA foi bem abaixo do que o encontrado para o íon metálico cobre. Esse resultado corrobora com o descrito por Porath (1988), que afirma que a estabilidade em formar complexos de metais de transição segue a ordem de acordo com a regra de Irving-Williams: $\text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$.

No estudo comparativo feito por Sharma & Agarwall (2002), no qual a estabilidade dos agentes quelantes IDA e TREN complexados com os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} foi analisada em diferentes condições de pH, força iônica e concentração, os autores chegaram a conclusão que o complexo IDA- Ni^{2+} é menos estável que o complexo IDA- Cu^{2+} . Isso se deve ao fato de que quando é empregado um sistema tamponante de pH igual a 4,0, mesma condição empregada na eluição deste trabalho, há um enfraquecimento do complexo IDA- Ni^{2+} que leva à perda significativa do íon metálico.

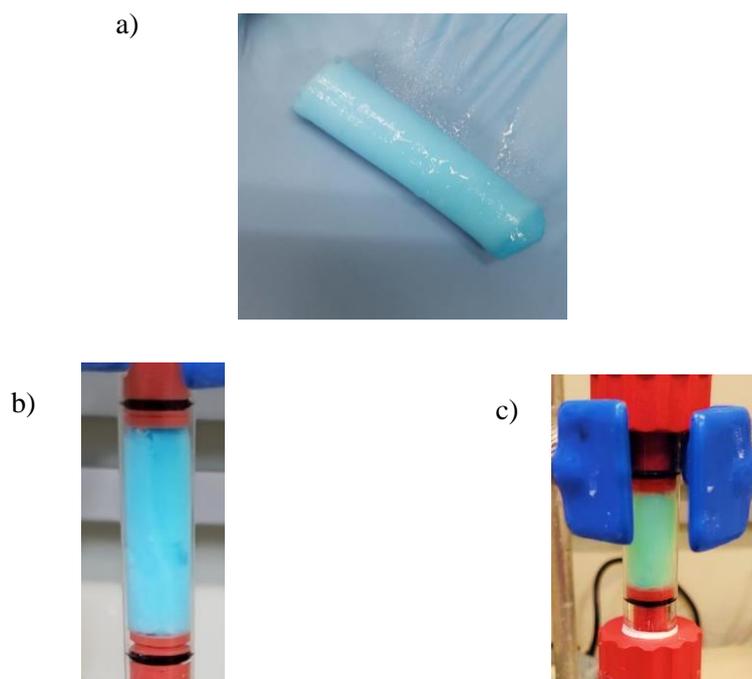
A quantidade de íons cobre quelatados ao IDA neste trabalho está abaixo do encontrado por Chen *et al.* em (2011); no estudo comparativo os autores demonstraram que membranas de celulose fabricadas para imobilização de penicilina G, com IDA- Cu^{2+} complexado, quelatavam 492,8 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{g}$ de membrana e um gel comercial de metacrilato quelatava 299,8 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{g}$ de gel, ambos ativados com epicloridrina. No caso de criogéis, devido a alta densidade de macroporos, possuem menor área disponível para imobilização de ligantes (PLIEVA *et al.*, 2004b).

Por outro lado, Evili *et al.* (2018), sintetizaram criogéis de poliácridamida e utilizaram glicidil metacrilato para introduzir grupos reativos epóxi no monolito, possibilitando a posterior imobilização do IDA. Em contra partida, Cheeks *et al.* (2009), utilizaram alil diglicidil éter, como neste trabalho. Os autores encontraram uma densidade de ligantes, respectivamente, de 225,02 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{g}$ e 16,7 $\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{mL}$ de criogel, ambos menores do que o obtido para o PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} .

Os criogéis PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} e PAAm-Alg-AGE-IDA- Ni^{2+} obtidos após a quelatação reversível do íon metálico cobre e níquel, adquiriram a coloração azul e verde, respectivamente (Figura 21). Como o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} apresentou maior

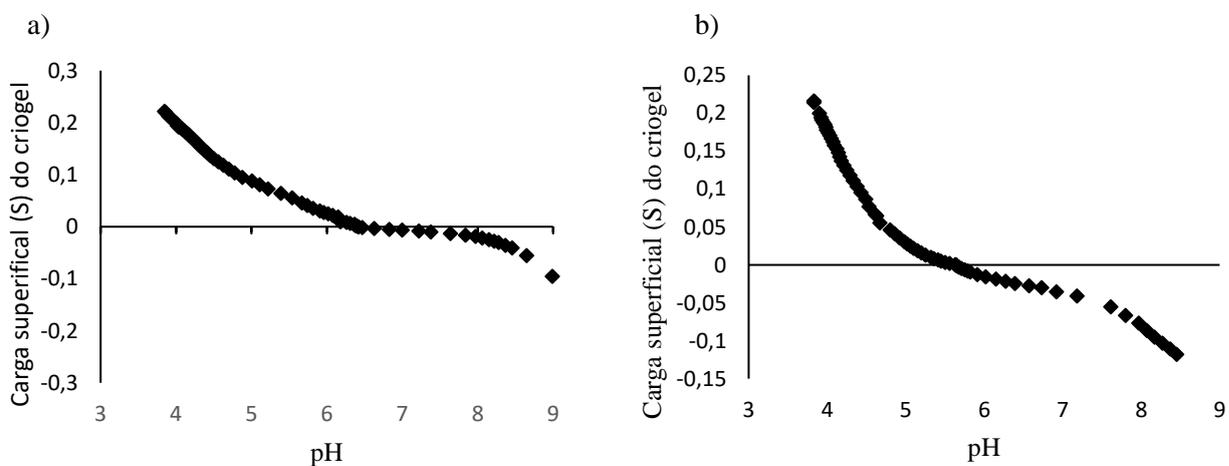
densidade de íons metálicos imobilizados, investigou-se se o ponto de carga nula do adsorvente seria alterado em relação ao criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. As curvas de titulação obtidas para o adsorvente sem e com o íon metálico Cu^{2+} quelatado estão expressas nas Figuras 22 a e b, respectivamente.

Figura 21 - Foto dos criogéis: PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} (a) saturado com água e (b) em coluna cromatográfica e PAAm-Alg-AGE-IDA- Ni^{2+} (c) em coluna cromatográfica.



Fonte: Autor (2020)

Figura 22 - Curva de titulação dos criogéis (a) PAAm-Alg-AGE-IDA e (b) PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+}



Fonte: Autor (2021)

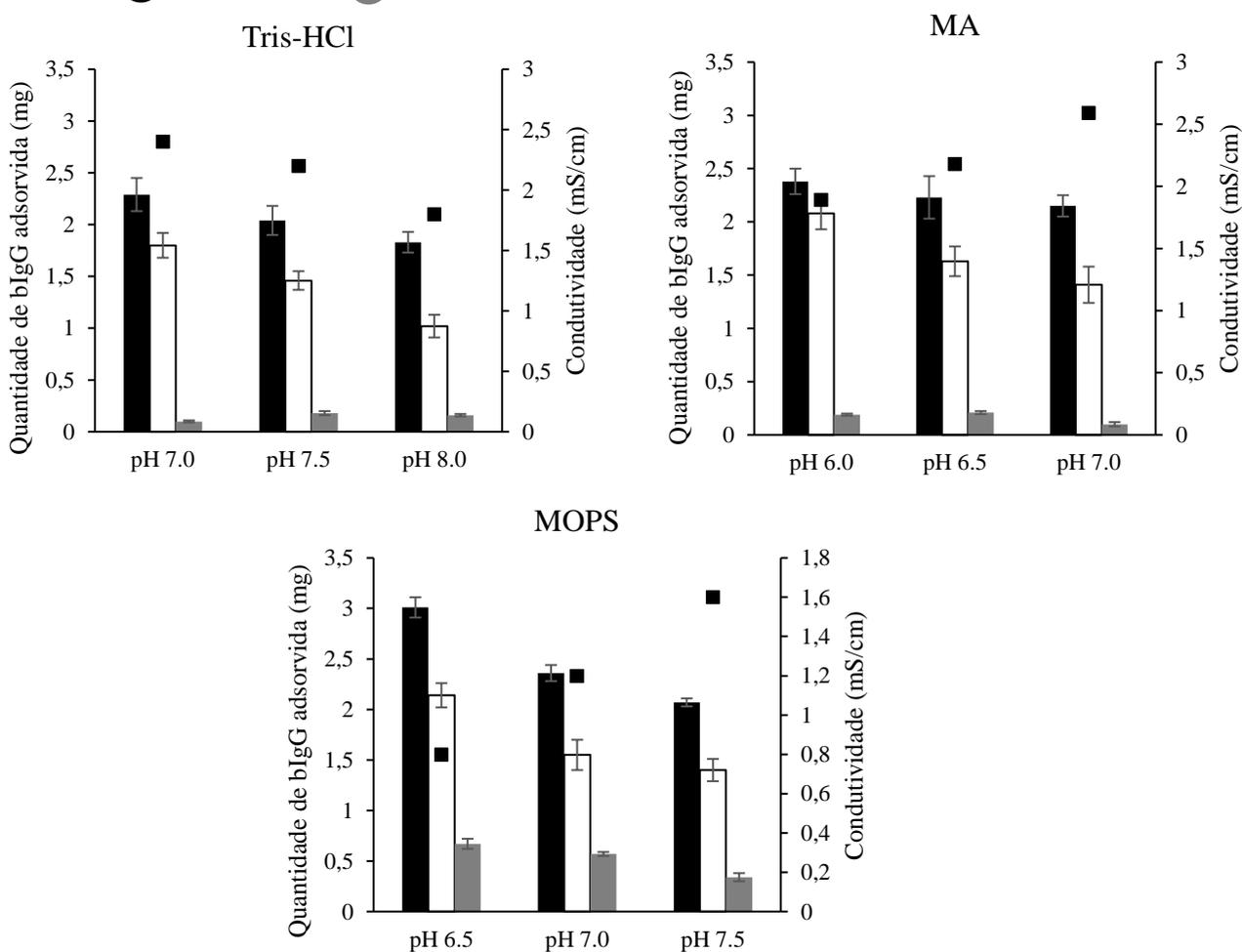
Analisando os resultados apresentados na Figura 22, conclui-se que o ponto de carga

nula tornou-se mais ácido, passou de 6,2 para 5,4 quando o íon cobre foi quelatado ao criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Mourão *et al.* (2016) encontraram que o gel de agarose com o quelato CM-Asp-Cu²⁺ imobilizado, em pH 7,5, possuía carga total negativa, com potencial zeta de -5.877 ± 0.224 mV. Neste trabalho o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ também possui carga total negativa em pH neutro, de acordo com a metodologia empregada, apesar das diferenças nas estruturas entre os adsorventes.

4.3 Ensaios cromatográficos bIgG em criogel PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem íon metálico quelatado

Ensaios cromatográficos foram realizados com a finalidade de avaliar o potencial do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Me²⁺ e do criogel controle PAAm-Alg-AGE-IDA em adsorver bIgG sob diferentes condições tamponantes (Figura 23).

Figura 23 – Quantidade de bIgG adsorvida em colunas com 3 mL de PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem íon metálico quelatado. Injeção de 4 mg de bIgG /mL aproximadamente. Ensaios cromatográficos realizados nos sistemas tamponante e nos valores de pH indicados. Cobre (●), níquel (○), sem metal (●) e condutividade (■)



Fonte: Autor (2020)

Foram propostos 3 sistemas tamponantes de cargas totais diferentes, em três faixas de pH, porém na mesma concentração de 25 mmol/L: o positivamente carregado Tris-HCl em pH 7,0-8,0, o negativamente carregado MA em pH 6,0-7,5 e o zwitteriônico MOPS em pH 6,5-7,5. Essas condições tamponantes foram escolhidas para avaliar o efeito tanto da condutividade do meio quanto da natureza do tampão na adsorção da bIgG. A eluição da bIgG adsorvida foi realizada com tampão de eluição acetato 25 mmol/L em pH 4,0 para o criogel com os íons metálicos imobilizados e para o controle, MOPS 25 mmol/l com adição de 0,5 mol/L de NaCl. A etapa final de regeneração, foi realizada com tampão EDTA 100 mmol/L em pH 7,0 no monolito PAAm-Alg-AGE-IDA-Me²⁺, no criogel controle esta etapa não foi necessária, uma vez que toda a bIgG adsorvida no criogel controle foi desorvida na etapa de eluição.

A quantidade adsorvida de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Me²⁺ seguiu a seguinte ordem: Cu²⁺ > Ni²⁺ independentemente do sistema tamponante empregado, corroborando com a análise realizada por Porath (1988). Segundo o autor, a capacidade de adsorção de proteína em um adsorvente IMAC é fortemente influenciada pelo tipo de íon metálico imobilizado, uma vez que as interações entre o quelato metálico e a biomolécula podem ocorrer de formas diferentes, sendo mais acentuadas na presença do íon metálico cobre que possui menos restrições para interagir com proteínas, em comparação ao níquel, por exemplo. Além disso a quantidade adsorvida pode ser influenciada também, pela densidade de ligantes imobilizados na matriz cromatográfica.

Neste trabalho, a quantidade do íon metálico níquel quelatada é quase quatro vezes menor do que a do íon metálico cobre. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro *et al.* 2008, que utilizaram os mesmos sistemas tamponantes e obtiveram menor capacidade de adsorção de IgG humana em IDA-Ni²⁺ em relação ao IDA-Cu²⁺. No trabalho proposto por Ribeiro *et al.*, 2008 o agente quelante IDA foi imobilizado em membranas de fibras ocas de álcool polietileno vinílico.

Para os ensaios realizados com o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA, a quantidade adsorvida foi inferior, chegando a valores dez vezes menores em comparação aos adsorventes com íons metálicos imobilizados. De acordo com a curva de titulação realizada, para valores de pH acima de 6,2, o criogel possui carga total negativa, permitindo ao agente quelante ser um trocador fraco de cátions, interagindo com as proteínas positivamente carregadas do meio. A baixa quantidade adsorvida no IDA-criogel pode estar relacionada com as cargas da bIgG, que possui pI entre 5,5 e 8,3 (DONG *et al.*, 2013). Nos valores de pH estudados, a biomolécula apresenta quantidade de cargas total mista interagindo com o adsorvente somente as que estavam positivamente carregadas.

Apesar da baixa quantidade de bIgG adsorvida no IDA-criogel, toda proteína adsorvida foi desorvida na etapa de eluição, o que não aconteceu com o adsorvente com os íons metálicos imobilizados. Neste caso, parte da bIgG, entre 50 e 90%, foi removida apenas na etapa de regeneração, principalmente nos experimentos realizados com níquel quelatado. Os balanços de massa dos experimentos de adsorção de bIgG pré purificada estão no Apêndice D.

A maior quantidade adsorvida atingida foi observada na condição MOPS pH 6,5 para o adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ que das 4,0 mg de bIgG alimentadas na coluna, reteve 3,0 mg. Resultados semelhantes foram observados também para os criogéis PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺ e PAAm-Alg-AGE-IDA, quando empregado MOPS em pH 6,5. Estes adsorventes obtiveram maiores capacidades de adsorção em comparação aos demais sistemas tamponantes, retendo 2,14 e 0,67 mg das 4,0 mg de bIgG injetadas respectivamente.

Por outro lado, a menor quantidade de bIgG adsorvida ocorreu na condição Tris-HCl 25 mmol/L em pH 8,0 para os adsorventes com os íons metálicos Cu²⁺ e Ni²⁺ quelatados. Das 4 mg de bIgG injetadas foram adsorvidas 1,83 e 1,02 mg respectivamente. Sem a presença dos íons metálicos, a menor adsorção de bIgG no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA foi observada quando empregado os tampões Tris-HCl pH 7,0 e MA pH 7,0, com o valor de 0,1 mg de bIgG adsorvida para ambos adsorventes. No geral, os tampões MOPS e MA promoveram a maior adsorção de bIgG nos monolitos, enquanto Tris-HCl as menores.

Prasanna e colaboradores (2015) também observaram que o sistema tamponante MOPS 25 mmol/L em pH 6,5 promovia maior adsorção de IgG humana, em comparação ao Tris-HCl e fosfato de sódio, tampões que possuem carga total positiva e negativa, respectivamente. Os autores utilizaram como matriz cromatográfica monolitos em formato de disco, derivatizados com carbonildiimidazol e etilenodiamina, e L-histidina como ligante. Resultado semelhante também foi encontrado por Denizli e colaboradores (2003), quando utilizado o quelato HistidinaCu²⁺ imobilizado em esferas de poli metilmetacrilato, no qual MOPS promoveu maior adsorção em detrimento do fosfato de sódio.

Outro fator que influenciou a adsorção de bIgG foi a condutividade do meio. Com exceção do sistema tamponante Tris-HCl, o aumento da condutividade acarretou em uma diminuição na quantidade de bIgG adsorvida, corroborando com o estudo feito por Pavan e colaboradores em 2017, que também observaram que o aumento da condutividade resultou em uma menor adsorção de IgG humana em adsorventes de IMAC. A influência da condutividade na adsorção de bIgG nos diferentes adsorventes, pode ser demonstrada, pois dentre as condições utilizadas, o MOPS possui menores valores de condutividade e a maior quantidade de bIgG adsorvida, uma vez que a maior quantidade de íons livres no meio é responsável por suprimir

interações eletrostáticas, que podem estar ocorrendo entre o adsorvente e a bIgG

O tampão Tris-HCl possui em sua estrutura um grupamento amino que pode participar da ligação de coordenação com o íon metálico quelatado (WONG *et al.*, 1991; BRESOLIN *et al.*, 2009). Esta ligação permite a este sistema tamponante se comportar como agente competidor fraco pelo sítio da proteína, afetando a adsorção da bIgG à matriz, resultando em menores quantidades adsorvidas de bIgG. Este fato não se aplica para criogel sem íon metálico quelatado, no qual houve um aumento da adsorção de bIgG. Neste caso, as interações envolvidas provavelmente sejam majoritariamente eletrostáticas, que são favorecidas com a redução da condutividade, o que resultou em maiores quantidades da biomolécula adsorvida.

O sistema tamponante Tris-HCl apresenta pKa igual a 8,1 (SIGMA ALDRICH, 2013), logo o aumento do pH para valores próximos de seu pKa, promove um aumento do número de grupamentos amino desprotonados capazes de competir pelo sítio de adsorção. Este fato deve estar relacionado à redução da quantidade de bIgG adsorvida no criogel com íons metálicos quelatados quando há aumento do pH.

A partir dos resultados de adsorção de bIgG, realizou-se ensaios de purificação de IgG a partir do soro bovino com os íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados e na melhor condição foram feitos experimentos sem o íon metálico quelatado (controle).

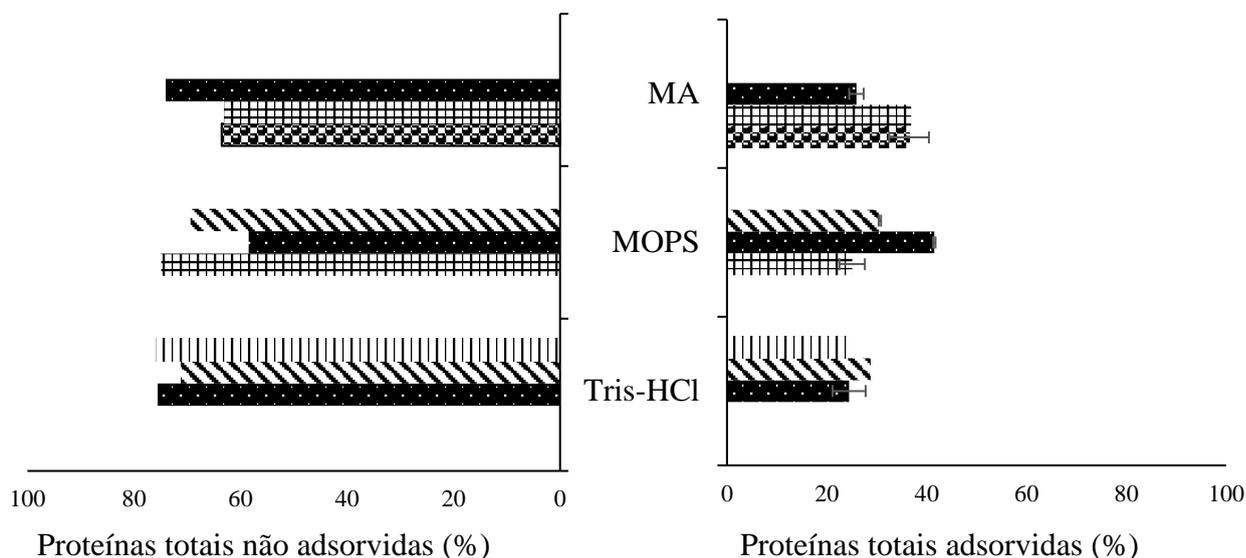
4.4 Purificação de IgG a partir do soro bovino

4.4.1 Efeito do quelato IDA-Cu²⁺ e do sistema tamponante na purificação de bIgG

Com o objetivo de avaliar o potencial do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ em purificar IgG a partir do soro bovino foram realizados ensaios cromatográficos nas mesmas condições tamponantes indicadas no item 4.3. A eluição das proteínas adsorvidas no criogel foi realizada com tampão acetato de sódio a pH 4,0, com exceção do tampão de adsorção MA, que foi utilizado do início ao fim da cromatografia por tamponar em uma ampla faixa de pH, podendo ser empregado em pH 4,0.

A Figura 24 apresenta a porcentagem de proteínas totais do soro bovino adsorvidas e não adsorvidas no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ e a Figura 25 os perfis eletroforéticos obtidos nos diferentes sistemas tamponantes estudados.

Figura 24 - Proteínas totais do soro bovino adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ dos ensaios cromatográficos com injeção de soro bovino diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes e valores de pH indicados: pH 8,0 (⊖), pH 7,5 (⊗), pH 7,0 (●), pH 6,5 (⊕) e pH 6,0 (⊗).



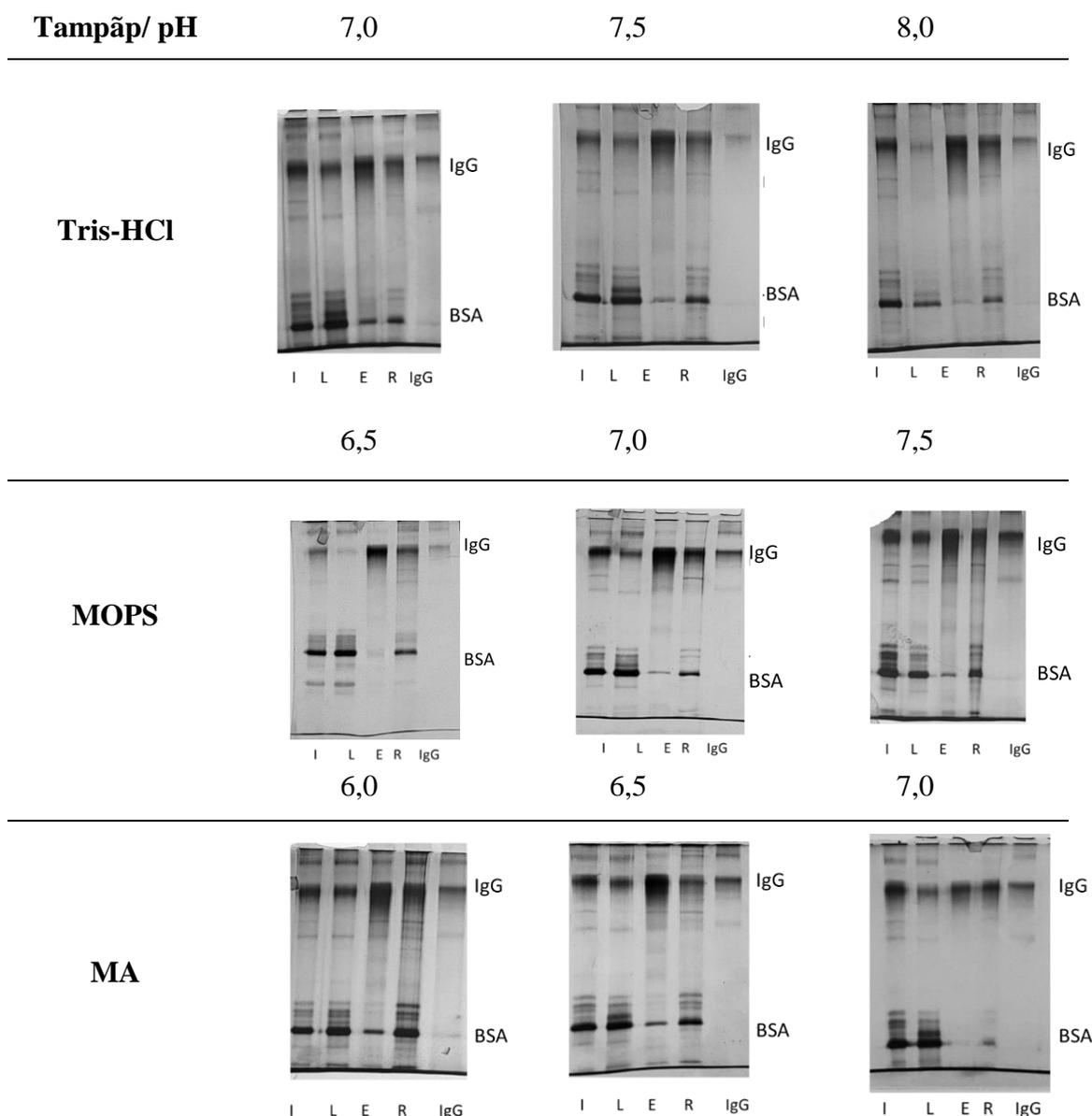
Fonte: Autor (2020)

A IgG e outras proteínas do soro bovino foram adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ em todas as condições estudadas (Figura 24). Em termos de proteínas totais, a maior porcentagem de proteínas adsorvidas foi alcançada em tampão MOPS em pH 7,0 (40% da quantidade de proteína total injetada). A menor porcentagem de proteínas adsorvidas foi obtida em tampão Tris-HCl pH 8,0 (20,8%). Nesta condição este sistema tamponante está com sua carga total quase zero, uma vez que o pKa do Tris é 8,1 (SIGMA ALDRICH, 2013). Além disso a característica do tampão Tris-HCl de agir como competidor fraco pelo sítio de adsorção da proteína em IMAC, como já discutido anteriormente, pode ter promovido menor retenção de proteínas totais.

Ressalta-se que os perfis eletroforéticos das cromatografias realizadas no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ em tampões MOPS a pH 6,5 e MA a pH 7,0 mostram a adsorção de bIgG com traços de albumina (Figura 25). Nas demais condições tamponantes, outras proteínas do soro foram co-eluídas juntamente com a bIgG. Uma hipótese para a seletividade do criogel quelatado ao íon cobre na presença MOPS pH 6,5 pode estar relacionada ao fato deste tampão estar na forma zwitteriônica no valor de pH igual a 6,5 o que diminui a condutividade elétrica do meio, suprimindo interações eletrostáticas que poderiam acontecer entre impurezas negativamente carregadas e o íon metálico quelatado, favorecendo as ligações

de coordenação (PRASANNA e VIJAYALAKSHMI, 2010).

Figura 25 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE em 7,5% de acrilamida sob condições não redutoras) das frações cromatográficas das cromatografias realizadas em PAAM-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ com injeção de soro bovino diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem. E: *pool* das frações de eluição; IgG marcador de IgG (Sigma)



Fonte: Autor (2020)

Para o tampão Tris-HCl, por exemplo, destaca-se principalmente a presença de BSA nas frações de eluição e regeneração, não sendo possível obter a bIgG purificada com Cu²⁺ quelatado. Resultados semelhantes foram demonstrados por Prasanna e colaboradores (2015), para os três monolitos em formato de disco sintetizados com L-histidina como ligante. No

estudo, o sistema tamponante MOPS em pH 6,5 demonstrou melhor seletividade em purificar IgG do plasma humano quando comparado ao Tris-HCl em pH 7,4, sendo que o último, adsorveu boa parte da albumina presente.

Serpa e colaboradores (2005), utilizaram o tampão de adsorção Tris-HCl a pH 7,0 nas cromatografias em matriz de fibras oca com o quelato IDA-Cu²⁺ imobilizado para purificação de anticorpo monoclonal murino anti-TNP do isotipo IgG₁ tendo obtido resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, com presença de albumina nas frações de eluição

Em valores de pH acima de 6,0 as proteínas presentes em maiores concentrações no soro bovino, transferrina e BSA, encontram-se negativamente carregadas (pI = 4,9 para transferrina e entre 5,2 < pI < 5,9 para BSA) (Putnam, 1984), desfavorecendo a adsorção devido a repulsão mais efetiva entre as cargas, uma vez que de acordo com o perfil de titulação, acima do pH 5,4 o adsorvente encontra-se com carga total negativa.

Denizli e colaboradores (2003), estudaram o potencial de esferas de metacrilato com íons metálicos Cu²⁺ quelatados em éster metílico de L-histidina para purificação de IgG humana. O adsorvente foi capaz de capturar o anticorpo com 90,7% de pureza quando empregado também o tampão MOPS, porém em pH 7,0. Segundo o estudo a alta seletividade atingida pode ter sido influenciada pela característica zwitteriônica do tampão e também, pela estrutura conformacional da hIgG neste valor de pH.

Em termos de retenção de proteínas, a maior força de ligação entre o criogel e a as proteínas, foi observada nas cromatografias com tampão MA. Muitas proteínas co-adsorvidas com bIgG foram dessorvidas somente na etapa de regeneração da coluna, na presença de EDTA (Figura 23). A adição de acetato no tampão zwitteriônico MOPS, aumenta a densidade de cargas negativas do meio, alterando a condutividade. Esta mudança, pode favorecer ligações de coordenação que podem estar ocorrendo entre a albumina e o íon metálico, uma vez que isto não ocorreu na presença de MOPS no mesmo valor de pH.

Ribeiro em (2006) avaliou o potencial de uma matriz de membranas de fibra oca com IDA imobilizado e íons Cu²⁺ quelatados na purificação de IgG humana, e quando a adsorção foi realizada em sistema tamponante MA pH 7,0 na presença de 1,0 mol NaCl grande parte das imunoglobulinas foram eluídas apenas na presença de EDTA, demonstrando também maior força de retenção de proteínas nesta condição.

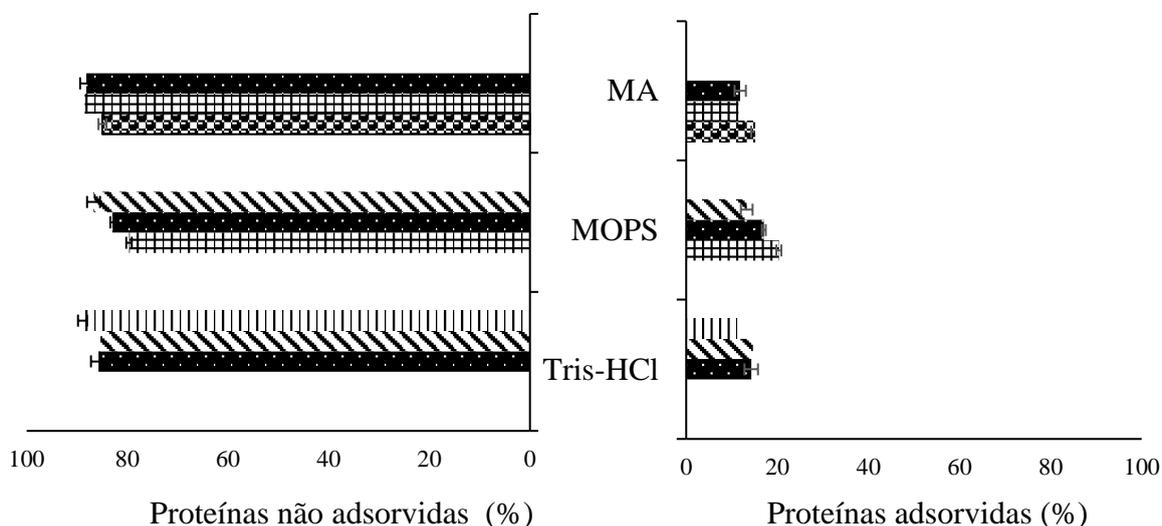
4.4.2 *Efeito do quelato IDA-Ni²⁺ e do sistema tamponante na purificação de bIgG*

O efeito do quelato IDA-Ni²⁺ na purificação de bIgG foi analisado nas mesmas

condições tamponantes daquelas utilizadas nos experimentos realizados com o quelato IDA-Cu²⁺ e os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 26 e 27.

