



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

HENRIQUE SEPÚLVEDA DEL RIO HAMACEK

**Síntese e caracterização de criogéis de poliacrilamida-quitosana
com íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados para a purificação de
imunoglobulina G humana por IMAC**

Campinas

2021

HENRIQUE SEPÚLVEDA DEL RIO HAMACEK

Síntese e caracterização de criogéis de poliacrilamida-quitosana com íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados para a purificação de imunoglobulina G humana por IMAC

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: Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Este trabalho corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno HENRIQUE SEPÚLVEDA DEL RIO HAMACEK 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

H17s Hamacek, Henrique Sepúlveda Del Rio, 1994-
Síntese e caracterização de criogéis de poli(acrilamida)-quitosana com íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados para a purificação de imunoglobulina G humana por IMAC / Henrique Sepúlveda Del Rio Hamacek. – 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. 4. Quitosana. 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: Synthesis and characterization of polyacrylamide-chitosan cryogels with immobilized metal ions Cu^{2+} and Ni^{2+} for purification of human immunoglobulin G with IMAC

Palavras-chave em inglês:

Immunoglobulin G

Chromatography

Proteins - Purification

Chitosan

Área de concentração: Engenharia Química

Títuloção: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Sônia Maria Alves Bueno [Orientador]

Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

Diana Cristina Silva de Azevedo

Data de defesa: 22-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9901-4813>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3036666707636094>

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por **HENRIQUE SEPÚLVEDA DEL RIO HAMACEK**, aprovada em 22 de setembro de 2021 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

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

FEQ / UNICAMP

Videoconferência

Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin

UNIFESP

Videoconferência

Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo

UFC

Videoconferência

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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às pessoas que me ajudaram durante o período do mestrado e permitiram que a dissertação fosse finalizada. Obrigado.

À minha família e aos meus amigos.

À Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno pela oportunidade, pela presença e pela orientação.

Aos professores da FEQ, agradeço especialmente ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda e à Profa. Dra. Ângela Maria Moraes.

Aos membros da Banca da Defesa do Mestrado, Profa. Dra. Diana Cristina Silva de Azevedo e Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin.

Aos meus colegas de Laboratório, em especial à Camila Marcuz e ao Igor Ferreira Fioravante.

Estendo os meus agradecimentos aos funcionários da FEQ da UNICAMP.

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

RESUMO

Anticorpos ou imunoglobulinas estão dentre as proteínas que mais requerem alto grau de pureza para suas aplicações, como no diagnóstico e no tratamento de doenças. Métodos de purificação atuais, os quais fornecem altos rendimentos e graus de pureza, para essas biomoléculas podem envolver a cromatografia de afinidade, uma técnica que se baseia na interação seletiva entre um ligante imobilizado e o produto de interesse. A utilização desses procedimentos levam a redução do número de etapas adicionais, custos e tempo de processamento quando comparados a outros métodos de purificação de proteínas. Esse trabalho visou sintetizar e caracterizar uma fase estacionária monolítica com propriedades adequadas para ser utilizada em cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados para a separação de imunoglobulinas G (hIgG) a partir do soro humano. Diferentes condições de criopolimerização dos monômeros acrilamida (AAm), bisacrilamida (MBAAm) e alil-glicidil-éter (AGE) na presença de cadeias de quitosana (CS) e do reagente de reticulação glutaraldeído (GA) foram testadas e o criogel que se mostrou mais adequado foi selecionado. O agente quelante ácido iminodiacético (IDA) foi imobilizado covalentemente no criogel, sendo denominado de PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Em seguida, as capacidades de adsorção e purificação de hIgG do criogel na presença ou não de íons Cu^{2+} e Ni^{2+} quelatados foram investigadas. No criogel contendo Ni^{2+} quelatado, o sistema tamponante fosfato de sódio a pH 7,0 (25 mmol L⁻¹) contendo imidazol (2 mmol L⁻¹) mostrou ser a condição mais promissora por proporcionar rendimento de 55% e pureza de 88% para hIgG. A curva de ruptura revelou que o criogel foi seletivo para hIgG em condições de saturação, resultando em pureza de 96%. Os experimentos cinéticos evidenciaram que o tempo de equilíbrio de adsorção é rapidamente alcançado. Finalmente, isotermas de adsorção foram construídas e os parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich foram ajustados por regressão não linear. O modelo de Langmuir-Freundlich, representou bem os dados experimentais de adsorção, resultando em capacidade máxima igual a 31,19 mg hIgG/g criogel seco e constante de dissociação da ordem de $K_d = 10^{-7}$ mol L⁻¹. Os resultados obtidos mostraram o potencial do criogel de poli(acrilamida) e quitosana com íons metálicos imobilizados em separar e purificar hIgG a partir do soro humano.

Palavras-chave: criogel, cromatografia, IMAC, imunoglobulina G, purificação

ABSTRACT

Antibodies or immunoglobulins are amongst the proteins that require the most degree of purity for their applications, such as in the diagnostic and treatment of diseases. Current purification methods, in which allow high yields and degree of purity, for those biomolecules can involve affinity chromatography, a technique that is based on the selective interaction between an immobilized ligand and the product of interest. The utilization of those procedures leads to the reduction of the number of additional steps, costs and processing time when compared to other protein purification methods. This work aimed to synthesize and characterize a monolithic stationary phase with adequate properties to be used in immobilized metal ion affinity chromatography to separate immunoglobulin G (hIgG) from human serum. Different conditions of cryopolymerization of the acrylamide, bisacrylamide, allyl-glycidyl-ether in the presence of chitosan chains and the crosslinking agent glutaraldehyde were tested and the cryogel that proved more suitable was selected. The chelating agent iminodiacetic acid (IDA) was covalently immobilized onto the cryogel, which was named as PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Then, the adsorption and purification capacities of hIgG by the cryogel in the presence or not of chelated Cu^{2+} and Ni^{2+} ions were investigated. In the cryogel with chelated Ni^{2+} , the sodium phosphate buffer system at pH 7,0 (25 mmol L⁻¹) with imidazole (2 mmol L⁻¹) proved to be the most promising condition for providing yield of 55% and purity of 88% for hIgG. The breakthrough curve revealed that the cryogel continued to be selective for hIgG under saturation conditions, resulting in 96% of purity. The kinetics experiments evidenced that the equilibrium time of the adsorption is quickly reached. Finally, adsorption isotherms were built and the parameters of the Langmuir and Langmuir-Freundlich models were adjusted by non-linear regression. The Langmuir-Freundlich model represented well the adsorption experimental data, resulting in the maximum capacity equal to 31,19 mg hIgG/g dry cryogel and a dissociation constant in the order of $K_d = 10^{-7}$ mol L⁻¹. The obtained results proved the potential of the cryogel of polyacrylamide and chitosan with immobilized metal ions to separate and purify hIgG from human serum.

Key-words: cryogel, chromatography, IMAC, immunoglobulin G, purification

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Etapas 1 e 2: Síntese e caracterização dos criogéis monolíticos. | 29 |
| Figura 2 - Etapas 3 e 4: Ensaios cromatográficos com IgG de alta pureza e soro humano. | 30 |
| Figura 3 - Etapa 5: Realização de experimentos para determinação da cinética de adsorção; obtenção de isothermas e curvas de ruptura..... | 31 |
| Figura 4 - Estrutura esquemática de uma imunoglobulina G. Abreviações: V: região variável; C: região constante; Ag: antígeno; Fab: fragmento de ligação com o antígeno; Fc: fragmento cristalizável; L: referente à cadeia leve; H: referente à cadeia pesada.... | 33 |
| Figura 5 - Ilustração das etapas da cromatografia de afinidade | 36 |
| Figura 6 – Estrutura proposta do ácido nitrilotriacético (NTA) como agente quelante de íons metálicos imobilizados. | 39 |
| Figura 7 - Representação esquemática de um complexo octaédrico onde o íon metálico de transição é o átomo central e seis ligantes que os cercam. | 41 |
| Figura 8 - Mecanismos de interação entre um íon metálico imobilizado e uma proteína. a) Interação eletrostática e de carga induzida; b) Coordenação ou interação entre doador e receptor de elétrons; c) Ligação covalente. S: suporte; Me: íon metálico; Pr: proteína. | 42 |
| Figura 9 – Estrutura proposta do suporte de IMAC com o TREN como agente quelante de íons metálicos. | 44 |
| Figura 10 – Estrutura proposta do suporte de IMAC com o TED como agente quelante de íons metálicos. | 44 |
| Figura 11 - Criogéis sintetizados como esferas(a), membranas (b) e monolitos (c). | 46 |
| Figura 12 - Diagrama simplificado da formação de um criogel monolítico macroporoso | 48 |
| Figura 13 – Estrutura química da poliacrilamida (PAAm, em preto) reticulada com o N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAm, em vermelho) | 49 |
| Figura 14 - Estrutura da quitosana parcialmente desacetilada. | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 - Representação esquemática da reticulação de cadeias de quitosana (CS, em preto) com glutaraldeído (GA, em vermelho)..... | 52 |
| Figura 16 - Reticulação de quitosana (CS, em preto) com epícloridrina (ECH, em verde) em meio básico e aquecimento..... | 52 |
| Figura 17 - Curva de ruptura de adsorção de solutos em leito fixo..... | 57 |
| Figura 18 - Criogel monolítico de poli(acrilamida e quitosana (PAAm-CS; controle).. | 76 |
| Figura 19 – Criogel monolítico de: a) PAAm-CS-AGE(200); b) PAAm-CS-AGE(300) | 78 |
| Figura 20 - Criogel monolítico de poli(acrilamida e quitosana de baixa massa molecular (PAAm-CS _{LM})..... | 80 |
| Figura 21 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CS _{LM} -GA(10); b) PAAm-CS _{LM} -GA(20); e c) PAAm-CS _{LM} -GA(40)..... | 81 |
| Figura 22 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CS _{LM} -AGE(200); e b) PAAm-CS _{LM} -AGE(300)..... | 82 |
| Figura 23 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(200); e b) PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(300)..... | 83 |
| Figura 24 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CS _{LM6} ; b) PAAm-CS _{LM6} -GA(20); e c) PAAm-CS _{LM6} -AGE(200)..... | 83 |
| Figura 25 - Reação entre os grupos epóxi do AGE e o IDA em meio básico..... | 84 |
| Figura 26 - Imagens obtidas por MEV do criogel PAAm-CS. Superfície do criogel de PAAm-CS ampliada: a) 250 vezes; b) 1000 vezes; Seção transversal do criogel de PAAm-CS ampliada: c) 250 vezes; d) 1000 vezes; Seção longitudinal do criogel de PAAm-CS ampliada: e) 250 vezes; f) 1000 vezes..... | 90 |
| Figura 27 - Imagens obtidas por MEV do criogel PAAm-CS-GA. Superfície do criogel de PAAm-CS-GA ampliada: a) 250 vezes; b) 1000 vezes; Seção transversal do criogel de PAAm-CS-GA ampliada: c) 250 vezes; d) 1000 vezes; Seção longitudinal do criogel de PAAm-CS-GA ampliada: e) 250 vezes; f) 1000 vezes..... | 91 |
| Figura 28 - Imagens obtidas por MEV do criogel PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Superfície do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA ampliada: a) 250 vezes; b) 1000 | |

vezes; Seção transversal do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA ampliada: c) 250 vezes; d) 1000 vezes; Seção longitudinal do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA ampliada: e) 250 vezes; f) 1000 vezes..... 92

Figura 29 - Composição mássica do criogel úmido de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA, em percentagem 95

Figura 30 - Estudo da degradação in vitro do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em PBS a temperatura ambiente..... 97

Figura 31 - Curvas de titulação dos criogéis: a) PAAm-CS-GA-AGE-IDA; b) PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺; e c) PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ 98

Figura 32 – Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + NaCl; Eluição: acetato de sódio pH 4,0 + NaCl; **3** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl; **5** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl..... 103

Figura 33 - Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 6,5; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹). 104

Figura 34 - Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺ em tampão: a) NaP e b) Tris-HCl a pH 7,0. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: NaP ou Tris-HCl pH 7,0; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹);

3 - Adsorção: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl..... 105

Figura 35 - Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **3** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + Imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** - NaP pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **5** – Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl. 107

Figura 36 – Proteínas totais (%) do soro humano não adsorvidas (●) e adsorvidas (○) em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em diferentes sistemas tamponantes. Injeção: 1,025 mL de soro humano (3,5 mg mL⁻¹; diluído 15 vezes). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. 110

Figura 37 – Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% em acrilamida) das frações cromatográficas em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA realizadas com injeção de soro humano diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem; E: pool das frações mais concentradas da eluição; hIgG: marcador de IgG humana (Sigma-Aldrich); hTRF: transferrina humana; HSA: albumina do soro humano. 110

Figura 38 – a) Proteínas totais (%) e b) perfis eletroforéticos de SDS-PAGE obtidos nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Injeção: 75 µL de soro humano diluído em 1,050 mL (15 vezes) de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **2** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl; **3** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** - NaP pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **5** – Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl. 112

Figura 39 – a) Proteínas totais (%) e b) perfis eletroforéticos obtidos nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Injeção: 75 µL de solução de soro humano diluído em 1,050 mL (15 vezes) em tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl; **2** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **3** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + Imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + Imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** - NaP pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **5** – Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl..... 114

Figura 40 – a) Curva de ruptura de proteínas do soro humano obtida para criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Leito: 3,0 mL de criogel. Tampão de adsorção: NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹). Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹). Injeção: 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão de adsorção (concentração aproximada de 3,1 mg mL⁻¹ em termos de proteínas totais, volume total de 33 mL de solução contendo soro humano). Massa total de proteína alimentada: 99,85 mg; b) Eletroforese da curva de ruptura. Legenda: I – Alimentação; F – Flowthrough; W - Lavagem; E – Eluição; R - Regeneração. M: marcador de alta massa molecular; I: alimentação; 2 a 6: primeiras frações (volume de 1,0 mL cada) do flowthrough coletadas; F: pool das demais frações do flowthrough; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina. 119

Figura 41 – Dados experimentais de adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹) a 25 °C (●) e curvas ajustadas dos modelos de: a) Langmuir e b) Langmuir-Freundlich 123

Figura B. 1 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0; W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0; E - Eluição: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana. 156

Figura B. 2 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão Tris-HCl a pH 7,0; W - Lavagem: Tampão Tris-HCl a pH 7,0; E - Eluição: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana. 157

Figura B. 3 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão NaP a pH 7,0; W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0; E - Eluição: Tampão NaP a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana. 158

Figura B. 4 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MES a pH 5,5; W - Lavagem: Tampão MES a pH 5,5; E - Eluição: Tampão MES a pH 5,5 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana. 159

Figura B. 5 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 6,5; W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 6,5; E - Eluição: Tampão MOPS a pH 6,5 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana. 160

Figura B. 6 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
 Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão MOPS a pH 7,0 + Imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 161

Figura B. 7 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
 Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + Imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina. 162

Figura B. 8 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
 Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + Imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 163

Figura B. 9 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão NaP a pH 7,0 + Imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 164

Figura B. 10 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 6,5 + Imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão MOPS a pH 6,5 + imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 165

Figura B. 11 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina. 166

Figura B. 12 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do

soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: MOPS a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 167

Figura B. 13 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: MOPS a pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 168

Figura B. 14 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 169

Figura B. 15 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹.
Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 +

NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações de eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; IgG: marcador de hIgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina..... 170

Figura C. 1 – Curva de calibração de hIgG para os experimentos de imunodifusão radial (RID)..... 171

Figura D. 1 - Experimento (1) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da curva de ruptura de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 38 mL de 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); F – Flowthrough: Proteínas não adsorvidas durante a injeção; W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; 2 a 6: primeiras frações (Volume: 1,0 mL cada) do flowthrough coletadas; F: pool das demais frações do flowthrough; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina. 172

Figura D. 2 – Duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da curva de ruptura de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 28 mL de 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); F – Flowthrough: Proteínas não adsorvidas durante a injeção; W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; 2 a 6: primeiras frações (Volume: 1,0 mL cada) do flowthrough coletadas; F: pool das demais frações do flowthrough; W: pool das frações de lavagem mais concentradas; E: pool das frações da eluição mais concentradas; R: pool das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina. 173