O comportamento de adsorção de proteínas do soro bovino em IDA-Ni²⁺ foi similar àquele observado em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, no qual todos os sistemas tamponantes foram capazes de adsorver a IgG e outras proteínas, no entanto, com menor capacidade de adsorção (Figura 26).

Figura 26 - Proteínas totais do soro bovino adsorvidas e não adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺ dos ensaios cromatográficos com injeção de soro bovino diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes e valores de pH indicados : pH 8,0 (⊕), pH 7,5 (⊗), pH 7,0 (●), pH 6,5 (⊕) e pH 6,0 (⊗)



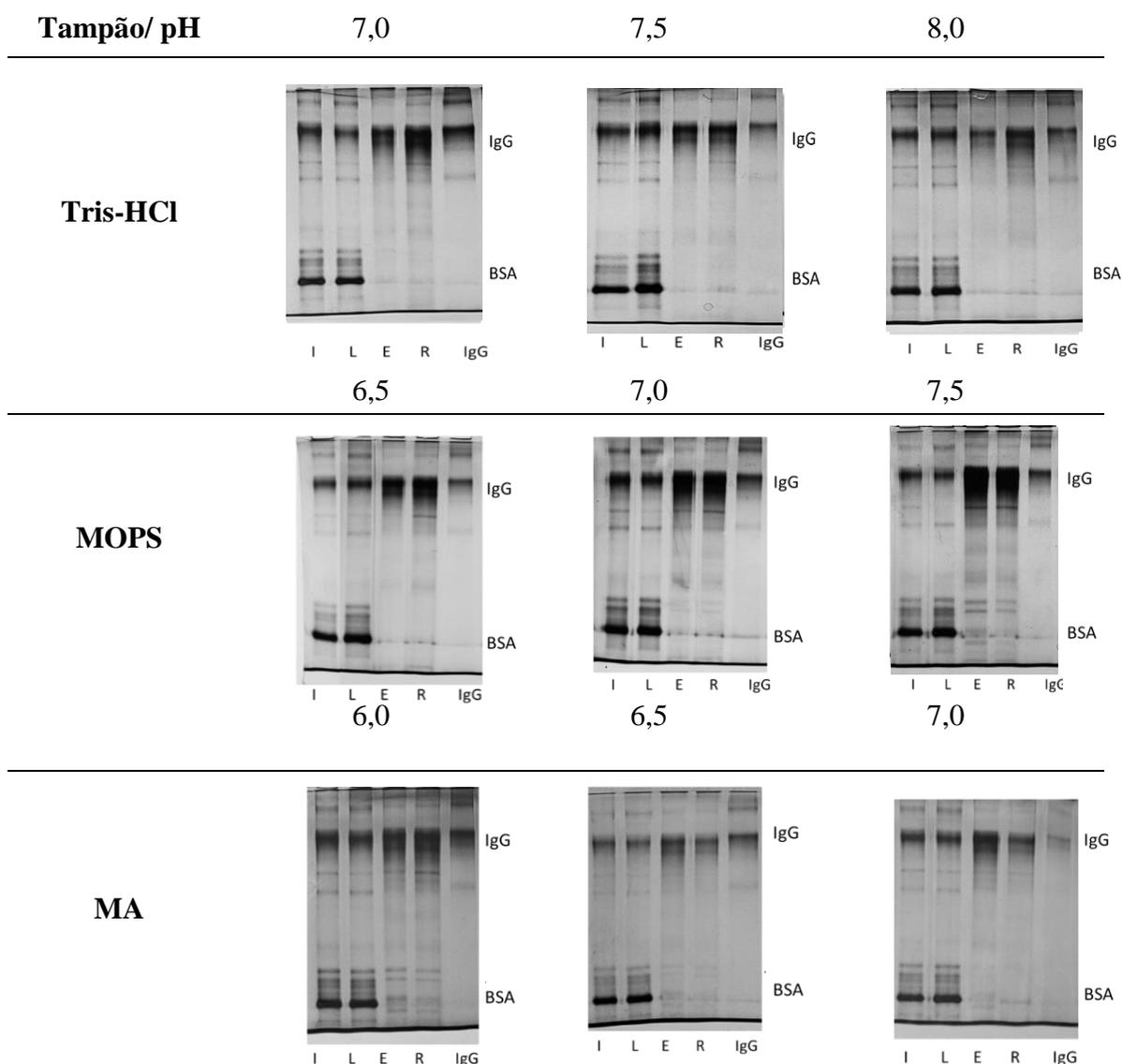
Fonte: Autor (2020)

Ao contrário do íon metálico cobre, o níquel interage com proteínas em solução quando estas apresentam acessíveis na sua superfície dois ou mais resíduos de histidina ou um *cluster* de resíduos de histidina (BRESOLIN *et al.*, 2009). A presença de um resíduo de histidina exposto na superfície da proteína já é suficiente para formar ligações de coordenação com o íon metálico cobre. Uma pequena porcentagem de proteínas globulares apresentam a conformação exigida para a interação com os íons Ni²⁺, haja vista que a tendência dos resíduos de histidina é de se localizarem no interior da molécula. O Ni²⁺ promoveu menor quantidade adsorvida com maior seletividade ao interagir com as proteínas do soro bovino (Figuras 26 e 27).

A maior porcentagem de adsorção de proteínas totais foi obtida em presença do tampão MOPS a pH 6,5 (20,34% da quantidade de proteína total alimentada) e a menor em Tris-HCl a pH 8,0 (11,1%). A quantidade de proteínas adsorvidas diminuiu com o aumento do valor de pH, com exceção ao tampão MA, que ao aumentar o valor de pH de 6,0 para 6,5, a porcentagem

de proteína adsorvida se manteve constante. Estes resultados também foram observados para adsorção de bIgG pré-purificada no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺.

Figura 27 - Perfis eletroforéticos (SDS-PAGE em 7,5% de acrilamida sob condições não redutoras) das frações cromatográficas das cromatografias realizadas em PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺ com injeção de soro bovino diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de massa molecular; I: injeção; L: *pool* das frações de lavagem. E: *pool* das frações de eluição; IgG marcador de IgG humana (Sigma)



Fonte: Autor (2019)

Como já discutido no item anterior, a menor quantidade adsorvida obtida em presença de Tris-HCl pode estar relacionada a característica competitiva deste sistema tamponante pelo sítio de ligação em IMAC (WONG *et al.*, 1991; BRESOLIN *et al.*, 2009). Além disso, a

presença do grupamento $-NH_3$ protonado na faixa de pH estudado pode estar interagindo com proteínas do soro bovino negativamente carregadas, inibindo a adsorção.

Corroborando os estudos de Sulkowski (1989) os perfis eletroforéticos mostram que bIgG foi co-eluída com menor quantidade de impurezas (Figura 27) quando comparado aos experimentos realizados com o quelato IDA- Cu^{2+} . Para o Tris-HCl, por exemplo, em todos os valores de pH estudados, pode-se notar traços fracos de outras proteínas nas frações de eluição e regeneração. No caso do MA, o aumento do pH promoveu um aumento na seletividade, atingindo melhor resultado em pH 7,0, diferentemente do MOPS, que houve presença maior de contaminantes e a melhor condição foi em pH 6,5. A partir dos resultados demonstrados, os sistemas tamponantes proporcionaram a seguinte ordem de seletividade Tris-HCl > MA > MOPS.

Os sistemas tamponantes de maior condutividade, Tris-HCl e MA, promoveram maior seletividade em comparação ao MOPS, de menor condutividade. Esta relação pode estar ligada à formação de interações eletrostáticas, além das de coordenação existentes, entre o complexo agente quelante-íon metálico e as proteínas do soro bovino. Em condições nas quais o sistema tamponante possui maior condutividade, ligações eletrostáticas são suprimidas favorecendo as ligações de coordenação, o que pode estar relacionado a maior seletividade destes tampões para o adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA- Ni^{2+} (Porath, 1988; Ueda *et al.*, 2003).

Bresolin e colaboradores em 2010 utilizaram membranas de fibras ocas com CM-Asp- Ni^{2+} imobilizado para purificação de IgG1 monoclonal proveniente de murinos. Os autores estudaram o tampão Tris-HCl em pH 7,0 para a etapa de adsorção e gradiente de concentração de Tris para a etapa de eluição. Dessa forma, foi possível obter a IgG₁ com elevado grau de pureza. Prasanna & Vijayalashmi em 2010, por sua vez, utilizaram um monolito comercial em formato de disco de metacrilado com IDA- Ni^{2+} quelatado para purificação de IgG do fluido acistítico de ratos e quando empregaram a condição MMA em pH 7,4 foi possível recuperar o anticorpo com 90% de pureza.

4.4.3 Avaliação da melhor condição de purificação em PAAm-Alg-AGE-IDA- Me^{2+}

A partir dos perfis eletroforéticos e dos balanços de massa dos ensaios cromatográficos de purificação de IgG proveniente do soro bovino nas diferentes condições tamponantes realizados nas matrizes PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} e PAAm-Alg-AGE-IDA- Ni^{2+} , foi escolhida a melhor condição utilizando dois critérios:

1. Perfil eletroforético no qual a proteína foi desorvida com menor quantidade de

impurezas do soro bovino

2. Quantidade adsorvida e eluída de bIgG.

O adsorvente com o íon metálico cobre imobilizado, de acordo com o perfil eletroforético obtido, demonstrou maior potencial para separação quando empregado MOPS 25 mmol/L em pH 6,5. Além disso, em termos de proteínas totais, o criogel foi capaz de adsorver 25,07% do soro bovino alimentado.

Por outro lado, apesar dos perfis eletroforéticos de purificação de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺ nas condições Tris-HCl em pH 7,5 e 8,0 e MA em pH 7,0 demonstrarem um possível potencial de separação, a quantidade de proteínas totais adsorvidas no geral, foi baixa 14,67%, 14,28% e 11,85% respectivamente. Além disso, a maior parte das proteínas eluídas do adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺ foram recuperadas apenas na etapa de regeneração.

Portanto, foi escolhido os resultados do experimento em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ na condição MOPS 25 pH 6,5 para realizar os ensaios de imunodifusão radial a fim de avaliar o grau de pureza da bIgG dessorvida nas frações de eluição e regeneração. O balanço de massa dos experimentos realizados está representado na Tabela 5.

O balanço de massa demonstrou que foi possível recuperar 66% da bIgG com 78% e 17% de pureza nas frações de eluição e regeneração, respectivamente. Em massa, o PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ adsorveu 0,43 mg em 3 mL de criogel (2,03 mg de bIgG por g de criogel seco), sendo que 0,31 mg foram recuperadas na eluição (1,46 mg de bIgG por g de criogel seco). Estes resultados demonstram que o sistema tamponante MOPS pH 6,5 apresenta potencial para captura de IgG do soro bovino. Os resultados quantitativos corroboram com o perfil eletroforético obtido, visto que nas etapas de eluição e regeneração há bandas de outras proteínas do soro bovino. Importante notar, que a condição tamponante estudada promoveu a retenção forte de proteínas do soro bovino diferentes da bIgG, uma vez que a maioria das impurezas foram removidas na etapa de regeneração.

Como já discutido anteriormente, basta um resíduo de histidina acessível na superfície da proteína para que o íon metálico Cu²⁺ forme ligações de coordenação com a proteína, Apesar do íon metálico cobre ter adsorvido 87% da bIgG alimentada, o quelato adsorveu também outras proteínas (SULKOWSKI, 1989). Além disso, o IDA, por ser um agente quelante tridentado, possibilita maior potencial de adsorção, pois deixa três sítios do íon metálico livres para interação com a proteína (Porath, 1988).

Tabela 5 - Balanço de massa da cromatografia em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição: acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 e regeneração com EDTA 100 mmol/L pH 7,0.

Frações	Bradford		Imunodifusão radial			
	PT ^a (mg)	(%) ^b	bIgG ^c (mg)	(%) ^d	Pureza ^e (%)	FP ^d
Injeção	3,42 ± 0,15	100,0	0,48 ± 0,03	100,0	14,0 ± 0,1	1,0
Lavagem	2,17 ± 0,10	63,5 ± 3,9	0,09 ± 0,02	16,4 ± 1,5	3,9 ± 0,2	0,3
Eluição	0,40 ± 0,08	11,7 ± 2,3	0,31 ± 0,01	65,5 ± 3,1	77,9 ± 0,2	5,6
Regeneração	0,67 ± 0,05	19,6 ± 1,2	0,12 ± 0,02	22,0 ± 1,2	17,2 ± 0,1	1,1
Recuperação	3,24 ± 0,23	94,8 ± 4,5	0,51 ± 0,04	107,3 ± 2,6		

^a PT de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com BSA como proteína de referência

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

^c bIgG: Massa de bIgG estimada por RID

^d Massa de bIgG em cada etapa dividida pela massa de bIgG na injeção x 100

^e Pureza: massa de bIgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

^f Fator de purificação: pureza de cada etapa dividida pela pureza da solução de injeção

Fonte: Autor (2020)

Shi e colaboradores em 2015 utilizaram esferas de agarose com 5-aminobenzimidazol imobilizado (T-ABI) como ligante para purificar IgG do soro bovino, por meio da técnica de adsorção em leito expandido combinada com cromatografia hidrofóbica de carga induzida. Os autores reportaram que o adsorvente foi capaz de adsorver 78% da bIgG com uma pureza de 91% quando empregado tampão fosfato de sódio em pH 7,4. Mesma condição foi utilizada por Lu *et al.* (2017) em uma resina de gel de agarose com 2 mercapto-1-metil-imidazol imobilizado como ligante para purificar IgG do plasma humano. Os autores atingiram uma pureza de 95% e recuperação maior que 90%.

Como a pureza alcançada neste trabalho foi de 78%, ficando abaixo do que é reportado na literatura por outros métodos, e dependendo da aplicação, serão necessárias etapas subsequentes de purificação, como cromatografia de troca iônica e de filtração em gel. Com isso, explorou-se as características ionogênicas do IDA como possível trocador de cátions em cromatografia de troca iônica, uma vez que curva de titulação do PAAm-Alg-AGE-IDA demonstrou que em valores de pH acima de 6,2 o adsorvente apresenta carga total negativa. Como as proteínas com maior concentração no soro bovino apresentam, pI na faixa de 4,9 a 5,9 (pI = 4,9 para transferrina e entre 5,2 < pI < 5,9 para BSA) (Putnam, 1984), em pH acima de 6,2 essas proteínas estarão negativamente carregadas, não sendo adsorvidas em PAAm-Alg-AGE-IDA.

Bresolin *et al.* (2020) avaliaram o potencial do IDA imobilizado em membranas de fibra oca de álcool polietileno vinílico como trocador de cátions para purificação de anticorpos

monoclonais murinos isotipo IgG₁. Apesar da baixa capacidade de adsorção, foi possível recuperar a IgG₁ com 94,7% de pureza quando empregado sistema tamponante Tris-HCl 25 mmol/L em pH 7,0.

Com base nesses resultados, escolheu-se a melhor condição tamponante de purificação para o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ e a que promoveu maior adsorção de bIgG pré-purificada em PAAm-Alg-AGE-IDA (controle) para avaliar o potencial destes adsorventes em purificar IgG do soro bovino.

4.5 Purificação de IgG a partir do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA

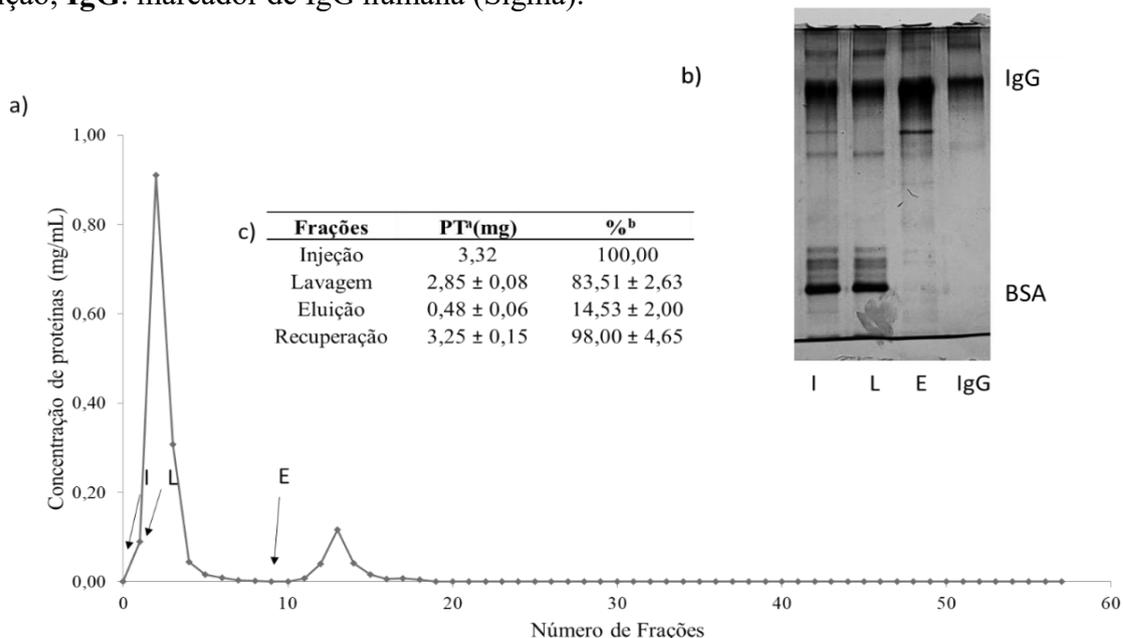
Os ensaios cromatográficos para avaliar o potencial do criogel PAAm-Alg-AGE-IDA como adsorvente para purificação de IgG do soro bovino foram realizados em MOPS 25 mmol/L a pH 6,5, em duplicata (Apêndice A). A Figura 28 apresenta, o cromatograma, o perfil eletroforético e o balanço de massa de proteínas da cromatografia de soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA.

A partir do balanço de massa observa-se capacidade de adsorção de proteínas totais menor para o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA (0,48 mg do injetado foi adsorvido representando 14,53% do total) quando comparado aos criogéis quelatados com íons metálicos. Contudo, o perfil eletroforético demonstra qualitativamente na pista das frações eluídas uma banda intensa de bIgG juntamente com bandas de fracas intensidade de albumina e transferrina. Logo, para determinar o grau de pureza da bIgG eluída, foi realizada imunodifusão radial das frações de injeção e dos *pools* da lavagem e eluição das frações cromatográficas (Tabela 6).

O balanço de massa da imunodifusão radial demonstrou que o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA adsorveu 0,35 mg de bIgG em 3 mL de criogel (1,65 mg de bIgG por g de criogel seco), uma relação de aproximadamente 81% do que foi alimentado. Além disso, a bIgG foi eluída com um grau de pureza de 84% com um fator de purificação de 5,6.

Em relação aos experimentos realizados com o adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, observa-se valores idênticos de fator de purificação (5,6) e valores similares de grau de pureza da bIgG eluída (77,9% para IDA-Cu²⁺ e 84% para IDA). No entanto, foi observado maior rendimento (81%) nas cromatografias com IDA sem íon metálico quelatado quando comparado às cromatografias em IDA-Cu²⁺ (65%), bem como maior quantidade eluída, 0,35 mg e 0,31 mg em 3 mL de criogel, respectivamente (1,65 mg e 1,46 mg por g de criogel seco). Ressalta-se que o criogel com Cu²⁺ quelatado adsorveu outras proteínas além da bIgG, que foram eluídas nas frações de regeneração.

Figura 28 - Cromatograma (a), perfil eletroforético (b) e balanço de massa (c) da cromatografia de soro bovino diluído 15 vezes em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 em criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. (a) Perfil cromatográfico em que **I**: Injeção de 75uL de soro bovino diluído em 1,050 ml de tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 (3,32 mg/mL de proteínas totais e injeção de 1 mL de solução). **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 6,5. **E**: Eluição com tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 contendo 0,5 mol/L NaCl. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas totais. **M**: marcador de alta massa molar; **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações da eluição; **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).



Fonte: Autor (2020)

Tabela 6 – Balanço de massa da cromatografia do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição com MOPS 25 mmol/L contendo 0,5 mol/L de NaCl, pH 6,5.

Frações	Bradford		Imunodifusão radial			
	PT ^a (mg)	(%) ^b	bIgG ^c (mg)	(%) ^d	Pureza ^e (%)	FP ^d
Injeção	2,94 ± 0,10	100,0	0,44 ± 0,01	100,0	14,9 ± 1,0	1,0
Lavagem	2,35 ± 0,06	79,9	0,06 ± 0,00	13,6	2,5 ± 0,5	0,2
Eluição	0,42 ± 0,10	14,3	0,35 ± 0,01	80,6	83,9 ± 1,5	5,6
Recuperação	2,77 ± 0,15	94,2 ± 1,8	0,41 ± 0,01	94,2 ± 1,4		

^a PT: Massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com BSA como proteína de referência

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

^c bIgG: Massa de bIgG estimada por RID

^d Massa de bIgG em cada etapa dividida pela massa de bIgG na injeção x 100

^e Pureza: massa de bIgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

^f Fator de purificação: pureza de cada etapa dividida pela pureza da solução de injeção

Fonte: Autor (2020)

Considerando todos os fatores discutidos acima, pode-se inferir que o criogel PAAm-

Alg-AGE-IDA possui potencial para purificação de IgG do soro bovino, podendo ainda ser possível que atinja valores de pureza superiores se outras condições tamponantes e valores pHs forem explorados

Pourrostan-Ravadanaq *et al.* (2020) estudaram diferentes tipos de adsorventes com os aminoácidos L-histidina e imidazol imobilizados (pelo grupo amino em agarose) para purificação de IgG do leite bovino. Os autores observaram que os adsorventes com L-histidina como ligante, devido aos grupamentos COO^- presentes, em baixos valores de pH, poderiam interagir com a IgG que estivesse positiva no meio. Tendo como base essa informação, utilizaram a condição tamponante acetato 25 mmol/L a pH 5,0 para garantir que a bIgG se encontrasse abaixo do seu pI, e obtiveram uma adsorção de 0,28 mg por mL de gel, ou seja, aproximadamente 0,42 mg de bIgG por grama de gel seco, com uma pureza de aproximadamente 80% e rendimento de 46%. Nota-se que o valor de pureza foi próximo ao encontrado nos experimentos realizados com PAAm-Alg-AGE-IDA, porém a recuperação de bIgG do criogel foi praticamente o dobro, demonstrando que o o IDA imobilizado no criogel sintetizado no presente trabalho é mais eficiente em capturar a bIgG do que a L-histidina imobilizada em gel de agarose.

A partir dos resultados discutidos anteriormente, foram determinadas a capacidade dinâmica de adsorção, por meio da cinética de adsorção e curvas de ruptura, e os parâmetros termodinâmicos, obtidos por meio das isotermas de adsorção, nas melhores condições tamponantes de adsorção de bIgG para o PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem íon metálico quelatado.

4.6 Curvas de ruptura do soro bovino em criogéis quelatados e não quelatados a íons Cu^{2+}

Para determinar a quantidade adsorvida no criogel e verificar o quão seletivo os criogéis PAAm-Alg-AGE-IDA e PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} são para bIgG em condições de saturação da coluna, foram realizadas as curvas de ruptura de soro bovino em MOPS 25 mmol/L e pH 6,5. Na Figura 28 são apresentadas as curvas de ruptura para ambos adsorventes, na Figura 29, os perfis eletroforéticos e nas Tabelas 7 e 8 os balanços de massa da imunodifusão radial para bIgG dos experimentos. Os cromatogramas, balanço de massa e as duplicatas dos ensaios estão apresentados no Apêndice B.

Figura 29 - Curva de ruptura do soro bovino em PAAm-Alg-AGE-IDA (♦) e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ (×). Vazão: 1,0 mL/min. Tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. Alimentação: 2,12 mL e 3,34 mL de soro bovino diluídos 15 vezes em tampão de adsorção (concentração de 3,90 e 3,86 mg/mL em termos de proteínas totais, volume total de 32 mL e 50 mL de solução de soro bovino, respectivamente, para o adsorvente sem e com o íon metálico quelatado. Massa total alimentada: 132,88 mg para PAAm-Alg-AGE-IDA e 192,96 mg para PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺. Volume do leite: 3,0 mL. Volume das frações 2,0 mL.

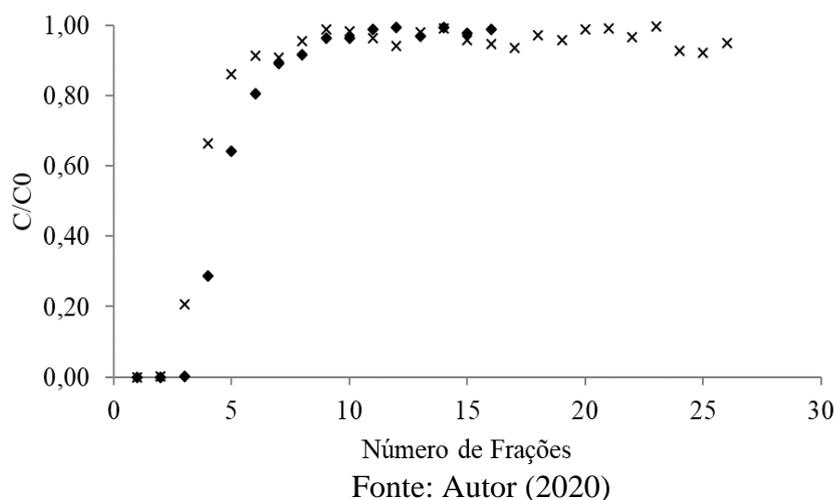


Figura 30 - Perfis eletroforéticos SDS-PAGE sob condições não redutoras em 7,5% de acrilamida das frações cromatográficas referentes às curvas de ruptura realizadas em criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA (a) e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ (b). M: marcador de massa molecular; IgG: marcador de IgG bovina; I: injeção; F: *flowthrough*; L: lavagem; E: eluição e R: regeneração

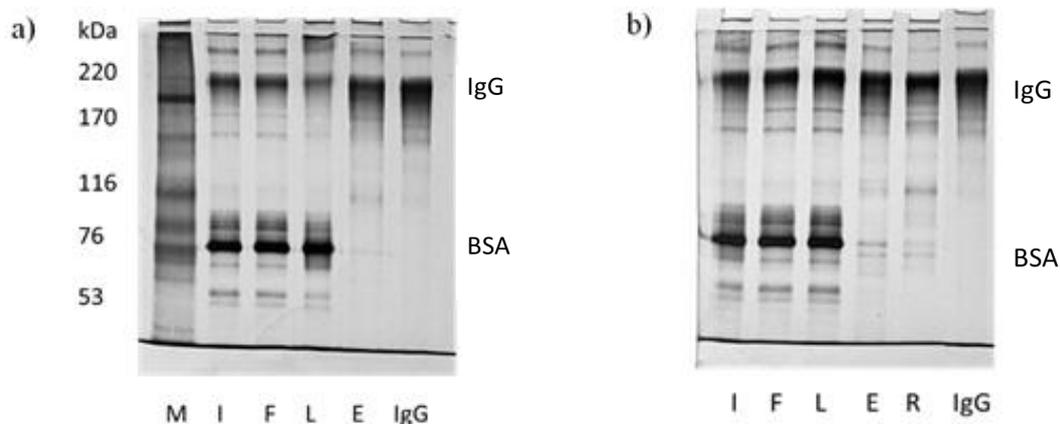


Tabela 7 - Balanço de massa da curva de ruptura do soro bovino em PAAM-Alg-AGE-IDA utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição: MOPS 25 mmol/L contendo 0,5 mol/L de NaCl, pH 6,5.

Frações	Bradford		Imunodifusão radial			
	PT ^a (mg)	(%) ^b	bIgG ^c (mg)	(%) ^d	Pureza ^e (%)	FP ^d
Injeção	137,88 ± 4,6	100,0	12,72 ± 0,55	100,0	9,2 ± 0,4	1,0
<i>Flowthrough</i>	101,49 ± 2,2	73,6	6,07 ± 0,16	47,7	6,0 ± 0,4	0,6
Lavagem	21,75 ± 0,55	15,8	0,72 ± 0,01	5,7	3,3 ± 0,5	0,4
Eluição	5,61 ± 0,8	4,1	4,94 ± 0,50	38,8	88,0 ± 2,0	9,6
Recuperação	128,85 ± 2,4	93,5	11,73 ± 0,70	92,2 ± 5,1		

^aPT: massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com BSA como proteína de referência

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

^c bIgG: massa de bIgG estimada por RID

^d Massa de bIgG em cada etapa dividida pela massa de bIgG na injeção x 100

^e Pureza: massa de bIgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

^f Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção

Fonte: Autor (2020)

Tabela 8 - Balanço de massa da curva de ruptura do soro bovino em PAAM-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ utilizando tampão de equilíbrio e lavagem MOPS 25 mmol/L, pH 6,5; eluição: acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0 e regeneração com EDTA 100 mmol/L pH 7,0.

Frações	Bradford		Imunodifusão radial			
	PT ^a (mg)	(%) ^b	bIgG ^c (mg)	(%) ^d	Pureza ^e (%)	FP ^d
Injeção	192,63 ± 10,1	100,0	20,98 ± 0,40	100,0	10,9 ± 0,2	1,0
<i>Flowthrough</i>	167,28 ± 6,10	86,8	16,53 ± 0,44	78,8	9,9 ± 0,1	0,9
Lavagem	14,15 ± 7,18	7,4	0,62 ± 0,40	2,9	4,4 ± 0,2	0,4
Eluição	2,10 ± 0,19	1,1	1,58 ± 0,10	9,5	75,3 ± 1,1	6,9
Regeneração	4,75 ± 1,10	2,5	2,10 ± 0,15	10,0	44,3 ± 1,0	4,1
Recuperação	188,28 ± 12,1	97,7	20,84 ± 0,30	99,3 ± 0,4		

^aPT: massa de proteína total estimada pelo método de Bradford (1976), com BSA como proteína de referência

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

^c bIgG: massa de bIgG estimada por RID

^d Massa de bIgG em cada etapa dividida pela massa de bIgG na injeção x 100

^e Pureza: massa de bIgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100

^f Fator de purificação: pureza dividida pela pureza da solução de injeção.

Fonte: Autor (2020)

A quantidade de bIgG adsorvida em 3 mL de adsorventes estão apresentadas na Tabela 9 comparados a dados da literatura.

Tabela 9 – Quantidade adsorvida de bIgG (mg) em modo dinâmico.

Capacidade dinâmica de adsorção de IgG (mg)								
Adsorvente	Este trabalho		Literatura					
	Criogel PAAm-Alg-AGE-IDA ^a	Criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ^{2+a}	Membrana IDA-PEVA ^b	Monolito Cu ²⁺ -IDA-HEMA-co-PDA-co-DATD ^c	Agarose-Proteína A ^d	Criogel PAAm-Alg-AGE-P-Tyr ^e	Criogel Poliacrilamida-AGE-Concanavalina A ^f	Agarose-tetrapeptídeos biomiméticos ^g
Solução de Alimentação	bIgGa partir de soro bovino		MAB a partir de sobrenadante de cultura celular	hIgG	MAB humanizado	hIgG a partir do soro humano	hIgG a partir do plasma humano	hIgG a partir do plasma humano
Capacidade por mL	4,94	3,68	2,67	5,12	24,8	1,42	--	28-37
Capacidade por grama de massa seca*	23,24	17,31	3,10	27,8	74,4	28,4	25,6	--
Referência	Este trabalho	Este trabalho	Bresolin <i>et al.</i> (2020)	Kaparde & Tetala (2020)	Kang <i>et al.</i> , (2016)	Marcuz <i>et al.</i> (2021)	Babac <i>et al.</i> (2006)	Zhu <i>et al.</i> (2019)

* 3 mL de criogel equivale a 0,2125g de massa seca.

^aTampão MOPS 25 mmol/L em pH 6,5 e soro bovino diluído 15 vezes

^bTampão Tris-HCl 25 mmol/L em pH 7,0 sobrenadante MAB IgG₁ de murinos.

^cTampão MMA 20 mmol/L contendo 0,5 M NaCl em pH 7,4 e IgG humana pré purificada, matriz monolítica microcapilar de 2-hidroxietil metacrilato, diacrilato de piperzina e dialliltartramida com IDA cobre imobilizado

^dTampão fosfato de sódio 100 mmol/L em pH 8,0 com excesso de trastuzumab (MAB humanizado)

^eTampão HEPES 25 mmol/L pH 7,0 e soro humano diluído 15 vezes

^f Plasma humano não diluído e diluído em tampão fosfato contendo 0,1 mol/L de NaCl

^g Tampão Tris-HCl, pH 9,0

Fonte: Autor (2020)

Os perfis eletroforéticos referentes aos *pools* das frações da curva de ruptura demonstraram conformidade com os resultados obtidos nas cromatografias que foram alimentadas 75 μ L de soro bovino diluído 15 vezes, o que demonstra que nesta condição tamponante a seletividade dos criogéis estudados independe da quantidade de proteína alimentada. Os balanços de massa da imunodifusão radial (Tabela 7 e 8) confirmaram que a bIgG foi recuperada com pureza mais elevada para o adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA em detrimento do PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, apesar do criogel com o íon metálico quelatado ter adsorvido maior quantidade de proteínas totais.

O criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA apresentou quantidade de bIgG adsorvida maior quando comparado ao PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ 4,94 e 3,60 mg de bIgG/mL de criogel, respectivamente (Tabela 9), e com maior grau de pureza (88,6% e 75,3%, respectivamente).

Em relação ao encontrado na literatura, o criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA apresentou quantidade de bIgG adsorvida muito maior (25,26 mg/g) do que o que foi apresentado por Bresolin e colaboradores em 2020, no qual os autores empregaram membranas de fibra oca derivatizadas com IDA, porém com menor grau de pureza (94,1% de pureza de IgG em membranas e 88,6% no criogel). Segundo o estudo desenvolvido por Bresolin et al. (2020), uma das razões para a baixa quantidade adsorvida no adsorvente está relacionada a baixa concentração do anticorpo monoclonal na solução de alimentação (63 μ g de IgG₁/mL).

A quantidade de bIgG adsorvida determinada por Kaparde & Tetala (2020) para o monolito microcapilar com IDA-Cu²⁺ imobilizado, foi um pouco superior ao encontrado para o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. No entanto, os autores utilizaram hIgG pré-purificada, diferente deste trabalho, que foi empregado soro bovino. Logo a quantidade de bIgG adsorvida no criogel foi obtida a partir de uma solução de alimentação de soro bovino e não apenas do anticorpo. Isto pode explicar a maior adsorção do monolito Cu²⁺-IDA HEMA-co-PDA-co-DATD.

Por outro lado, Kang *et al.* (2016) determinaram para o gel de agarose comercial com proteína A imobilizada, adsorção de 74,4 mg de IgG humana por g de gel. Da mesma forma, utilizando como base uma matriz de agarose, porém com cinco tetrapeptídeos diferentes imobilizados como ligantes, Zhu *et al.* (2019) encontraram valores entre 28-37 mg de hIgG por mL, sendo quantidades adsorvidas muito superiores às dos dois adsorventes estudados neste trabalho. A maior quantidade adsorvida observada por géis de agarose, pode estar relacionada a área superficial do material, visto que por possuírem macroporos, os criogéis monolíticos apresentam menor área superficial para imobilização de ligantes, o que leva a diminuição na quantidade de proteína adsorvida.

Marcuz *et al.* (2021) determinaram para o monolito PAAm-Alg-AGE-P-Tyr, quantidade adsorvida de 28,4 mg/g de massa seca do criogel. No entanto, os autores expressaram a quantidade adsorvida em termos de proteína total e não de hIgG, diferentemente do criogel de poli(acrilamida)-AGE com concanavalina A imobilizado, proposto por Babac *et al.* (2006). No estudo os autores encontraram que o criogel foi capaz de reter de 25,6 mg de hIgG por grama.

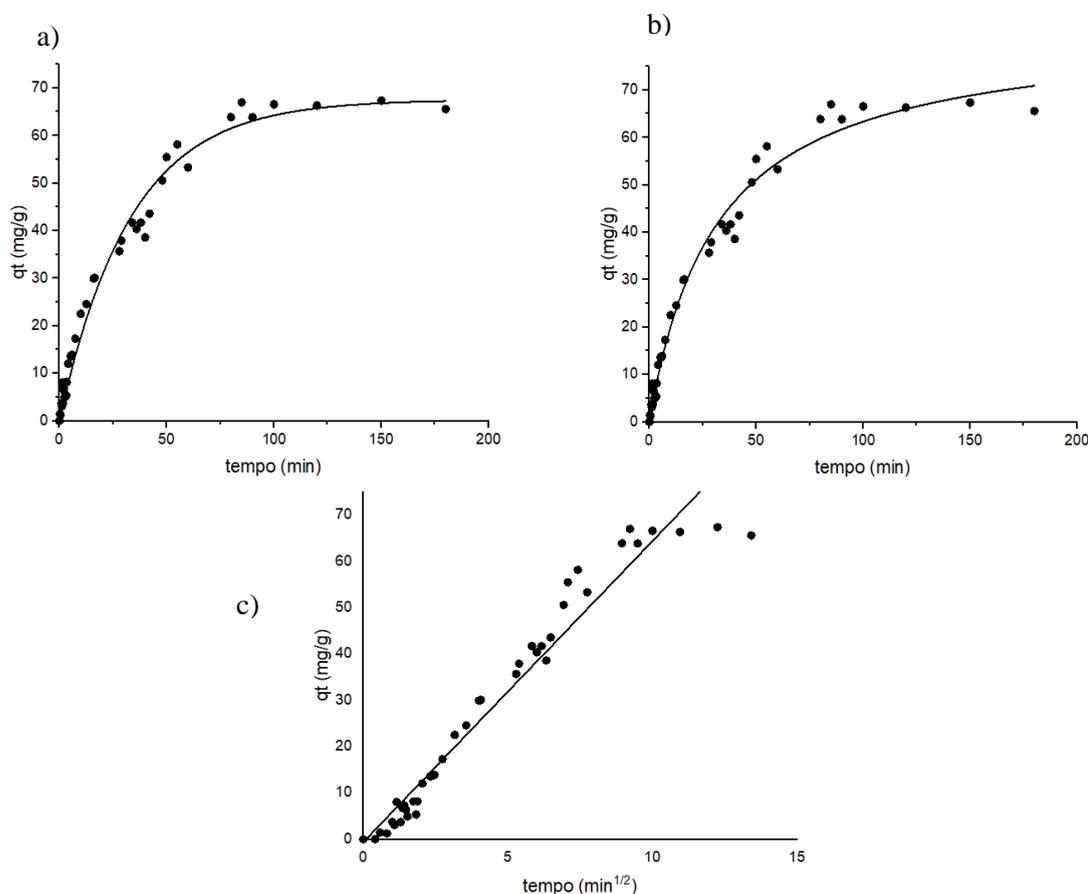
Os resultados demonstram que tanto o PAAm-Alg-AGE-IDA quanto o PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ apresentaram quantidade adsorvida de bIgG intermediária, compatível com a determinada por outros autores que utilizaram criogéis como fase estacionária em cromatografia. Fatores como densidade de ligantes do suporte sólido e a presença de proteínas diferentes na alimentação da coluna influenciam a capacidade dinâmica. No caso dos criogéis a presença de macroporos diminuem a área superficial disponível para imobilização de ligantes, e além disso, os experimentos foram realizados com soro bovino.

4.7 Cinética de adsorção de bIgG

A adsorção de bIgG nos criogéis PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ e PAAm-Alg-AGE-IDA foi avaliada em função do tempo (cinética de adsorção), na vazão de 1,0 mL/min. nas concentrações de 0,5 mg/mL e 2,0 mg/mL, em MOPS 25 mmol/L pH 6,5, como descrito no item 3.2.5. Para as duas concentrações estudadas, três modelos cinéticos diferentes foram ajustados: o de pseudo-primeira-ordem, o de pseudo-segunda-ordem e o de Weber-Morris. As Figuras 31 e 32 e as Figuras 33 e 34 apresentam os dados experimentais da cinética de adsorção de bIgG e as curvas ajustadas referentes aos ensaios realizados em PAAm-Alg-AGE-IDA e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, respectivamente e nas Tabelas 10 e 11 e Tabelas 12 e 13, encontram-se os valores dos parâmetros obtidos a partir do ajuste, respectivamente, aos ensaios citados anteriormente.

A partir dos parâmetros obtidos do modelo de pseudo-segunda-ordem, foi calculado também o tempo gasto para atingir metade da quantidade adsorvida no equilíbrio e a taxa inicial de adsorção. Todos os modelos propostos representaram bem os dados experimentais da cinética de adsorção de bIgG no adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA, em ambas concentrações estudadas de 0,5 mg/mL e de 2,0 mg/mL, com $R^2 > 0,94$ (Tabelas 10 e 11).

Figura 31 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 0,5 mg de bIgG/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos (—) a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris



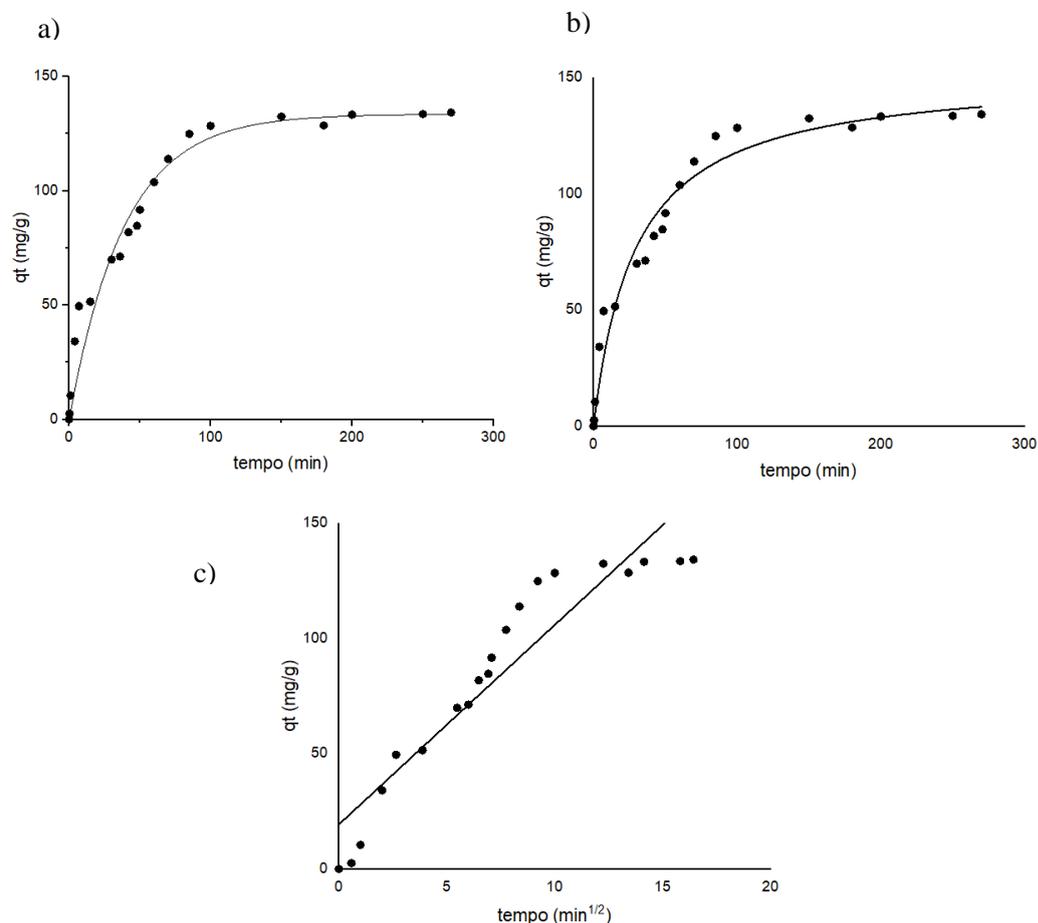
Fonte: Autor (2020)

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA, concentração de 0,5 mg de bIgG/mL.

Concentração de bIgG (mg/mL)	q_t experimental (mg/g)	Parâmetros dos modelos cinéticos				
		0,5	66,55	Pseudo-primeira ordem		
k_1 (1/min)	q_t (mg/g)			Chi ²	R ²	h (mg/g.min)
$0,0297 \pm 0,0022$	$68,07 \pm 2,17$			10,28	0,982	1,95
Pseudo-segunda ordem						
k_2 (g/mg.min)	q_t (mg/g)			Chi ²	R ²	$t_{1/2}$ (min)
$0,00032 \pm 0,00004$	$78,24 \pm 3,33$			8,64	0,963	39,94
Weber-Morris						
K_{di} (mg/g.min ^{0,5})	C			Chi ²	R ²	
$6,496 \pm 0,241$	$-0,598 \pm 1,37$			30,29	0,946	

Fonte: Autor (2020)

Figura 32 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 2,0 mg bIgG/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos (—) a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris



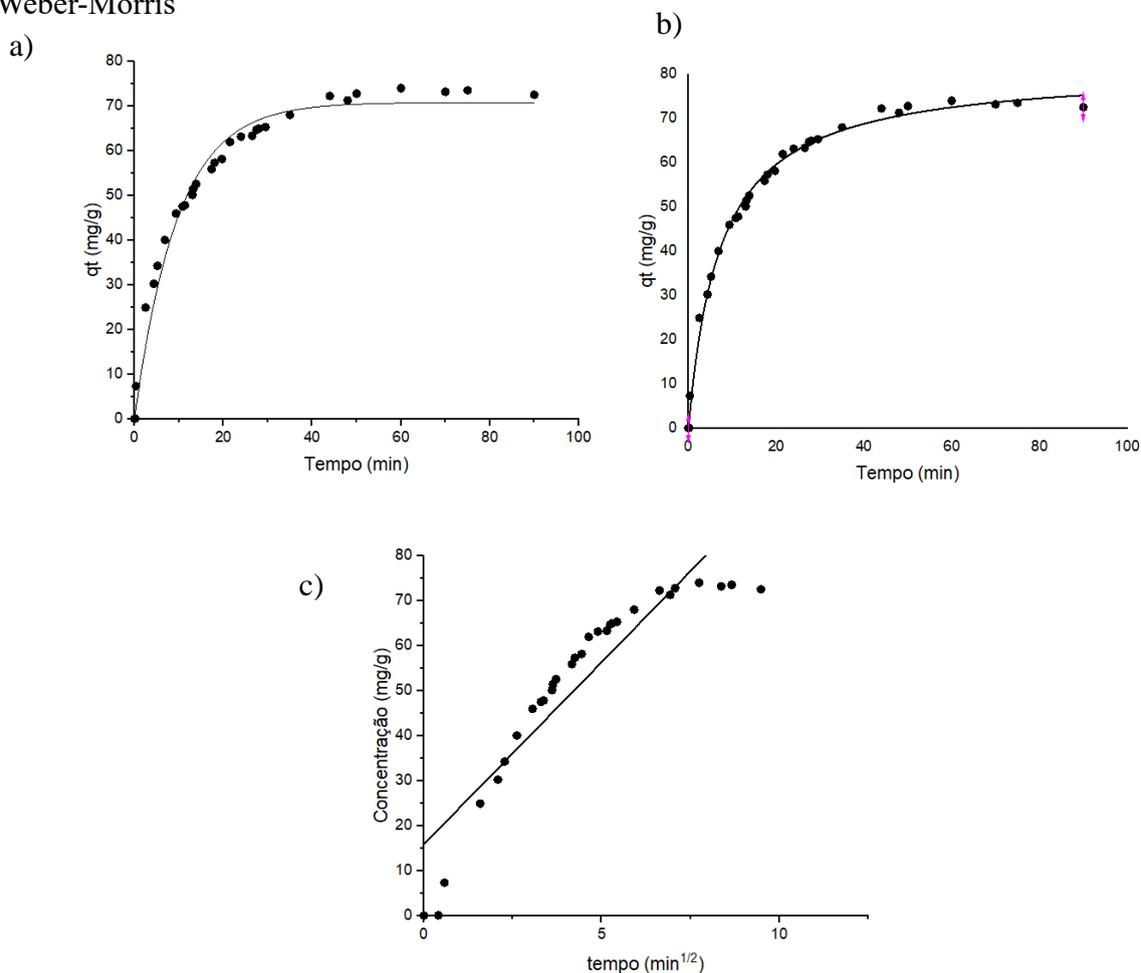
Fonte: Autor (2020)

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA, concentração 2,0 mg bIgG/mL

Concentração de bIgG (mg/mL)	qt experimental (mg/g)	Parâmetros dos modelos cinéticos				
		2,0	133,572	Pseudo-primeira ordem		
k_1 (1/min)	qt (mg/g)			Chi ²	R ²	h (mg/g.min)
$0,0256 \pm 0,0026$	$133,51 \pm 4,38$			93,19	0,970	5,33
Pseudo-segunda ordem						
k_2 (g/mg.min)	qt (mg/g)			Chi ²	R ²	$t_{1/2}$
$2,3 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$	$152,27 \pm 6,33$			78,87	0,955	28,55
Weber-Morris						
K_{di} (mg/g.min ^{0.5})	C			Chi ²	R ²	
$8,659 \pm 0,745$	$19,34 \pm 6,66$			267,64	0,875	

Fonte: Autor: (2020)

Figura 33 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 0,5 mg bIgG/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos (—) a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris



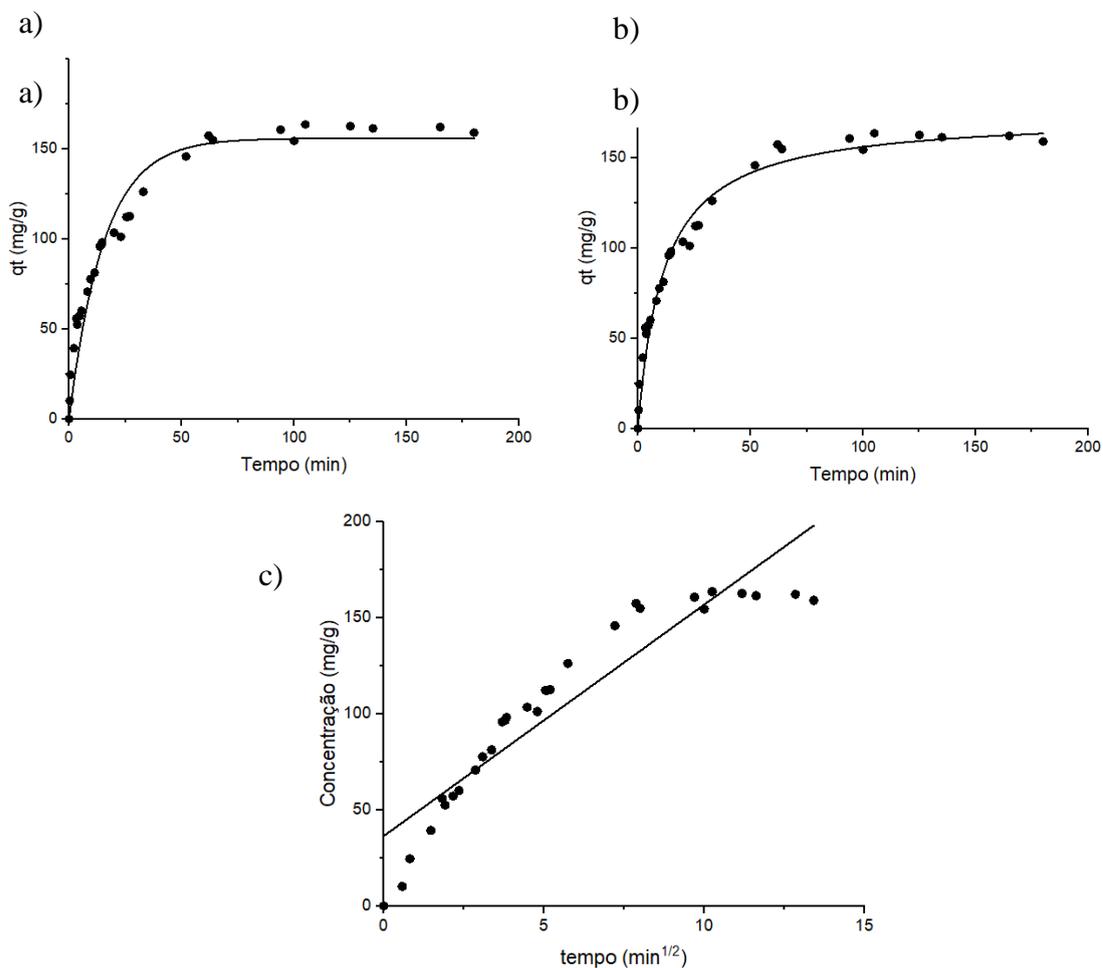
Fonte: Autor (2020)

Tabela 12 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, concentração de 0,5 mg bIgG/mL.

Concentração de bIgG (mg/mL)	qt experimental (mg/g)	Parâmetros dos modelos cinéticos				
		0,5	75,021	Pseudo-primeira ordem		
k_1 (1/min)	qt (mg/g)			Chi ²	R ²	h (mg/g.min)
$0,105 \pm 0,006$	$67,58 \pm 1,10$			9,71	0,97	10,75
Pseudo-segunda ordem						
k_2 (g/mg.min)	qt (mg/g)			Chi ²	R ²	$t_{1/2}$ (min)
$0,0016 \pm 8,33 \times 10^{-5}$	$81,98 \pm 0,89$			2,56	0,995	7,62
Weber-Morris						
K_{di} (mg/g.min ^{0,5})	C			Chi ²	R ²	
$8,096 \pm 0,66$	$15,85 \pm 3,38$			75,81	0,835	

Fonte: Autor (2020)

Figura 34 - Cinética de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ no sistema tamponante MOPS 25 mmol/L pH 6,5, concentração 2,0 bIgG mg/mL. Dados experimentais (●). Curvas ajustadas dos modelos cinéticos (—) a) Pseudo-primeira ordem, b) Pseudo-segunda ordem e c) Weber-Morris



Fonte: Autor (2020)

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos ajustados a partir dos dados experimentais da cinética da adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, concentração de 2,0 bIgG mg/mL.

Concentração de bIgG (mg/mL)	qt experimental (mg/g)	Parâmetros dos modelos cinéticos				
		2,0	163,652	Pseudo-primeira ordem		
		k_1 (1/min)	qt (mg/g)	Chi ²	R ²	h (mg/g.min)
		0,064 ± 0,005	150,96 ± 3,8	136,8	0,941	15,33
		Pseudo-segunda ordem				
		k_2 (g/mg.min)	qt (mg/g)	Chi ²	R ²	$t_{1/2}$ (min)
		5,1x10 ⁻⁴ ± 4,5x10 ⁻⁵	173,85 ± 3,5	58,8	0,977	11,27
		Weber-Morris				
		K_{di} (mg/g.min ^{0,5})	C	Chi ²	R ²	
		12,049 ± 0,894	36,40 ± 5,9	343,8	0,861	

Fonte: Autor (2020)

Na concentração de 0,5 mg/mL, o equilíbrio foi atingido em aproximadamente 90 minutos (Figura 31) e o q_t experimental foi de 66,55 mg/g de criogel seco, já o q_t calculado pelos modelos de pseudo-primeira-ordem (Eq. 2.5) e pseudo-segunda-ordem (Eq. 2.6) foram $68,07 \pm 2,17$ e $78,24 \pm 3,33$ mg/g, respectivamente. A taxa inicial de adsorção (h) e o tempo necessário para atingir metade da quantidade adsorvida no equilíbrio ($t_{1/2}$) foram calculados, com valores de 1,95 mg/g.min e 39,94 min. Na concentração de 2,0 mg/mL foram necessários 150 minutos para atingir o equilíbrio (Figura 32), com metade da quantidade adsorvida ($t_{1/2}$) em 28,55 min. O q_t experimental alcançado foi de 133,57 mg/g de criogel seco, já o q_t calculado pelos modelos foi $133,51 \pm 4,38$ mg/g para o de pseudo-primeira-ordem e $152,27 \pm 6,33$ mg/g para o de pseudo-segunda-ordem, além disso a taxa inicial de adsorção foi de 10,75 mg/g.min.

Para o criogel sem o íon metálico quelatado, em ambas as concentrações estudadas, o modelo de pseudo-primeira-ordem apresentou o melhor ajuste, obtendo além dos maiores R^2 (0,982 e 0,970), q_t do equilíbrio calculado mais próximos do encontrado experimentalmente, indicando que a adsorção de bIgG neste adsorvente possui como etapa limitante a difusão nos poros e não a interação entre o IDA e a proteína. O modelo de Weber-Morris (Eq. 2.7) foi ajustado aos dados experimentais com intuito de confirmar se realmente houve efeitos difusivos, e de fato, para a concentração de 0,5 mg/mL o modelo se ajustou bem aos dados ($R^2 = 0,94$). Além disso, o valor da constante C se aproximou de zero ($-0,598 \pm 1,37$), indicando que a etapa limitante do processo foi a difusão nos poros. Isso pode ser confirmado também pela reta gerada pelo gráfico plotado passando pela origem. Contudo, para a concentração de 2,0 mg/mL, o modelo não forneceu um bom ajuste ($R^2 = 0,875$), apesar dos dados cinéticos de adsorção nesta concentração terem sido melhor representados pelo modelo de pseudo-primeira-ordem. Além disso, a reta gerada pelo gráfico do modelo não intercepta a origem, o que indica que a difusão ocorre intrafilme, o que não é comum para monolitos macroporosos.

De acordo com o que foi apresentado nas Figuras 33 e 34 e nas Tabelas 12 e 13, o adsorvente PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ demonstrou comportamento diferente, apesar de que os dois modelos, tanto de pseudo-primeira-ordem quanto o de pseudo-segunda-ordem, apresentaram boa correção com os dados em ambas concentrações, $R^2 > 0,94$. Neste caso, o modelo de pseudo-segunda-ordem descreveu melhor os dados experimentais para adsorção de bIgG. Na primeira concentração estudada, 0,5 mg/mL foram necessários aproximadamente 60 minutos para alcançar o equilíbrio, com metade da quantidade adsorvida em 7,62 minutos ($t_{1/2}$) e taxa inicial de adsorção (h) de 10,75 mg/g.min. O q_t experimental atingindo foi de 75,021 mg/g de criogel seco. Já o q_t calculado pelos modelos de pseudo-primeira-ordem ($R^2=0,97$) e pseudo-segunda-ordem ($R^2=0,99$) foram $67,58 \pm 1,10$ mg/mL e $81,98 \pm 0,89$ respectivamente,

demonstrando maior proximidade do q_t do segundo modelo ao determinado experimentalmente. Para a maior concentração, 2,0 mg/mL o q_t experimental de 163,65 mg/g foi atingido após 100 minutos, e já o calculado pelos modelos foi $150,96 \pm 3,81$ mg/g para o de pseudo-primeira-ordem ($R^2=0,94$) e $173,85 \pm 3,52$ mg/g para o de pseudo-segunda-ordem ($R^2=0,97$). Com os dados obtidos pelo último modelo, ainda foi possível calcular o ($t_{1/2}$) no valor de 11,27 minutos e a taxa inicial de adsorção h , no valor de 15,33 mg/g.min. Dessa forma, é possível afirmar que o modelo de pseudo-segunda-ordem, também descreveu melhor os dados obtidos nesta condição.

Para confirmar que não houve efeitos difusivos na cinética de adsorção no criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ nas concentrações estudadas, o modelo matemático de Weber-Morris também foi ajustado aos dados cinéticos de adsorção experimentais, não demonstrando boa correlação tanto para a menor concentração, $R^2=0,83$, quanto para a maior concentração $R^2=0,86$. Com isto, conclui-se que para o adsorvente com íon metálico quelatado, nas concentrações iniciais de bIgG estudadas, 0,5 mg/mL e 2,0 mg/mL, o processo de adsorção é governado pela ligação entre o complexo IDA-Cu²⁺ e a bIgG.

Os resultados obtidos para a cinética de adsorção de bIgG nos adsorventes PAAm-Alg-AGE-IDA e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, demonstram que o adsorvente com o íon metálico cobre quelatado possui maior capacidade de adsorção dinâmica de bIgG, corroborando com o descrito em literatura para adsorventes com íons metálicos imobilizados (BRESOLIN *et al.* 2009; BLOCK *et al.*, 2009). O tempo para atingir o equilíbrio para o PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ também foi menor, o que pode ter ocorrido devido a etapa limitante da adsorção em PAAm-Alg-AGE-IDA ser governada pela difusão, retardando o processo de transferência de massa e a interação entre o IDA e a bIgG. Além disso, por meio da taxa inicial de adsorção, foi possível concluir que ao aumentar a concentração de bIgG, inicialmente, a adsorção ocorre mais rapidamente.

Daoud-Attieh *et al.* (2013) também avaliaram os modelos de pseudo-primeira-ordem, pseudo-segunda-ordem e de Weber-Morris para o criogel de poli (2-hidroxietil metacrilato) com n-vinilimidazol [poli(HEMA-VIM)] como ligante pseudobioespecífico. Neste caso, para a cinética de adsorção de bIgG ao criogel, o modelo de pseudo-segunda-ordem descreveu melhor os dados demonstrando que para este monolito, a interação entre o ligante e a bIgG é a etapa limitante da adsorção. O q_t do equilíbrio obtido no estudo realizado por estes pesquisadores para concentração de bIgG de 1 mg/mL, foi igual 8,65 mg/g de criogel seco, valor bem abaixo do que foi encontrado neste trabalho para ambos adsorventes.

Pavan e colaboradores em 2017 estudaram os parâmetros cinéticos da adsorção de IgG

humana em gel de agarose ativado com bisoxirano com orto-fosfo-tirosina como ligante. A capacidade de adsorção obtida para este adsorvente foi de 71,38 mg/g para a concentração de 0,5 mg/mL e 117,63 mg/g para a concentração de 2,0 mg/mL de hIgG diluída em tampão NaP 10 mmol/L pH 6,0. Neste caso, apesar de q_t do equilíbrio na menor concentração estar bem próximo ao encontrado neste trabalho para os dois adsorventes, o obtido para concentração de 2,0 mg/mL ficou abaixo. Porém é importante ressaltar que as matrizes cromatográficas, o anticorpo e as condições empregadas são diferentes.