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Afinidade do complexo proteína-IDA-Me ²⁺ em função dos resíduos de Histidina (His) ou Triptofano (Trp) existentes na superfície das proteínas. | 41 |
| Tabela 2 - Volumes de GA e AGE utilizados para a síntese dos criogéis e a sua nomenclatura correspondente | 62 |
| Tabela 3 - Quantificação de íons a) Cu ²⁺ e b) Ni ²⁺ eluídos de diferentes criogéis monolíticos de poliacrilamida e quitosana com IDA imobilizado, do respectivo criogel controle e a diferença da quantidade de íons Cu ²⁺ e Ni ²⁺ quelatados pelo IDA, em termos de massa de criogel seco e volume de criogel úmido..... | 86 |
| Tabela 4 - Capacidade de intumescimento de criogéis de poliacrilamida e quitosana ou poliacrilamida e alginato derivatizados. | 94 |
| Tabela 5 - Valores de ponto de carga zero dos criogéis de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu ²⁺ e PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni ²⁺ | 98 |
| Tabela 6 – hIgG pré-purificada adsorvida em criogel de PAAm-CS-GA nos tampões MOPS, NaP e Tris-HCl a pH 7,0 e tampão MES a pH 5,5. Volume do leito: 3,0 mL. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL do tampão de adsorção. | 100 |
| Tabela 7 - hIgG pré-purificada adsorvida em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA nos tampões MOPS, NaP e Tris-HCl a pH 7,0, tampão MOPS a pH 6,5 e tampão MES a pH 5,5. Volume do leito: 3,0 mL. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL do tampão de adsorção. | 101 |
| Tabela 8 - Balanço de massa do ensaio cromatográfico para purificação de hIgG a partir de soro humano no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni ²⁺ . Lavagem: NaP a pH 7,0 + imidazol (2mmol L ⁻¹); Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L ⁻¹); Regeneração: EDTA a pH 7,0 (100 mmol L ⁻¹). | 116 |
| Tabela 9 - Balanço de massa da curva de ruptura para purificação de hIgG a partir de soro humano no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni ²⁺ . Lavagem: NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L ⁻¹); Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L ⁻¹); Regeneração: EDTA a pH 7,0 (100 mmol L ⁻¹). | 121 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 10 – Tempos de equilíbrio (min) estimados para as concentrações de 0,5 mg hIgG mL ⁻¹ e 2,0 mg hIgG mL ⁻¹ | 122 |
| Tabela 11 - Parâmetros obtidos por meio do ajuste não-linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni ²⁺ em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L ⁻¹) a 25 °C. | 124 |
| Tabela A.1. 1 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0 e tampão MES a pH 5,50 (25 mmol L ⁻¹). Leito: 3,0 mL. Eluição: Respectivo tampão + NaCl (1,0 mol L ⁻¹). Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; Rec.: Recuperação. | 153 |
| Tabela A.2. 1 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS a pH 6,5 e 7,0, Tris-HCl e NaP a pH 7,0, tampão MES a pH 5,50. Leito: 3,0 mL de PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Eluição: Respectivo tampão + NaCl (1,0 mol L ⁻¹). Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; Rec.: Recuperação. | 153 |
| Tabela A.2. 2 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu ²⁺ . Eluição: Tampão acetato a pH 4,0 (25 mmol L ⁻¹). Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação. | 153 |
| Tabela A.2. 3 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L ⁻¹). Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu ²⁺ . Eluição: Respectivo tampão + imidazol (100 mmol L ⁻¹). Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação. | 153 |
| Tabela A.2. 4 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L ⁻¹) + imidazol (2 mmol L ⁻¹). Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu ²⁺ . Eluição: Respectivo tampão + NaCl (100 mmol L ⁻¹) + imidazol (100 mmol L ⁻¹). Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação. | 154 |

Tabela A.2. 5 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampão MOPS a pH 6,5. Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Eluição: MOPS a pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹) ou tampão acetato de sódio a pH 4,0. Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação. 154

Tabela A.2. 6 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS a pH 6,5 e 7,0, Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹), NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹). Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Eluição: Respectivo tampão + imidazol (100 mmol L⁻¹) ou acetato de sódio a pH 4,0. Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação..... 154

Tabela B. 1 - Condutividade (mS cm⁻¹) mensurada nos tampões preparados 174

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 25 |
| 1.1. OBJETIVO | 27 |
| 1.2. ESTRATÉGIA DE TRABALHO | 28 |
| | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 32 |
| 2.1. ANTICORPOS E IMUNOGLOBULINA G | 32 |
| 2.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS | 35 |
| 2.2.1. Fundamentos de IMAC | 38 |
| 2.2.2. Íons metálicos empregados em IMAC | 40 |
| 2.2.3. Agentes quelantes empregados em IMAC | 43 |
| 2.2.4. Suportes sólidos empregados em IMAC | 45 |
| 2.3. CRIOGÉIS MONOLÍTICOS | 47 |
| 2.4. POLIACRILAMIDA | 48 |
| 2.5. QUITOSANA | 50 |
| 2.6. CRIOGÉIS MONOLÍTICOS DE POLIACRILAMIDA-QUITOSANA | 53 |
| 2.7. ADSORÇÃO | 54 |
| 2.7.1. Cinética | 54 |
| 2.7.2. Adsorção no equilíbrio para obtenção de isotermas | 55 |
| 2.7.3. Curvas de ruptura | 56 |
| | |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 59 |
| 3.1. MATERIAIS | 59 |
| 3.1.1. Reagentes | 59 |
| 3.1.2. Equipamentos | 59 |
| 3.2. MÉTODOS | 60 |
| 3.2.1. Preparação das soluções de quitosana | 60 |
| 3.2.2. Síntese de criogel de poliacrilamida e quitosana | 60 |
| 3.2.2.1. Variação na concentração de alil-glicidil-éter (AGE) e glutaraldeído (GA) | 62 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2.2. Ativação do criogel PAAm-CS com epicloridrina (ECH)..... | 63 |
| 3.2.2.3. Imobilização do agente quelante IDA | 63 |
| 3.2.3. Quantificação de íons metálicos quelatados pelo criogel com IDA | |
| imobilizado | 64 |
| 3.2.4. Ensaios cromatográficos | 65 |
| 3.2.4.1. Experimentos cromatográficos com hIgG e soro humano | 65 |
| 3.2.4.2. Ensaios cromatográficos com hIgG e soro humano em criogel com íons Cu ²⁺ e Ni ²⁺ imobilizados..... | 66 |
| 3.2.5. Curva de ruptura de adsorção do criogel | 67 |
| 3.2.6. Cinética de adsorção de hIgG | 67 |
| 3.2.7. Isotermas de adsorção de hIgG | 68 |
| 3.2.8. Métodos analíticos | 69 |
| 3.2.8.1. Capacidade de intumescimento | 69 |
| 3.2.8.2. Estimativa da porosidade | 69 |
| 3.2.8.3. Quantificação da capacidade do criogel em se ligar à água presente no ar..... | 70 |
| 3.2.8.4. Determinação da resistência ao fluxo do criogel..... | 70 |
| 3.2.8.5. Estudo de degradação in vitro do criogel | 71 |
| 3.2.8.6. Cálculo do rendimento de monômeros do criogel..... | 71 |
| 3.2.8.7. Medição do ponto de carga superficial zero do criogel..... | 71 |
| 3.2.8.8. Morfologia do criogel..... | 72 |
| 3.2.8.9. Eletroforese SDS-PAGE..... | 73 |
| 3.2.8.10. Imunodifusão radial (RID) | 73 |
| 3.2.8.11. Dosagem de proteínas totais | 74 |
| | |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |
| 4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÕES VISUAIS DOS CRIOGÉIS | 75 |
| 4.1.1. Estudos da variação da composição dos criogéis | 75 |
| 4.1.1.1. Criogéis sintetizados com GA..... | 76 |
| 4.1.1.2. Criogéis sintetizados com AGE | 77 |
| 4.1.1.3. Ativação do criogel de PAAm-CS com ECH..... | 78 |
| 4.1.2. Estudo da variação da composição em criogéis sintetizados com solução de CS_{LM} | 79 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.3. <i>Estudo da variação da composição em criogéis sintetizados com solução de CS_{LM6}</i> | 83 |
| 4.2. <i>IMOBILIZAÇÃO DO AGENTE QUELANTE IDA E QUANTIFICAÇÃO DE Cu²⁺ E Ni²⁺ QUELATADOS PELOS CRIOGÉIS</i> | 84 |
| 4.3. <i>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA</i> | 89 |
| 4.4. <i>CARACTERIZAÇÕES FÍSICAS</i> | 93 |
| 4.4.1. <i>Rendimento de monômeros em criogel de PAAm-CS-GA-AGE</i> | 96 |
| 4.4.2. <i>Degradação in vitro de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA</i> | 97 |
| 4.4.3. <i>Determinação do ponto de carga zero do criogel</i> | 98 |
| 4.5. <i>ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM hIgG PRÉ-PURIFICADA</i> | 99 |
| 4.5.1. <i>Adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA</i> | 99 |
| 4.5.2. <i>Adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA</i> | 100 |
| 4.5.3. <i>Adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Me²⁺</i> | 102 |
| 4.5.3.1. <i>PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺</i> | 102 |
| 4.5.3.2. <i>PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺</i> | 106 |
| 4.6. <i>ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA PURIFICAÇÃO DE hIgG A PARTIR DO SORO HUMANO</i> | 108 |
| 4.6.1. <i>Purificação de hIgG a partir do soro humano em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA</i> | 109 |
| 4.6.2. <i>Purificação de hIgG a partir do soro humano em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Me²⁺</i> | 111 |
| 4.6.2.1. <i>PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺</i> | 111 |
| 4.6.2.2. <i>PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺</i> | 113 |
| 4.6.3. <i>Determinação da melhor condição de purificação de hIgG a partir de soro humano pelo criogel</i> | 116 |
| 4.7. <i>CURVA DE RUPTURA DO SORO HUMANO EM CRIOGÉIS DE PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺</i> | 118 |
| 4.8. <i>CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE hIgG</i> | 122 |
| 4.9. <i>ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE hIgG</i> | 122 |
| 5. <i>CONCLUSÃO</i> | 127 |

| | |
|--|------------|
| 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 129 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 130 |
| APÊNDICE A. BALANÇOS DE MASSA DE CROMATOGRAFIAS COM hIgG PRÉ-PURIFICADA | 153 |
| APÊNDICE B. CROMATOGRAMAS, BALANÇOS DE MASSA E ELETROFORESES DOS ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS REALIZADOS COM SORO HUMANO | 156 |
| APÊNDICE C. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE hIgG PARA OS EXPERIMENTOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL | 171 |
| APÊNDICE D. CROMATOGRAMAS, BALANÇOS DE MASSA E ELETROFORESES DOS ENSAIOS DE CURVA DE RUPTURA REALIZADOS COM SORO HUMANO | 172 |
| APÊNDICE E. MEDIDA DE CONDUTIVIDADE DOS TAMPÕES UTILIZADOS NOS ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS | 174 |

1. INTRODUÇÃO

Avanços nas tecnologias relacionadas à engenharia genética e técnicas de DNA recombinante propiciaram um aumento significativo na demanda por proteínas. Entretanto, grande parte das operações de produção que envolvem biomoléculas ainda são muito custosas, principalmente às relacionadas à recuperação e purificação, pois pode chegar a ser responsável por 50 a 80% do custo total de produção da proteína-alvo (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007). Dessa forma, há uma preocupação em desenvolver novos métodos de purificação, principalmente os que minimizem os custos, possibilitando a aquisição desses produtos por maior parte da população, resultando em benefícios socioeconômicos. Requerem-se, então, técnicas de purificação que sejam simples e com alto custo-benefício (SINGH *et al.*, 2014).

Dentre as proteínas com a maior demanda de quantidade e de pureza, encontram-se os anticorpos. Cada tipo de anticorpo é específico para um determinado antígeno, dessa forma as aplicações dos anticorpos são extensas, como em testes diagnóstico e tratamento de doenças e em pesquisas na área de biologia e biotecnologia (ROQUE; SILVA; TAIPA, 2007).

Devido à todas essas possibilidades de aplicação, em 2020, anticorpos monoclonais para uso clínico e diagnóstico possuíam um valor de mercado maior que 106 bilhões de dólares de acordo com *Business Wire* (2021). Projeções de mercado estimam que as vendas globais de anticorpos monoclonais aproxime de 179 bilhões de dólares até o final de 2025, explicado pela taxa de aprovação de pelo menos 4 novos produtos por ano desde 2014 (ECKER; JONES; LEVINE, 2014; Business Wire, 2021).

Com o intuito de reduzir custos dos processos de recuperação e purificação, a aplicação de técnicas seletivas para a remoção de contaminantes e impurezas da solução contendo o anticorpo de interesse tem sido consideradas, sendo uma delas, a cromatografia de afinidade (THÖMMES; ETZEL, 2007). A cromatografia de afinidade é uma técnica que possibilita a obtenção de anticorpos com maior grau de pureza e com maior rendimento, quando comparada a técnicas que não envolvam afinidade (HUSE; BÖHME; SCHOLZ, 2002).

A cromatografia de afinidade se baseia na interação seletiva entre um ligante imobilizado em uma matriz sólida e o produto de interesse (VIJAYALAKSHMI, 1989; ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017). As interações entre o ligante e a molécula de

interesse podem ser de natureza biológica funcional (bioespecífica) ou de natureza estrutural (pseudobioespecífica) (ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017). Os ligantes bioespecíficos geralmente são macromoléculas frágeis, de alto custo e difíceis de imobilizar em suportes sólidos, o que, muitas vezes, inviabiliza a utilização desses adsorventes em larga escala. Em contrapartida, ligantes pseudobioespecíficos, como os quelatos metálicos são de baixo custo e simples, entretanto, a especificidade e as interações entre o ligante e a molécula de interesse são mais fracas, propiciando menor seletividade ao processo (VIJAYALAKSHMI, 1989; TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004).

Na técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), ligações de coordenação de natureza reversível são formadas entre o ligante pseudobioespecífico quelato metálico e a proteína-alvo, separando-a da mistura na qual ela se encontra, resultando na obtenção de proteínas purificadas com alto grau de pureza (PORATH, 1992; CHAGA, 2001).

Em cromatografia de afinidade, membranas, partículas esféricas e monolitos podem ser empregados como fases estacionárias para a purificação de biomoléculas (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017). Especificamente sobre os monolitos, estudos mostram que essas estruturas são capazes de garantir transferência de massa por convecção, maior capacidade de adsorção e uma menor difusão nos poros, perda de carga e presença de caminhos preferenciais quando comparados às outras matrizes sólidas previamente citadas (ÇORMAN, 2018). Monolitos podem ser obtidos por diferentes técnicas a partir de materiais orgânicos ou inorgânicos. Dentre as técnicas utilizadas para obtenção de monolitos orgânicos, pode-se citar a criogelificação. A literatura relata o emprego de criogéis monolíticos como fase estacionária em cromatografia de afinidade para a purificação de imunoglobulinas (BARROSO *et al.*, 2013).

Diferentes formulações de precursores de criogel podem ser empregadas para sintetizar criogéis. Criogéis provenientes de polímeros sintéticos vêm sendo produzidos para serem utilizados como fases estacionárias em cromatografia de afinidade para a purificação de proteínas, tais como os criogéis de poliacrilamida (PAAm) e hidroxietil metacrilato (HEMA) (LOZINSKY *et al.*, 2003; BAKHSHPOUR *et al.*, 2019). Por outro lado, criogéis produzidos por polímeros naturais, como os polissacarídeos, destacam-se

devido a questões relacionadas à sustentabilidade de processos químicos e biocompatibilidade. (BARROSO *et al.*, 2013).

No entanto, criogéis compostos de apenas polissacarídeos mostraram-se frágeis, sendo inadequados para uso como fase estacionária em cromatografia. Dessa forma, a combinação de polissacarídeos com polímeros sintéticos pode impactar positivamente certas características dos criogéis, como a sua resistência mecânica (JAIN *et al.*, 2015).

Criogéis monolíticos de poliacrilamida e quitosana foram sintetizados por Dragan *et al.* (2012) e Jain & Kumar (2009) para o uso em separação de corantes e em *scaffolds* 3D para o crescimento de células, respectivamente. Esses estudos relataram que o material obtido pela combinação desses compostos possui macroporos, é biocompatível e é mecanicamente mais resistente quando comparados a criogéis de apenas poliacrilamida ou apenas quitosana (JAIN; KUMAR, 2009).

Tendo em vista essas considerações, o emprego da IMAC para a purificação de imunoglobulinas utilizando um criogel monolítico de poliacrilamida e quitosana pode possivelmente atender as demandas levantadas pela indústria em relação à necessidade de se desenvolver processos simples e de baixo custo para a purificação de anticorpos.

1.1. OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo preparar e caracterizar um criogel monolítico de poliacrilamida (PAAm) e quitosana (CS) com o agente quelante ácido iminodiacético (IDA) imobilizado, visando a sua aplicação como fase estacionária na cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) para a purificação de imunoglobulina G (hIgG) a partir do soro humano.

Para alcançar o objetivo deste trabalho, os objetivos específicos foram: estudar o efeito da concentração do monômero alil-glicidil-éter (AGE) e do agente de reticulação glutaraldeído (GA) nos aspectos físicos e visuais dos criogéis monolíticos de poliacrilamida e quitosana; avaliar diferentes sistemas tamponantes para a adsorção e purificação de hIgG; verificar a adsorção de hIgG e proteínas do soro humano em criogéis sintetizados com IDA livre e com quelatos IDA-Ni²⁺ e IDA-Cu²⁺; determinar parâmetros termodinâmicos e cinéticos de adsorção de hIgG no criogel.