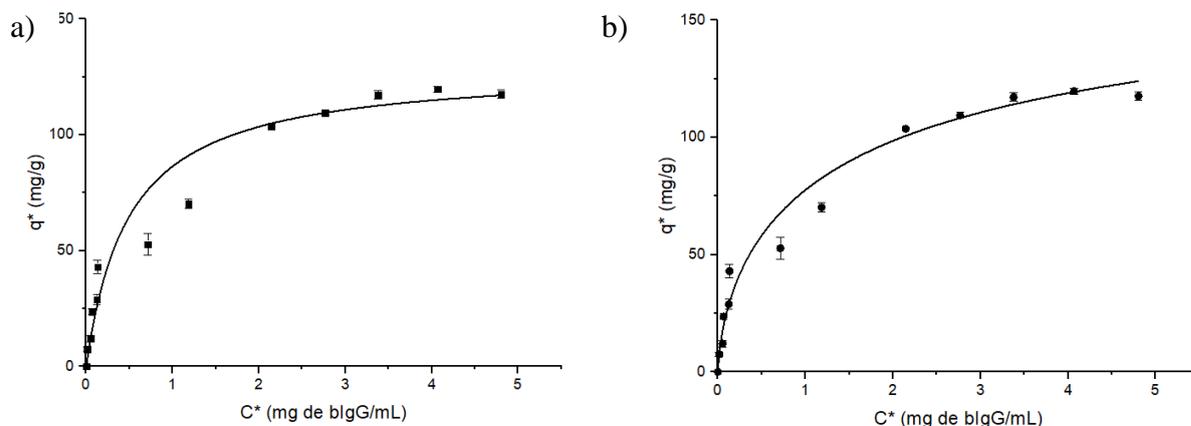
Oliveira e colaboradores em 2015 avaliaram a capacidade dinâmica de uma matriz de agarose ativada com bisoxirano e orto-fosfo-serina (OPS) imobilizada como ligante na adsorção de IgG_{2a} monoclonal de murinos. Os autores encontraram o q_t do equilíbrio após 100 minutos igual a 4,125 mg de IgG_{2a} por g de gel e o modelo de pseudo-primeira-ordem se ajustou melhor aos dados experimentais quando empregado a concentração de 0,2 mg/mL de IgG_{2a} mAb diluída em Tris-HCl 25 mmol/L em pH 7,0.

Apesar de todos os autores citados terem realizado estudos em diferentes colunas cromatográficas, é possível concluir que, tanto PAAm-Alg-AGE-IDA quanto PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ possuem alta capacidade dinâmica de adsorção de bIgG quando empregado o sistema tamponante MOPS 25 mmol/L em pH 6,5 e que a presença do íon metálico cobre diminui a adsorção de bIgG na matriz, adsorvendo também outras impurezas do soro bovino, como observado no item 4.6.

4.8 Isotermas de adsorção de bIgG nos criogéis com IDA e IDA-Cu²⁺ imobilizados

Uma vez determinada a cinética de adsorção de bIgG foram realizados ensaios para obtenção dos dados experimentais de adsorção da bIgG no equilíbrio para os criogéis PAAm-Alg-AGE-IDA e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺. Os experimentos foram conduzidos em batelada, à temperatura ambiente (25 °C ± 1) como descrito no item 3.2.6, visando determinar a capacidade máxima de adsorção (q^*) e a constante de dissociação (K_d , $K_{d(LF)}$) dos complexos IDA-bIgG e IDA-Cu²⁺-bIgG. O resultados obtidos para adsorção de bIgG nos adsorventes PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ e PAAm-Alg-AGE-IDA estão apresentados nas Figuras 35 e 36, respectivamente, e os parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich estão apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Figura 35 - Dados experimentais de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ a 25° C no equilíbrio (●) e curvas ajustadas dos modelos de a) Langmuir e b) Langmuir-Freundlich



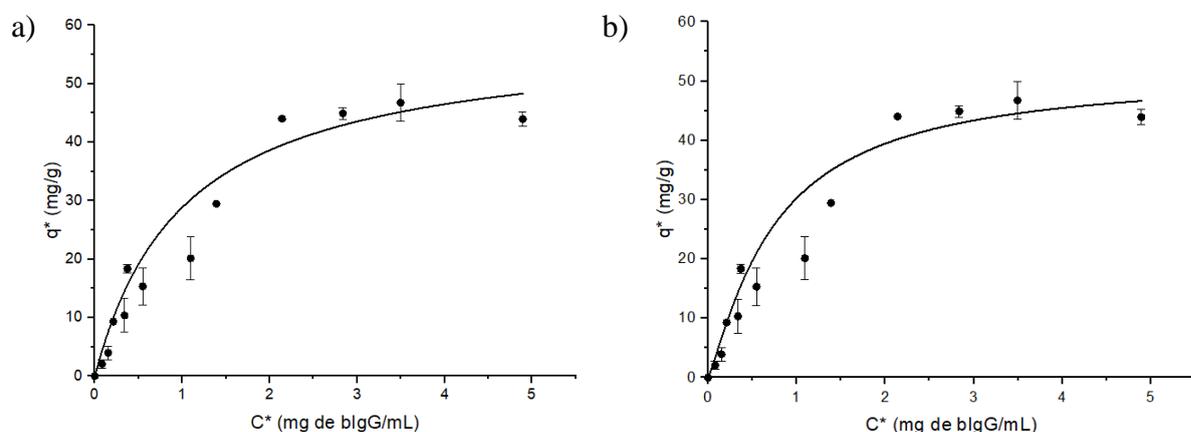
Fonte: Autor (2020)

Tabela 14 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺

q* experimental (mg/g)	Modelos/ Parâmetros				
	118,17 ± 2,15	Langmuir			
K_d (mol/L) x10⁶		q* (mg/g)	Chi²	R²	
3,27 ± 1,60		129,68 ± 6,44	23,55	0,984	
Langmuir-Freundlich					
K_{d(LF)} (mol/L) x10⁶		q* (mg/g)	N	Chi²	R²
9,33 ± 0,35	148,09 ± 31,42	0,998 ± 0,247	12,13	0,992	

Fonte: Autor (2020)

Figura 36 - Dados experimentais de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA a 25° C no equilíbrio (●) e curvas ajustadas dos modelos de a) Langmuir e b) Langmuir-Freundlich



Fonte: Autor (2020)

Tabela 15 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA

q* experimental (mg/g)	Modelos/ Parâmetros				
44,88 ± 0,54	Langmuir				
	Kd (mol/L) x10 ⁶	q* (mg/g)	Chi ²	R ²	
	6,83 ± 1,15	58,41 ± 4,77	9,29	0,961	
	Langmuir-Freundlich				
	K _{d(LF)} (mol/L) x10 ⁶	q* (mg/g)	N	Chi ²	R ²
	4,67 ± 1,2	51,50 ± 6,84	1,49 ± 0,25	9,37	0,9673

Fonte: Autor (2020)

Como pode ser observado na Tabela 14, para o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, representaram bem os dados experimentais, com R² iguais a 0,984 e 0,992, respectivamente. Em relação à quantidade máxima adsorvida no equilíbrio os dois modelos apresentaram valores distintos, 129,68 ± 6,44 mg de IgG por g de criogel para o modelo de Langmuir e 148,09 ± 31,42 mg de IgG por g de criogel para o de Langmuir Freundlich, além disso, o primeiro apresentou maior chi² comparado ao ultimo (23,55 e 12,13 respectivamente). As constantes de dissociação dos modelos foram em ordem de magnitude de 10⁻⁶, K_d= 3,27 ± 1,60 e K_{d(LF)}= 9,33 ± 0,35 mol/L, indicando afinidade média para o complexo IDA-Cu²⁺-bIgG, o que é típico de ligantes de afinidade pseudobioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989).

O modelo de Langmuir-Freundlich possui o parâmetro adicional *n*, que indica se há ou não cooperatividade entre proteínas. No caso do PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, este parâmetro foi igual 1,0, indicando que não há cooperatividade na adsorção de bIgG na matriz cromatográfica. Isso indica que não existem forças atrativas causadas pelas interações laterais por exemplo, que podem ser comuns no mecanismo de adsorção em IMAC (VIJAYALAKSHMI, 1989; SHARMA & AGARWAL, 2001a). Estes resultados indicam que os dados para adsorção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ podem ser bem representados dentro da idealidade proposta pelo modelo de Langmuir.

Bakhshpour e colaboradores (2016) sintetizaram um criogel de poli (hidroxietilmetacrilato) PHEMA com poli (etileno imino) PEI como agente quelante e íons cobre imobilizados. Este adsorvente alcançou q* no equilíbrio de 75 mg de IgG humana/g de adsorvente seco. Por outro lado, Altintas *et al.* (2007), para esferas de poli (glicidil metacrilato) com IDA-Cu²⁺ imobilizado, encontraram um q* de 172,4 mg/g, também para adsorção de IgG.

humana..Valores superiores foram constatados por Borsoi-Ribeiro *et al.* (2013), os autores demonstraram que para o gel de agarose com IDA-Cu²⁺ imobilizado, a quantidade máxima adsorvida de IgG humana foi de 516,7 mg/g e para membranas de fibra ocas com o mesmo quelato imobilizado, 337,9 mg/g de suporte seco.

A partir destes resultados, pode-se dizer que o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ possui uma quantidade máxima adsorvida no equilíbrio intermediária dentre diferentes tipos de materiais com o mesmo íon metálico imobilizado. Isto se deve ao fato de criogéis possuírem menor área superficial devido aos macroporos, o que resulta em uma menor densidade de ligantes e, portanto, menor capacidade de adsorção. Outro fator que contribui também é o método de ativação, que neste trabalho foi escolhido adicionar AGE na síntese do criogel, resultando em menor quantidade de grupamentos epóxi disponível para imobilização do agente quelante em relação às matrizes ativadas com epícloridrina, por exemplo, como as esferas e o gel de agarose. A constante de dissociação, K_d , para as matrizes pesquisadas, também ficou entre o intervalo de 10^{-5} e 10^{-6} mol/L, corroborando com o esperado para ligantes pseudobioespecíficos.

A Tabela 15 apresenta os parâmetros dos modelos ajustados para o criogel sem o íon metálico imobilizado, PAAm-Alg-AGE-IDA, nas mesmas condições. Ambos os modelos representaram bem os dados experimentais, com $R^2 = 0,961$ e $\chi^2 = 9,29$ para o Langmuir e $R^2 = 0,967$ e $\chi^2 = 9,37$ para o Langmuir-Freundlich. Em relação à quantidade máxima adsorvida de bIgG, q^* , os valores apresentaram grande diferença, $58,41 \pm 4,77$ mg/g para o primeiro modelo e $46,51 \pm 2,37$ mg/g para o segundo, indicando queo valor calculado pelo modelo de Langmuir-Freundlich se aproximou mais do valor encontrado experimentalmente, $51,50 \pm 6,84$ mg/g. Em relação a constante de dissociação K , tanto o K_d quanto o $K_{d(LF)}$ demonstraram afinidade média do complexo IDA-bIgG, com magnitude de 10^{-6} , $K_d = 6,83 \pm 1,15 \times 10^{-6}$ e $K_{d(LF)} = 4,67 \pm 1,2 \times 10^{-6}$ mol/L. O parâmetro n do modelo de Langmuir-Freundlich apresentou valor maior que a unidade, $1,49 \pm 0,25$, indicando a heterogeneidade da superfície e a presença de efeitos cooperativos positivos na adsorção de bIgG no criogel.

Bresolin *et al.* (2020), em seu estudo com membranas de fibras ocas derivatizadas com IDA, determinou um q^* no valor de 74,1 mg/g de anticorpo monoclonal murino por massa seca de membrana, o K_d também de magnitude de 10^{-6} e o $n = 1,16 \pm 0,24$. Por outro lado, Daoud-Attieh e colaboradores em 2013 apresentaram que para a matriz composta por um criogel de poli (2-hidroxietil-metacrilato-n-vinilimidazol), no qual o anel imidazol agia como ligante pseudobioespecífico, o q^* foi 22,4 mg/g de bIgG por massa do criogel e o parâmetro n do

modelo de Langmuir-Freundlich foi maior que 1 para adsorção de IgG proveniente do soro bovino.

Mourão e colaboradores em 2019, por sua vez, avaliaram a quantidade máxima adsorvida dos criogéis de poliacrilamida/alginate ativados com bisoxirano utilizando orto-fosfo-L-tirosina como ligante (PAAm-Alg-Bix-P-Tyr) e sem ativação (PAAm-Alg). Os autores encontraram q^* igual a 36,12 mg/g para o primeiro e para o segundo 36,73 mg/g de IgG humana por grama de criogel seco. Ao utilizar o mesmo ligante em uma matriz de gel de agarose comercial Pavan e colaboradores em 2017, determinaram um q^* no valor de 150 mg/g de gel. No estudo conduzido nos criogéis, o valor do parâmetro de Langmuir-Freundlich, n , foi maior que 1, já para de gel de agarose o valor foi menor que 1, demonstrando que para PAAm-Alg e PAAm-Alg-Bix-P-Tyr, a adsorção tem cooperatividade positiva e para agarose-P-Tyr, cooperatividade negativa. Em relação ao K_d e o $K_{d(LF)}$ dos estudos, ficaram entre 10^{-5} e 10^{-7} respectivamente, representando afinidade média dos complexos formados com a hIgG.

Tendo em vista estes resultados, é possível dizer que a q^* encontrada neste trabalho para PAAm-Alg-AGE-IDA é intermediária dentre os outros adsorventes pesquisados, porém, é importante ressaltar que é vantajosa, pois o ácido iminodiacético possui preço inferior ao do ligante orto-fosfo-L-tirosina, por exemplo, além das vantagens dos criogéis em relação às outras matrizes cromatográficas.

Para os criogéis estudados neste trabalho, PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ e PAAm-Alg-AGE-IDA, o adsorvente com o íon metálico cobre quelatado obteve melhor resultado, q^* aproximadamente 2,6 vezes maior em comparação ao sem íon metálico. Uma explicação possível para este fenômeno se deve ao fato de que o cobre necessita apenas de um resíduo de histidina exposto na superfície da proteína para interagir, e nos experimentos realizados com o PAAm-Alg-AGE-IDA a interação ocorre por meio de cargas diferentes entre o adsorvente e o anticorpo. Assim, por se tratar de um anticorpo policlonal com grande intervalo de pI, apenas uma parte da bIgG consegue interagir com a matriz cromatográfica. Em relação aos modelos, enquanto para o PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ o modelo de Langmuir representou melhor os dados, o PAAm-Alg-AGE-IDA foi melhor representado por Langmuir-Freundlich, demonstrando mecanismos de adsorção diferentes.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

Neste trabalho foi sintetizado um criogel macroporoso de poliacrilamida/alginate contendo alil diglicidil éter (PAAm-Alg-AGE) em forma de monolito. O criogel apresentou estrutura elástica e esponjosa, macroporos bem definidos e interconectados, além de boa capacidade de inchamento, provendo as características necessárias para ser empregado como fase estacionária em cromatografia de afinidade. A adição de AGE permitiu a derivatização do monolito com o agente quelante IDA (PAAm-Alg-AGE-IDA), possibilitando a posterior quelatação dos íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} , obtendo 267,67 e 72,64 μmol de íon metálico por g de criogel seco, respectivamente.

O criogel PAAm-Alg-AGE-IDA- Me^{2+} foi empregado para adsorção de bIgG em tampão MOPS 25 mmol/L em pH 6,5, retendo até 75% da proteína alimentada (4 mg/mL). Constatou-se que tanto o pH, a condutividade, quanto a natureza do sistema tamponante influenciaram a adsorção de bIgG na matriz cromatográfica com e sem íons metálicos quelatados.

Os experimentos de purificação de IgG a partir do soro bovino diluído no tampão de adsorção em criogéis com os íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados apresentaram grau de pureza da proteína alvo de aproximadamente 80%. No entanto, foi observado forte retenção de bIgG em PAAm-Alg-AGE-IDA- Ni^{2+} e a baixa capacidade de adsorção fez com que fosse selecionado o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} para análises posteriores. Em conformidade com a condição que promoveu a maior quantidade de bIgG de alta pureza injetada, o sistema tamponante MOPS 25 mmol/L em pH 6,5 propiciou a melhor condição de purificação para o íon metálico cobre, demonstrada por meio da eletroforese SDS-PAGE e imunodifusão radial, sendo este adsorvente adequado para captura da bIgG a partir do soro.

Com base na literatura, foi avaliado também o potencial do criogel controle PAAm-Alg-AGE-IDA para a purificação de bIgG por troca iônica entre o anticorpo e a matriz cromatográfica na melhor condição tamponante (MOPS 25 mmol/L em pH 6,5). O criogel sem íon metálico quelatado, apresentou porcentagens de pureza de bIgG similar a do íon metálico Cu^{2+} (78% e 84%, para IDA- Cu^{2+} e IDA, respectivamente). As curvas de ruptura demonstraram que mesmo após saturação, a seletividade dos monolitos PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} e PAAm-Alg-AGE-IDA, não foi prejudicada, atingindo valores de pureza de 75% e 88%, respectivamente.

Na melhor condição tamponante também foram realizados experimentos cinéticos e de adsorção de bIgG no equilíbrio, permitindo, a partir dos dados obtidos, determinar parâmetros

de modelos termodinâmicos (Langmuir e Langmuir-Freundlich) e cinéticos (pseudo-primeira-ordem, pseudo-segunda-ordem e de Weber-Morris) para ambos criogéis, com Cu^{2+} quelatado e o controle. Segundo os valores dos parâmetros ajustados dos modelos cinéticos, concluiu-se que a adsorção da bIgG no monolito PAAm-Alg-AGE-IDA é governada pela difusão nos poros com q_t iguais a $68,07 \pm 2,17$ e $133,51 \pm 4,38$ mg/g de criogel seco para as concentrações de bIgG de 0,5 e 2,0 mg/mL respectivamente. Por outro lado, para o PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} , obteve-se valores de q_t iguais a $81,98 \pm 0,89$ e $173,85 \pm 3,52$, porém a adsorção de bIgG foi governada pela interação entre IDA- Cu^{2+} -bIgG. Os experimentos para adsorção de bIgG no equilíbrio resultaram em, para o PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} , o modelo de Langmuir ($q^* = 129,689 \pm 6,44$, $K_d = 3,27 \pm 1,60 \times 10^{-6}$ e $r^2 = 0,985$) representou melhor os dados, diferentemente do PAAm-Alg-AGE-IDA, que foi melhor representado por Langmuir-Freundlich ($q^* = 51,498 \pm 6,841$, $K_{d(LF)} = 4,67 \pm 1,2 \times 10^{-6}$, $n = 1,49 \pm 0,25$ e $r^2 = 0,967$). A partir dos resultados da cinética de adsorção e dos parâmetros termodinâmicos, conclui-se que os adsorventes possuem capacidade (q^*) de adsorção que se comparam a literatura, apresentam afinidade característica de ligantes pseudobioespecíficos e possuem mecanismos diferentes de interação. Além disso, para o criogel sem o íon metálico quelatado há competitividade positiva na adsorção de bIgG.

Em termos de captura de bIgG, quando empregado soro bovino, o agente quelante IDA foi mais eficiente em adsorver a IgG, porém, nos experimentos nos quais o anticorpo pré purificado foi empregado, o complexo IDA- Cu^{2+} demonstrou maior capacidade em adsorver o anticorpo.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que criogéis a base de PAAm e Alg com IDA imobilizado apresentam maior potencial para ser empregado como fase estacionária em cromatografia para purificação de IgG a partir do soro bovino criogéis com o quelato IDA- Cu^{2+} imobilizado.

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados de purificação de IgG do soro bovino obtidos por este trabalho utilizando o criogel PAAm-Alg-AGE-IDA com e sem os íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados e a literatura pesquisada, torna-se relevante a exploração de outras condições como:

- 1) Avaliar o potencial do criogel controle PAAm-Alg-AGE-IDA em outras condições tamponantes, como Tris-HCl;
- 2) Testar outros íons metálicos, como Co^{2+} e Zn^{2+} na purificação de bIgG;
- 3) Avaliar o potencial do monolito na purificação de fragmentos de bIgG.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, M. Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 39, p. 239-292, 2005.

AGAWAL, G. P; SHARMA, S. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 37, p. 3491-3511, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.

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

ALWAN, S.; MASHIKI, A.; LI-CHAN, E.; NAKAI, S. Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1747-1755, 1988.

ALTINTAS, E. B.; TÜZMEN, N.; UZUN, L.; DENIZILI, A. Immobilized Metal Affinity Adsorption for Antibody Depletion from Human Serum with Monosize Beads. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.26, p.514-520, 2013.

ANDAÇ, M.; DENIZILI, A. Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies. **RSC Advances.**, v. 4, p. 31130, 2014.

ANDAÇ, M.; GALAEV, I.Y.; DENIZLI, A. Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, 2016, p. 69-80.

AQUINO, L.C.L.; SOUSA, H.R.T.; MIRANDA, E.A.; VILELA, L.; BUENO, S.M.A. Evaluation of IDA-PEVA hollow fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin. **Journal of Chromatography B**, v. 834, p. 68-76, 2006.

ARNOLD, J. N.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; SIM, R. B. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. **Immunology Letter**, v. 106, p. 103-110, 2006.

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

ARORA, S.; SAXENA, V.; AYYAR, V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. **Methods**, v. 116, p. 84-94, 2017.

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

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

ASMUTH, D.M.; MA, Z.M.; ALBANESE, A.; SANDLER, N.G.; DEVARAJ, S.; KNIGHT, T.H.; FLYNN, N.M.; YOTTER, T.; GARCIA, J-C.; TSUCHIDA, E.; WU, T.T.; DOUEK, D.C.; MILLER, C.J. Oral serum-derived bovine immunoglobulin improves duodenal immune reconstitution and absorption function in patients with HIV enteropathy. **Aids**, v. 27, p. 2207-17, 2013.

AYYAR, B.V.; ARORA, S.; MURPHY, C., O'KENNEDY, R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. **Methods**, v.56, p.116-129, 2011.

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

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

BAKSHPOUR, M., DERAZSHAMSHIR, A.; BARELI, 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.

BAKSHPOUR, M.; BERELI, N.; SENEL, S. Preparation and characterization of thiophilic cryogels with 2-mercapto ethanol as the ligand for IgG purification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 261-268, 2014.

BAKSHPOUR, M.; IDIL, N.; PERÇIN, I. S; DENIZLI, A. Biomedical applications of polymeric cryogels. **Applied Science**, v. 9, p. 553-575. 2019.

BELEW, M.; PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography, Effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. **Journal of Chromatography A**, v. 516, p. 333-354, 1990.

BEITL, R.R.; ATAANI, M.M. Immobilized metal affinity chromatography and related techniques. **AIChE Symposium Series**, v. 88, n. 290, 34-43, 1992.

BIBI, N.S.; SINGH, N.K.; DSOUZA, R.N.; AASIM, M.; FERNÁNDEZ-LAHORE, M. Synthesis and performance of megaporous immobilized metal-ion affinity cryogels for recombinant protein capture and purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p; 145-149, 2013.

BILLAKANTI, J.M.; FEE, C.J.; NAIK, A.M.; CARBONEEL, R.G. Application of peptide chromatography for the isolation of antibodies from bovine skim milk, acid whey and colostrum. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 199-207, 2014.

BIOPHARMACEUTICALS MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2021 – 2026), **Business Wire**, 2021. Disponível em: <<https://www.businesswire.com/news/home/20210301005774/en/Global-Peptide-Therapeutics-Market-2021-to-2026---Growth-Trends-COVID-19-Impact-and-Forecasts---ResearchAndMarkets.com>> Acesso em: 01 de março de 2021.

BLOCK, H.; MAERTENS, B.; SPRIESTERSBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; LABAHN, J.; SCHÄFER, F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. **Methods in Enzymology**, v. 463, p.439-473, 2009.

BOBER, P.; CAPÁKOVÁ, Z.; ACHARYA, U.; ZASOŇSKA, B.A.; HUMPOLÍČEK, P.; HODAN, J.; HROMÁDKOVÁ, J.; STEJSKAL, J. Highly conducting and biocompatible polypyrrole/poly(vinyl alcohol) cryogels, **Synthetic Metals**, v. 252, p. 122-126, 2019.

BOI, C.; ANDREA MALAVASI, A.B.; RUBEN, G.; CARBONELL, B.; GARY, G.A. Direct comparison between membrane adsorber and packed column chromatography performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, 2020.

BORSOI-RIBEIRO, M.; VIJAYALAKSHMI, M.A.; TODOROVA-BALVAY, D.; BUENO, S.M.A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes. **Journal of Chromatography. B**, v. 861, p. 64-73, 2008.

BORSOI-RIBEIRO, M.; BRESOLIN, I. T. L.; VIJAYALAKSHMI, M.; BUENO, S. M. A. Behavior of human immunoglobulin g adsorption onto immobilized Cu(II) affinity hollow-fiber membranes. **Molecular Recognition**. v. 26, p. 514-520, 2013.

BORBA, C. E. **Modelagem da Remoção de Metais Pesados em Coluna de Adsorção de Leito Fixo**. [s.l.] Unicamp, 2006.

BOSCHETTI, E. The use of thiophilic chromatography for antibody purification: A review. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 49, p. 361-389, 2001.

BOSSI, A.; RIGHETTI, P. G. Generation of peptide maps by capillary zone electrophoresis in isoelectric iminodiacetic acid. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2012-2018, 1997.

BOTTOMLEY, S.P.; SUTTON, B.J.; GORE M.G. Elution of human IgG from affinity columns containing immobilised variants of protein A. **Journal of Immunological Methods**, v. 182, p. 185-192, 1995.

BODEN, V.; WINZERLING, J.J.; VIJAYALAKSHMI, M.; PORATH, J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. **Journal of Immunological Methods**, v. 181, p. 225-235, 1995.

BOLSTER, C.H.; HORNBERGER, G.M. On the use of linearized Langmuir equations. **Nutrient Management & Soil Plant Analysis**, v 71, p. 1796-1806, 2007.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use, **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, 2001,

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, p. 248-254, 1976.

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A.; *Microbiologia Médica*, ed. 26, Porto Alegre: AMGH, 2014.

BRESOLIN, I. T. L.; BORSOI-RIBEIRO, M; CARO, J. R.; DOS SANTOS, F. P.; DE CASTRO, M. P.; BUENO, S. M. A. Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: purification of human IgG by negative chromatography, **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 17-23, 2009.

BRESOLIN, I. T. L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; AUGUSTO, E. F. P.; VIJAYALAKSHMI, M. A.; BUENO, S. M. A. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for IgG₁ monoclonal antibodies purification: The effect of chelating ligand and support. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2148-2165, 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, p. 1288-1296, 2009.

BRESOLIN, I. T. L.; BRESOLIN, I.R.A.P. BUENO, S.M.A. Evaluation of iminodiacetic acid (IDA) as an ionogenic group for Adsorption of IgG₁ monoclonal antibodies by membrane chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, p. 810–823 2020.

BUTLER, J. E. Synthesis and distribution of immunoglobulins. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.163, p.795–798, 1973.

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

BUTLER, J.E. Biochemistry and biology of ruminant immunoglobulins. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 1-53, 1985.

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

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; SILVA, W.F.; MINIM, L.A.; SOARES, A.M.; CARVALHO, G.G.P.; DA SILVA, S.L. Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. **Food Chemistry**, v. 154, p. 308-314, 2014.

CELEBI, B. A Simple synthetic route for the preparation of a reversed-phase stationary phase

based on monosized-porous hydrogel beads and its chromatographic use for separation of small molecules. **Acta Chromatographica**, v. 29, p. 143-159, 2017.

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p.313-334, 2001.

CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 297, p. 179-202, 1984.

CHAMPAGNE, J.; DELATTRE, C.; SHANTHI, C.; SATHEESH, B.; DUVERNEUIL, L.; VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudoaffinity Chromatography Using a Convective Interaction Media®-Disk Monolithic Column, **Chromatographia**, v. 65, p. 639-648, 2007.

CHEN, J.; WANG, C. Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 701-706, 1991.

CHEN, K.; LEE, S.; SHOW, P.; HONG, S.; CHANG, Y. Direct recovery of malate dehydrogenase from highly turbid yeast cell homogenate using dye-ligand affinity chromatography in stirred fluidized bed. **Journal of Chromatography B**, v. 1100-1101, p.65-75, 2018.

CHEN, C.; KO, Y.; SHIEH, C.; LIU, Y. Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 380, p.34-40, 2011.

CHEEKS, M.C; KAMAL, N.; SORREL, A.; DARLING, D.; FARZANEH, F.; SLATER, N.K.H. Immobilized metal affinity chromatography of histidine-tagged lentiviral vectors using monolithic adsorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2705-2711, 2009.

CHEUNG, R.C.F.; WONG, J.H.; NG, T.B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, p.1411-1420, 2012.

CÖMERT, S.C.; ODABASI, M. Investigation of lysozyme adsorption performance of Cu²⁺-attached PHEMA beads embedded cryogel membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 34, p. 1-8, 2014.

DABROWSKI, A. Adsorption from theory to practice. **Advanced Colloid Interface Scientific**, v. 93, p. 135-224, 2001.

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.

DEMIRYAS, N.; TÜZMEN, N.; GALAEV, I.Y.; PISKIN, 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, p. 1808-1816, 2007.

DENIZLI, A.; ALKAN, M.; GARIPCAN, B.; ÖZKARA, S.; PISKIN, E. Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma. **Journal of**

Chromatography B, v. 795, p. 93-103; 2003.

DONG, S.; CHEN, L.; DAI, B.; JOHNSON, W.; YE, J.; SHEN, S.; YUN, J.; YAO, K.; LIN, D.Q.; YAO, S.J. Isolation of immunoglobulin G from bovine milk whey by poly(hydroxyethyl methacrylate)-based anion-exchange cryogel. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 2387-2393, 2013.

DONATI I., PAOLETTI S. Material Properties of Alginates. In: Rehm B. Alginates: Biology and Applications. Microbiology Monographs, ed.13. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.

DOULTANI, S.; TURHAN, K.N.; ETZEL, M.R. Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1737-1743, 2004.

EARNEST, C. P.; JORDAN, A. N.; SAFIR, M.; WEAVER, E.; CHURCH, T. S. Cholesterol-lowering effects of bovine serum immunoglobulin in participants with mild hypercholesterolemia. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 81, p. 792-779, 2005.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market, **mAbs**, v. 7, p. 9-14, 2015.

ELVIRO, M., VEJA, M.; VALLE, E.M.; GALÁN, M.A. Preparation and characterization of a macroporous agarose monolith as a stationary phase in IMAC chromatography. **Chemical Engineering Communications**, v. 206, p. 268-277, 2019.

ELKAK, A.; HAMADE, A.; NERELI, N.; ARMUTCU, C.; DENIZLI, A. Synthesis of hydroxyethyl-methacrylate-(L)-histidine methyl ester cryogels. Application on the separation of bovine immunoglobulin G. **Analytical Biochemistry**, v. 525, p. 1-7, 2017.

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

EVILI, S.; ORHAN, H.; AKTAS, P.S.; UYGUN, M.; UYGUN, D.A. Metal-chelated cryogels for amyloglucosidase adsorption: application for continuous starch hydrolysis. **Bulletin of Materials Science**, v. 140, p. 1660-1669, 2018.

FARIAS, T.; HAJIZADEH, S.; YE, L. Cryogels with high cisplatin adsorption capacity: Towards removal of cytotoxic drugs from wastewater. **Separation and Purification Technology**, v, 235, p. 116203, 2020.

FIEDLER, M; SKERRA, A. Use of thiophilic adsorption chromatography for the one step purification of a bacterially produced antibody F(ab) fragment without the need for an affinity tag. **Protein Expression and Purification**, v. 17, p.421-427, 1999.

FREEDMAN, D. J.; TACKET, C. O.; DELEHANTY, A.; MANEVAL, D. R.; NATARO, J.; CRABB, J. H. Milk Immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v 177, p. 662–667, 1998.

FLORIÁN-ALGARÍN, V.; ACEVEDO, A. Rheology and Thermotropic Gelation of Aqueous Sodium Alginate Solutions. **Journal of Pharmacy Innovation**, v. 5, p. 37-44, 2010.

FUKUMOTO, L.R.; LI-CHAN, E.; KWAN, L.; NAKAIL, S. Isolation of immunoglobulins from cheese whey using ultrafiltration and immobilized metal affinity chromatography. **Food Research International**, v. 27, p. 335-348, 1994.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 335- 360, 2001.

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

GAPPER, L.W.; COPESTAKE, D.E.; OTTER, D.E.; INDYK, H.E. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 93-109, 2007.