1.2. ESTRATÉGIA DE TRABALHO

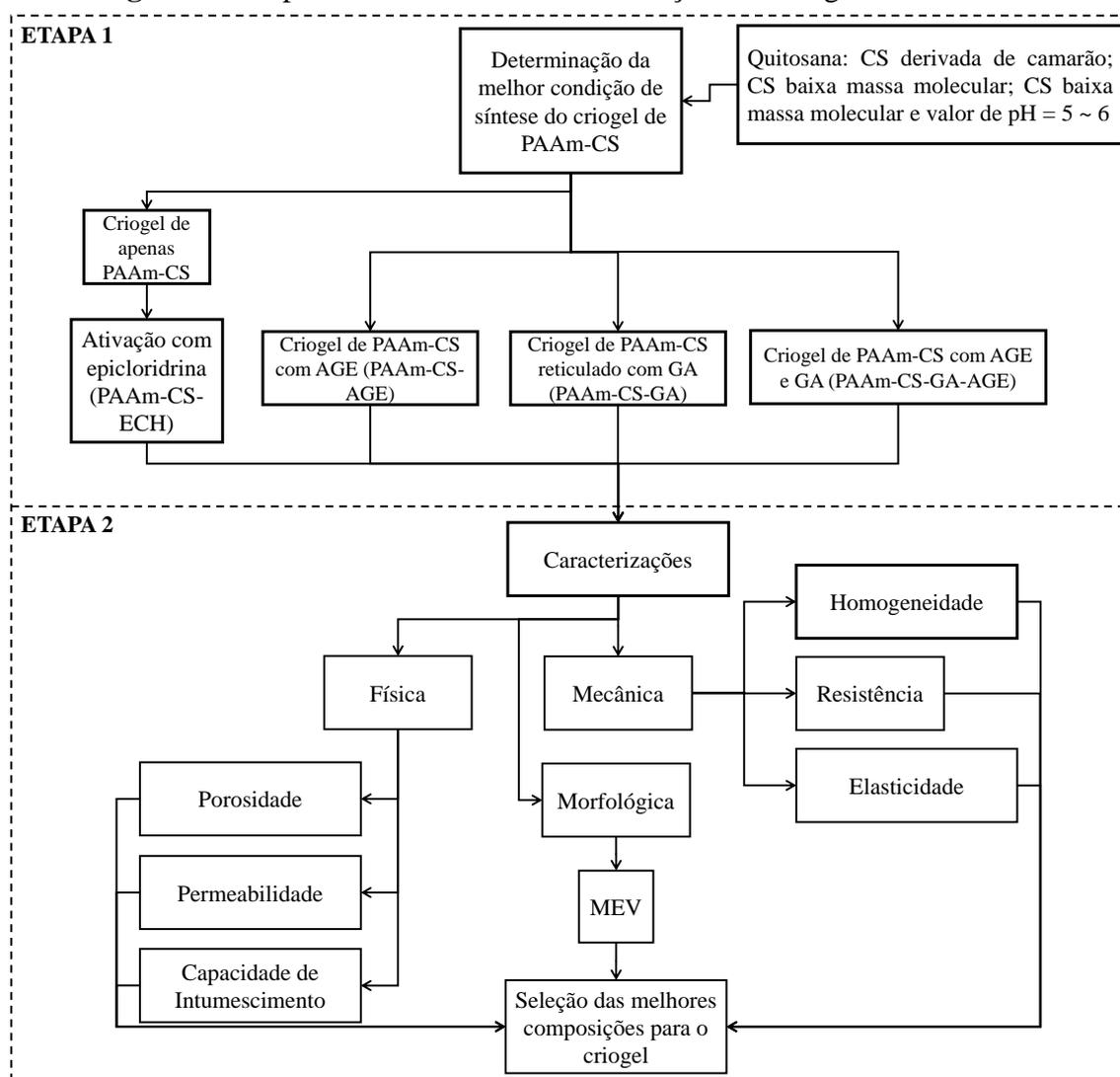
O trabalho foi dividido nas seguintes etapas: 1) síntese e determinação da melhor condição visual do criogéis; 2) caracterizações físicas e morfológicas dos criogéis preparados e selecionados na primeira etapa; 3) experimentos cromatográficos com IgG humana (hIgG) de alta pureza em diferentes condições tamponantes de adsorção e de eluição, e na presença ou não de íons Cu^{2+} ou Ni^{2+} imobilizados; 4) experimentos cromatográficos com soro humano em diferentes condições tamponantes para definição das melhores condições de separação da hIgG e 5) determinação de dados de adsorção em modo dinâmico para obtenção da curva de ruptura e dados cinéticos para obtenção do tempo de equilíbrio, seguido da determinação de dados de adsorção de hIgG no criogel no equilíbrio, para obtenção de isotermas e parâmetros importantes para ampliação de escala.

Na primeira etapa, a qual consistiu na síntese do criogel de poliacrilamida-quitosana (PAAm-CS), foram preparados criogéis com concentrações de quitosana de 0,5% m/v, baseando-se no método de síntese do criogel de poliacrilamida e alginato (MOURÃO *et al.*, 2019; MARCUZ *et al.*, 2021) e nos métodos de preparação de criogéis de poliacrilamida e quitosana de Jain & Kumar (2009) e Dragan *et al.* (2012). Nesta etapa, três soluções distintas de quitosana foram empregadas, sendo de quitosana $\geq 75\%$ desacetilada, quitosana de baixa massa molecular e quitosana de baixa massa molecular entre pH 5 e 6. Além disso, durante a síntese dos criogéis, agentes de reticulação e funcionalização, como o glutaraldeído (GA) e o alil-glicidil-éter (AGE), foram incluídos ou não, com o objetivo de produzir um monolito com cadeias interpenetrantes que fosse capaz de imobilizar o ligante de interesse sem necessidade de ativação da matriz após a síntese. No caso dos monolitos não funcionalizados durante a síntese, empregou-se a técnica de ativação com epicloridrina (ECH) proposta por Porath & Olin (1983). Em seguida, o agente quelante ácido iminodiacético (IDA) foi imobilizado covalentemente nos criogéis sintetizados com melhores aspectos de homogeneidade, esponjidade, resistência à compressão manual e permeabilidade. O criogel resultante foi novamente caracterizado quanto aos seus aspectos físicos e visuais.

Na etapa seguinte, o criogel selecionado por possuir melhores características visuais após a síntese, foi caracterizado quanto à sua composição, morfologia,

porosidade, permeabilidade, capacidade de absorção de água, resistência mecânica e capacidade de quelatar íons metálicos. Ademais, o criogel selecionado, porém sem o IDA, foi utilizado como padrão (controle) para verificação dos efeitos causados pela imobilização do ligante na estrutura do criogel. O esquema das etapas 1 e 2 está representado pela Figura 1.

Figura 1 - Etapas 1 e 2: Síntese e caracterização dos criogéis monolíticos.

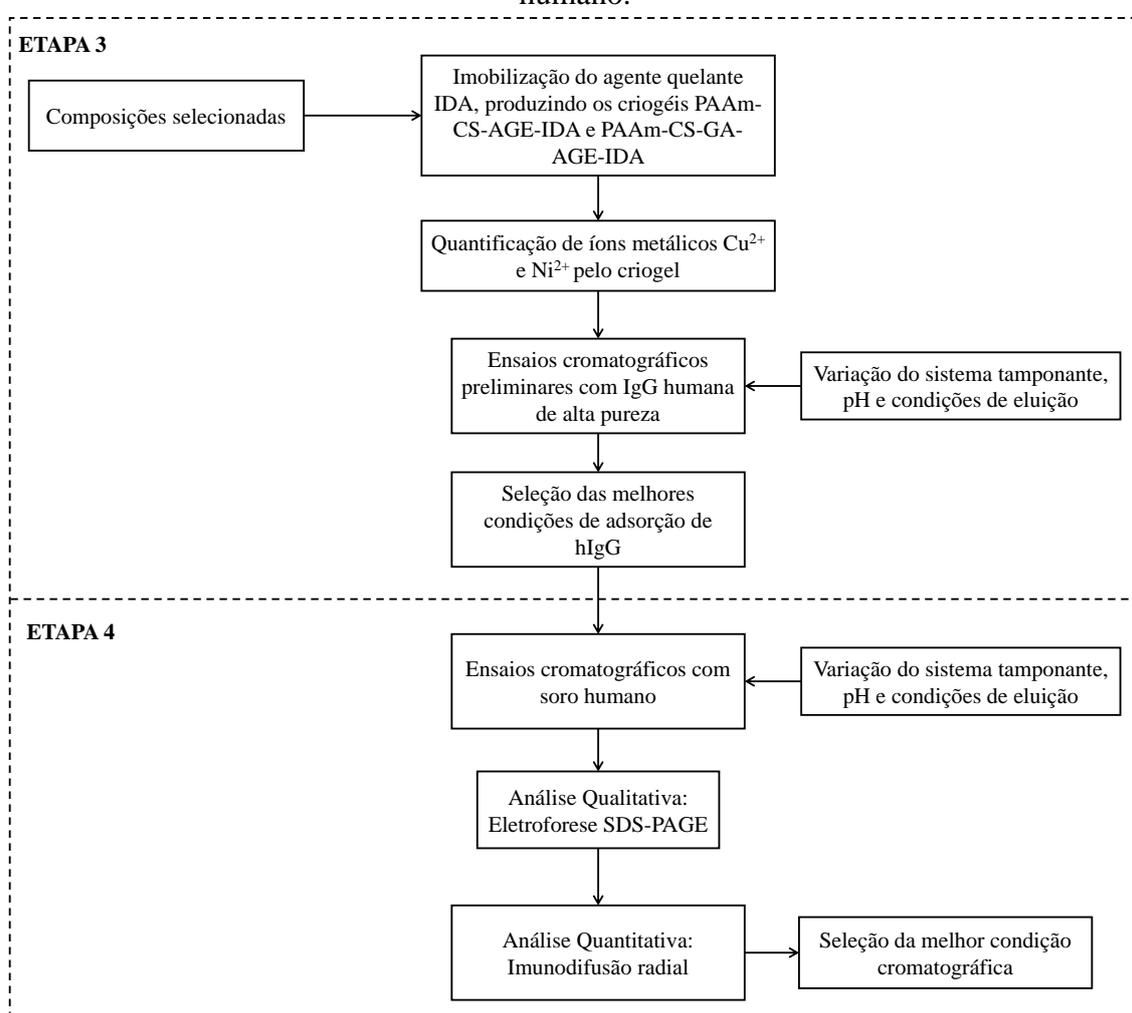


Fonte: Autor (2021)

Na terceira etapa, foram realizados ensaios de quantificação de íons Cu^{2+} e Ni^{2+} quelatados pelo criogel e experimentos cromatográficos visando a adsorção de hIgG de alta pureza em várias condições tamponantes e na presença ou não de íons metálicos (Cu^{2+} e Ni^{2+}) quelatados. Nesta etapa, sistemas tamponantes, valores de pH e condições de eluição foram variados.

Para a quarta etapa, baseando-se nos resultados da terceira etapa, foram realizados experimentos cromatográficos com soro humano diluído em diferentes soluções tamponantes e valores de pH, com o objetivo de verificar a seletividade do adsorvente para a hIgG. Análises qualitativas e quantitativas das frações cromatográficas de lavagem e eluição foram realizadas por eletroforese SDS-PAGE, e medida de proteína total (Bradford, 1976), respectivamente. O fator de purificação da condição mais promissora foi determinado por imunodifusão radial (RID). As etapas 3 e 4 estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Etapas 3 e 4: Ensaios cromatográficos com IgG de alta pureza e soro humano.

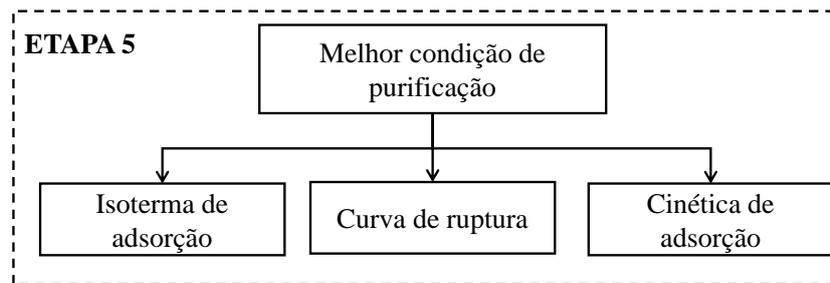


Fonte: Autor (2021)

A quinta etapa consistiu na determinação da cinética de adsorção de hIgG para determinação do tempo de equilíbrio, seguido da construção de isotermas de adsorção

de hIgG na melhor condição verificadas nas etapas 3 e 4, visando a obtenção de parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich. A capacidade dinâmica de adsorção de hIgG na fase estacionária foi determinada por meio da realização de curvas de ruptura (Figura 3). Os resultados obtidos foram analisados após cada etapa.

Figura 3 - Etapa 5: Realização de experimentos para determinação da cinética de adsorção; obtenção de isothermas e curvas de ruptura



Fonte: Autor (2021)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

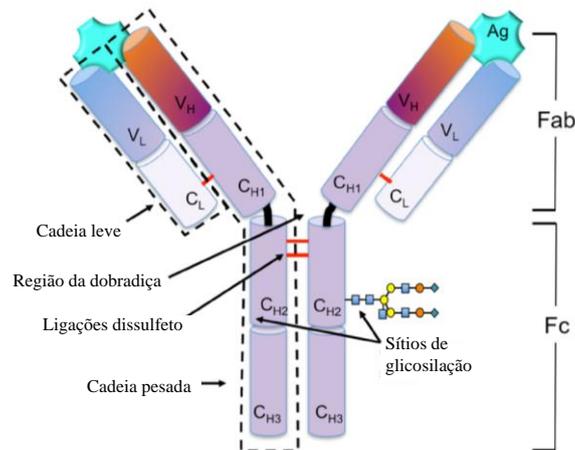
Os tópicos abordados na revisão bibliográfica são relacionados aos anticorpos e imunoglobulina G, purificação de anticorpos, criogéis monolíticos, criogéis compostos pelos polímeros de interesse para este trabalho - poliacrilamida e quitosana -, cromatografia de afinidade, cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), englobando os íons metálicos, os agentes quelantes, os agentes de reticulação e os suportes sólidos aplicados neste trabalho. São também apresentadas noções de isotermas de adsorção, modelos cinéticos e curvas de ruptura.

2.1. ANTICORPOS E IMUNOGLOBULINA G

Proteínas são macromoléculas constituídas de unidades monoméricas denominadas aminoácidos, os quais são ligados entre si por ligações peptídicas (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Elas participam de uma ampla gama de processos fisiológicos complexos como na contração muscular, transporte de oxigênio e na função imunológica (NELSON; COX, 2000).

Especificamente sobre a função imunológica dos anticorpos, estes são glicoproteínas especializadas em detectar, reconhecer e se ligar a antígenos, fazendo parte da resposta imunológica da maioria dos organismos vertebrados (TURNER, 1994). Estruturalmente, essas proteínas são encontradas em forma de “Y” e são compostas por quatro cadeias polipeptídicas, na maioria dos organismos, possuindo duas cadeias pesadas, de aproximadamente 50 kDa e duas cadeias leves, de 25 kDa, ligadas entre si por ligações dissulfeto (HEADS *et al.*, 2012). A Figura 4 esquematiza uma molécula de imunoglobulina G (IgG).

Figura 4 - Estrutura esquemática de uma imunoglobulina G. Abreviações: V: região variável; C: região constante; Ag: antígeno; Fab: fragmento de ligação com o antígeno; Fc: fragmento cristalizável; L: referente à cadeia leve; H: referente à cadeia pesada.



Fonte: Adaptado de Murphy, Devine & O’Kennedy (2016)

Cada cadeia pesada e leve possui domínios constantes e variáveis. As regiões constantes se ligam a componentes do sistema imunológico, proporcionando a fagocitose do antígeno, ao passo que as regiões variáveis são responsáveis por se ligar a antígenos específicos (BOWEN; CASADEVALL, 2017).

O tipo de cadeia pesada define a classe e a subclasse das imunoglobulinas. As imunoglobulinas humanas podem ser divididas em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (BOOTH, 2007). Cada classe de imunoglobulina é diferenciada por microheterogeneidades, as quais promovem variação de ponto isoelétrico e massa molecular das cadeias pesadas (HARRISON, 1992). Dentre as classes citadas, a IgG é o anticorpo que está presente em maior proporção (aproximadamente 75%) no plasma humano (LE *et al.*, 2016). A classe das moléculas de IgG ainda pode ser subdividida em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), as quais são diferenciadas pelas sequências de aminoácidos das cadeias pesadas, tamanho das regiões de dobradiça e padrões das ligações dissulfeto entre as cadeias (HEADS *et al.*, 2012).

Anticorpos possuem alta seletividade e especificidade, sendo capazes de reconhecer epítopos específicos na presença de diversos epítopos (ALVARENGA; MOURA; BILLIALD, 2017). Além disso, outras características, como a estabilidade e o grande tempo de meia-vida dos anticorpos, fomentaram seus usos como ferramentas nas áreas de pesquisa biotecnológica, farmacêutica e terapêutica (CONROY *et al.*, 2017). Assim, para a aplicação nas áreas citadas previamente, essas proteínas devem ser

obtidas com alto grau de pureza e de modo eficiente, sendo necessário separar, por exemplo, moléculas de DNA, vírus, pirogênicos e outras impurezas (BUCHACHER; CURLING, 2018).

O aumento na demanda por proteínas para usos na área médica, incluindo imunoglobulinas, tem influenciado o desenvolvimento de métodos de manufatura, isolamento e detecção de proteínas específicas a partir de misturas complexas (MEHTA; VEDANTHAM, 2017). Normalmente, a recuperação e purificação de um bioproduto envolve o enriquecimento inicial (remoção de água e alguns contaminantes), seguido de uma purificação intermediária e, finalmente, a purificação final. Em todas as etapas, pode-se aplicar tanto métodos não-cromatográficos, como a precipitação, centrifugação e filtração; quanto métodos cromatográficos, como as cromatografias de troca iônica, afinidade e outras (LOW; O'LEARY; PUJAR, 2007).

Concebido na década de 1940, o processo de Cohn, o qual envolve o fracionamento de plasma pela manipulação da concentração de etanol, pH e temperatura, foi um dos pontos iniciais para a purificação de imunoglobulinas (COHN *et al.*, 1946). Desde o seu desenvolvimento, o método de Cohn passou por várias modificações para aumentar a pureza do produto e rendimento do processo de obtenção de imunoglobulinas, destacando os processos de Oncley (ONCLEY *et al.*, 1949) e Kistler-Nitschmann (KISTLER; NITSCHMANN, 1962). Com o desenvolvimento de novas técnicas de purificação e recuperação de anticorpos, a empresa biofarmacêutica CSL Behring desenvolveu no ano 2000, um processo de purificação de imunoglobulinas utilizando apenas processos cromatográficos (BERTOLINI, 2016).

Métodos não-cromatográficos utilizados em purificação de proteínas ainda vêm sendo desenvolvidos como alternativa à métodos cromatográficos e suas limitações, principalmente para produtos que não requerem alta pureza (SHUKLA *et al.*, 2007). Dentre as técnicas não-cromatográficas exploradas, tem-se a extração em duas fases aquosas, precipitação, filtração em membrana e outras (PRZYBYCIEN; PUJAR; STEELE, 2004).

Devido à necessidade de alta pureza para algumas proteínas, como os anticorpos de uso terapêutico, técnicas cromatográficas de alta resolução são requeridas. Atualmente, a cromatografia está dentre os métodos mais aplicados para a purificação de anticorpos. Técnicas cromatográficas são capazes de purificar proteínas por meio da exploração de diferentes propriedades, como massa molecular, carga, hidrofobicidade

ou especificidade para ligantes de afinidade (BERTOLINI, 2016). Além disso, estudos demonstram que métodos cromatográficos de diferentes naturezas, incluindo variações no tipo de leito empregado (fixo ou fluidizado) e nas características da fase estacionária (membranas, monolitos ou partículas esféricas), são capazes de propiciar purificações finais adequadas para a aplicação dos anticorpos (MEHTA; VEDANTHAM, 2017).

A cromatografia de afinidade é um dos tipos de cromatografia mais escolhidos para a purificação de anticorpos monoclonais (provenientes de um único clone) e, apesar da ampliação de seu uso por indústrias de biotecnologia, cromatografias baseadas em afinidade são de alto custo e possuem variadas limitações, como a baixa produtividade (THÖMMES; ETZEL, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de tecnologias, como novos materiais e métodos capazes de superar os entraves atuais da cromatografia de afinidade é de grande interesse para as indústrias de purificação e separação de imunoglobulinas e outras biomoléculas.

2.2. CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE E CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS

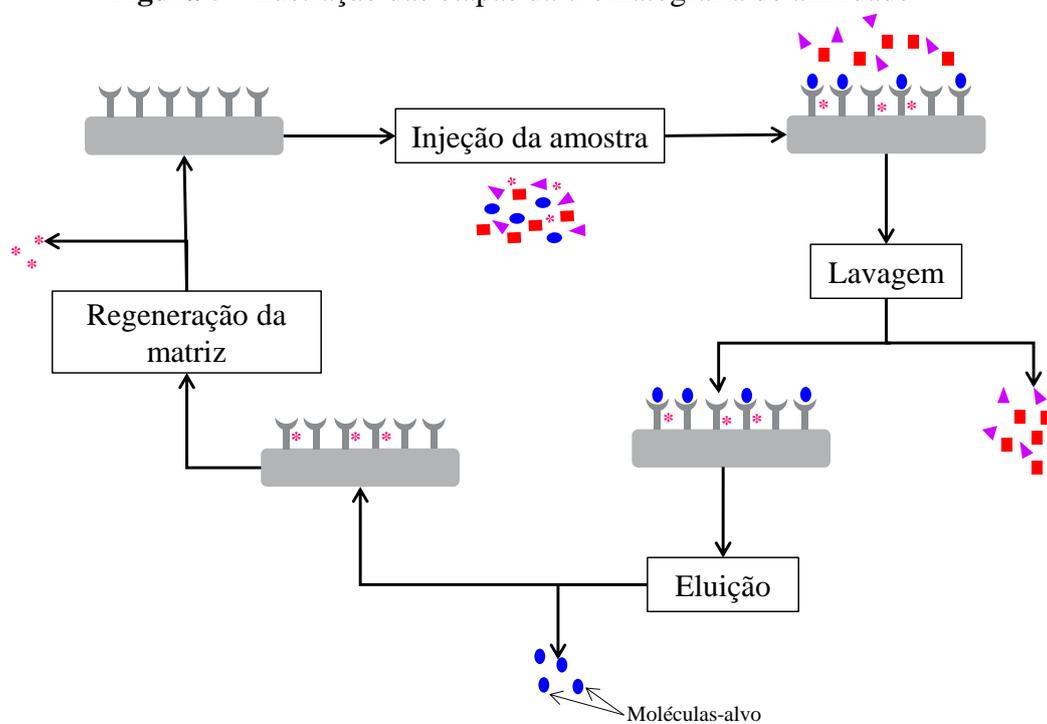
A partir da década de 1980, a introdução de produtos de origem biológica para utilização farmacêutica foi acentuada (GUO *et al.*, 2019). Apesar disso, devido à complexidade das misturas de origem biológica e, com poucas exceções, presentes em pequenas quantidades, é necessário realizar uma separação e purificação eficiente das moléculas-alvo para as suas aplicações (PERRET; BOSCHETTI, 2018).

Assim, a cromatografia de afinidade é uma das alternativas mais eficientes empregadas para a purificação desses bioprodutos. Desde a década de 60, métodos de cromatografia de afinidade vêm sendo escolhidos para a purificação efetiva de anticorpos (ROQUE; LOWE; TAIPA, 2007).

A cromatografia de afinidade é uma operação unitária de adsorção seletiva baseado em interações reversíveis entre a biomolécula-alvo presente na fase móvel e os ligantes, os quais geralmente são moléculas complementares, imobilizados covalentemente na matriz sólida (fase estacionária) (HAGE *et al.*, 2017). Esta técnica propicia a obtenção de um produto com alto grau de pureza (ARRUA; IGARZABAL, 2011).

O processo de cromatografia de afinidade pode ser subdividido em quatro etapas: a alimentação da amostra, a lavagem da coluna, a eluição da molécula de interesse e a regeneração da matriz (Figura 5). Para a realização da cromatografia, a coluna contendo a fase estacionária é alimentada com a mistura que contém a molécula de interesse solubilizada em uma solução tampão. Essa solução deve possuir pH e força iônica que permitam que o ligante interaja seletivamente com a molécula-alvo, adsorvendo-a na superfície da matriz. Em seguida, ocorre a etapa de lavagem, normalmente com a mesma solução tampão utilizada previamente na etapa de adsorção para a remoção de substâncias fracamente adsorvidas. A etapa de eluição é realizada por meio da alteração das características do líquido que percola a fase estacionária, geralmente o pH e a força iônica, permitindo a dessorção da molécula-alvo adsorvida. Pode-se citar, também, o emprego de agentes competitivos nos tampões de eluição, esses compostos são capazes de competir pelo sítio de adsorção do composto adsorvido e o ligante. As moléculas dessorvidas são coletadas em um alto grau de pureza. Finalmente, a coluna deve passar por um processo de regeneração, propiciando que a matriz retorne à sua condição original e, com isso, é possível realizar mais ciclos de purificação (PFAUNMILLER *et al.*, 2012).

Figura 5 - Ilustração das etapas da cromatografia de afinidade



Fonte: Adaptado de Hage *et al.* (2017)

Para a purificação de anticorpos, as proteínas A, G e L são os ligantes mais empregados para a realização da cromatografia de afinidade e, devido à natureza biológica funcional da interação entre essas proteínas e os anticorpos, elas são classificadas como ligantes bioespecíficos (CHEN; WENG, 1991). Os ligantes bioespecíficos são moléculas com estrutura tridimensional que normalmente possuem alta afinidade de ligação com as imunoglobulinas, incluindo proteínas derivadas de bactérias, antígenos, lectinas e anti-anticorpos (ÇORMAN *et al.*, 2017), provendo alta seletividade ao processo de purificação.

Entretanto, o uso de ligantes bioespecíficos está associado a certas desvantagens, abrindo espaço para o desenvolvimento de ligantes que contornem essas limitações de modo a diminuir os custos e a complexidade desses materiais. Dentre as limitações do uso de ligantes bioespecíficos pode-se citar a baixa estabilidade nas condições cromatográficas, alta variabilidade entre lotes, alto risco de contaminação e toxicidade, ciclos de uso limitados, baixo potencial de escalonamento e outros (VIJAYALAKSHMI, 1989; KRULJEC, BRATKOVIC, 2017).

Dessa forma, ligantes menores, robustos, de baixo custo e de baixa toxicidade e de estrutura simples vêm sendo desenvolvidos para contornar as limitações vinculadas ao uso de ligantes bioespecíficos; sendo esses ligantes chamados de pseudobioespecíficos (VIJAYALAKSHMI, 1989; ROQUE, SILVA, TAIPA, 2007).

Por meio de interações de natureza estrutural, os ligantes pseudoespecíficos são capazes de interagir com anticorpos, separando-os e purificando-os seletivamente de misturas biológicas complexas. Diferentes tipos de ligantes pseudobioespecíficos já são conhecidos e estudados para a aplicação em técnicas de purificação de imunoglobulinas, como os quelatos metálicos, ligantes hidrofóbicos, aminoácidos, peptídeos e ligantes tiofílicos (PRASANNA, VIJAYALAKSHMI, 2010; HUSE, BÖHME, SCHOLZ, 2002).

Dentre os ligantes pseudobioespecíficos citados anteriormente, destacam-se os quelatos metálicos para a purificação de anticorpos por cromatografia de afinidade, sendo o processo que os utiliza denominado de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados ou IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*).

O termo cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados foi introduzido por Porath *et al.* em 1975, em experimentos de separação de metaloproteínas por quelatos imobilizados (PORATH *et al.*, 1975). Desde então,

técnicas de IMAC vêm sendo aplicadas para a separação e purificação de células, de DNA e ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos e proteínas, incluindo imunoglobulinas (CHAGA, 2001).

Comparada a outros tipos de cromatografia de afinidade, a IMAC possui recuperação, seletividade e capacidade de processamento relativamente altas, além de baixos custos e a injeção da amostra e a eluição da molécula-alvo podem ser realizadas em condições brandas (CHAGA, 2001, UEDA, GOUT & MORGANTI, 2003).

Como é descrito por Hage *et al.* (2017), a fase estacionária é constituída de uma matriz com um agente quelante imobilizado covalentemente e quelatado ao íon metálico, enquanto a fase móvel é composta pelo líquido que percola a fase estacionária. Sendo uma técnica versátil, a IMAC pode ser aplicada em diversas áreas e em condições variadas.

2.2.1. Fundamentos de IMAC

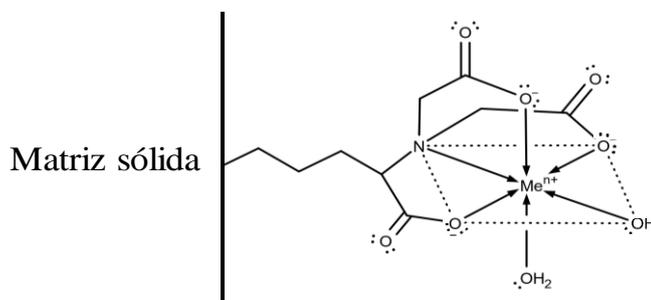
A técnica de IMAC é baseada na afinidade existente entre íons metálicos imobilizados na superfície da matriz sólida da fase estacionária e determinados grupamentos expostos na superfície de moléculas presentes na fase móvel da cromatografia, como os resíduos de aminoácidos das proteínas (ARNOLD, 1991). Essa interação origina ligações de coordenação de natureza reversível, esse princípio favorece a utilização de técnicas de adsorção e dessorção para a separação de moléculas em misturas complexas (GAGNON, 2012).

Os resíduos de aminoácidos que normalmente têm afinidade pelos íons metálicos imobilizados são bases de Lewis. Pode-se citar o anel imidazol da histidina, o tiol da cisteína, o indol do triptofano e os resíduos da serina, ácido glutâmico e ácido aspártico (WONG *et al.*, 1991). A afinidade entre os íons metálicos imobilizados e os resíduos de aminoácidos expostos na superfície das proteínas segue a classificação de Lewis para ácidos e bases. Assim, os íons metálicos têm caráter ácido e tendem receber elétrons, ao passo que átomos, como nitrogênio, oxigênio e enxofre presentes nos resíduos dos aminoácidos têm a tendência a doar elétrons, ou seja, possuem caráter básico.

Concomitantemente, a interação dos íons metálicos, tanto com os agentes quelantes quanto com os resíduos de aminoácidos expostos na superfície da proteína, seguem a teoria de Pearson para ácidos e bases moles e duros (PEARSON, 1963). Isso é evidenciado pelo fato de que íons de metais classificados como duros (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{3+}) interagem de forma estável com bases duras, como o fósforo, nitrogênio alifático e o oxigênio. Os íons de metais moles (Ag^+ e Cu^+) tem maior afinidade por átomos de enxofre. Finalmente, íons metálicos classificados como intermediários ou de transição (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+}) ligam-se preferencialmente com grupos aromáticos que contém nitrogênio, oxigênio e enxofre (UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003).

Para a estruturação do complexo composto pelo íon metálico e pelo agente quelante, uma solução do íon metálico é injetada à coluna cromatográfica e os íons metálicos se ligam ao agente quelante devido à sua maior afinidade pelos sítios de coordenação disponíveis que as moléculas de água e de tampão (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). A Figura 6 apresenta a estrutura proposta de um suporte para IMAC que contém ácido nitrilotriacético (NTA) como agente quelante para os íons metálicos.

Figura 6 – Estrutura proposta do ácido nitrilotriacético (NTA) como agente quelante de íons metálicos imobilizados.



Fonte: Adaptado de Hage *et al.* (2017)

As etapas cromatográficas de alimentação, lavagem e eluição são semelhantes àquelas empregadas nas cromatografias de afinidade, sendo que a etapa de regeneração da coluna cromatográfica normalmente é executada alimentando-se a coluna com soluções de agentes quelantes sextadentados, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), removendo o íon metálico imobilizado na fase estacionária (UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003).

De acordo com Chaga (2001), diferentes agentes quelantes podem ser utilizados em IMAC, como: tridentados (ex. ácido iminodiacético, IDA), tetradentados (ex. tris(2-aminoetil)amina, TREN) e pentadentados (ex. tris(carboximetil)etilenodiamina, TED), além de variados íons metálicos, como o Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} . A escolha dos agentes quelantes e dos íons metálicos é de alta importância para a que a IMAC seja eficiente (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Simultaneamente, espera-se que a matriz não participe de adsorções não específicas (GUO *et al.*, 2019) e que seja facilmente ativável para a imobilização do agente quelante (ARORA; SAXENA; AYYAR, 2017). Dessa forma, nos tópicos seguintes os componentes da fase estacionária serão analisados.