GEANKOPLIS, C. J. Transport Processes and Separation Process Principles: Includes Unit Operations. Minnesota: **Prentice Hall Professional Technical Reference**, 2003, 1026p.

GLOBAL BOVINE BLOOD PLASMA DERIVATIVES MARKET: SNAPSHOT, **Transparent Market Research**, 2018. Disponível em: <<https://www.transparencymarketresearch.com/bovine-blood-plasma-derivatives-market.html>> Acesso em: 12 de agosto de 2019.

GÓES, L.C.; MIRANA, E.A.; BUENO, S.M.A. Interaction of histidine-tagged human proinsulin with immobilized nickel ion: Effect of chelating ligand and thermodynamics analysis, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 369, p. 176-185, 2010.

GOLDMAN, A. Immunologic supplementation of cow's milk formulations. **Bulletin-International Dairy Federation**, v. 244, p. 38-42, 1989.

GOLIKOV, A.; MALAKHOVA, I.; AZAROVA, Y.; ELISEIKINA, M.; PRIVAR, Y.; BRATSKAYA, S. Extended Rate Constant Distribution Model for Sorption in Heterogeneous Systems. 1: Application to Kinetics of Metal Ion Sorption on Polyethyleneimine Cryogels. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 59, p. 1123-1234, 2020.

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

GURGEL, V.; CARBONELL, R.G.; SAWASGOOD, H.E. Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin. **Bioseparation**, v. 9, p. 385-392, 2000.

GUTIÉRREZ, R., VALLE, E.M., MARTÍN DEL VALE, E.M. e GALÁN, M.A. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. **Separation and Purification Reviews**, v.36, p.71-111, 2007.

GURIKOV, P.; SMIRNOVA, I. Non-conventional methods for gelation of alginate. **Gels**, v. 4, p. 1-14, 2018.

HAHN, R.; SCHULZ, P.; SCHAUPP, C.; JUNGBAUER, A. Bovine whey fractionation based

on cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.2, p. 277-287, 1998.

HAMILTON, R. G. The human IgG subclasses book, ed. 1, Calbiochem-Novabiochem, Baltimore: MD, 2001.

HART, S.R.; WATERFIELD, M.D; BURLINGAME, A.L.; CRAMER, R. Factors governing the solubilization of phosphopeptides retained on ferric NTA IMAC beads and their analysis by MALDI TOFMS, **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, p. 1042-1051, 2002.

HAUGHEY, S.A.; ELLIOTT, C.T.; OPLATOWSKA, M.; STEWART, L.D.; FRIZZELL, C.; CONNOLLY, L.; Production of a monoclonal antibody and its application in an optical biosensor-based assay for the quantitative measurement of pantothenic acid (vitamin B5) in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 134, p. 540-545, 2012.

HEIDEBRECHT, H. J.; KAINZ, B.; SCHOPF, R.; GODL, K.; KARCIER, Z.; KULOZIK, U.; FÖRSTER, B. Isolation of biofunctional bovine immunoglobulin G from milk- and colostrum whey with mixed-mode chromatography at lab and pilot scale, **Journal of Chromatography A**, v 1562, p. 59-68, 2018.

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

HO, Y.S. Review of second-order models for adsorption systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 681-689, 2006.

HO, Y.S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption process. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 451-465, 1999.

HOLT, L.; HERRING, C.; JESPERS, L.S.; WOOLVEN, B.P.; TOMLINSON, I.M. domain antibodies: proteins for therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 484-490, 2003.

HUTCHENS, T. W.; YIP, T. T.; PORATH, J. Protein interaction of immobilized ligands: Quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatography approaches using immobilized metal affinity adsorbents. **Analytical Biochemistry**, v. 170, p. 168-182, 1988.

INDYK, H.E.; WILLIAMS, J.W.; PATEL, H.A. Analysis of denaturation of bovine IgG by heat and high pressure using an optical biosensor, **International Dairy Journal**, v. 18, p. 359-366, 2008.

JAIN, E.; KUMAR, A. Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production, **Nature Protocols**, v. 8, p. 821-835, 2013.

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

JANEWAY, C.A. Imunologia de Janeway. Ed. 8ª, São Paulo: **Artmed**, 2014.

JEJURIKAR, A.; SEOW, X. T.; LAWRIE, G.; MARTIN, D.; JAYAKRISHANAN, A.; GRONDAHL, L. Degradable alginate hydrogels crosslinked by the macromolecular crosslinker alginate dialdehyde. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 9751-9758, 2012.

KAGEDAL, L. Immobilized metal ion affinity chromatography. In: Jason, J. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications**. 3.ed. John Wiley & Sons, Inc., p.183-201, 2011.

KANG, H.J.; CHOE, W.; MIN, J.; LEE, Y.; KIM, B.M.; CHUNG, S.J. Cyclic peptide ligand with high binding capacity for affinity purification of immunoglobulin G. **Journal of Chromatography A**. v. 1466, p. 105-112, 2016.

KARPADE, A.; TETALA, K.K.R. Simplification of affinity macroporous monolith microfluidic column synthesis and its ability for protein separation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v, 181, p. 99-113, 2020.

KEMPE, H.; AXELSSON, A.; NILSSON, B.; ZACCHI, G. Simulation of chromatographic processes applied to separation of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 846, p. 1-12, 1999.

KLIMATCHEVA, E.; PANDINA, T.; REILLY, C.; TORNO, S.; BUSSLER, H.; SCRIVENS, M.; JONASON, A.; MALLOW, C.; DOHERTY, M.; PARIS, M.; SMITH, E.S.; ZAUDERER, M. CXCL13 antibody for the treatment of autoimmune disorders. **BMC Immunology**, v.6, p.1-17, 2015.

KONECNY, P.; BROWN, R.J.; SCOUTEN, W.H. Chromatographic purification of immunoglobulin G from bovine milk whey. **Journal of Chromatography A**, v. 673, p. 45-53, 1994.

KOISOR, A.; ANTOŠOVÁ, M.; FABER, R.; VILLAIN, L.; POLAKOVIC, M. Single-component adsorption of proteins on a cellulose membrane with the phenyl ligand for hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Membrane Science**, v. 442, p.216-224, 2013.

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, p. 35-42, 2006.

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

LAGERGREN, S.Z. Theorie Der Sogenannten Adsorption Geloster Stoffe. **K. Sven. Vetenskapsakad. Handl**, v, 24, p. 1-39, 1898.

LAI, W.; LIN, S.-C. Hydroxyethyl cellulose-grafted loofa sponge-based metal affinity adsorbents for protein purification and enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, v. 74, p.141-147, 2018.

LALLI, E.; SILVA, J.S.; BOI, C.; SARTI, G.C.; Affinity Membranes and Monoliths for Protein

Purification. **Membranes**, v. 10, p. 1-12, 2020.

LAMBERT, J.M.; BERKENBLIT, A.; Antibody–Drug Conjugates for Cancer Treatment. **Annual Review of Medicine**, v. 69, p. 191-207, 2018.

LARSON, B.L.; Immunoglobulins of the mammary secretions. **Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins**, v. 2, p. 231-254, 1992.

LAZZAROTTO, I. T.; BERSOI-RIBEIRO, M; CARO, J. R.; DOS SANTOS, F. P.; DE CASTRO, M. P.; BUENO, S. M. A. Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: Purification of human IgG by negative chromatography, **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 17-23, 2009.

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

LI, S.; YANG, K.; LIU, L.; ZHAO, B.; CHEN, Y.; LI, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Surface sieving coordinated IMAC material for purification of His-tagged proteins. **Analytica Chimica Acta**, v. 997, p. 9-15, 2017

LINDMARK, R.; THORÉN-TOLLING, K.; SJÖQUIST, J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. **Journal of Immunological Methods**, v. 62, p. 1-13, 1983.

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

LOZINSKY, V.I. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. **Russian Chemical Bulletin**, v. 57, p. 1015—1032, 2008.

LOWE, C. R.; PEARSON, J. C. Affinity chromatography on immobilized dyes. **Methods in Enzymology**, v. 104, p. 97-113, 1984.

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

LUPELLAU, E., VON STOCKAR, U., VOGT, S., AND FREITAG, R. Development of a downstream process for the isolation and separation of monoclonal immunoglobulin A monomers, dimers and polymers from cell culture supernatant. **Journal of Chromatography A**, v. 796, p. 165–175, 1998.

LUONG, J.H.T.; NGUYEN, A.L.; MALE, K.B. Recent developments in downstream processing based on affinity interactions. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 281-286, 1987.

MARASCO, W.A.; SUI, J.; The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1421-1434, 2007.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, p.235-254, 1965.

MARCUZ, C. **Adsorção de IgG humana no criogel monolítico de acrilamida-alginato-alil-o-fosfo-l-tirosina**. 98f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

MARCUZ, C.; MOURÃO, C. A.; HAUPT, K.; BUENO, S. M. A. Performance of phospho-L-tyrosine immobilized onto alginate/ polyacrylamide-based cryogels: Effect of ligand coupling on human IgG adsorption and Fab fragments separation. **Journal of Chromatography B**. v. 1165, 122530, 2021.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. Unit Operations of Chemical Engineering. 5^a ed. [s.l.] McGraw-Hill International Editions, 1993.

MELO, C.; Remoção de cor de efluente de tinturaria em leito poroso. **Mestrado**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2007.

MEMIC, A.; COLOMBANI, T.; EGGERMON, L.J.; REZAEYAZDI, M.; STEINGOLD, J.; ROGERS, Z.J.; NAVARE, K.J.; MOHAMMED, H.S.; BENCHERIF, S.A. **Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications**. **Advanced Therapy**, v. 2, p. 1-14, 2019.

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

MONDAL, S.; AIKAT, K.; HALDER, G. Journal of Environmental Chemical Engineering Ranitidine hydrochloride sorption onto superheated steam activated biochar derived from mung bean husk in fixed bed column. **Biochemical Pharmacology**, v. 4, p. 488–497, 2016.

MOONEY, J. T.; FREDERICKS, D. P.; ZHANG C.; CHRISTENSEN, T.; JESPERGAARD, C.; SCHIØDT, C. B; HEARN, M. T. W. Purification of a recombinant human growth hormone by an integrated IMAC procedure, **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 85-94, 2014.

MORENO-CASTILLA, C. Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. **Carbon**, v. 42, p. 83–94, 2004.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 310, p. 307–310, 1981.

MOURÃO, C.A.; CUNHA, D.C.; BUENO, S.M.A.; Cryogel as adsorbent for the purification of immunoglobulin G from human serum. **XXI SINAFERM e XII SHEB**, v. 2, p. 1-4, 2017.

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

NOIR, M.L.; PLIEVA, F.; HEY, T.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B. Macroporous

molecularly imprinted polymer/cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants, **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 158-164, 2007.

OKAY, O.; LOZINSKY, V.I. Synthesis and structure–property relationships of cryogels. **Advances in Polymer Science**, v. 263, p. 103-157; 2014.

OKHUYSEN, P.C.; CHAPPEL, C.L.; CRABB, J.; VALDEZ, L.M.; DOUGLASS, E.; DUPONT, H.L. Prophylactic effect of bovine anti-Cryptosporidium hyperimmunocolostr immunoglobulin in healthy volunteers challenged with *Cryptosporidium parvum*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 1324-1329, 1998.

OLIVEIRA, C. R.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; BUENO, S. M. A. Evaluation of OPS-agarose pseudo-affinity adsorption IgG2a mouse monoclonal antibody. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 2267-2274, 2015.

OONA, B.; RÄGÖ, T.; MAAROOS, H.J.; MIKELSAR, E.; LOIVUKENE, K.; SALMINEN, S.; HANNU, K. Helicobacter pylori in children with abdominal complaints: Has immune bovine colostrum some influence on gastritis? **Alpe Adria Microbiology Journal**, v. 6, p. 49-57, 1997.

ORR, V.; ZHONG, L.Z.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C.P. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography. **Biotechnology Advance**, v. 31, p. 450-465, 2013.

OUTINEN, M.; TOSSAVAINEN, O. TUPASELA, T.; KOSKELA, P.; KOSKINEN, H.; RANTAMÄKI, P.; SYVÄOJA, E.L.; ANTILA, A.; KANKAREB, V. Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes. **Lebensm-Wiss u-Technology**, v. 29, p. 411-417, 1996.

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

PAVAN, G.L.; BRESOLIN, I.T.L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; VIJAYALAKSHMI, M.; BUENO, S.M.A. The effect of NaCl on the adsorption of human IgG onto CM-Asp-PEVA hollow fiber membrane-immobilized nickel and cobalt metal ions. **Adsorption**, v. 20, p. 677-688, 2014.

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

PEARSON, R.G. (1973) Hard and soft acids and bases. **In Benchmark Papers in Inorganic Chemistry**, p. 53–59, 1973.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. Chemical Engineers' Handbook. 7th ed. [s.l.] McGraw-Hill, v. 27, 1997.

PERÇIN, I.; IDIL, N.; DENIZLI, A. Molecularly imprinted poly(*N*-isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G purification. **Process Biochemistry**, v. 80, p. 181-189, 2019.

PETSCHOW, B. W.; BLIKSLAGER, A.T.; WEAVER, E. M.; CAMPBELL, J. M.; POLO, J.; SHAW, A. L.; BURNETT, B. P.; KLEIN, G. L.; RHOADS, J. M. Bovine immunoglobulin protein isolates for the nutritional management of enteropathy, **World Journal Gastroenterology**, v. 20 p. 11713-11726, 2014.

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

PLIEVA M.; KARLSSON, M.; AGUILAR, M.-R.; GOMEZ, D.; MIKHALOVSKY, S.; GALAEV, I.Y. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. **Soft Matter**, v. 4, p. 303-309, 2005.

PLIEVA, F. M.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 28–836, 2004.

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

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.; SAVINA, I. N.; DERAZ, S.; ANDERSSON, J.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide-based matrices designed for chromatography of bioparticles. **Journal of chromatography B**, v. 807, p. 129-137, 2004b.

PODGORNIK, A.; KRAJNC, N.L. Application of monoliths for bioparticle isolation. **Journal of Separation Science**. v. 35, p. 3059-3072, 2012.

PORATH, J. High-Performance Immobilized-Metal-Ion Affinity-Chromatography of Peptides and Proteins. **Journal of Chromatography**, v.443, p.3-11, 1988.

PORATH, J. Immobilized Metal-Ion Affinity-Chromatography. **Protein Expression and Purification**, v.3, p.263-281, 1992.

PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-599, 1975.

POURROSTAM-RAVADANAQ, P.; SAFA, K.D.; ABBASI, H. Study of imidazole performance as pseudo-affinity ligand in the purification of IgG from bovine milk. **Analytical Biochemistry**, v. 597, p. 1-10, 2020.

PRASANNA R.R.; KAMALANATHAN A.S.; VIJAYALAKSHMI M.A. Development of L-histidine immobilized CIM® monolithic disks for purification of immunoglobulin G. **Journal of Molecular Recognition**, v. 28, p. 129-141, 2015.

PRASANNA R.R; VIJAYALAKSHMI M.A Immobilized metal-ion affinity systems for recovery and structure–function studies of proteins at molecular, supramolecular, and cellular levels. **Pure Applied Chemistry**, v. 82, p. 39-55, 2010.

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

QI, Y.; YAN, Z.; HUANG, J. Chromatography on DEAE ion-exchange and protein G affinity columns in tandem for the separation and purification of proteins. **Journal of Biochemistry Biophysical Methods**, v. 49, p. 263-273, 2001.

QIU, H.; PAN, B.; ZHANG, Q-J.; ZHANG, W.; ZHANG, Q-X. Critical review in adsorption kinetic models. **Journal of Zhejiang University SCIENCE A**, v. 10, p. 716-724, 2009.

RIBEIRO, M. B.; 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. **Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas**, 2006. 148p. Tese (Doutorado).

RIBEIRO, M. B; VIJAYALAKSHMI, M.; TODOROVA-BALVAY, D.; BUENO, S. M. A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes. **Journal of Chromatography B**, v. 861, p. 64-73, 2008.

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

SAAD, K.; ABO-ELELA, M.G.M.; EL-BASEER, K.A.A.; AHMED, A.E.; AHMAD, F.A.; TAWFEEK, M.S.K.; EL-HOUFEY, A.A.; ABOULKHAIR, M.D.; ABDEL-SALAM, A.M.; ABO-ELGHEIT, A.; QUBAISEY, H.; ALI, A.M.; ABDEL-MAWGOUD, E. Effects of bovine colostrum on recurrent respiratory tract infections and diarrhea in children. **Medicine**, v. 37, p. 95, 2016.

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

SANTOS, T.; BRITO, A.; BOTO, R.; SOUSA P.; ALMEIDA, P.; CRUZ, C.; TOMAZ, C. Influenza DNA vaccine purification using pHEMA cryogel support, **Separation and Purification Technology**, v. 206, p. 192-198, 2018.

SARKER, S.A.; CASSWALL, T.H.; MAHALANABIS, D.; ALAM, N.H.; ALBERT, M.J.; BURSSOW, H.; GEORGE, J.; HAMMERSTRÖM, L. Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 17, p. 1149-1154, 1998.

SAVINA, I.N.; CNUDDÉ, V.; D'HOLLANDER, S.; HOOREBEKE, L.V.; MATTIASSON, B.; GALAEV, I.Y.; PREZ, F.D. Cryogels from poly(2-hydroxyethyl methacrylate):

macroporous, interconnected materials with potential as cell scaffolds. **Soft Matter**, v. 3, p. 1176-1184, 2007.

SAVINA, R.N.; ENGLISH, C.J.; WHITBY, R.L.D.; ZHENG, Y.; LEISTNER, A.; MIKHALOVSKY, S.V.; CUNDY, A.B. High efficiency removal of dissolved As(III) using iron nanoparticle-embedded macroporous polymer composites, **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 1002-1008, 2011.

SAYLAN, Y.S.; DENIZLI, A. Supermacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications. **Gels**, v. 5, p. 1-20, 2019.

SENGUPTA, P.P.; RUDRAMURTHY, G.R.; LIGI, M.; JACOB, S.S.; RAHMAN, H.; ROY, P. Development of an antigen ELISA using monoclonal antibodies against recombinant VSG for the detection of active infections of *Trypanosoma evansi* in animals. **Veterinary Parasitology**, v. 266, p. 63-66, 2019.

SERPA, GISELE. Purificação de anticorpos monoclonais anti-TNP do isotipo IgG₁ utilizando cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 105p. Dissertação (Mestrado).

SERPA, G.; AUGUSTO, E.F.P.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; RIBEIRO, M.B.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G(1) monoclonal antibody. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.816, n.1-2, p.259-268. February 2005.

SCHALLER, P.; SAIF, L.J.; CORDLE, C.T.; CANDLER, E.; WINSHIO, E.T.; SMITH, K.L. Prevention of human rotavirus-induced diarrhoea in gnotobiotic piglets using bovine antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 623-630, 1992.

SHARMA, A.; BHAT, S.; NAYAK, V.; KUMAR, A. Efficacy of supermacroporous poly(ethylene glycol)-gelatin cryogel matrix for soft tissue engineering applications, **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, p. 298-312, 2015.

SHARMA, M.; TAVARES, A.P.M.; NUNES, J. C. F, SINGH, N.; MONDAL, D.; NEVES, M.C.; PRASAD, K.; FREIRE, M.G. Hybrid alginate-protein cryogel beads: efficient and sustainable bio-based materials to purify immunoglobulin G antibodies. **Green chemistry**. v. 22, p. 2225-2233, 2020.

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, p. 3491-3511, 2001.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P.; Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. **Analytical Biochemistry**. v. 288, p. 156-140, 2001.

SHAW, A.L.; MATHEWS, D.W.; HINKLE, J.E.; PETSCHOW, B.W.; WEAVER, E.M.; DETZEL, C.J.; KLEIN, G.L.; BRADSHAW, T.P.; Absorption and safety of serum-derived bovine immunoglobulin/protein isolate in healthy adults. **Clinical and Experimental**

Gastroenterology, v. 9, p. 365-375, 2016.

SHENG, S.; KONG, F. Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography, **Pharmaceutical Biology**, v.. 50, p. 1038-1044, 2012.

SHI, W.; LIN, D.Q; TONG, H.F.; YUN, J.X; YAO, S.J. 5-Aminobenzimidazole as new hydrophobic charge-induction ligandfor expanded bed adsorption of bovine IgG. **Journal of Chromatography A**. v. 1425, p. 97-105, 2015.

SILVA, M. C. H.; CARVALHO, L. M.; MINIM, L. A. Cryogel poly(acrylamide): synthesis, structure and applications. **Separation & Purification Reviews**, V. 43, p. 241-262, 2014.

SPRIESTERSBACH, A.; KUBICEK, J.; SCHÄFER, F.; BLOCK, H.; MAETERNS, B. Chapter One - Purification of His-Tagged Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 559, p. 1-15, 2015.

STELWAGEN, K.; CARPENTER, E.; HAIGH, B.; HODKINSON, A.; WHEELER, T.T. Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3-9, 2009.

STRYER, L., *Bioquímica*, 7ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, pg 88, 2012.

SU, C-K.; CHIANG, B.H. Extraction of immunoglobulin-g from colostrum whey by reverse micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1639-1645, 2003.

SULKWOSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **BioEssays**, v. 10, p. 170-175, 1989.

SUN, S.; TANG, Y.; FU, Q.; LIU, X.; GUO, L.; ZHAO, Y. Preparation of agarose/chitosan composite. **Journal Separation Science**, v. 35, p. 893-900, 2012.

SUN, X.; CHIU, J. F.; HE, Q. Y. Fractionation of proteins by immobilized metal affinity chromatography, **Methods Molecular, Biol**, v. 424, p. 205-212, 2008.

SUN, X; CHIU, J. F; HE, Q. Y. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics, **Expert Review of Proteomics**, v. 5, p. 649–657, 2995.

SVEC, F.; LV, Y. Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography, v. 2015, p. 250-273, 2015.

TEKINER, P.; PERÇIN, I.; ERGÜN, B.; YAVYZ, H.; AKSÖZ, E. Purification of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*) with copper (II) chelated poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(l)-histidine methyl ester) cryogels. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, p. 549-554, 2012.

TETALA, K.K.R.; SKRZYPEK, K.; LEVISSON, M.; STAMATIALIS D.F. A metal ion charged mixed matrix membrane for selective adsorption of hemoglobin. **Separation and Purification Technology**, v. 115, p. 20-26, 2013.

TODOROVA, D.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography. In: HAGE, D.S.; CAZES, J. **Handbook of Affinity Chromatography**, v. 2

p. 257-281, 2006.

TRIPATHI, A.; KUMAR, A. Multi-featured macroporous agarose–alginate cryogel: Synthesis and characterization for bioengineering applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, p. 22, 2011.

UCHIDA, K.; YAMAGUCKI, H.; KAWASAKI, M.; YAMASHITA, K.; KAJI, N.; Bovine late colostrum (colostrum 6 or 7 days after parturition) supplement reduces symptoms of Upper Respiratory Tract Infection in Infant. **Japanese Journal of Clinical Nutrition**, v. 31, p. 122-127, 2010.

UEDA, E. K.; GOUT, P. W.; MORGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. **Journal of Chromatography A**, v. 988, p.1-23, 2003.

UNUABONAH, E. I. *et al.* Modeling of fixed-bed column studies for the adsorption of cadmium onto novel polymer-clay composite adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, p. 415–423, 2010.

UYGUN, D.A., S, ENAY, R.H., TURKCAN, C., AKGOL, S., DENIZLI, A.: Metalchelating nanopolymers for antibody purification from human plasma. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 1608, p. 1528–1539, 2012.

VANÇAN, S.; BUENO, S. M. A.; MIRANDA, E. A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 573-579, 2002.

VADIVELAN, V.; VASANTH KUMAR, K. Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 286, p. 90-100, 2005.

VENUGOPAL, N.; KRISHNAMURTHY, G.; BHOJYANAİK, H. S.; KRISHNA, P. M. Synthesis, spectral characterization and biological studies of Cu (II), Co (II) and Ni (II) complexes of azo dye ligand containing 4–amino antipyrine moiety. **Journal of Molecular Structure**, v. 1183, p. 37-51, 2019.

VERGARA-BARBAREÁN, M.; CARRASCO-CORREA, E.J.; LERMA-GÁRCIA, M.J.; SIMÓ-ALFONSO, E.F.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.H. Current trends in affinity-based monoliths in microextraction approaches: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1084, p-1-20, 2019.

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

VINCENTELLI R, CANAAN S, CAMPANACCI V, VALENCIA C, MAURIN D, FRASSINETTI F, SCAPPUCINI-CALVO L, BOURNE Y, CAMBILLAU C, BIGNON C. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. **Protein Science**, v. 13, p. 2782-2792, 2004.

VLUG, A. e VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. **American Clinical Laboratory**, v. 8, p.28-36, 1989.

WALSTRA, P. Physical chemistry of foods. **Food Science and Technology**, New York: Marcel Dekker, 2003.

WEBER, W. J., MORRIS, J. C. Kinetics of adsorption on carbon from solution. **Journal of Sanitary Engineering**, v. 89, p. 31-60, 1963.

WINZERLING, J. J.; BERNA, P.; PORATH, J.; Methods: a companion to Methods in Enzymology, **Academic Press Books**, v.4, p. 4-13; 1992.

WONG, J., ALBRIGTH, R.L; WANG N.H.W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) – chemistry and bioseparation applications. **Separation and Purification Methods**, v.20, p.49-106, 1991.

WU, M.; XU, Y. Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.14, p.155-165, 2009.

YANG, L.; CHEN, P. Chitosan coarse filter paper composite membrane for fast purification of IgG from human serum. **Journal of Membrane Science**, v. 205, p.141-153, 2002.

YANG, C.; YIN, T.; SUO, Z.; Polyacrylamide hydrogels. I. Network imperfection, **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 131, p. 43-55, 2019

YANG, Y.; GENG, X.; Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8813-8825, 2011.

YANG, X.; AL-DURI, B. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes on activated carbon. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 9, p. 25-34, 2005.

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

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

YAVASER, R.; KARAGÖZLER, A.A.; Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. **Process Biochemistry**. v. 101, p. 137-146, 2021.

YUGUSHI, Y.; HASEGAWA, A.; PADOL, A. M.; DRAGET, K. I.; STOKKE, B. T. Local structure of Ca²⁺ induced hydrogels of alginate–oligoguluronate blends determined by small-angle-X-ray scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 532-540, 2016.

ZERVENS, L.M.L; NIELSEN, S.S.; JUNGENSEN, G. Characterisation of an ELISA detecting immunoglobulin G to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in bovine colostrum. **The Veterinary Journal**, v. 197, p. 889-891, 2013.

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

ZHU, H.-Y.; CHEN, S.-G.; ZHANG, Q.; LIN, D.-Q.; YAO, S.-J. Adsorption characteristics of human immunoglobulin G on five new tetrapeptide biomimetic affinity resins. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 64, p. 1671-1679, 2019.

ZIMMERMAN, T.; FRÈRE, C.P.; SATZGER, M.; RABA, M.; WEISBACH, M.; DÖHN, K.; POPP, A.; DONZEAU, M.; Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments. **Journal of Immunological Methods**, v. 314, p. 67-73, 2006.

ZYDNEY, A.L.; Protein separation using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 243-250, 1998.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS E BALANÇO DE MASSA DOS ENSAIOS REALIZADOS COM PAAM-ALG-AGE-IDA-ME²⁺ E PAAM-ALG-AGE-IDA.