2.2.2. Íons metálicos empregados em IMAC

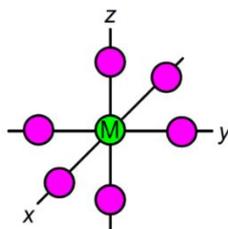
A escolha dos íons metálicos para a realização da IMAC é de fundamental importância para a eficiência do processo, visto que os íons metálicos quelatados apresentam afinidade e seletividade diferencial quanto aos resíduos de aminoácidos expostos na superfície das proteínas (GUTIÉRREZ; MARTÍN DEL VALLE; GALÁN, 2007).

Os íons de metais de transição usualmente são classificados como ácidos intermediários de acordo com a teoria de Pearson (PEARSON, 1963), sendo Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} , os principais íons metálicos utilizados em IMAC (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Dentre os íons metálicos apresentados, os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} são capazes de interagir com proteínas que possuem resíduos de histidina, cisteína e triptofano, pelos grupos imidazol, tiol e indol presentes nesses aminoácidos, respectivamente (SULKOWSKI, 1989).

Além disso, para o entendimento e visualização dos complexos formados, segue-se a teoria do orbital molecular e a teoria do campo cristalino; supõe-se, também, que cada átomo de ligante contribui com um par de elétrons livres, formando ligações apenas do tipo σ (HOUSE, 2020). Em geral, os íons metálicos aplicados em IMAC para a purificação de anticorpos são estabilizados com seis ligantes, como o Cu^{2+} e o Ni^{2+} , originando um complexo octaédrico (SULKOWSKI, 1985), entretanto, variações nas condições tamponantes e características específicas da interação entre o metal e o agente quelante podem originar complexos estabilizados com um número de ligantes diferente

de seis, como ocorre em complexos quadrado planares e tetraédricos. A Figura 7 mostra um esquema de complexo octaédrico em um sistema de coordenadas.

Figura 7 - Representação esquemática de um complexo octaédrico onde o íon metálico de transição é o átomo central e seis ligantes que os cercam.



Fonte: House (2020)

Especificamente sobre anticorpos, essas glicoproteínas possuem resíduos de histidinas em sua estrutura primária e em sua superfície (WOOF, 2009). Dessa forma, conhecendo diferenças de afinidade entre quelatos metálicos e resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície da proteína, pode-se separar seletivamente as biomoléculas-alvo das misturas complexas que elas se encontram.

No caso da histidina, tem-se na Tabela 1 uma predição de afinidade quando o quelato é o IDA-Me²⁺ em relação à presença de resíduos histidinas e triptofanos acessíveis (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). De acordo com a Tabela 1, proteínas que não possuem resíduos de histidina acessíveis nas condições apresentadas, não serão retidas devido à afinidade diferenciada existente, conseqüentemente, um processo de separação ocorrerá.

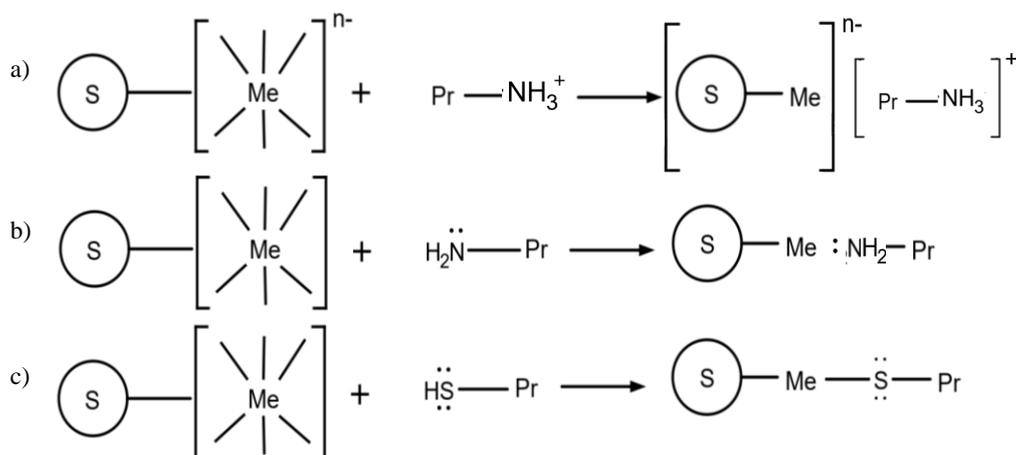
Tabela 1 - Afinidade do complexo proteína-IDA-Me²⁺ em função dos resíduos de Histidina (His) ou Triptofano (Trp) existentes na superfície das proteínas.

| Ocorrência de resíduos His ou Trp na superfície de proteínas | Retenção de proteínas nos quelatos IDA-Me ²⁺ |
|--|---|
| Ausência de His ou Trp | não há |
| 1 His | Cu ²⁺ |
| > 1 His | Cu ²⁺ , Ni ²⁺ |
| Cluster de His | Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ |
| Vários Trp, ausência de His | Cu ²⁺ |

Fonte: Adaptado de Bresolin, Miranda e Bueno (2009)

Vijayalakshmi (1989) sugere que os mecanismos de interação entre os quelatos metálicos imobilizados e as proteínas ocorrem de três modos principais, explicitados nas Figura 8a, 8b e 8c. A primeira delas é de natureza eletrostática, na qual cargas opostas entre o complexo formado pelo íon metálico e o agente quelante e os resíduos de aminoácidos interagem, causando a adsorção da proteína (Fig. 8a). Outro mecanismo de interação é do tipo de coordenação, onde ocorre doação e recebimento de elétrons, que geralmente é dependente do tipo de íon metálico e do resíduo de aminoácido envolvido (Fig. 8b). Finalmente, ligações covalentes podem ser formadas entre os quelatos metálicos e resíduos de aminoácidos, especificamente, esse efeito é observado para proteínas que possuem grupos sulfidríla em sua estrutura. Essa variação depende tanto do íon metálico quanto do agente quelante utilizado (Fig. 8c).

Figura 8 - Mecanismos de interação entre um íon metálico imobilizado e uma proteína. a) Interação eletrostática e de carga induzida; b) Coordenação ou interação entre doador e receptor de elétrons; c) Ligação covalente. S: suporte; Me: íon metálico; Pr: proteína.



Fonte: Adaptado de Vijayalakshmi (1989)

Na interação do quelato metálico IDA-Me^{2+} com proteínas que contém resíduos de histidina, propôs-se que o par de elétrons livres do nitrogênio do anel imidazol da histidina é o que contribui de forma mais significativa para a formação do complexo proteína-quelato metálico quando o agente quelante empregado é o IDA (PORATH, 1988). Entretanto, outros agentes quelantes podem proporcionar resultados diferentes aos dos obtidos por Porath. Dessa forma, assim como o íon metálico, o agente quelante é capaz de interferir no modo de adsorção das proteínas e nas propriedades do

complexo, sendo o estudo deste importante para o desenvolvimento de processos de IMAC eficientes.

2.2.3. Agentes quelantes empregados em IMAC

Assim como foi explicitado anteriormente, o centro de adsorção e suas propriedades são afetados pelo agente quelante escolhido para formar o complexo íon metálico-agente quelante. Geralmente, os agentes quelantes utilizados em IMAC são moléculas pequenas que possuem átomos doadores de elétrons, como o nitrogênio, oxigênio e enxofre (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

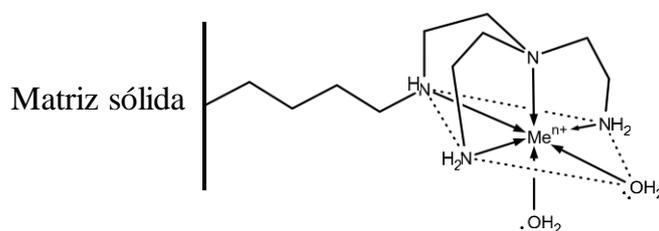
A classificação dos agentes quelantes é definida de acordo com o número de sítios de ligação do átomo central (íon metálico) que eles ocupam. Os agentes quelantes mais utilizados em IMAC podem ocupar dois, três, quatro ou cinco sítios de ligação, sendo chamados de bidentados, tridentados, tetradentados e pentadentados, respectivamente (CHAGA, 2001; MOONEY *et al.*, 2015).

O IDA é um agente quelante tridentado e um dos mais utilizados na IMAC. De acordo com as constantes de dissociação dos grupos carboxila existentes na estrutura da molécula de IDA, infere-se que a valores de pH baixos (abaixo do pKa dos grupos carboxílicos), algumas moléculas de IDA têm seus grupos protonados, o que pode afetar o número de sítios de ligação que essa molécula ocupa (PORATH; OLIN, 1983), exemplificando a importância das condições do meio para a IMAC. Agentes tridentados macrocíclicos foram propostos nas últimas décadas para purificação de proteínas recombinantes com cauda de histidina, tal como o 1,4,7-triazaciclononano (TACN) (MOONEY; FREDERICKS; HEARN, 2011; MOONEY *et al.*, 2015).

Agentes quelantes bidentados e tetradentados também têm sido empregados para o fracionamento de proteínas. O bidentado 8-hidroxiquinolina e os tetradentados ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), TREN e NTA foram estudados e analisados para aplicações em cromatografia de afinidade (GABERC-POREKAR; MENART, 2001; ZACHARIOU; HEARN, 2000). A estrutura putativa do quelato metálico que contém o TREN como agente quelante é representado pela Figura 9. A molécula de TREN contém quatro nitrogênios disponíveis para interagir com os sítios de ligação do átomo central, diferentemente dos agentes quelantes comumente empregados em IMAC, os

quais geralmente possuem pelo menos um átomo de oxigênio disponível para a quelação (BODEN *et al.*, 1995, SHARMA; AGARWAL, 2002, RIBEIRO *et al.*, 2008).

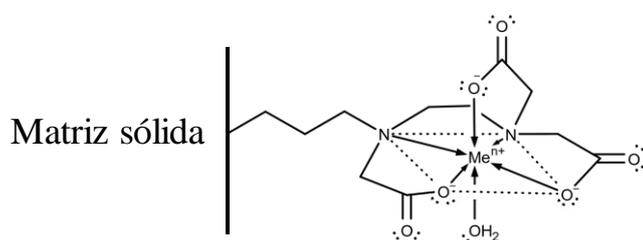
Figura 9 – Estrutura proposta do suporte de IMAC com o TREN como agente quelante de íons metálicos.



Fonte: Autor (2021)

Finalmente, o TED é um exemplo de agente quelante pentadentado. A estrutura proposta do complexo formado com íons metálicos é mostrada pela Figura 10 (PORATH; OLIN, 1983; BLOCK *et al.*, 2009).

Figura 10 – Estrutura proposta do suporte de IMAC com o TED como agente quelante de íons metálicos.



Fonte: Adaptado de Porath & Olin (1983)

O número de sítios de ligação do íon metálico ocupado pelo agente quelante influencia a IMAC de dois modos distintos. Com o aumento do número de sítios de ligação do íon metálico ocupados pelo agente quelante, a estabilidade do complexo aumenta, diminuindo a probabilidade de desprendimento de íons metálicos para a fase móvel da cromatografia. Simultaneamente, menos sítios de ligação com a biomolécula-alvo estarão disponíveis, diminuindo a intensidade da adsorção da molécula de interesse à fase estacionária (PORATH, 1988; BLOCK *et al.*, 2009).

Para a aplicação da IMAC, o agente quelante deve estar ligado covalentemente à matriz sólida e o íon metálico deve estar quelatado ao agente quelante. Chaga (2001)

relata que as constantes de formação de quelatos metálicos imobilizados e em solução mantêm a sua ordem de grandeza, não afetando o processo de quelação.

2.2.4. Suportes sólidos empregados em IMAC

Tanto na IMAC quanto na cromatografia de afinidade bioespecífica, a matriz sólida deve possuir características que permitam a adsorção seletiva da biomolécula-alvo.

Para cromatografias líquidas de baixa e média pressão, geralmente como é o caso da IMAC, as matrizes tradicionalmente utilizadas são géis de agarose, celulose ou dextrana (ERNST-CABRERA; WILCHEK, 1988). A importância desses materiais está relacionada à sua hidrofiliabilidade, a qual desfavorece adsorções não específicas de proteínas diferentes da proteína-alvo à matriz sólida. Ademais, a estrutura desses carboidratos é composta de grupamentos que são facilmente modificáveis quimicamente, ou ativados, permitindo a imobilização de ligantes por meio de técnicas simples (ARRUA; IGARZABAL, 2011).

As matrizes sólidas usualmente devem apresentar alta resistência mecânica, alta porosidade, grande área superficial e estabilidade nas condições cromatográficas (PORATH; OLIN, 1983; UEDA; GOUT; MORGANTI, 2003).

Historicamente, leitos empacotados com partículas porosas eram usados preferencialmente nas técnicas de cromatografia de afinidade (GAGNON, 2012). Para a IMAC, géis de agarose ativados com oxiranos para a imobilização do IDA como ligante foram as primeiras matrizes sólidas empregadas para a técnica (PORATH, 1975). Em seguida, géis de alta performance formados por polímeros orgânicos sintéticos foram desenvolvidos, apresentando vantagens, como maior estabilidade mecânica, estrutura mais rígida e menor variação de volume durante o uso, quando comparados aos géis de agarose (WONG *et al.*, 1991).

Ambos os materiais citados anteriormente possuem a limitação de não suportarem vazões elevadas e, devido ao filme formado ao redor das partículas, a transferência de massa ocorre de modo difusivo (GAGNON, 2012). Para contornar essa desvantagem, a síntese de membranas e monolitos foi proposta para a aplicação como matrizes sólidas em IMAC, pois suportam vazões elevadas, menos caminhos

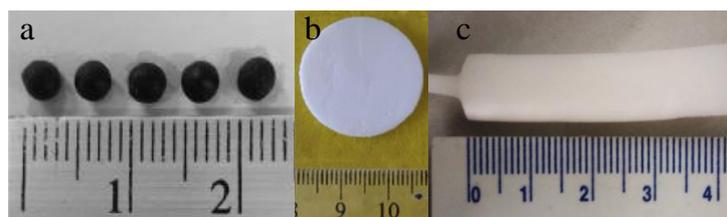
preferenciais são formados e permitem que a transferência de massa ocorra majoritariamente de modo convectivo (BRANDT *et al.*, 1988; BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009; BAKHSHPOUR *et al.*, 2019).

Para a cromatografia de adsorção, é observado que os monolitos possuem vantagens em relação às membranas devido à maior capacidade de adsorção volumétrica e versatilidade estrutural e composicional (PRASANNA; VIJAYALAKSHMI, 2010). Monolitos podem ser sintetizados por diferentes técnicas a partir de polímeros orgânicos sintéticos (ARRUA *et al.*, 2012), materiais inorgânicos (CALLERI *et al.*, 2012) e polissacarídeos (BAKHSHPOUR *et al.*, 2019). As principais rotas sintéticas empregadas para a preparação de monolitos inorgânicos são o processo de sol-gel. Para a síntese de monolitos orgânicos, aplicam-se principalmente técnicas de polimerização por radical livre. Finalmente, monolitos híbridos podem ser sintetizados por química de click, polimerização por abertura de anel e processo de sol-gel (GAMA; ROCHA; BOTTOLI, 2019). Esses três tipos de monolitos podem ser utilizados como matrizes sólidas na cromatografia líquida para a purificação de proteínas (LYNCH *et al.*, 2019).

Especificamente sobre os monolitos sintetizados por polimerização em solução, técnicas de criogelificação podem ser aplicadas para a síntese de criogéis monolíticos. Os criogéis são materiais reportados primeiramente na década de 1960, produzidos pelo tratamento criogênico de sistemas capazes de formarem gel, como uma mistura de monômeros ou polímeros (BAKHSHPOUR, 2019).

Além de monolitos, os criogéis podem ser sintetizados como esferas e membranas (Figura 11), diferenciando-se de géis tradicionais devido à sua alta elasticidade e estrutura esponjosa (BAKHSHPOUR, 2019).

Figura 11 - Criogéis sintetizados como esferas(a), membranas (b) e monolitos (c).



Fonte: a) Adaptado de Makkliang *et al.* (2017); b) Adaptado de Erol *et al.* (2019); e c) Autor (2020)

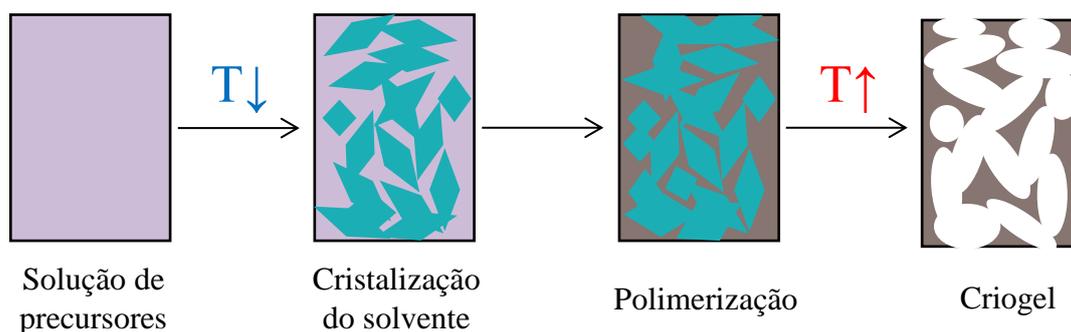
Geralmente, os poros nos criogéis variam de 10 a 200 μm e a utilização de compósitos pode ser capaz de permitir a síntese de materiais com paredes poliméricas finas e, conseqüentemente, gerar criogéis com áreas superficiais grandes, aumentando a capacidade de adsorção da biomolécula-alvo (HENDERSON *et al.*, 2013). Para a IMAC, o uso de criogéis monolíticos é de elevado interesse devido às vantagens que esse material possui em relação às membranas e partículas.

2.3. CRIOGÉIS MONOLÍTICOS

Os criogéis monolíticos possuem estrutura de um único bloco, diferindo de colunas de leito particulado. Os macroporos presentes na estrutura são interconectados, formando canais, os quais permitem que a adsorção na cromatografia líquida aconteça rapidamente, até mesmo para biomoléculas presentes em fluidos viscosos, como sangue e plasma. Além disso, esses monolitos proporcionam que o processo cromatográfico ocorra em baixas pressões, prevenindo ou reduzindo os efeitos de contrapressão e entupimento da coluna (BAKSHPOUR *et al.*, 2019).

Para a síntese de criogéis monolíticos, a mistura de precursores é resfriada a temperaturas de -5 a -20 $^{\circ}\text{C}$, nas quais o solvente é moderadamente cristalizado, ocorre a concentração dos precursores em regiões ao redor dos cristais do solvente, denominadas de microfases líquidas (LOZINSKY *et al.*, 2002). A reação de polimerização ocorre na fase não congelada da mistura, assim, os cristais do solvente se comportam como formadores de poros (HIXON; LU; SELL, 2017). Após um tempo apropriado de congelamento, o bloco sólido da reação é descongelado e, com o descongelamento dos cristais do solvente, macroporos interconectados são formados (HENDERSON *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019). A Figura 12 esquematiza o processo de formação do criogel monolítico. Diferentes polímeros e combinação de polímeros podem ser empregadas para a síntese de criogéis monolíticos, podendo-se citar criogéis de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (ÇORMAN *et al.*, 2017) e poliácridamida (PAAm) (JAIN; KUMAR, 2009).

Figura 12 - Diagrama simplificado da formação de um criogel monolítico macroporoso



Fonte: Autor (2021)

Polímeros naturais também podem ser utilizados devido a características como hidrofiliabilidade e facilidade de ativação de suas estruturas para a imobilização de ligantes. Trabalhos que utilizam alginato (MOURÃO *et al.*, 2019; MARCUZ *et al.*, 2021), gelatina (ODABAS *et al.*, 2013; INCI *et al.*, 2012), quitosana (JAIN; KUMAR, 2009), fibroína de seda (HINOJOSA, 2012) e alginato e fibroína de seda de aranha (SHARMA *et al.*, 2020) para a síntese de criogéis mostraram resultados satisfatórios para a aplicação em cromatografia de afinidade ou em engenharia de tecidos, sendo de grande interesse para a produção de *scaffolds* 3D para o cultivo de células animais (HIXON; LU; SELL, 2017).

Dentre os polímeros citados anteriormente, neste trabalho espera-se que um criogel composto de poliacrilamida e quitosana possua características que o torne adequado para sua utilização como fase estacionária em IMAC.

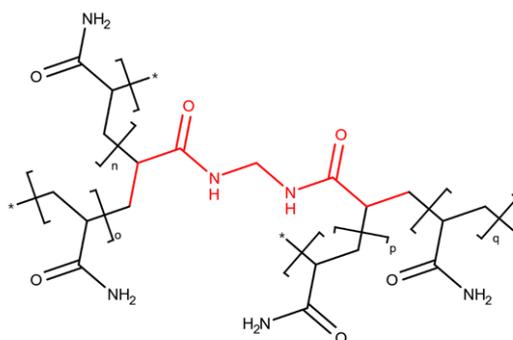
2.4. POLIACRILAMIDA

A poliacrilamida (PAAm) é um material já extensamente estudado, caracterizado e usado para a síntese de criogéis (KUMAR *et al.*, 2010), podendo ser utilizado em várias aplicações biológicas devido à sua hidrofiliabilidade e natureza bioinerte (DARNELL *et al.*, 2013).

Para a produção de criogéis monolíticos de PAAm, a reação de polimerização que ocorre para a formação da poliacrilamida é a copolimerização por radical livre, utilizando os monômeros acrilamida e, por exemplo, o agente reticulante N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAm) (PLIEVA *et al.*, 2004).

A Figura 13 mostra a estrutura da poliacrilamida reticulada com MBAm, evidenciando que cada MBAm é capaz de formar ligações cruzadas com quatro cadeias de poliacrilamida.

Figura 13 – Estrutura química da poliacrilamida (PAAm, em preto) reticulada com o N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAm, em vermelho)



Fonte: Adaptado de Sun *et al.* (2012)

Reações por radical livre começam por meio do uso de iniciadores, os quais são compostos capazes de fornecer radicais livres à reação, como o persulfato de amônio (APS). Os radicais livres formados pelo APS atacam a dupla ligação existente entre os carbonos nos monômeros presentes na mistura, gerando um novo radical e rompendo a ligação π do monômero atacado. O novo radical formado é capaz de atacar outra molécula de monômero, dando origem à etapa de propagação da cadeia. A etapa de propagação continua até que todos os monômeros sejam consumidos ou que a reação de terminação aconteça. A etapa de terminação pode ocorrer por diversos mecanismos, como a combinação de duas cadeias ativas, a combinação de uma cadeia ativa e um radical de iniciador e outras (BIERMANN, 1996).

Plieva *et al.* (2005) descrevem que a estrutura dos criogéis – tamanho dos poros e espessura da parede dos poros - de poliacrilamida é controlada pela temperatura de congelamento, concentração de monômeros e pela presença de agentes de reticulação. O trabalho mostra resultados que relacionam o aumento da concentração inicial de monômeros com o aumento da resistência ao fluxo.

Entretanto, Barroso *et al.* (2013) relatam que, quando comparados a outros materiais utilizados na síntese de monolitos, como sílica e metacrilato, criogéis e

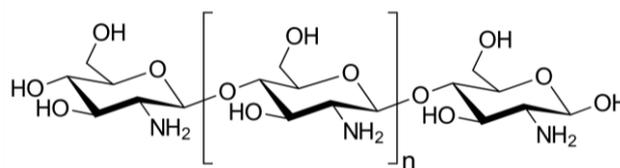
hidrogéis de poliacrilamida, por exemplo, possuem comportamento mecânico inadequado para a aplicação em cromatografia.

Assim, com o objetivo de melhorar as características mecânicas do criogel de poliacrilamida, o uso de polissacarídeos, como a quitosana ou alginato pode proporcionar um material com características mais adequadas para cromatografia que as do criogel composto com apenas poliacrilamida (DRAGAN; PERJU; DINU, 2012) ou apenas quitosana (JAIN; KUMAR, 2009), como maior elasticidade, resistência mecânica e estabilidade química.

2.5. QUITOSANA

A quitosana (CS) é um aminopolissacarídeo natural derivado da desacetilação da quitina, a qual pode ser obtida por meio da parede celular de fungos e do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sendo responsável por sua firmeza e resistência (MERZENDORFER, 2011). A estrutura da quitosana é constituída de monômeros de D-glucosamina e N-acetil-D-glicosamina (quando a quitina é parcialmente desacetilada), podendo ser considerada um heteropolímero (Figura 14).

Figura 14 - Estrutura da quitosana parcialmente desacetilada.



Fonte: Adaptado de Nilsen-Nygaard *et al.* (2015)

Ademais, é um polissacarídeo já consolidado na área biomédica, com diversas aplicações em tratamento de feridas, engenharia de tecidos e entrega controlada de fármacos, além de possuir atividade imunológica conhecida, sendo um biopolímero não-tóxico e com estrutura próxima a de diversos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular (KHÖR; LIM, 2003; ONO *et al.*, 2000; KAR; KAUR; THIRUGNANAM, 2016).

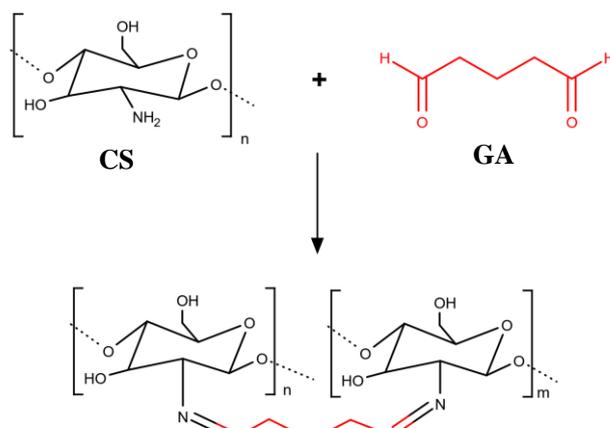
Em determinados valores de pH, a estrutura da quitosana se mantém positivamente carregada devido à protonação dos grupos amino. Com isso, a quitosana

é solúvel em soluções ácidas e insolúvel em soluções básicas (FREITAS, 2001). A protonação de grupos amino na quitosana proporciona a existência de interações eletrostáticas atrativas com grupos negativamente carregados (GUIBAL; VINCENT; NAVARRO, 2014).

De acordo com a estrutura desse polissacarídeo, é possível observar a presença dos grupos funcionais amino e hidroxila (ZENG; RUCKENSTEIN, 1999), os quais permitem a ativação e imobilização de ligantes à estrutura do gel de quitosana, tais como agentes quelantes para a aplicação em IMAC para purificação de biomoléculas. Além disso, pares de elétrons livres do nitrogênio do grupo amino da quitosana são capazes de quelatar íons metálicos de metais de transição em pH próximo de neutro (VARMA; DESHPANDE; KENNEDY, 2004).

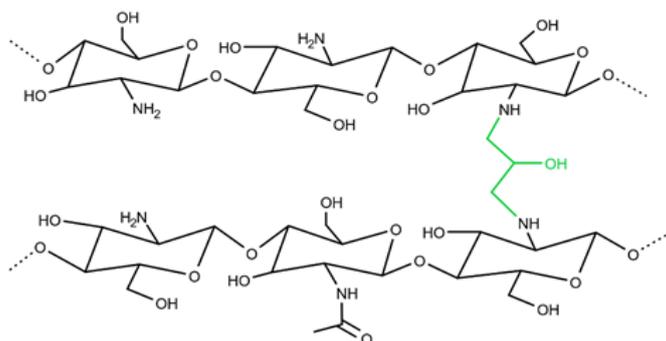
Hidrogéis de quitosana podem ser produzidos por técnicas que envolvem congelamento (DRAGAN; HUMELNICU; DINU, 2019), agentes formadores de poros (*porogens*) (WANG *et al.*, 2017) e espuma com gases (KAR; KAUR; THIRUGNANAM, 2016). Devido à cadeia linear desse polímero, técnicas de polimerização de quitosana geralmente envolvem o uso de agentes de reticulação, como o glutaraldeído (GA), a epícloridrina (ECH) e outros. O grau da reticulação e os grupos envolvidos afetam fortemente as características do material obtido, pois afeta o número de grupos funcionais disponíveis na estrutura do composto, além das características mecânicas do produto sintetizado (GUIBAL; VINCENT; NAVARRO, 2014). Por exemplo, o GA reage com os grupos amino das cadeias poliméricas de quitosana, conectando-as (Figura 15) (DRAGAN; DINU, 2020), o mesmo ocorre durante a reticulação de quitosana com ECH (Figura 16) (DRAGAN *et al.*, 2012).

Figura 15 - Representação esquemática da reticulação de cadeias de quitosana (CS, em preto) com glutaraldeído (GA, em vermelho).



Fonte: Adaptado de Dragan & Dinu (2020)

Figura 16 - Reticulação de quitosana (CS, em preto) com epicloridrina (ECH, em verde) em meio básico e aquecimento



Fonte: Adaptado de Dragan *et al.* (2012)

Por essas qualidades, membranas (ZENG; RUCKENSTEIN, 1999) e criogéis monolíticos (JAIN; KUMAR, 2009) que contém quitosana já são empregados em processos de purificação de proteínas e como fases estacionárias em cromatografia de afinidade. Levando em consideração os dois polímeros discutidos nos tópicos 2.4 e 2.5, considera-se relevante o desenvolvimento de um material composto de poliacrilamida e quitosana para a aplicação como fase estacionária em IMAC.

2.6. CRIOGÉIS MONOLÍTICOS DE POLIACRILAMIDA-QUITOSANA

A síntese de criogéis de quitosana começou a ser estudada para a produção de *scaffolds* de tecidos hepáticos, entretanto, matrizes sólidas compostas de apenas quitosana se mostraram frágeis, inviabilizando seu uso para essas aplicações (JAIN; KUMAR, 2009). Como forma de contornar essa limitação, compósitos de quitosana e outros polímeros, como a poliacrilamida (JAIN; KARANDE; KUMAR, 2011; PLIEVA *et al.*, 2004), poli(N-isopropilacrilamida) (JAIN *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2020), polipirrol (MAKKLIANG *et al.*, 2017) e ácido hialurônico (KUTLUSOY *et al.*, 2017) tornaram-se prevalentes. Assim, os materiais desenvolvidos possuem as características desejadas para os seus usos específicos, que vão além da engenharia de tecidos.

De acordo com o estudo realizado por Dragan *et al.* (2012), criogéis monolíticos e macroporosos de composição 5% m/v de poliacrilamida e 1% m/v quitosana mostraram boas características para a adsorção seletiva de corantes catiônicos. Os monolitos produzidos têm a característica de possuir uma estrutura semi-interpenetrante, na qual a cadeia de quitosana se mantém presa à estrutura de poliacrilamida por interações de natureza eletrostática. Além disso, estruturas interpenetrantes foram obtidas pelo *crosslink* da quitosana com epícloridrina (ECH) em meio básico na presença de cadeias de poliacrilamida.

Jain & Kumar (2009) relatam a síntese de criogéis monolíticos de composições variadas de poliacrilamida (4 a 10% m/v) e quitosana (0,6 a 1,2% m/v), sendo reticulados com a adição de glutaraldeído (2,5% m/v). O criogel monolítico foi, então, estudado como *scaffold* para o crescimento e proliferação de células, para isso, ensaios de contato direto e ensaios de adsorção de proteínas foram efetuados. Os ensaios de contato direto mostraram que o criogel sintetizado é biocompatível, enquanto que os estudos sobre a capacidade de adsorção de proteínas mostrou que o criogel adsorveu cerca de 18% das proteínas totais do soro bovino em tampão PBS, sendo esses resultados adequados para emprego do criogel no cultivo de células.

Yavaşer & Karagözler (2020) sintetizaram criogéis de poliacrilamida (5,7% m/v) e quitosana (0,1% m/v) com o corante Verde Reativo 5 (*Reactive Green 5*) imobilizado covalentemente à matriz sólida para a adsorção da enzima catalase. Os autores mostraram como o pH, força iônica, concentração inicial de catalase, temperatura e vazão afetam na adsorção de catalase pelo criogel. Além disso, é

explicitado que o ligante poderia ser covalentemente acoplado à estrutura do criogel tanto pelos grupos amino da quitosana quanto pelos grupos hidroxila da poliacrilamida, devido à presença do átomo de cloro no grupo triazina do corante (YAVAŞER; KARAGÖZLER, 2020).

Os trabalhos mencionados anteriormente caracterizaram o criogel de poliacrilamida e quitosana como macroporoso, estável, elástico, resistente e permeável ao solvente nas condições estudadas (JAIN; KUMAR, 2009; DRAGAN *et al.*, 2012; YAVAŞER; KARAGÖZLER, 2020). Devido a essas características, o material é adequado para aplicação como fase estacionária da IMAC. Além disso, vantagens do uso desses materiais envolvem a presença de grupos facilmente ativáveis nas cadeias de para a imobilização de ligantes.

2.7. ADSORÇÃO

2.7.1. Cinética

A adsorção de proteínas na superfície de determinado material é dependente de efeitos energéticos, exemplificados por interações iônicas, de van der Waals, de ligação de hidrogênio e entre grupos doadores-aceptores de elétrons, e contribuições entrópicas, como efeitos do solvente e alterações conformacionais (TIE; CALONDER; VAN TASSEL, 2003). Devido à multitude de interações envolvidas em processos de adsorção de proteínas, estudos de aspectos termodinâmicos e cinéticos devem ser utilizados para explicar e caracterizar o desempenho e mecanismos envolvidos na adsorção do adsorbato em certo adsorvente (QIU *et al.*, 2009). Os resultados dessas análises podem ajudar a prever, por exemplo, se a adsorção é de natureza química ou física, se é monocamada ou multicamada e se efeitos difusivos estão presentes durante a adsorção (RAY; GUSAIN; KUMAR, 2020).