Figura A 1 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAM-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0. Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes). **L**: Lavagem com Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

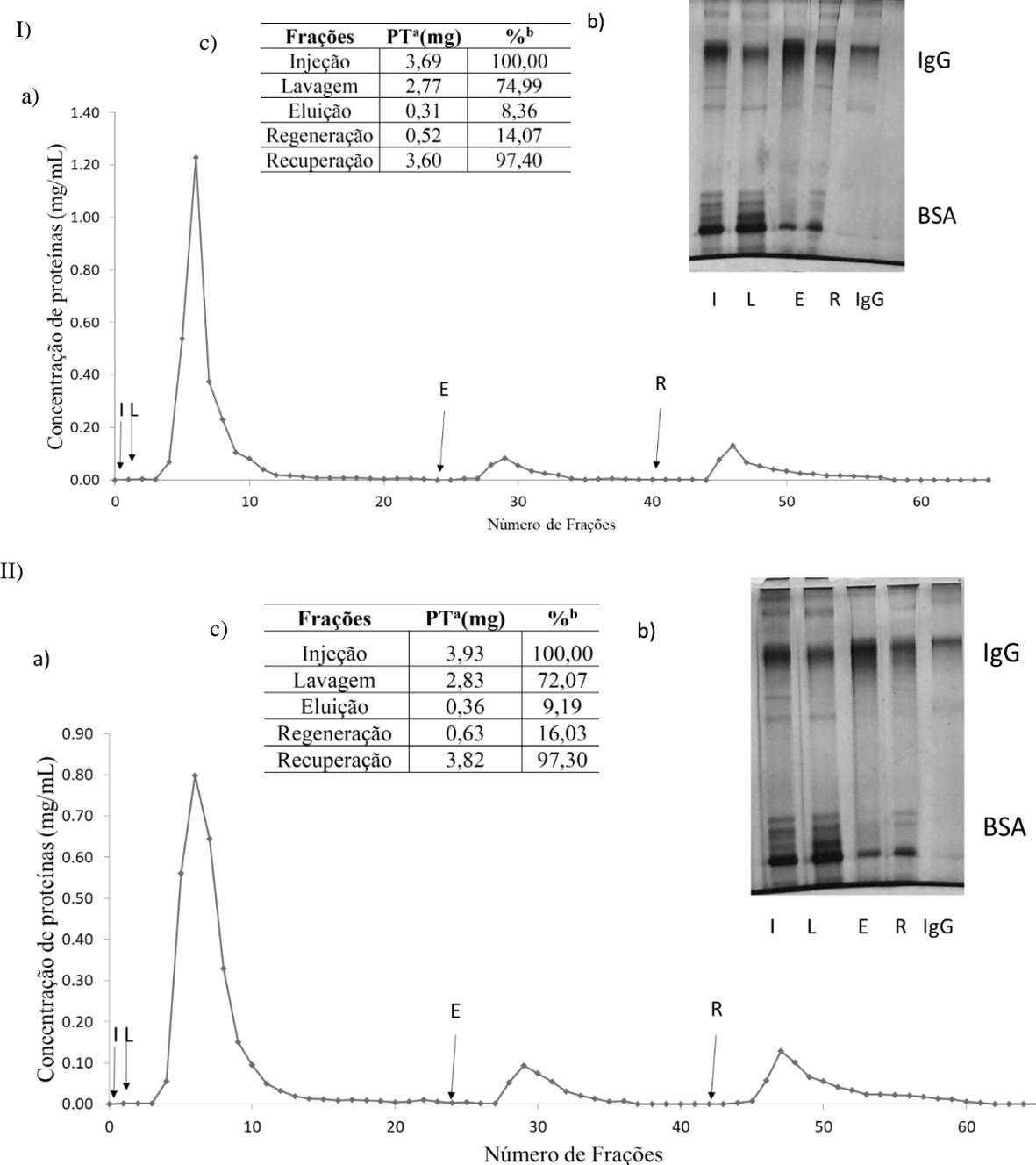


Figura A 2 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

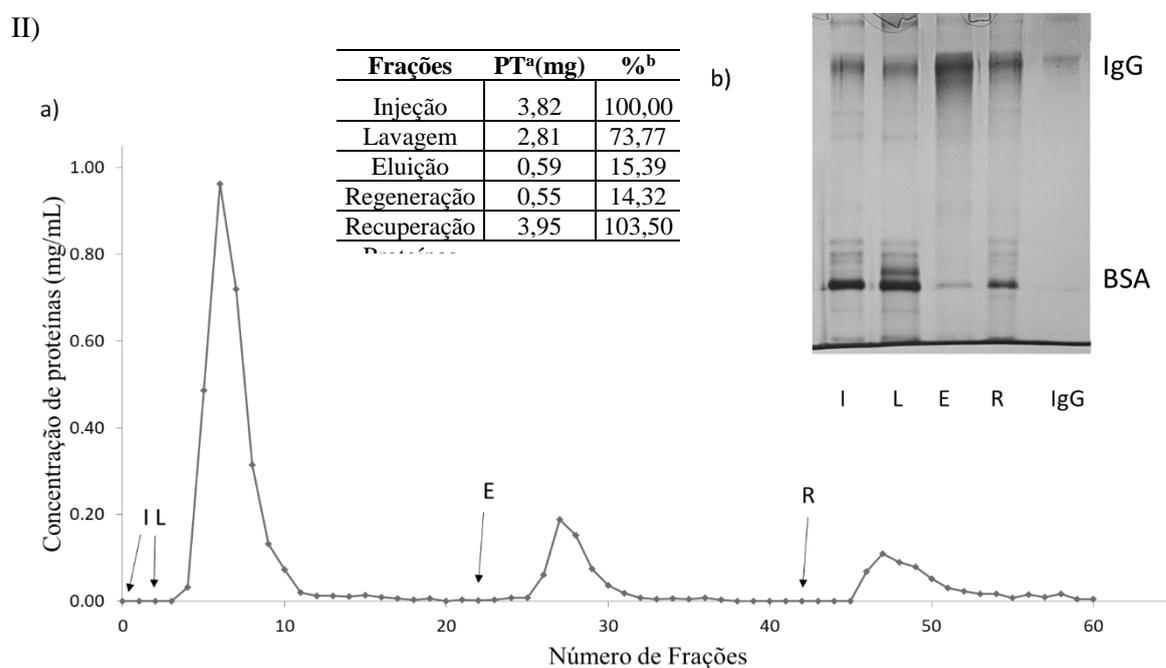
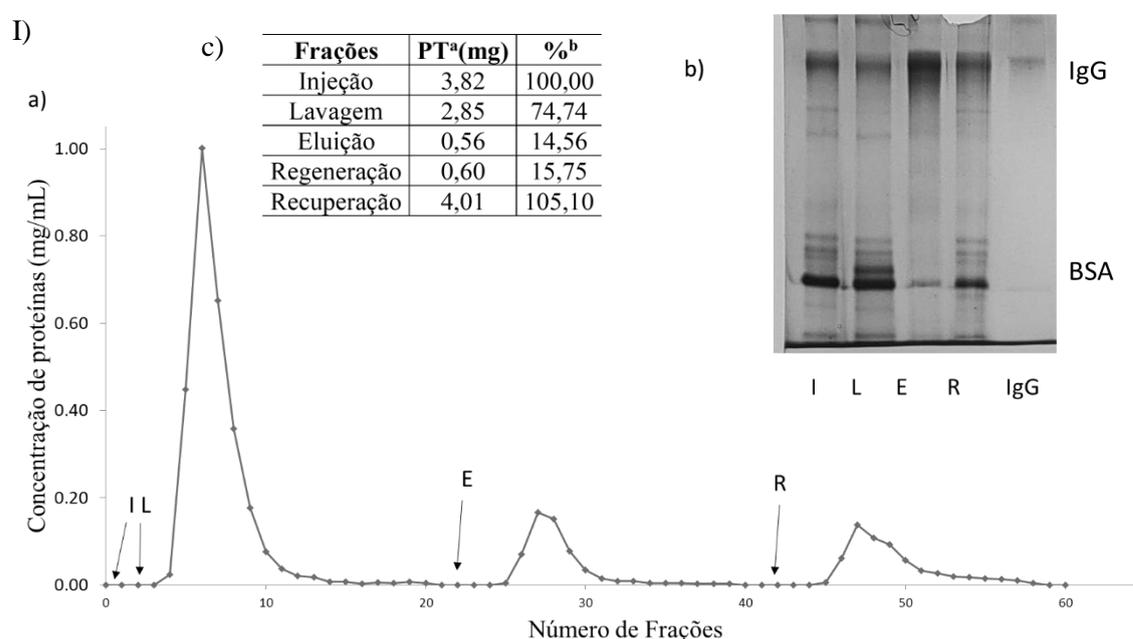


Figura A 3 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0. Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

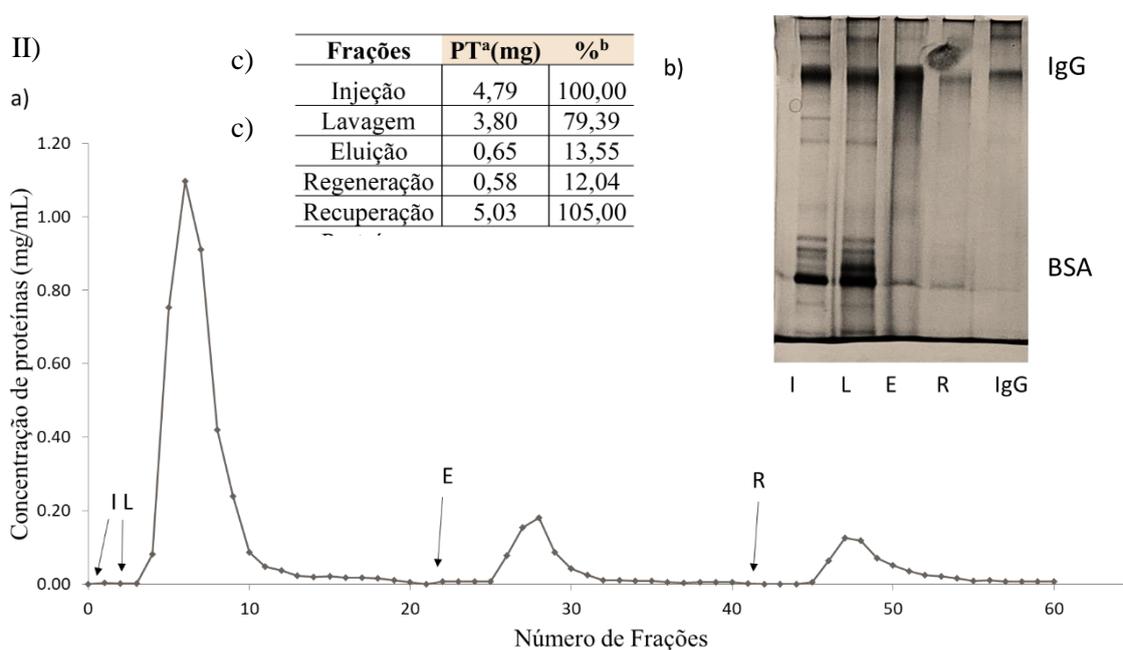
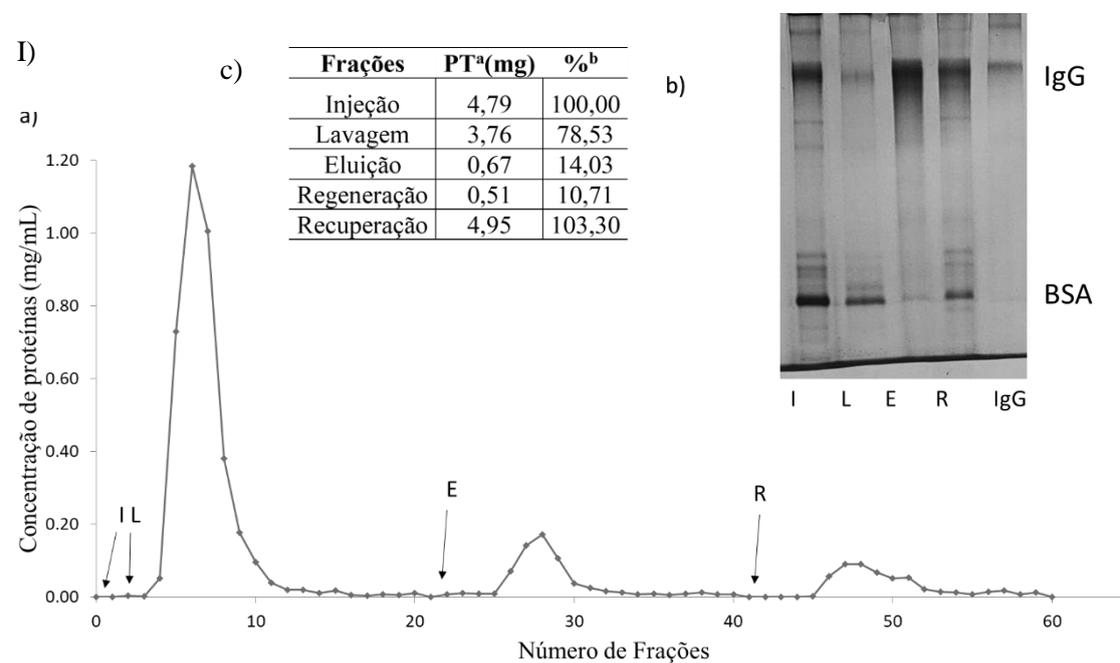


Figura A 4 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 μ L de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L pH 6,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 6,5. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

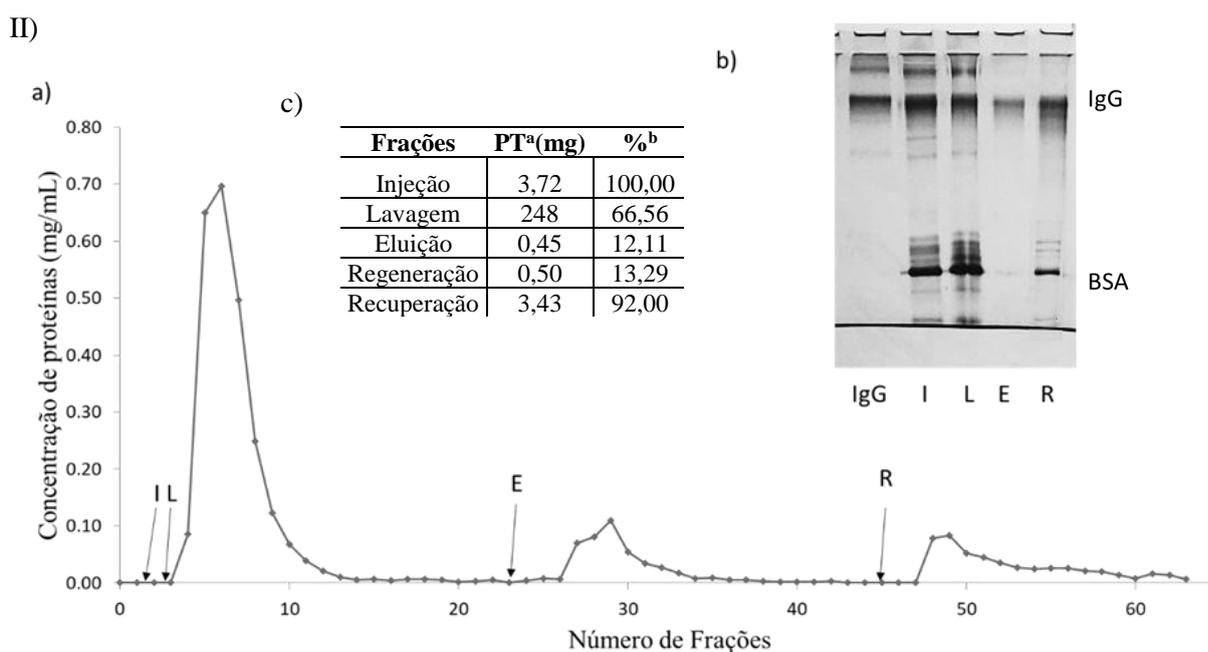
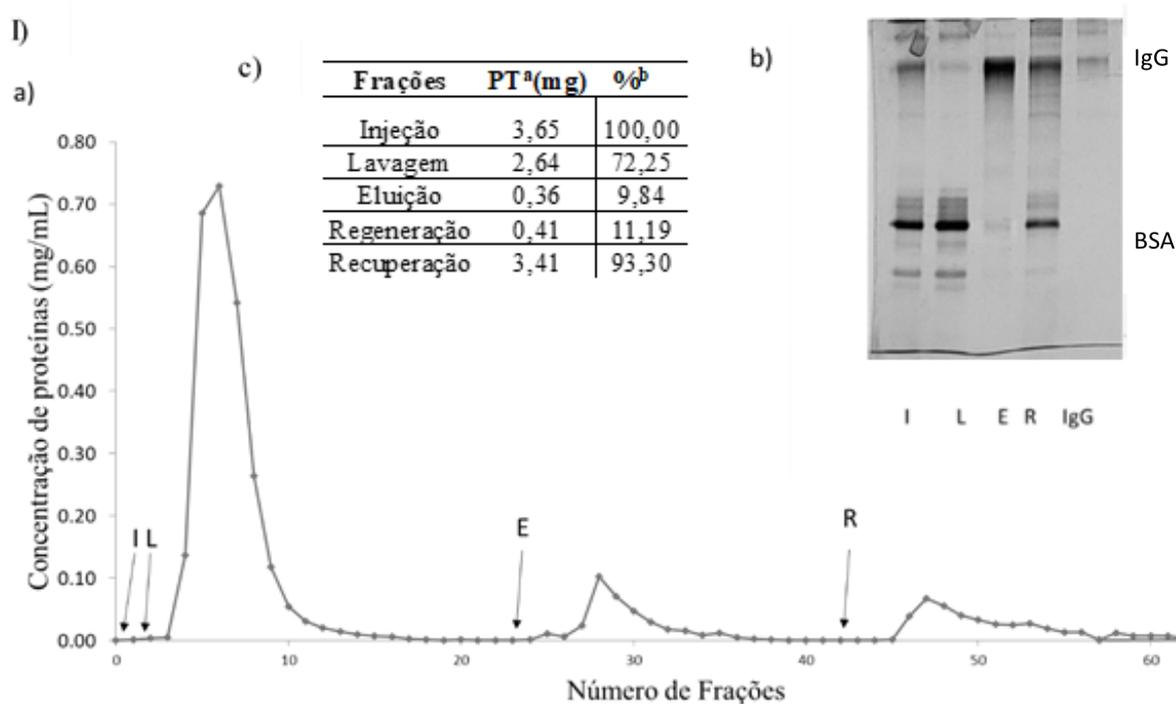


Figura A 5 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

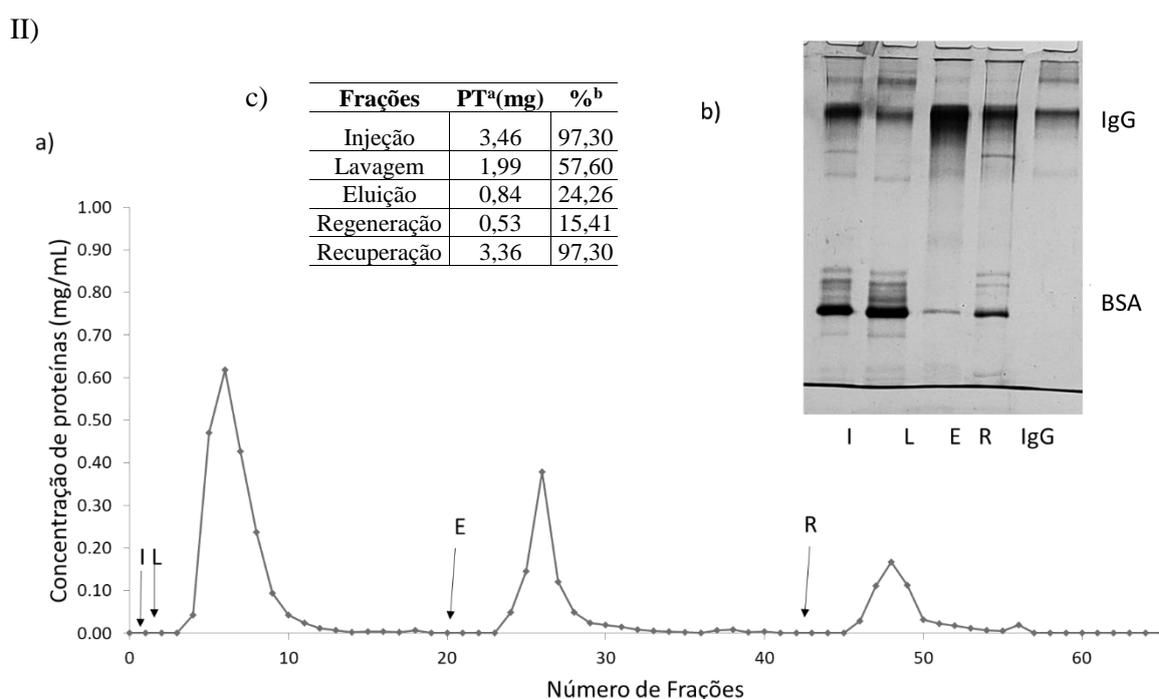
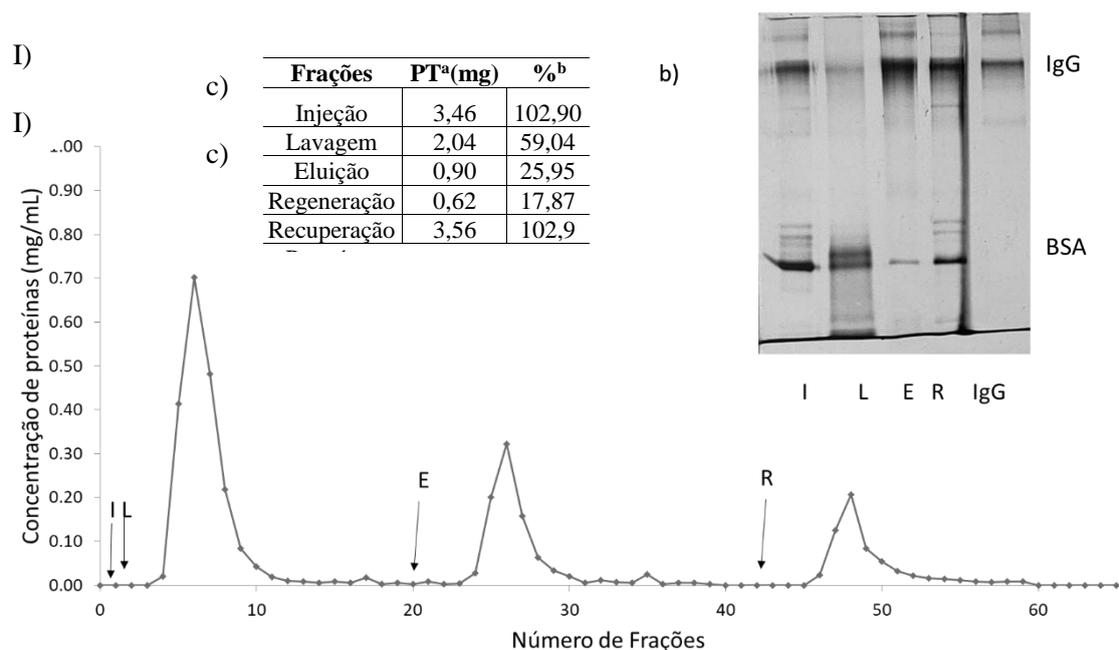


Figura A 6 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L pH 7,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 7,5. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

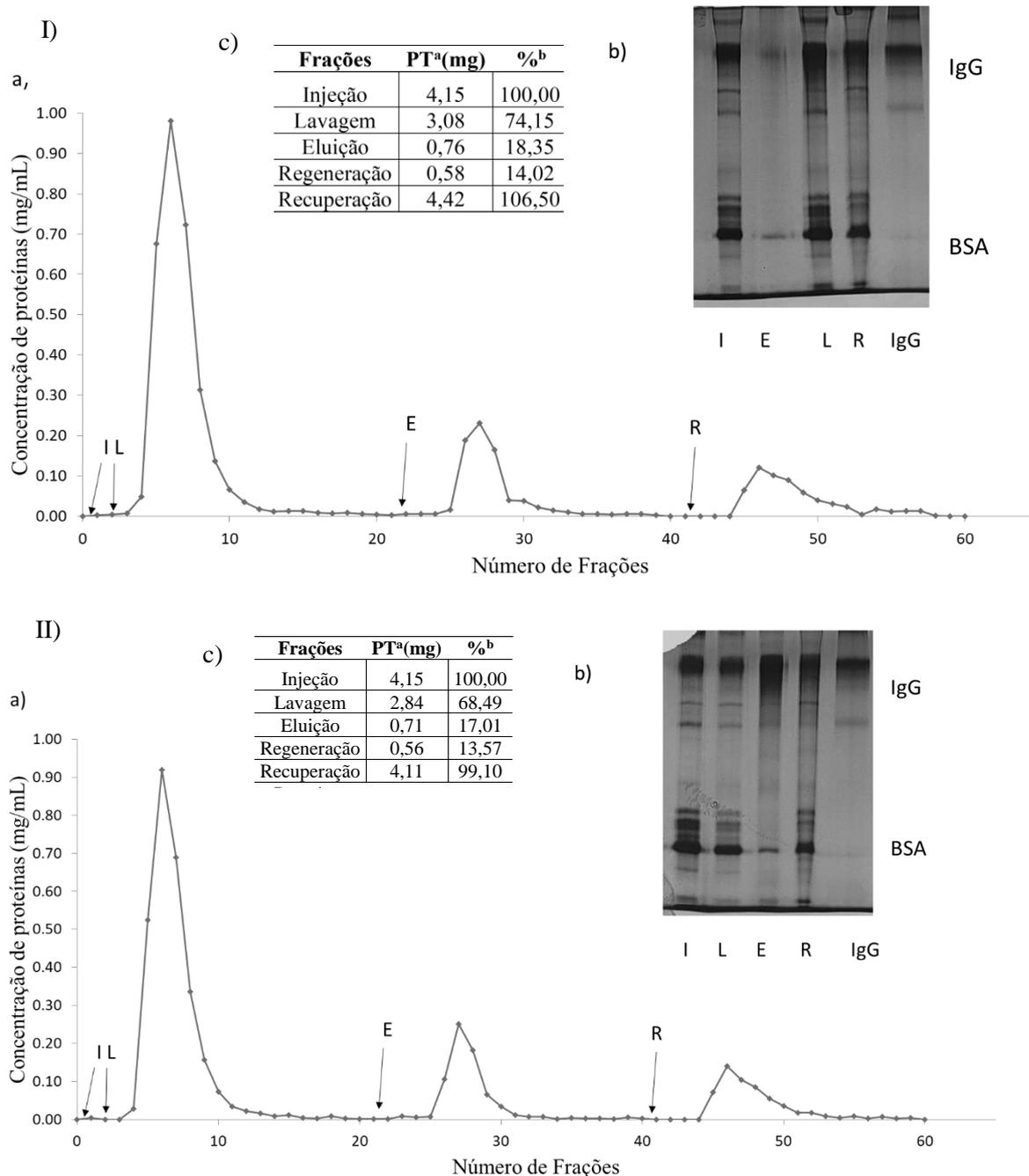


Figura A 7 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 μ L de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 6,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 6,0. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

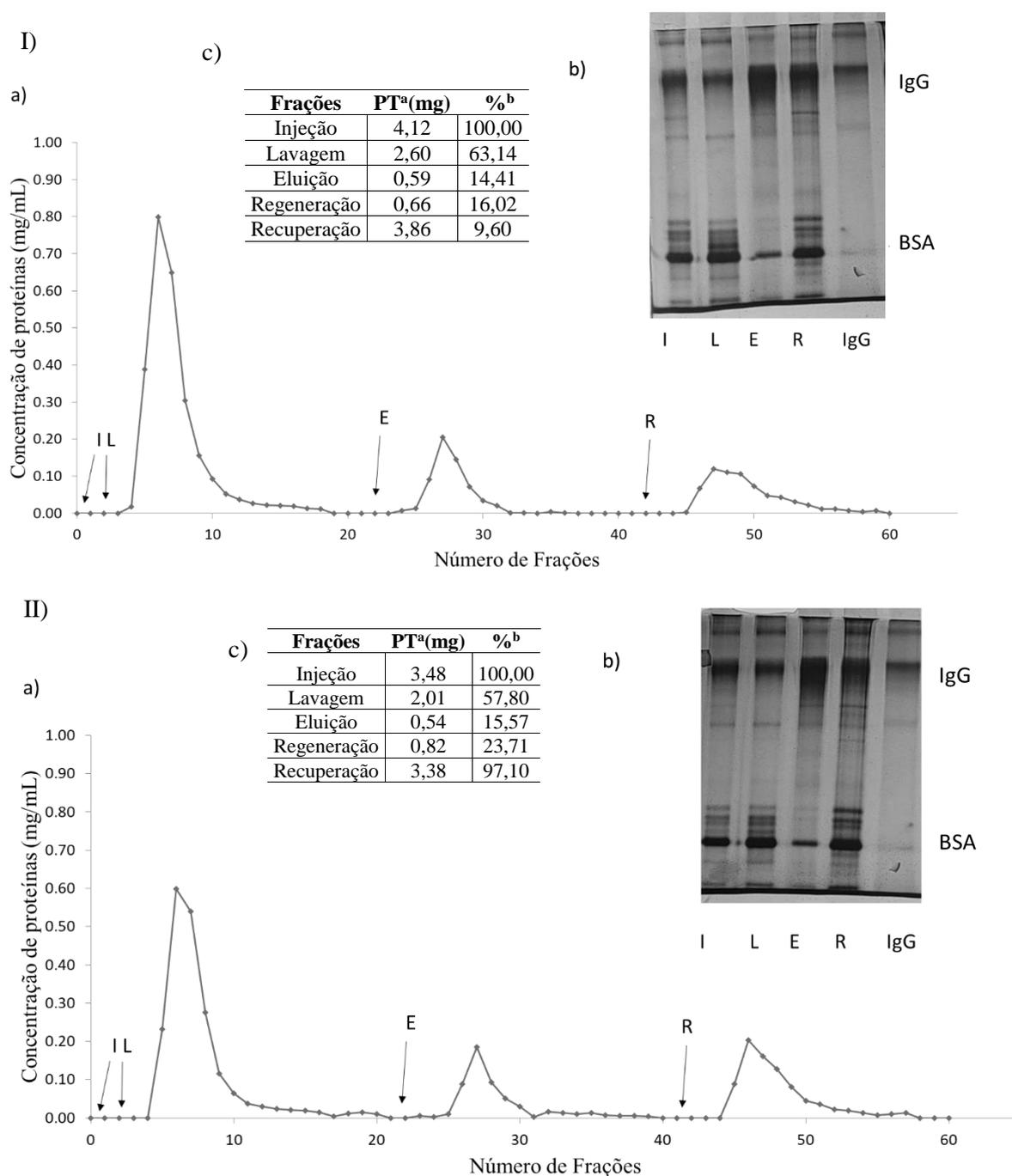


Figura A 8 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 6,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 6,5. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

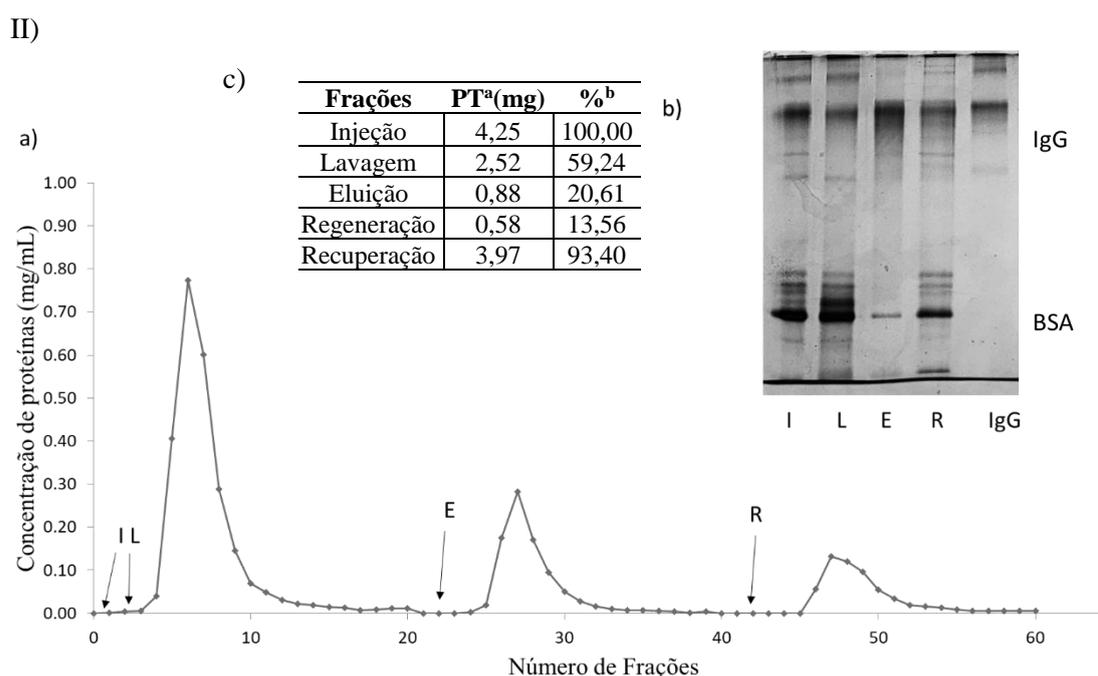
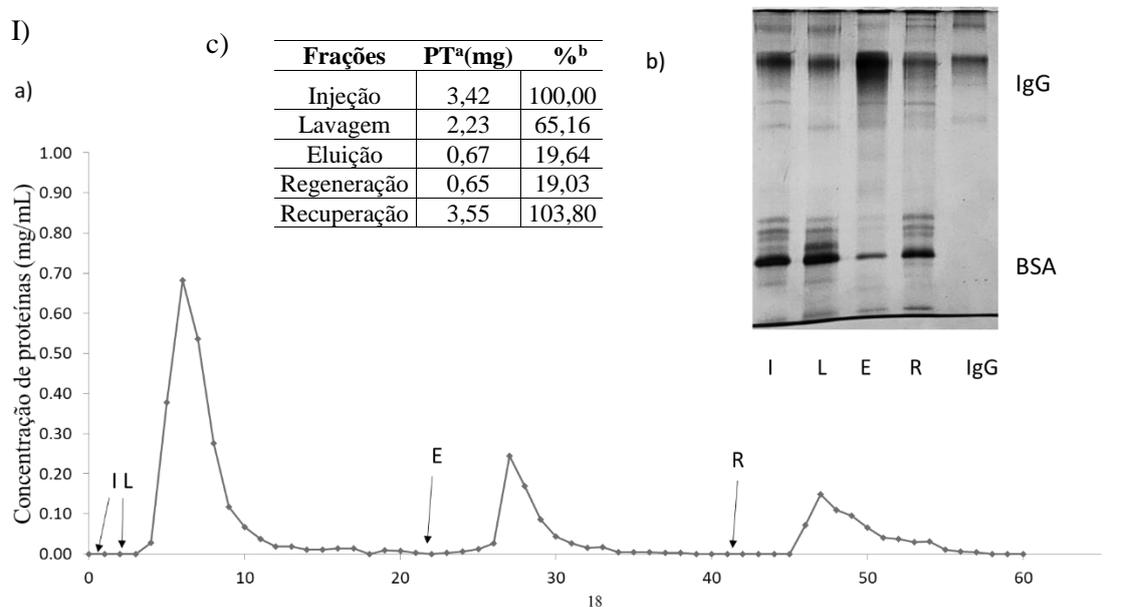


Figura A 9 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 7,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