Informações relacionadas ao tempo de equilíbrio podem ser obtidas por meios de experimentos cinéticos de adsorção e utilizados para a análise de viabilidade, escalonamento e otimização da adsorção (RAY; GUSAIN; KUMAR, 2020).

2.7.2. Adsorção no equilíbrio para obtenção de isotermas

O uso dos criogéis na IMAC para a separação de anticorpos de fluídos biológicos envolve o processo de adsorção, o qual é considerado um dos processos mais utilizados para a separação e purificação de diversas moléculas e íons (GUN'KO; SAVINA; MIKHALOVSKY, 2013). Além disso, devido à natureza macroporosa dos criogéis, eles são capazes de adsorver compostos de alta massa molecular, como proteínas (TIEN, 2019).

Dessa forma, os dados de adsorção cinéticos e no equilíbrio a uma dada temperatura são indispensáveis para a análise, caracterização e descrição dos mecanismos de interação que ocorrem entre o adsorvente e o adsorbato, sendo isso possível pelo tratamento e modelagem conforme diferentes teorias de adsorção (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020).

No âmbito desse trabalho, as equações de Langmuir e Langmuir-Freundlich serão especificadas.

O modelo de Langmuir é um dos mais utilizadas para representar dados de adsorção física no equilíbrio. Originalmente, a isoterma de Langmuir foi desenvolvida para descrever a adsorção nas fases gás-sólido, entretanto, é amplamente utilizada em outros sistemas de fase (VELOSO *et al.*, 2020).

As suposições para o modelo de Langmuir são: a adsorção do adsorbato ocorre em sítios de adsorção bem definidos; os sítios de adsorção são homogêneos e energeticamente uniformes e cada sítio pode ser ocupado por apenas uma molécula do adsorbato formando uma monocamada; não há interação lateral entre as moléculas adsorvidas (VELOSO *et al.*, 2020).

Comparativamente ao modelo de Langmuir, o modelo de isoterma de adsorção empírico de Freundlich descreve processos reversíveis e não-ideais de adsorção, sendo não restrito à conformação em monocamada e pode ser aplicado a superfícies heterogêneas e a faixas amplas de concentração (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020).

Combinando os modelos mencionados anteriormente, obtêm-se a isoterma de Langmuir-Freundlich, a qual engloba a heterogeneidade da adsorção, assim como evita as limitações relacionadas a grandes concentrações (AL-GHOUTI; DA'ANA, 2020). Segundo Sharma & Agarwal (2001), o modelo de Langmuir-Freundlich contorna as

limitações dos modelos de Langmuir e Freundlich, sendo geralmente o mais recomendado para descrever o comportamento de adsorção de proteínas em adsorventes com ligantes de afinidade.

As Equações 2.1 e 2.2 descrevem os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente:

$$Q^* = \frac{Q_m \times C^*}{K_d + C^*} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

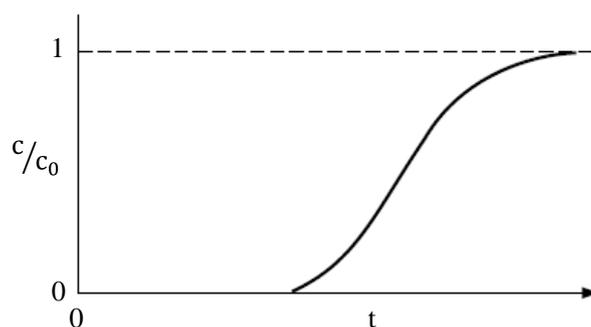
$$Q^* = \frac{Q_m \times (C^*)^n}{K_{dLF} + (C^*)^n} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

no qual C^* é a concentração do adsorbato no equilíbrio; Q_m é a capacidade máxima de adsorção (massa de adsorbato/massa de adsorvente); K_d e $K_{d(LF)}$ são as constantes de dissociação dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich (mol L^{-1}), respectivamente e n é o coeficiente de cooperatividade do modelo de Langmuir-Freundlich, o qual é capaz de representar o tipo e a intensidade da interação entre a adsorvente e o adsorbato (SHARMA; AGARWAL, 2001).

2.7.3. Curvas de ruptura

Leitos fixos constituídos por partículas porosas, membranas ou monolitos possuem diversas aplicações em cromatografia (GAGNON, 2012). Para a análise da adsorção em leitos fixos, curvas da concentração do fluido que sai da coluna em função do tempo são construídas, sendo denominadas de curvas de ruptura (*breakthrough*, MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993). Em experimentos de adsorção que envolvem leitos fixos, as concentrações do soluto na fase móvel e na fase estacionária variam ao longo do tempo, como é observado pela Figura 16 (GEANKOPLIS, 1993). A Figura 17 representa uma curva de ruptura típica, onde c/c_0 é a concentração de soluto no fluxo de saída relativo à concentração de alimentação (c_0).

Figura 17 - Curva de ruptura de adsorção de solutos em leito fixo.



Fonte: Adaptado de Perry & Green (2008)

Com o início da alimentação do leito, a concentração de soluto no fluxo de saída da coluna é praticamente zero, indicando a adsorção de grande parte do soluto pela fase estacionária. Com o passar do tempo, a concentração de soluto no fluxo de saída aumenta devido à saturação do leito, até que um valor máximo aceitável seja atingido, sendo este denominado de ponto de ruptura, sendo geralmente 1, 5 ou 10% da concentração de alimentação (GEANKOPLIS, 1993). O tempo no qual o ponto de ruptura é alcançado é chamado de tempo de ruptura. Quando a ruptura ocorre, a alimentação é parada com o intuito de se minimizar perdas e o processo de regeneração/dessorção é iniciado (MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993; REYNOLDS; RICHARDS, 1995; PERRY; GREEN; MALONEY, 1997).

Após o ponto de ruptura, a concentração de soluto no fluxo de saída aumenta rapidamente, gerando uma curva em formato de 'S' e a região onde a maior variação de c/c_0 ocorre é denominada de zona de transferência de massa (ZTM). O comprimento da ZTM está relacionado aos efeitos de transferência de massa, onde uma pequena ZTM é desejável por possuir menor resistência à transferência de massa, implicando em menores custos energéticos nas etapas de regeneração do leito (MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993)

Quando c/c_0 se aproxima de 1,0, o soluto não é capaz de ser adsorvido pela fase estacionária, pois grande parte dos sítios de adsorção do adsorvente se encontram ocupados.

Diferentes parâmetros podem ser calculados pela análise da curva de ruptura de um determinado sistema, sendo estes úteis para futuros escalonamentos e aplicações industriais do adsorvente. Dentre eles, a capacidade dinâmica de adsorção ou DBC (*dynamic binding capacity*), a qual é definida como a maior quantidade da molécula-

alvo que pode ser alimentada ao leito fixo sem que perdas significativas sejam observadas. DBC a 10% de ruptura é determinada por Boi *et al.* (2020) pela combinação das Eq. 2.3 e Eq. 2.4:

$$m_{\text{ads},10\%} = c_0 V_{10\%} - c_0 V_{\text{sis}} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

$$\text{DBC}_{10\%} = \frac{m_{\text{ads},10\%}}{V} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

onde $m_{\text{ads},10\%}$ é a massa de soluto adsorvida até o limite de 10%, c_0 é a concentração de proteína no fluxo de alimentação, $V_{10\%}$ é o volume de solução de proteína alimentada até o ponto de ruptura de 10%, V_{sis} é o volume morto do sistema. $\text{DBC}_{10\%}$ é a capacidade dinâmica de adsorção a 10% e é obtido pela razão entre $m_{\text{ads},10\%}$ e V , o qual é o volume da fase estacionária (Boi *et al.*, 2020).

Zhu *et al.* (2019) calculam a DBC a 10% de ruptura por meio da Eq. 2.5:

$$\text{DBC}'_{10\%} = \frac{c_0 \int_0^{V_{10\%}} (1 - C/C_0) dV}{V_{\text{gel}}} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

onde $V_{10\%}$ e V_{gel} são o volume alimentado de solução de proteína para atingir o ponto de ruptura de 10% e o volume do leito, respectivamente. C e C_0 são as concentrações de proteína na saída da coluna e na alimentação, respectivamente (Zhu *et al.*, 2019).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes

Quitosana (derivada de camarão, $\geq 75\%$ desacetilada, CS), quitosana (baixa massa molecular, 75-85% desacetilada, CSLM), gamaglobulina humana ($\geq 99\%$ por eletroforese, hIgG), persulfato de amônio (APS), alil-glicidil-éter (AGE), ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil]-etanosulfônico (Hepes), tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS), Azul de Coomassie (Coomassie brilliant blue G-250), imidazol, glutaraldeído (25% em água, GA), epicloridrina (ECH), agarose, polietilenoglicol (PEG 6000 Da), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), sulfato de cobre, sulfato de níquel, soro humano (esterilizado, filtrado; de plasma humano masculino de tipagem AB), anticorpo anti-hIgG (Fab específico) conjugados a peroxidase produzido em cabra, foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). N,N,N',N'-tetra-metilenodiamina (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), ditiotriol (DTT) e marcadores de alta massa molecular para eletroforese foram adquiridos da Cytiva (EUA). Acrilamida (AAm) e N,N'-metileno-bis-acrilamida (MBAm) foram obtidas da Bio-Rad (EUA). Cloreto de sódio, fosfato de sódio bibásico e monobásico, ácido cítrico, nitrato de prata, e carbonato de sódio anidro foram adquiridos da Synth (Brasil). Ácido acético glacial e glicerol foram adquiridos da Êxodo Científica (Brasil). Água ultrapura Milli-Q da Millipore (EUA) foi utilizada nos procedimentos. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.2. Equipamentos

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

isoterma de adsorção, foram utilizados os seguintes equipamentos: plataforma orbital Unimax 1010 (Heidolph, Alemanha), agitador de tubos TE-165 (TECNAL, Brasil), incubadora com agitação orbital TE-4200 (TECNAL, Brasil) e a centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha). Para a medição da condutividade dos tampões utilizados, o condutivímetro DM-32 (Digimed, Brasil) foi empregado.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparação das soluções de quitosana

Para a preparação das soluções de quitosana, flocos de quitosana do tipo derivado de camarão e $\geq 75\%$ desacetilada (CS) ou flocos de quitosana de baixa massa molecular (CS_{LM}) foram adicionados à solução de ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e dispersos por agitação mecânica. Após 1 hora de agitação, as soluções foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por um período de 24 a 48 horas para decantação das partículas insolúveis e maior solubilização dos flocos. As soluções foram filtradas em filtro de vidro sinterizado para a sua clarificação.

O preparo da solução de quitosana com valor de pH entre 5 e 6 foi realizado com a quitosana de baixa massa molecular e, após seguir os procedimentos realizados anteriormente, pérolas de hidróxido de sódio foram adicionadas até que o valor de pH da solução de quitosana estivesse dentro da faixa desejada, sendo esta solução denominada de CS_{LM6} . De acordo com Dragan *et al.* (2012), a solução de quitosana com o valor de pH indicado possibilitou a síntese de criogéis com características mecânicas, químicas e morfológicas mais adequadas. O acompanhamento do valor do pH foi feito com fitas de medição de pH.

As três soluções distintas de quitosana obtidas nesta etapa possuíam concentração de 1% m/v e foram utilizadas para a síntese de criogéis.

3.2.2. Síntese de criogel de poliacrilamida e quitosana

O procedimento de síntese do criogel de poliacrilamida e quitosana para o uso como fase estacionária em cromatografia para a purificação de proteínas utilizando a IMAC foi desenvolvido baseando-se nas descrições dos trabalhos de

Marcuz *et al.* (2021), Mourão *et al.* (2019), Mourão, Haupt & Bueno (2018), Jain *et al.* (2015), Dragan *et al.* (2012) e Jain & Kumar (2009).

Com o objetivo de se obter um criogel de características adequadas para a aplicação como fase estacionária, variou-se a concentração inicial dos reagentes GA e AGE, conforme descrito no tópico 3.2.2.1. O tipo de solução de quitosana adicionada à mistura de monômeros para a síntese dos criogéis (CS, CS_{LM} ou CS_{LM6}) também foi variado e a concentração final de quitosana foi mantida constante (0,5% m/v). As concentrações de iniciador (APS, 0,2% m/v), de catalisador (TEMED, 0,2% v/v) e de monômeros (6% m/v, sendo 4,74% m/v de AAm e 1,26% m/v de MBAm) foram mantidas constantes, sendo essas mesmas concentrações utilizadas na síntese de criogéis de poliacrilamida e alginato por Marcuz *et al.* (2021).

Para a preparação de 10 mL de criogel, 0,474 g de AAm e 0,126 g de MBAm foram pesados e dissolvidos em 4 mL de água ultrapura. Após completa solubilização, 5 mL da solução de quitosana (CS, CS_{LM} ou CS_{LM6}) foram adicionados à mistura dos monômeros em agitação. Após essa etapa, a solução foi levada a um banho ultrassônico por 20 minutos para remoção de gases dissolvidos. A mistura resultante foi resfriada em geladeira a 4 °C por 30 minutos. Soluções contendo TEMED (20 µL), APS (20 mg) e GA foram preparadas em ácido acético (0,1 mol L⁻¹) resfriado, quando necessário. Após o resfriamento da solução em geladeira, as soluções com os reagentes foram transferidas para a mistura monomérica. Adicionou-se também AGE em volumes definidos em algumas das formulações. O volume da mistura final em todos os experimentos foi de 10 mL. Foram distribuídos 3 mL da solução resultante para seringas de 5 mL e 0,5 cm de diâmetro interno ou colunas de vidro com 1,0 cm de diâmetro interno, ambas com uma de suas extremidades vedadas. Esses recipientes foram transferidos rapidamente para um freezer e em banho de etanol (99,5% v/v) a -20 °C por 16 horas.

Decorrido o tempo necessário, os criogéis foram descongelados à temperatura ambiente e, posteriormente, retirados de seus moldes. Os criogéis formados foram lavados com água ultrapura para a remoção dos monômeros e outros reagentes não reagidos e armazenados a 4 °C para uso posterior.

3.2.2.1. Variação na concentração de alil-glicidil-éter (AGE) e glutaraldeído (GA)

Mantendo fixas as concentrações de quitosana, AAm, MBAm, APS e TEMED, diversas formulações de criogel foram produzidas por meio da variação de AGE e GA com o objetivo de se verificar a influência desses reagentes nas características do criogel. Como controle, foram sintetizados criogéis sem a adição de GA ou AGE e eles foram identificados como PAAm-CS, PAAm-CS_{LM} e PAAm-CS_{LM6}, conforme a solução de quitosana utilizada para a síntese do criogel. A Tabela 2 mostra os volumes utilizados para sintetizar os criogéis nesta etapa.

Tabela 2 - Volumes de GA e AGE utilizados para a síntese dos criogéis e a sua nomenclatura correspondente

| Solução de quitosana | Volume (µL) | | Nome |
|----------------------|-------------|--|---|
| | GA | AGE | |
| CS | 0 | 0 | PAAm-CS |
| | 5 | 0 | PAAm-CS-GA(5) |
| | 10 | 0 | PAAm-CS-GA(10) |
| | 0 | 200 | PAAm-CS-AGE(200) |
| | 0 | 300 | PAAm-CS-AGE(300) |
| CS _{LM} | 0 | 0 | PAAm-CS _{LM} |
| | 10 | 0 | PAAm-CS _{LM} -GA(10) |
| | 20 | 0 | PAAm-CS _{LM} -GA(20) |
| | 40 | 0 | PAAm-CS _{LM} -GA(40) |
| | 0 | 200 | PAAm-CS _{LM} -AGE(200) |
| | 0 | 300 | PAAm-CS _{LM} -AGE(300) |
| | 20 | 200 | PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(200) |
| 20 | 300 | PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(300) | |
| CS _{LM6} | 0 | 0 | PAAm-CS _{LM6} |
| | 20 | 0 | PAAm-CS _{LM6} -GA(20) |
| | 20 | 200 | PAAm-CS _{LM6} -GA(20)-AGE(200) |

Fonte: Autor (2021)

Observando os criogéis sintetizados, as formulações com melhores características, como textura, rigidez, esponjidade, homogeneidade, velocidade de absorção de água e permeabilidade, foram escolhidas para testes posteriores.

3.2.2.2. Ativação do criogel PAAm-CS com epicloridrina (ECH)

O procedimento para a ativação do criogel de PAAm-CS com epicloridrina (ECH) descrito por Marcuz *et al.* (2021) foi realizado com o objetivo de introduzir grupos funcionais epóxi ao criogel para posterior imobilização do agente quelante.