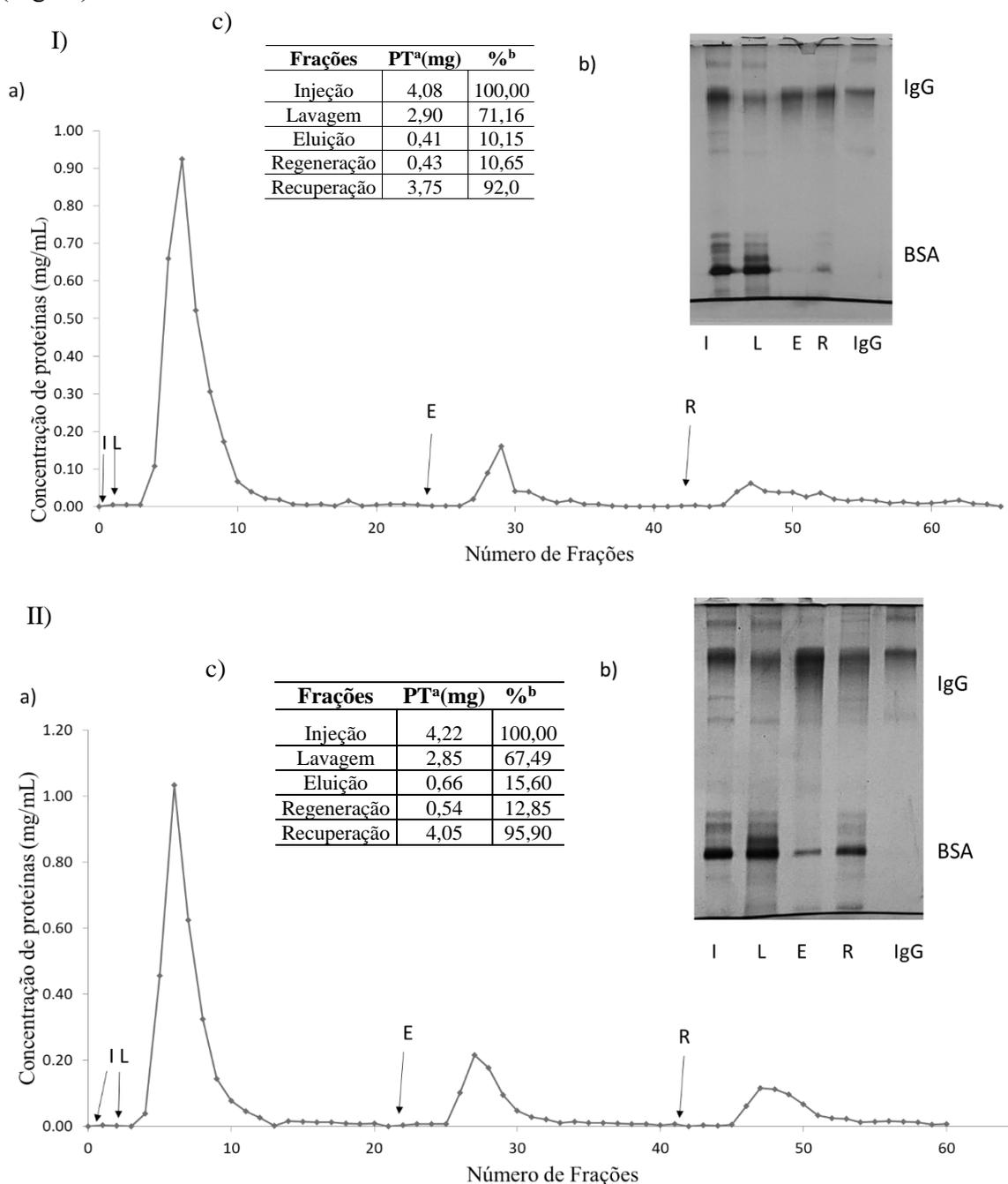


Figura A 10 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

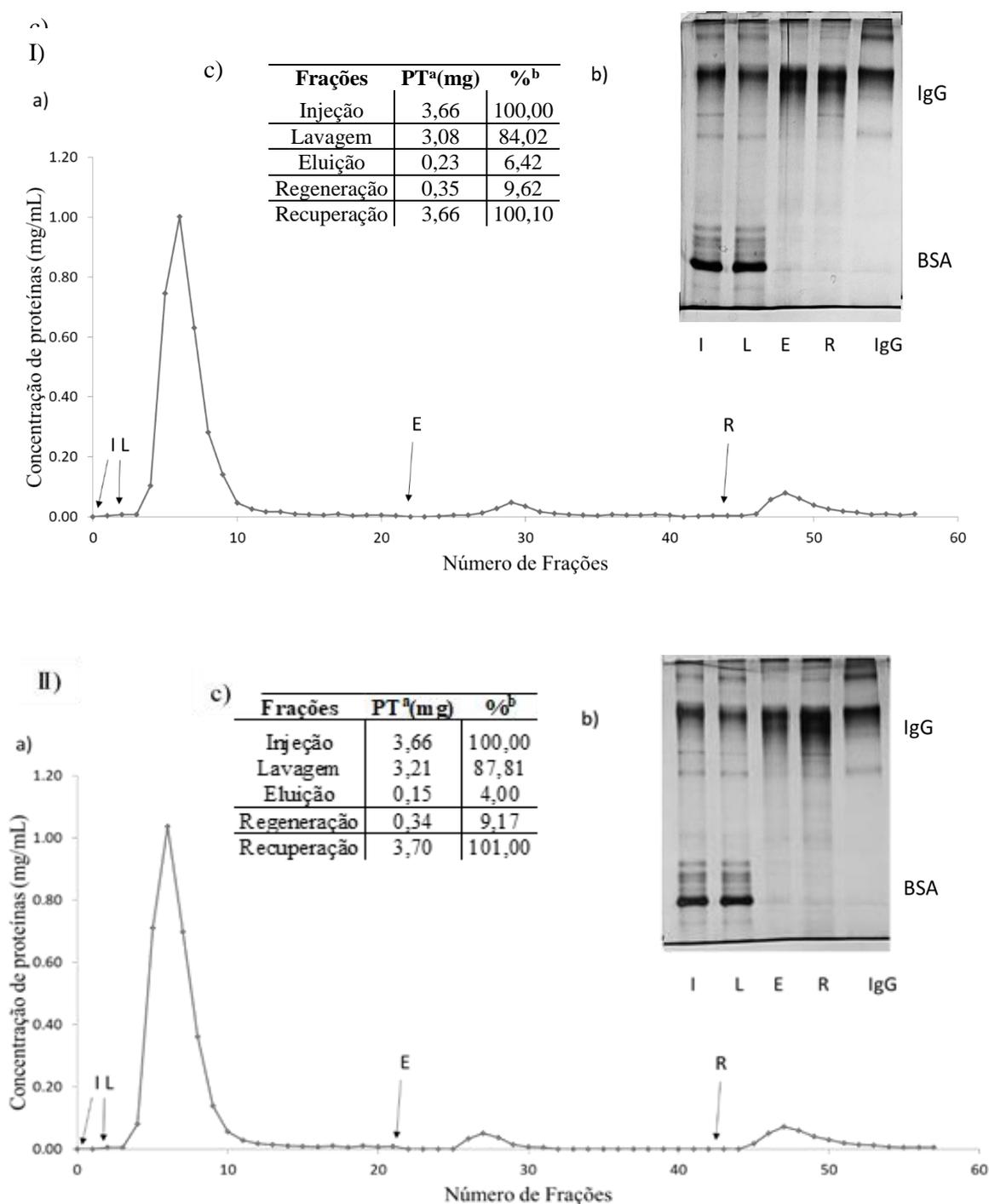


Figura A 11 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,5. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

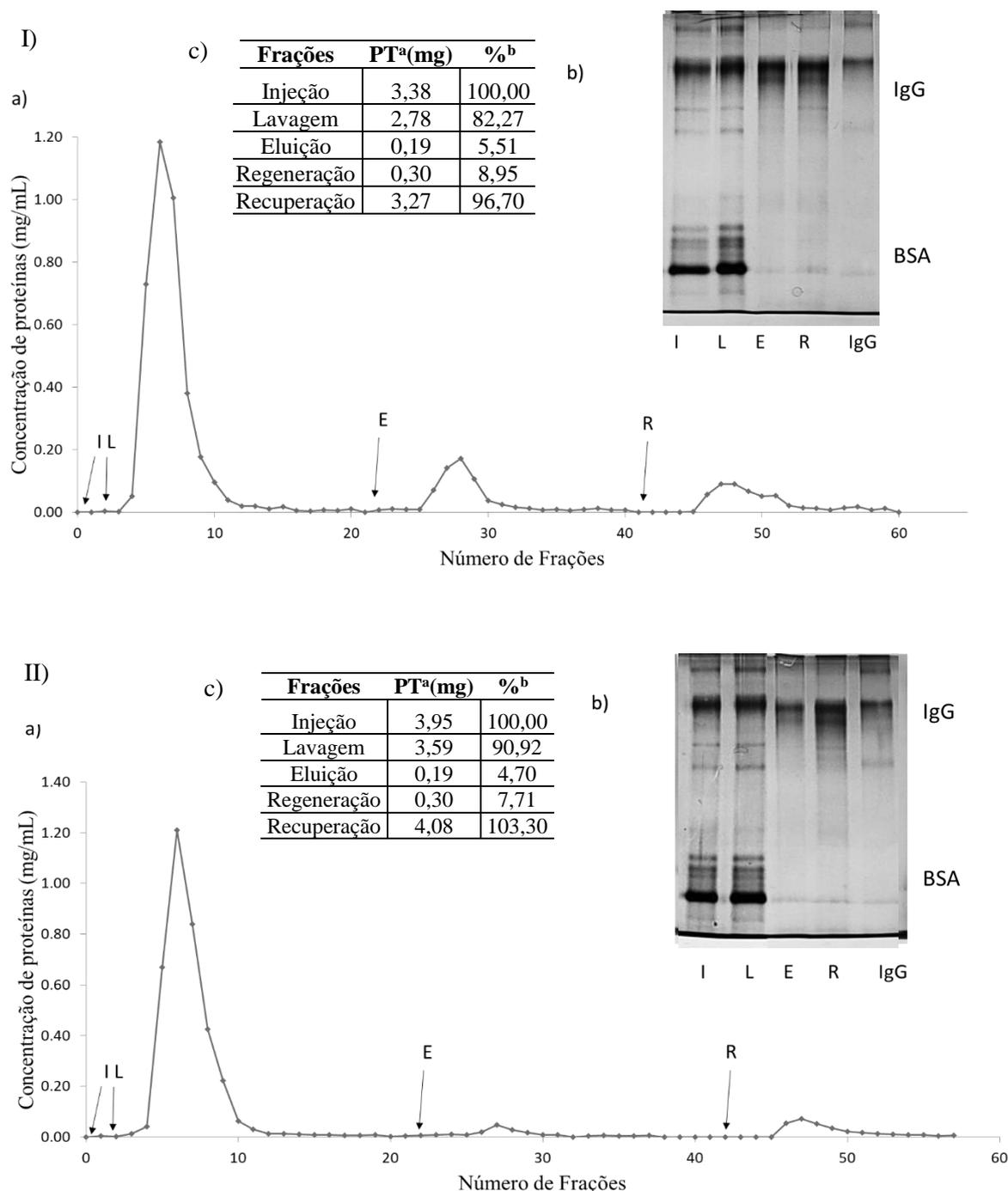


Figura A 12 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

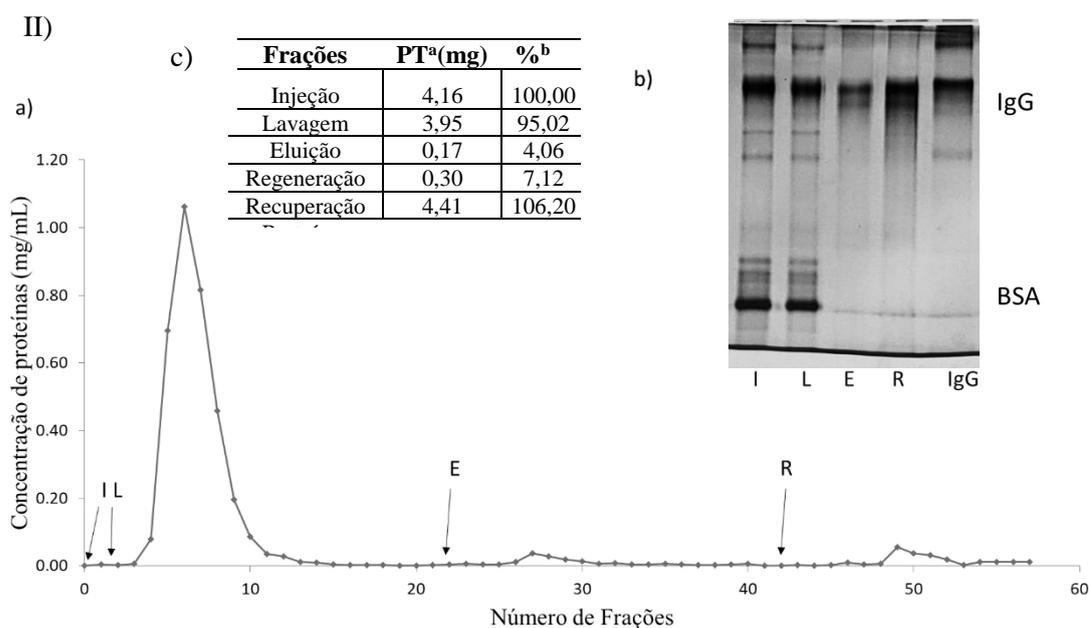
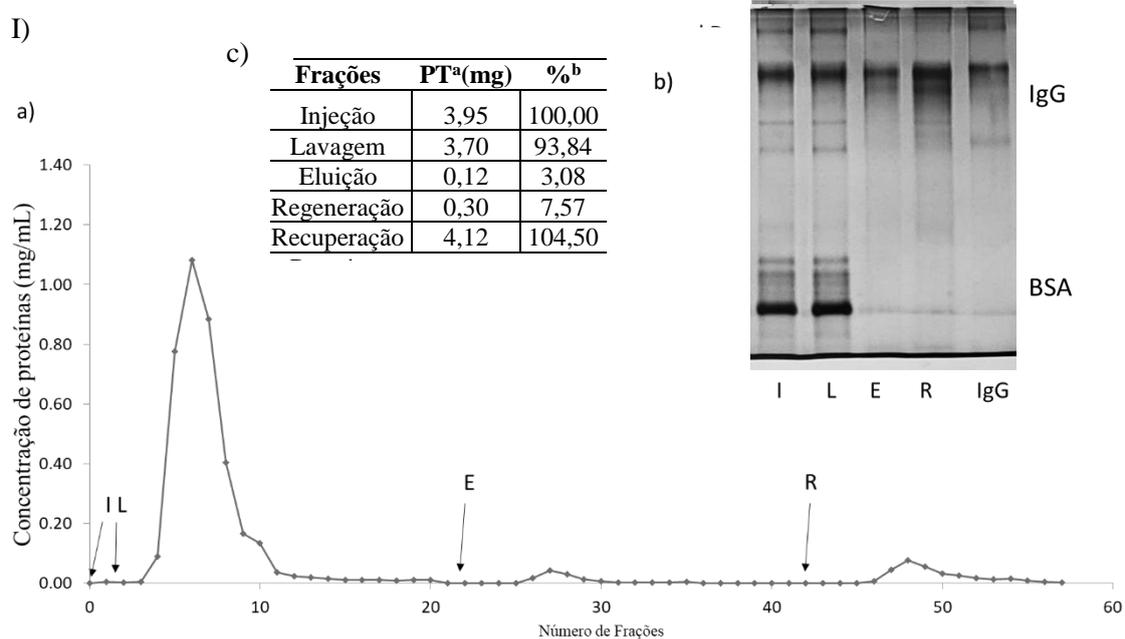


Figura A 13 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L pH 6,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 6,5. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

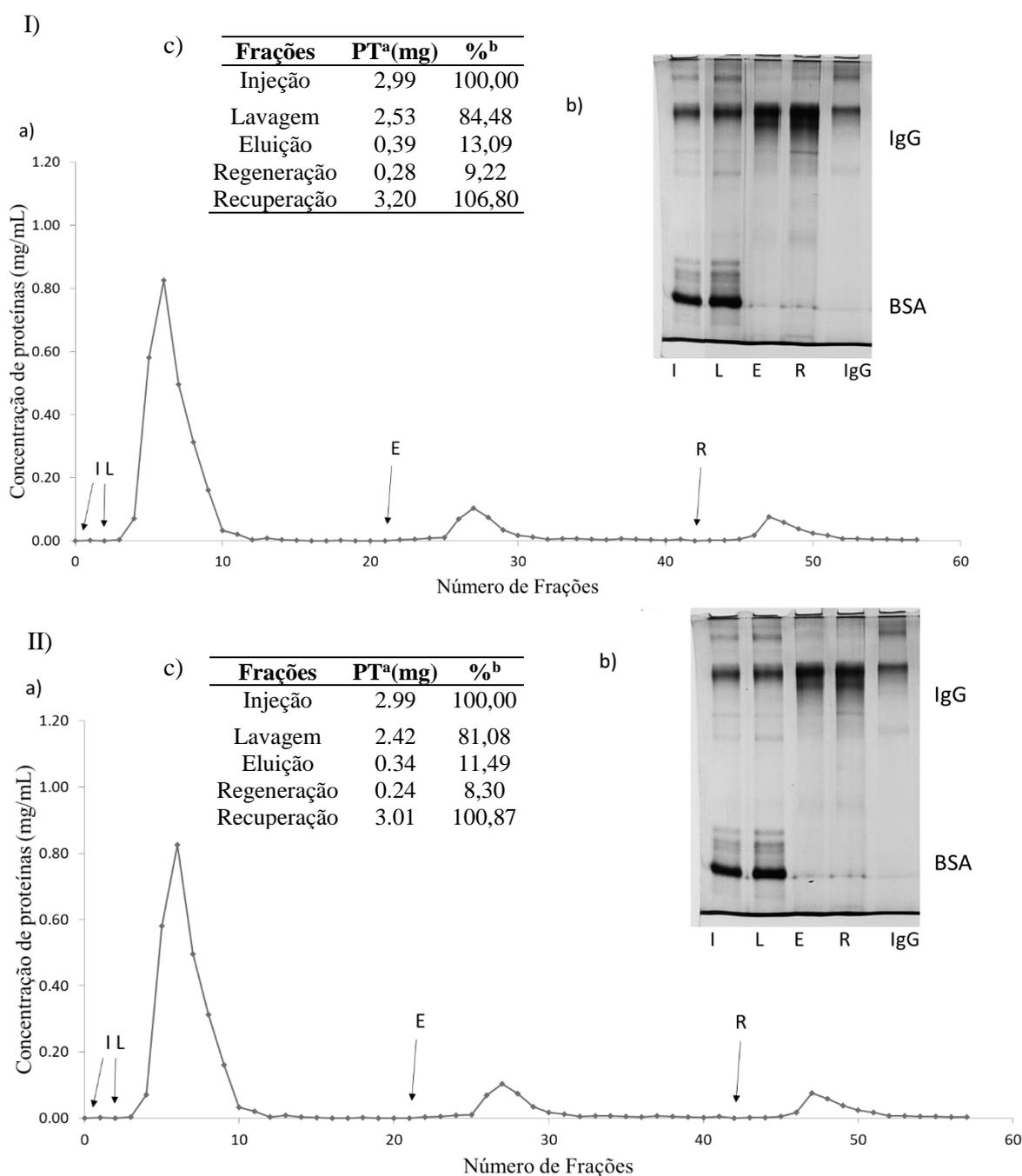


Figura A 14 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

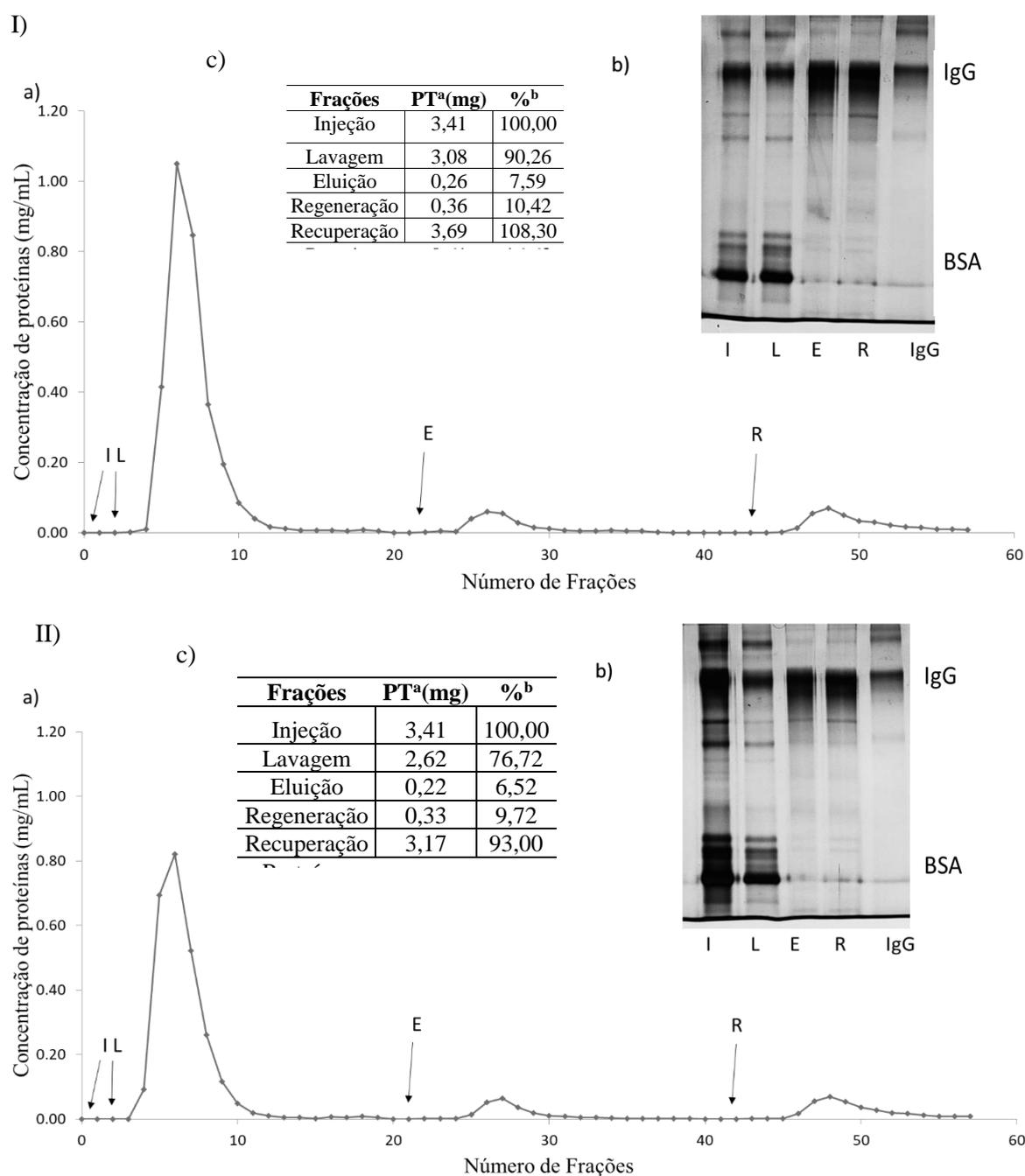


Figura A 15 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 7,5. Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MOPS 25 mmol/L pH 7,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com MOPS 25 mmol/L pH 7,5. **E**: Eluição Acetato 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

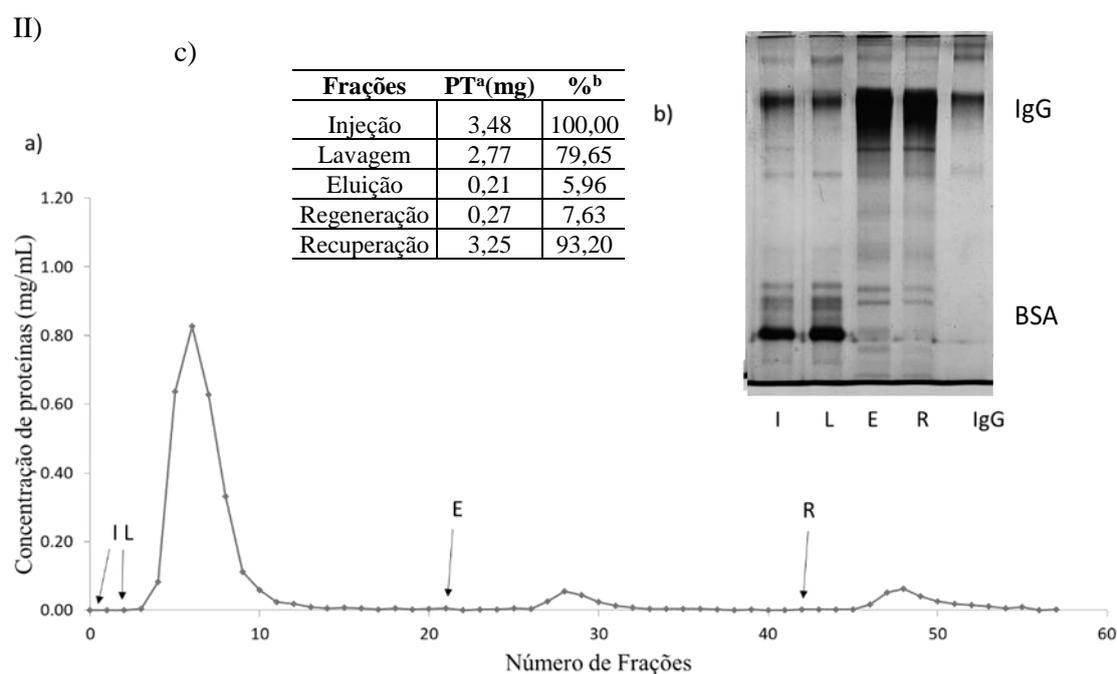
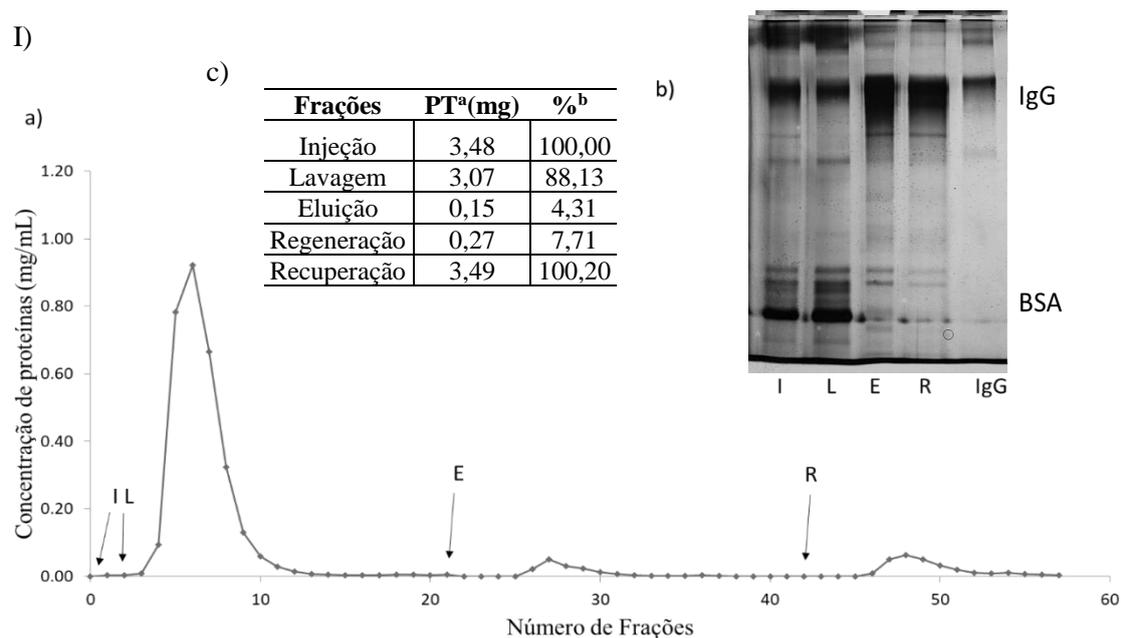


Figura A 16 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 6,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 6,0. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

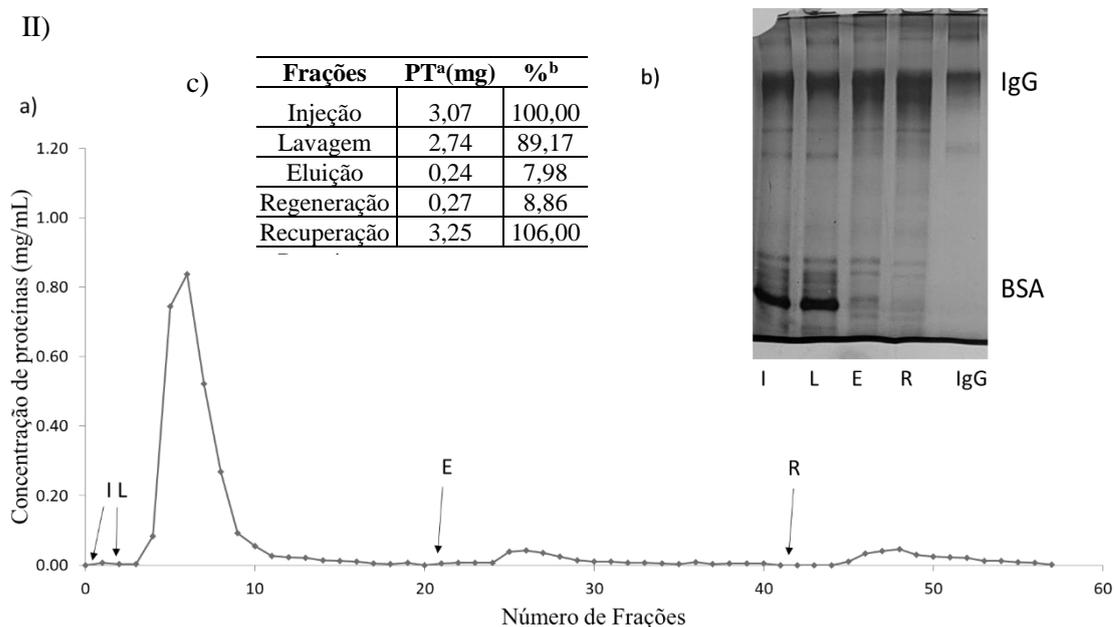
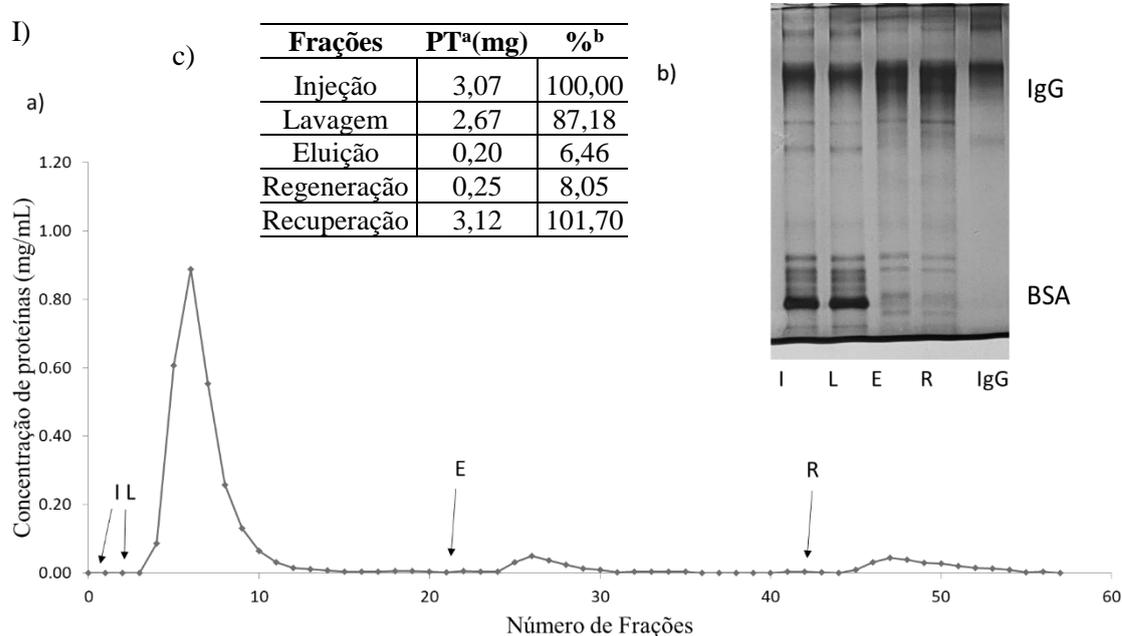


Figura A 1718 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 6,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 6,5 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 6,5. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

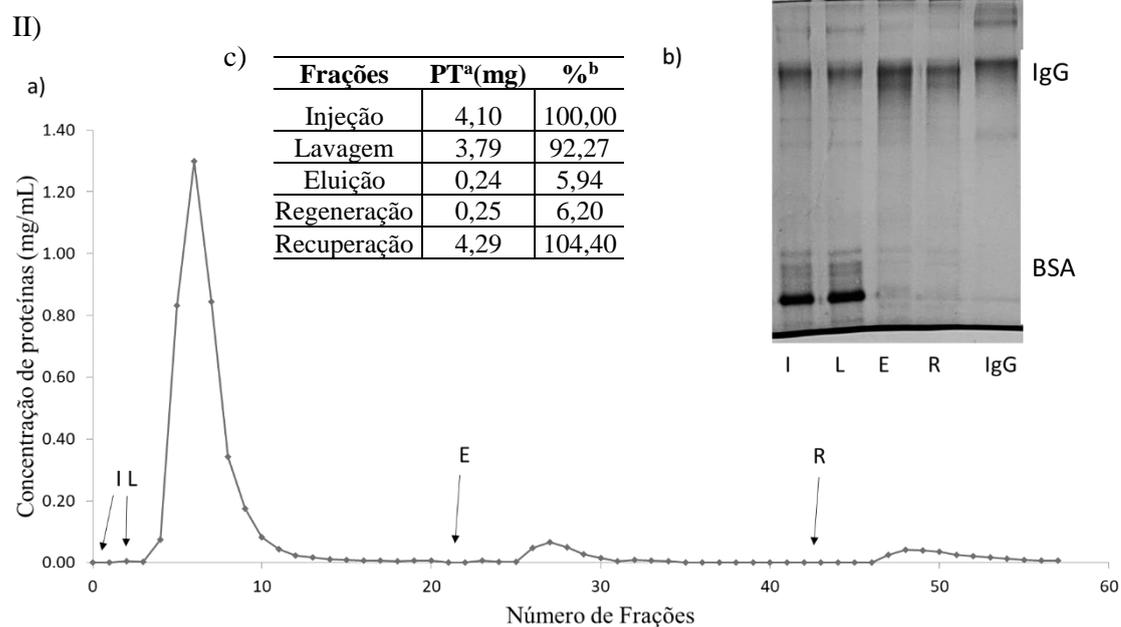
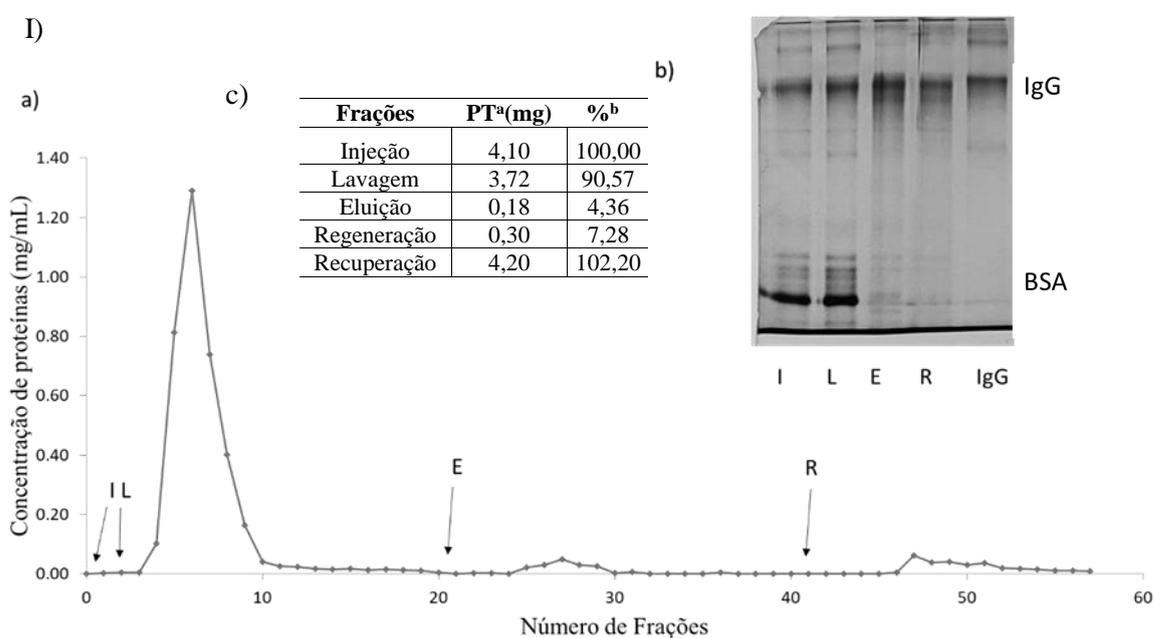


Figura A 18 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MA 25 mmol/L pH 7,0 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 uL de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).

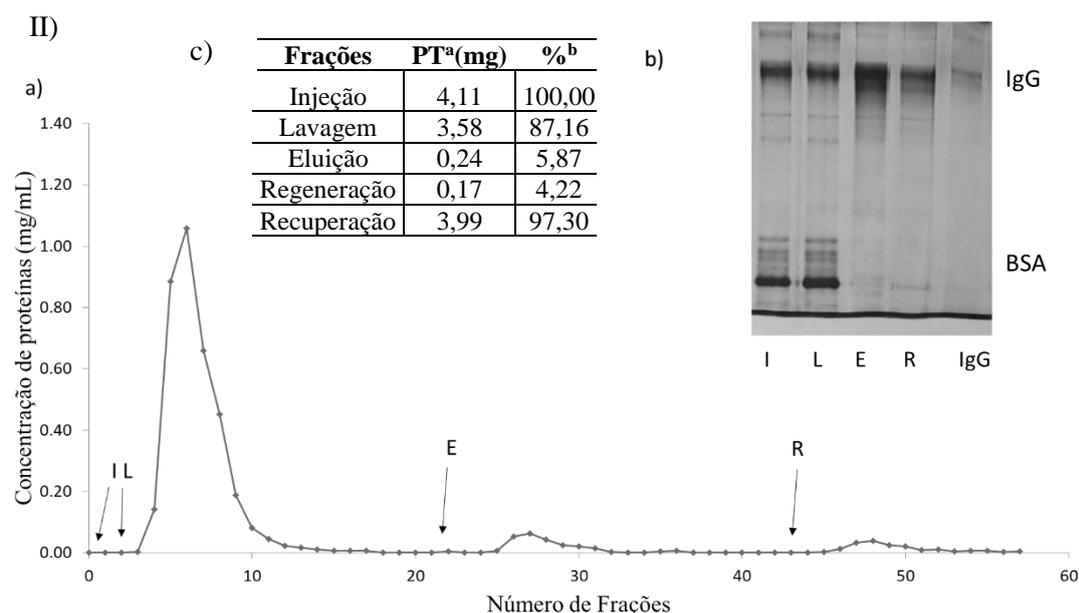
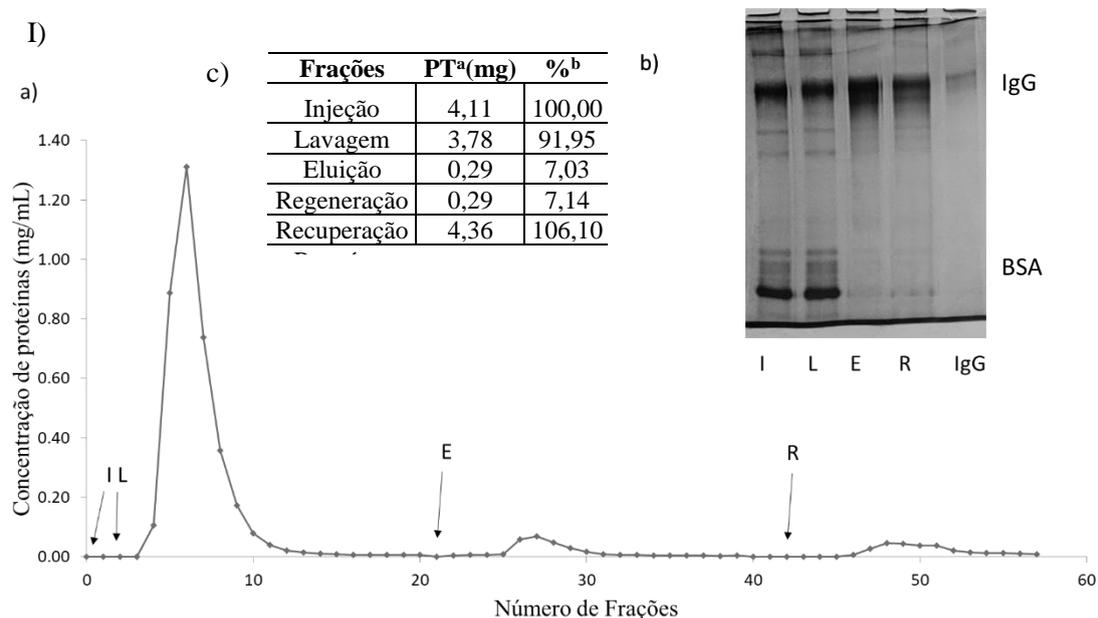
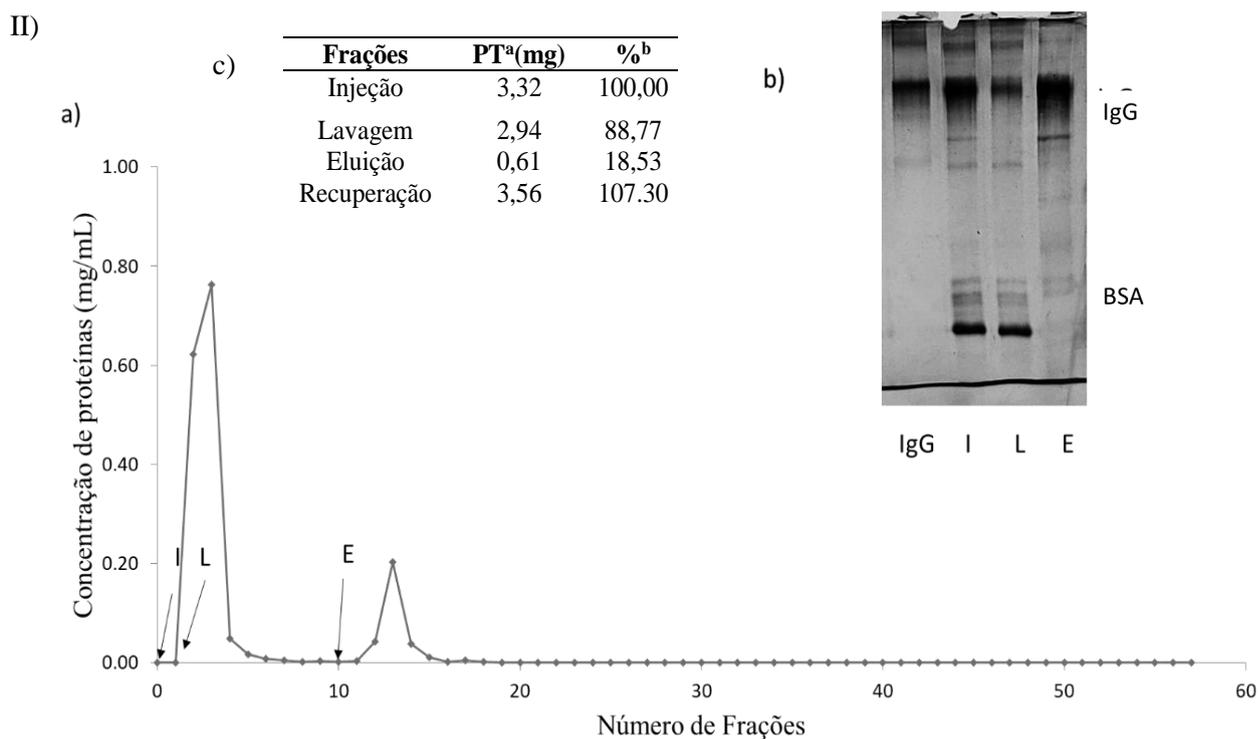
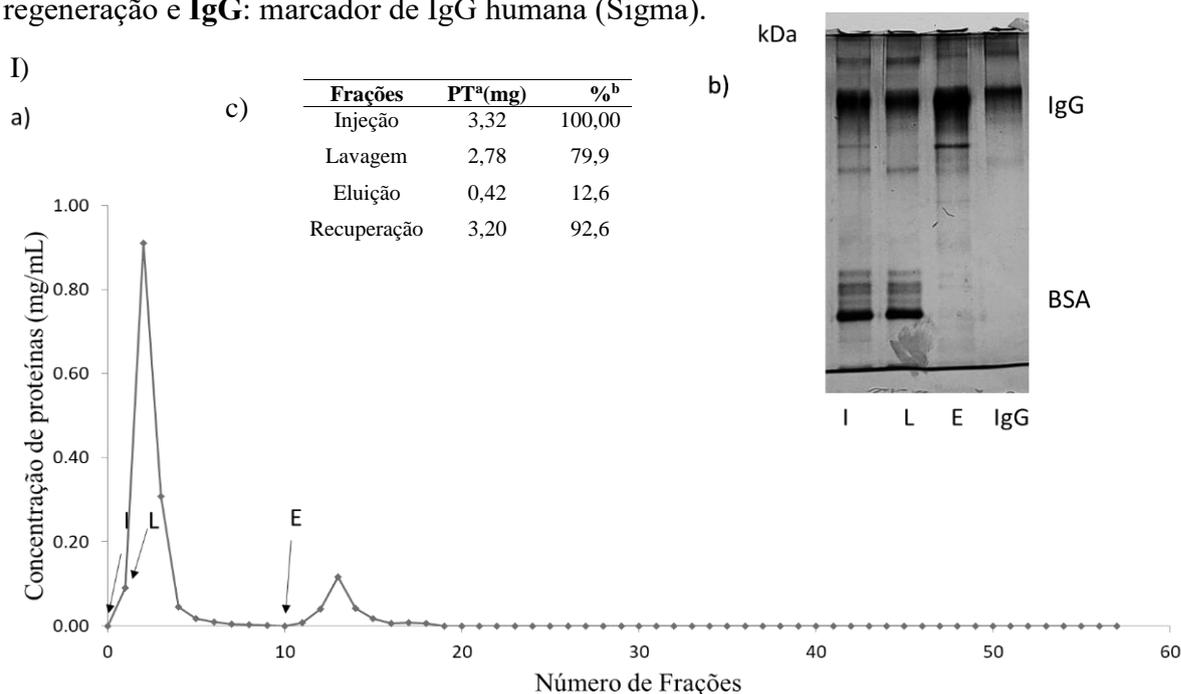


Figura A 19 - Experimento (I) e duplicata (II) para obtenção de: cromatograma (a), eletroforese (b) e balanço de massa (c) da cromatografia adsorção de proteínas em coluna contendo criogel PAAm-Alg-AGE-IDA, a partir de uma solução de soro bovino em tampão MOPS 25 mmol/L pH 6,5 Leito: 3,0 mL. Vazão: 1,0 mL/L. (a) Perfil cromatográfico, em que **I**: Injeção de 75 μ L de soro bovino diluído em 1,050 mL do tampão de adsorção MA 25 mmol/L pH 7,0 (15 vezes) **L**: Lavagem com MA 25 mmol/L pH 7,0. **E**: Eluição MA 25 mmol/L pH 4,0. **R**: Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Perfil eletroforético de *pools* das frações mais concentradas em proteínas, **I**: injeção; **L**: frações de lavagem; **E**: frações mais concentradas da eluição, **R**: frações da regeneração e **IgG**: marcador de IgG humana (Sigma).



APENDICE B: CURVAS DE RUPTURA

Figura B 1 – Experimento (I) e duplicata (II) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ com MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. Cromatograma (a), perfil eletroforético (b) e balanço de massa (c). Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Injeção: 50 mL de solução de soro bovino 15 vezes diluído em MOPS 25 mmol/L pH 6,5 (concentração: 3,85 e 4,20 mg/mL, respectivamente). F - *Flowthrough*: Proteínas não adsorvidas durante a injeção. L - Lavagem: MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. E - Eluição: Acetato 25 mmol/L a pH 4,0. R - Regeneração: EDTA 100 mmol/L pH 7,0. IgG: Marcador de IgG bovina. PT^a: proteínas totais, quantificadas pela metodologia de Bradford (1976). %^b: Razão entre a massa de proteínas totais de cada etapa e a massa de proteína alimentada, multiplicado por 100

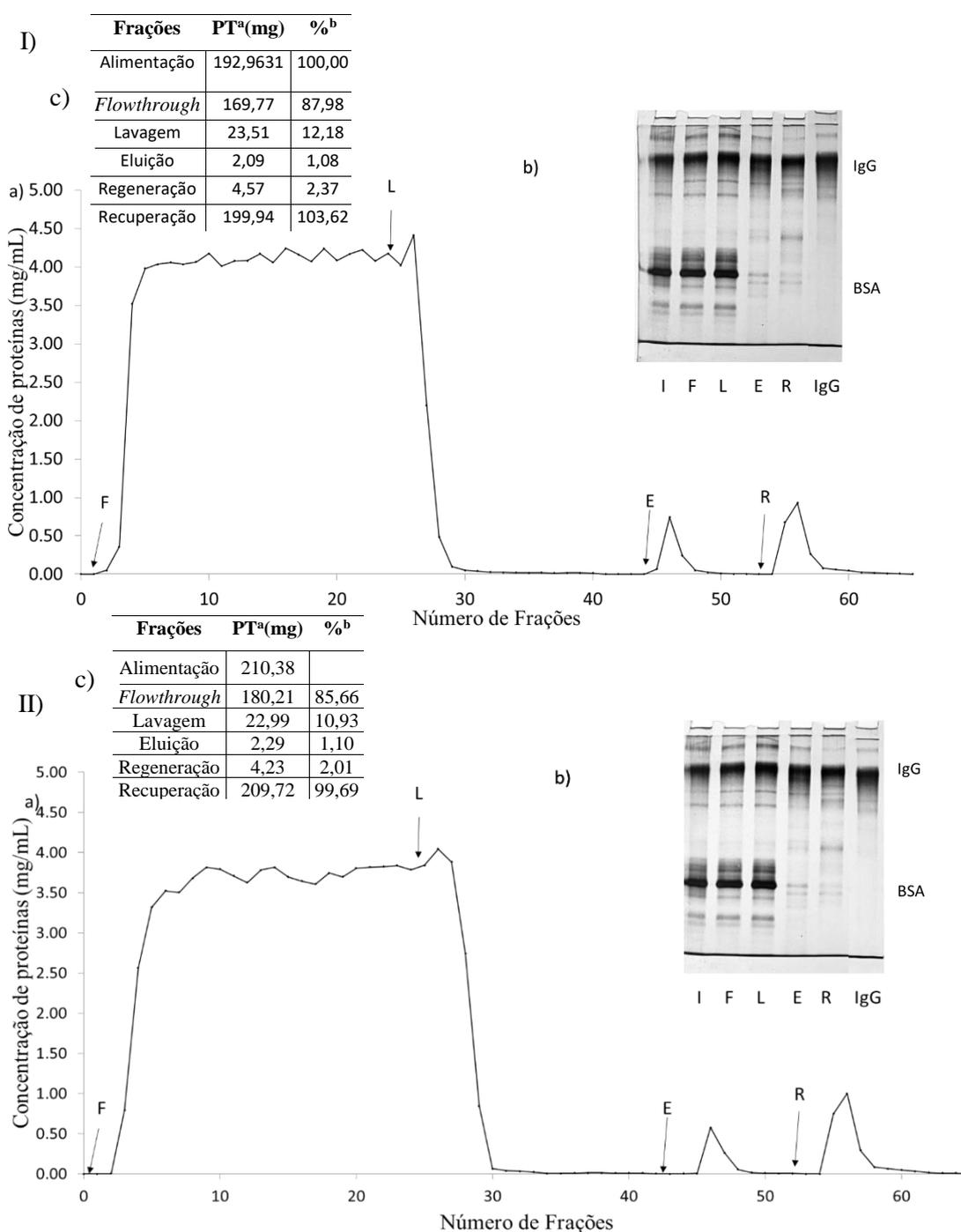
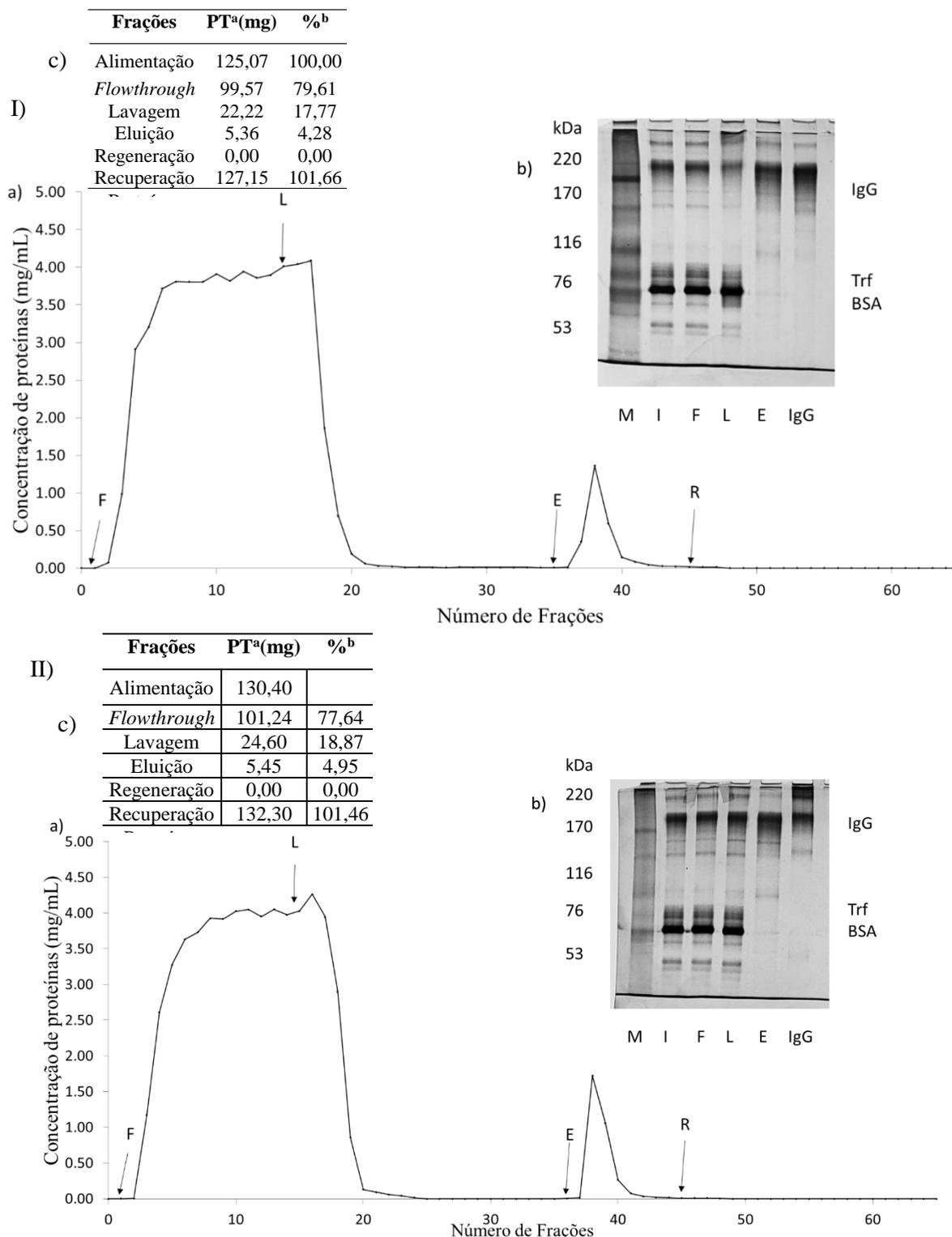
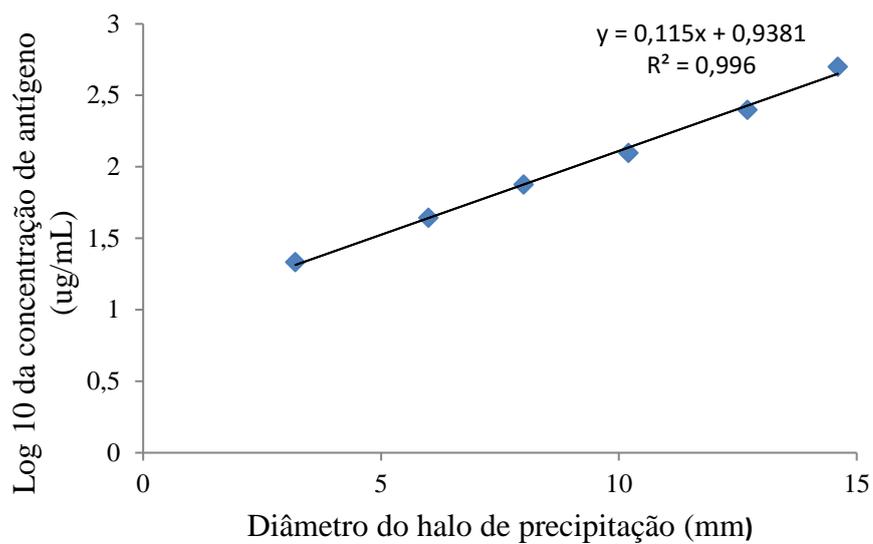


Figura B 2 - Experimento (I) e duplicata (II) da curva de ruptura em criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA com MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. Cromatograma (a), perfil eletroforético (b) e balanço de massa (c). Leito: 3,0 mL de criogel. Vazão: 1,0 mL/min. Injeção: 34 mL de solução de soro bovino 15 vezes diluído em MOPS 25 mmol/L pH 6,5 (concentração: 3,91 e 4,07 mg/mL, respectivamente). F - *Flowthrough*: Proteínas não adsorvidas durante a injeção. L - Lavagem: MOPS 25 mmol/L a pH 6,5. E - Eluição: MOPS 25 mmol/L + 0,5 mol/L de NaCl a pH 6,5. R - Regeneração: NaOH 10 mmol/L. IgG: Marcador de IgG bovina. PT^a: proteínas totais, quantificadas pela metodologia de Bradford (1976). %^b: Razão entre a massa de proteínas totais de cada etapa e a massa de proteína alimentada, multiplicado por 100



APÊNDICE C: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE IGG BOVINA PARA OS EXPERIMENTOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL.

Figura C 1 – Curva de calibração de blgG para os experimentos de imuno difusão radial



APÊNDICE D: BALANÇO DE MASSA DAS CROMATOGRAFIAS REALIZADAS COM IGG BOVINA PRÉ PURIFICADA

Tabela D 1 – Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em Tris-HCl nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA						
Tris-HCl						
	pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,45	100,0	3,3	100,0	3,45	100,0
Lavagem	3,41	98,9	3,3	100,1	3,43	99,3
Eluição	0,10	2,8	0,19	5,9	0,16	4,7
Regeneração	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
Recuperação	3,51	101,7	3,49	106,3	3,59	104,0

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%. Porcentagem de ^aPT: Proteínas totais em (mg).

Tabela D 2 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MA nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA						
MA						
	pH 6,0		pH 6,5		pH 7,0	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,23	100,0	3,39	100,0	3,42	100,0
Lavagem	2,99	92,8	3,19	93,9	3,61	105,4
Eluição	0,19	5,8	0,21	6,3	0,12	3,4
Regeneração	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
Recuperação	3,18	98,6	3,40	100,2	3,73	108,8

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%. Porcentagem de bIgG em cada etapa.

Tabela D 3 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MOPS nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA						
MOPS						
	pH 6,5		pH 7,0		pH 7,5	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,32	100,0	3,40	100,0	3,42	100,0
Lavagem	2,57	77,2	2,72	80,0	3,26	95,4
Eluição	0,67	20,0	0,57	16,9	0,35	10,2
Regeneração	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
Recuperação	3,24	97,2	3,29	96,9	3,61	105,4

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%. Porcentagem de bIgG em cada etapa.

Tabela D 4 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em Tris-HCl nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺						
Tris-HCl						
	pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,69	100,0	3,11	100,0	3,90	100,0
Lavagem	1,72	46,62	1,22	39,1	2,32	59,5
Eluição	0,20	5,3	0,13	4,1	0,08	2,1
Regeneração	2,09	56,7	1,92	61,6	1,75	44,9
Recuperação	4,01	108,6	3,26	104,8	4,15	106,5

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%: Porcentagem de ^aPT: Proteínas totais em (mg).

Tabela D 5 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MA nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺						
MA						
	pH 6,0		pH 6,5		pH 7,0	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,18	100,0	3,30	100,0	2,92	100,0
Lavagem	0,78	24,4	1,08	32,7	0,92	31,6
Eluição	0,34	10,7	0,20	6,1	0,12	4,2
Regeneração	2,04	64,2	2,23	67,4	2,03	69,6
Recuperação	3,16	99,3	3,51	106,2	3,73	105,4

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%: Porcentagem de bIgG em cada etapa.

Tabela D 6 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MOPS nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu ²⁺						
MOPS						
	pH 6,5		pH 7,0		pH 7,5	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	4,00	100,0	3,07	100,0	3,38	100,0
Lavagem	1,05	26,2	0,83	26,8	1,30	39,4
Eluição	1,95	48,7	1,26	41,1	1,00	29,7
Regeneração	1,06	26,5	1,10	35,6	1,06	31,4
Recuperação	4,06	101,4	3,29	103,5	3,36	99,5

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%: Porcentagem de bIgG em cada etapa.

Tabela D 7 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em Tris-HCl nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺						
Tris-HCl						
	pH 7,0		pH 7,5		pH 8,0	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	4,20	100,0	4,60	100,0	3,85	100,0
Lavagem	2,52	59,9	3,16	68,7	2,86	74,4
Eluição	0,40	9,5	0,30	6,5	0,18	4,6
Regeneração	1,62	38,6	1,17	25,3	0,84	21,9
Recuperação	4,54	108,0	4,62	100,4	3,88	100,9

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%. Porcentagem de ^aPT: Proteínas totais em (mg).

Tabela D 8 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MA nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺						
MA						
	pH 6,0		pH 6,5		pH 7,0	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,87	100,0	3,80	100,0	4,51	100,0
Lavagem	1,52	39,2	2,43	63,9	3,29	73,0
Eluição	0,35	9,1	0,13	3,3	0,11	2,5
Regeneração	1,83	47,2	1,50	39,4	1,30	28,8
Recuperação	3,69	95,5	4,05	106,6	4,70	104,3

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%. Porcentagem de bIgG em cada etapa.

Tabela D 9 - Balanço de massa da cromatografia com bIgG pré purificada em MOPS nos pHs indicados. Leito: 3 mL de criogel PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni²⁺. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976).

PAAm-Alg-AGE-IDA-Ni ²⁺						
MOPS						
	pH 6,5		pH 7,0		pH 7,5	
	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b	PT ^a	% ^b
Injeção	3,16	100,0	3,36	100,0	2,92	100,0
Lavagem	0,89	28,2	1,60	47,7	1,54	52,8
Eluição	0,56	17,7	0,37	11,0	0,37	12,7
Regeneração	1,68	53,0	1,18	35,2	1,06	36,4
Recuperação	3,13	98,9	3,15	93,9	2,98	101,8

^aPT: Proteínas totais em (mg).

^b%. Porcentagem de bIgG em cada etapa.