Em béquer, 0,06 g de boroidreto de sódio (NaBH_4) foram dissolvidos em 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH , 2 mol L^{-1}). Os criogéis foram mergulhados nessa solução e, lentamente, adicionou-se 1,0 mL de ECH. A mistura foi mantida sob agitação constante em mesa agitadora à temperatura ambiente por 15 min. Decorrido esse tempo, 10 mL de solução de NaOH (2 mol L^{-1}) foram adicionados à solução e, em seguida, 4,6 mL de ECH foram acrescentados ao béquer lentamente. A reação foi mantida sob agitação constante em plataforma orbital à temperatura ambiente por 16 horas. Terminado esse tempo, o criogel foi lavado com água para remoção da base até a neutralização e colocado em uma coluna cromatográfica. O criogel obtido foi denominado PAAm-CS-ECH.

3.2.2.3. Imobilização do agente quelante IDA

Para a imobilização do agente quelante IDA, seguiu-se o procedimento de Fioravante (2021), no qual 10,6 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram dissolvidos em 50 mL de água, a solução resultante foi utilizada para equilibrar a coluna cromatográfica contendo 3 mL dos criogéis com melhores aspectos físicos e visuais selecionados previamente, sendo eles: PAAm-CS-ECH, PAAm-CS-AGE(200), PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(200) ou PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(300). Em seguida, 4 g de IDA foram dissolvidos em 10 mL de solução de NaOH (2 mol L^{-1}) e o pH desta solução foi ajustado para 10 com a adição de pérolas de NaOH . Preparou-se uma solução de Na_2CO_3 pela adição de 2,12 g de Na_2CO_3 em 10 mL de água. As duas soluções foram misturadas e a solução resultante, à temperatura de $65 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho termostático, foi recirculada na coluna por meio de uma bomba peristáltica por 24 horas. Decorrido esse tempo, a coluna foi lavada com água ultrapura exaustivamente, até que o pH da água na corrente de saída se igualasse ao pH da água da corrente de alimentação.

Os criogéis obtidos foram denominados PAAm-CS-ECH-IDA, PAAm-CS-AGE(200)-IDA, PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(200)-IDA ou PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(200)-IDA e armazenados em geladeira a 4 °C.

3.2.3. *Quantificação de íons metálicos quelatados pelo criogel com IDA imobilizado*

Utilizando os criogéis com agente quelante imobilizado descritos em 3.2.2.3, a quantificação de íons metálicos quelatados pelo monolito foi determinada conforme procedimento utilizado por Fioravante (2021), alimentando-se a coluna cromatográfica com 30 mL (10 volumes de coluna) de solução do íon metálico (sulfato de cobre e sulfato de níquel em concentrações de 50 mmol L⁻¹). Em seguida, a coluna foi lavada com água e com tampão acetato de sódio a pH 4,0 (25 mmol L⁻¹) para a retirada dos íons metálicos fracamente adsorvidos. Para a remoção dos íons metálicos quelatados, a coluna foi alimentada com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a pH 7,0 (100 mmol L⁻¹). Frações de 2 mL foram coletadas e medidas em espectrofotômetro a 733 nm e 384 nm para Cu²⁺ e Ni²⁺, respectivamente.

A Eq. 3.1 foi utilizada para a determinação da quantidade de íons metálicos que foram quelatados pelo criogel:

$$n_{Me^{n+}} = Coef \times ABS_{nm} \times F_d \times V_{amostra} \quad (Eq. 3.1)$$

no qual Coef é a constante correspondente ao coeficiente angular da curva analítica do íon metálico em solução de EDTA no comprimento de onda apropriado, ABS_{nm} é o valor medido da absorbância de cada fração no comprimento de onda de 733 ou 384 nm para os íons metálicos cobre ou níquel, respectivamente; F_d é o fator de diluição e $V_{amostra}$ é o volume (mL) de cada fração coletada e $n_{Me^{n+}}$ (μ mol) são o número de mols de Cu²⁺ ou Ni²⁺ quelatado. Como controle e verificação da capacidade de adsorção de íons metálicos pela matriz sólida sem o agente quelante, testes de adsorção de Cu²⁺ e Ni²⁺ foram realizados com o criogel de PAAm-CS, e PAAm-CS_{LM}-GA(20).

A diferença entre os valores de íons metálicos quelatados obtidos pelo criogel com IDA e pelo criogel controle é a quantidade de íons metálicos quelatados pelo agente quelante.

3.2.4. Ensaios cromatográficos

O criogel com melhores características visuais e aspectos mais adequados para cromatografia foi selecionado para ser utilizado em ensaios cromatográficos, sendo ele o criogel de PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(200)-IDA. Nesse caso, o criogel de PAAm-CS_{LM}-GA(20) foi usado como controle. Como simplificação, seus nomes foram reduzidos para PAAm-CS-GA-AGE-IDA e PAAm-CS-GA, respectivamente. As cromatografias foram realizadas em colunas cromatográficas C10/10 (Cytiva, EUA), as quais foram acopladas a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão Biologic LP System (Bio-Rad, EUA). Foram realizados ensaios cromatográficos com e sem íons metálicos quelatados no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Os experimentos foram realizados a vazão de 2,0 mL min⁻¹ e em temperatura ambiente. Frações de volumes conhecidos foram coletadas para quantificação em termos de proteínas totais empregando a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976). Os valores de condutividade dos tampões utilizados encontram-se na Tabela E.1 do Apêndice E. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.4.1. Experimentos cromatográficos com hIgG e soro humano

Com o intuito de verificar a capacidade de adsorção de proteínas totais do soro humano e hIgG pelo criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, cromatografias com hIgG pré-purificada e soluções de soro humano foram realizadas nos seguintes sistemas tamponantes a 25 mmol L⁻¹: MOPS a pH 6,5 e 7,0; MES a pH 5,5; fosfato de sódio (NaP) a pH 7,0 e Tris-HCl a pH 7,0. MOPS e MES são zwitteriônicos, NaP é carregado negativamente e Tris-HCl é carregado positivamente nos valores de pH utilizados.

Para cada cromatografia, as colunas foram equilibradas com 10 volumes de coluna (VC) de tampão de adsorção. Posteriormente, uma das seguintes soluções foi alimentada ao leito cromatográfico: 1,0 mL de solução de hIgG (2 mg mL⁻¹), preparada pela adição de 2 mg de hIgG pré-purificada (Sigma-Aldrich) a 1,0 mL de tampão de adsorção; ou 1,0 mL de solução de soro humano (3,5 mg mL⁻¹), preparada diluindo-se 75 µL de soro humano (Sigma-Aldrich) em 1,050 mL de tampão de adsorção (diluição de 15 vezes). Finalizada a alimentação, o criogel foi lavado com 30 mL (10 VC) do mesmo tampão de adsorção até a remoção de toda proteína não adsorvida (absorbância da corrente de saída próxima a zero) e, em seguida, a eluição foi realizada com 30 mL

(10 VC) do tampão de adsorção contendo $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio (NaCl) ou até que todas as proteínas adsorvidas fossem eluídas. Concluída a eluição, a coluna foi lavada com água ultrapura e reequilibrada com o tampão de adsorção para ser utilizada em um novo ciclo.

Durante as cromatografias, frações de 2,0 mL foram coletadas e quantificadas em termos de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e, no caso da cromatografia do soro humano, as amostras mais concentradas foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

3.2.4.2. Ensaios cromatográficos com hIgG e soro humano em criogel com íons Cu^{2+} e Ni^{2+} imobilizados

Para verificar o efeito de íons metálicos quelatados na adsorção de proteínas, o criogel foi inicialmente saturado com o íon metálico pela passagem de 30 mL (10 VC) da solução de sulfato de cobre ou níquel (50 mmol L^{-1}). Em seguida, a coluna foi lavada com 15 mL (5 VC) de água e lavado com 30 mL (10 VC) de tampão acetato de sódio a pH 4,0 (25 mmol L^{-1}) para a remoção de íons metálicos fracamente adsorvidos. Iniciaram-se, então, as etapas de equilíbrio da coluna, injeção da amostra e lavagem, como descrito no tópico 3.2.4.1. Em seguida, a etapa de eluição foi realizada com 30 mL (10 VC) do tampão acetato de sódio a pH 4,0 (25 mmol L^{-1}) ou com imidazol (100 mmol L^{-1}) acrescentado ao respectivo tampão de adsorção. A coluna foi regenerada com 30 mL (10 VC) de solução de EDTA a pH 7,0 (100 mmol L^{-1}). Finalmente, a coluna foi lavada com água e armazenada na geladeira até a realização de novos experimentos.

Baseando-se nos resultados de quantidade de hIgG obtida na etapa de eluição, as melhores condições de adsorção dos criogéis com íons metálicos imobilizados foram empregadas em testes com soro humano.

Frações de 2,0 mL das etapas de lavagem, eluição e regeneração foram coletadas e quantificadas em termos de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). No caso das cromatografias com solução de soro humano, as amostras mais concentradas foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. A condição de purificação que se mostrou mais promissora em termos de pureza e quantidade de hIgG obtida na etapa de eluição foi também analisada por imunodifusão radial (RID). Ensaios

para obtenção da curva de ruptura, cinética de adsorção e isotermas foram realizados na melhor condição de purificação determinada por esta etapa.

3.2.5. Curva de ruptura de adsorção do criogel

Com o objetivo de se determinar dados relacionados à ruptura, como o tempo de ruptura e seletividade do monolito em condições de saturação, os ensaios foram realizados na melhor condição de purificação obtida pelos experimentos cromatográficos, a qual foi obtida com o criogel PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ e com NaP a pH 7,0 contendo imidazol (2 mmol L⁻¹) como tampão de adsorção e NaP a pH 7,0 contendo imidazol (100 mmol L⁻¹) como tampão de eluição.

Dessa forma, seguiu-se os mesmos procedimentos descritos no tópico 3.2.4.2. para a imobilização do íon metálico Ni²⁺ ao criogel e para o equilíbrio da fase estacionária. Em seguida, foram alimentados cerca de 35 mL de solução de soro humano (3,5 mg mL⁻¹) diluído 15 vezes no tampão de adsorção para que a saturação do monolito fosse garantida. As etapas de lavagem, eluição e regeneração ocorreram conforme o tópico 3.2.4.2.

Frações de 2,0 mL das etapas de *flowthrough*, lavagem, eluição e regeneração foram coletadas e quantificadas em termos de proteínas totais pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras mais concentradas foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE e RID.

O tempo e o volume requeridos para que a coluna atingisse o ponto de ruptura foi determinado quando a relação entre a concentração de proteínas totais no fluxo de saída da coluna (C) e a concentração de proteínas totais na alimentação (C₀) fosse igual a 0,1. A capacidade dinâmica de adsorção (DBC) foi determinada com base nos dados obtidos a 10% e empregando as Eq. 2.3, Eq. 2.4 e Eq. 2.5.

3.2.6. Cinética de adsorção de hIgG

Os estudos cinéticos de adsorção de hIgG no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ foram realizados para se obter o tempo de equilíbrio de adsorção do monolito

no modo de recirculação da solução, como descrito em Erzenin, Ünlü & Odabaşı (2011).

A coluna contendo o criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA foi saturada com solução de sulfato de níquel, lavada com água e com acetato de sódio a pH 4,0, nessa ordem. Em seguida, a coluna foi equilibrada com o tampão de adsorção NaP a pH 7,0 contendo imidazol (2 mmol L^{-1}). Soluções de 0,5 e 2,0 mg hIgG mL^{-1} (50 mL) foram preparadas e recirculadas na coluna contendo o criogel, a uma vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, até que o equilíbrio fosse atingido. Em tempos determinados, alíquotas de 20 μL foram coletadas. A concentração de hIgG foi determinada em duplicata pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Decorrido o tempo do experimento (3 horas), a coluna foi lavada com o tampão de adsorção e as proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão NaP a pH 7,0 contendo imidazol (100 mmol L^{-1}). Finalmente, a coluna foi regenerada com EDTA a pH 7,0 (100 mmol L^{-1}) e lavada com água para a realização de experimentos subsequentes.

3.2.7. Isotermas de adsorção de hIgG

Determinado o tempo de equilíbrio de adsorção de hIgG, foram executados experimentos em batelada com o criogel escolhido na melhor condição de adsorção da proteína-alvo, com base no procedimento descrito por Mól *et al.*, (2017), Mourão *et al.* (2019) e Fioravante (2021). Preparou-se 25 mL de solução-mãe de hIgG no tampão de adsorção NaP a pH 7,0 contendo imidazol (2 mmol L^{-1}). Foram introduzidos 20 mg de fragmentos do criogel PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} secos em tubos *Eppendorf* de 2 mL de capacidade. Em seguida, volumes predeterminados do tampão NaP a pH 7 contendo 2 mmol L^{-1} imidazol foram adicionados aos tubos que continham os fragmentos de criogéis. Em seguida, volumes predeterminados da solução-mãe foram coletados e adicionados aos tubos *Eppendorf* de modo que cada tubo possuísse uma concentração inicial de hIgG distinta. Em seguida, os frascos foram colocados sob agitação em um agitador de tubos, o qual foi levado a um *shaker* para garantir que a temperatura do experimento fosse constante e igual a $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, até que o equilíbrio fosse alcançado.

A concentração de hIgG no sobrenadante no equilíbrio foi determinada pelo método de Bradford e, pela diferença entre a concentração inicial (C) e a final (C*), foi

calculada a quantidade de hIgG adsorvida. A capacidade de adsorção de hIgG do criogel (Q^*) foi expressa em mg de hIgG por massa seca do adsorvente. Posteriormente foram ajustados os parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, como descrito no tópico 2.7.2, por regressão não linear utilizando o *software* Origin® (Microcal, EUA). Obteve-se, então, aproximações para a capacidade máxima de adsorção (Q_m), constantes de dissociação para cada modelo, e o coeficiente de cooperatividade (n) para o modelo de Langmuir-Freundlich.

3.2.8. Métodos analíticos

3.2.8.1. Capacidade de intumescimento

A capacidade de intumescimento do criogel é a capacidade do criogel em reter água em seus poros. A determinação desse valor foi realizada como descrito em da Silva *et al.* (2014) e Marcuz *et al.* (2021) (Eq. 3.2):

$$S_{w/w} = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

onde $S_{w/w}$ é a capacidade de absorção de água (g água/g de adsorvente seco), m_w e m_d são as massas do adsorvente úmido e seco (g), respectivamente.

Para o experimento, amostras de volume conhecido do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA foram brevemente secas em papel de filtro e pesadas, obtendo-se o valor de m_w . Em seguida, os criogéis foram secos em estufa a 60 °C até massa constante, sendo este o valor m_d .

3.2.8.2. Estimativa da porosidade

A porosidade foi determinada conforme o protocolo de Sun *et al.* (2012). Uma peça cilíndrica de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA foi saturada com água ultrapura e imersa em um recipiente cilíndrico graduado com volume inicial de água conhecido, V_1 . O volume final após a imersão foi medido, obtendo-se o volume V_2 . O volume de criogel saturado com água V_0 foi calculado pela diferença entre os volumes V_1 e V_2 (Eq. 3.3).

$$V_0 = V_2 - V_1 \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Em seguida, o criogel saturado com água foi pesado (m_w) e a água dentro dos poros do criogel foi removida por compressão manual, como descrito por Arvidsson *et al.* (2003). O criogel livre de água foi novamente pesado (m_s). A porosidade (φ) foi calculada por meio da Eq. 3.4:

$$\varphi = \frac{m_w - m_s}{\rho_w \times V_0} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

no qual ρ_w é a densidade da água à temperatura de realização do experimento.

3.2.8.3. Quantificação da capacidade do criogel em se ligar à água presente no ar

Amostras do criogel PAAm-CS-GA-AGE-IDA foram secas em estufa a 60 °C e, posteriormente, pesadas (m_s), como em 3.2.8.1. Logo depois, os criogéis secos foram armazenados em atmosfera úmida, produzida em recipiente fechado hermeticamente contendo solução saturada de cloreto de potássio (35% m/v a temperatura ambiente) em água, conforme procedimento descrito em Mourão *et al.* (2019). Os criogéis foram colocados no recipiente, sem entrar em contato com a solução aquosa. Finalmente, o aumento de massa dos criogéis foi monitorado até atingir massa constante (m_c), assim, a massa de água retida foi calculada pela Eq. 3.5.

$$m_{\text{água}}(\text{em g}) = m_c - m_s \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Os resultados de massa obtidos após cada procedimento citado dos tópicos 3.2.8.1 a 3.2.8.3 foram utilizados para a determinação da composição mássica do criogel úmido, na qual a massa de água nos poros maiores é a massa de água removida por compressão manual, a massa de água correspondente à água presente nos poros menores foi obtida pela secagem do criogel em vidro sinterizado, a massa de água ligada ao polímero foi obtida pelo uso da Eq. 3.5 e a massa de polímero seco é igual a m_s .

3.2.8.4. Determinação da resistência ao fluxo do criogel

De acordo com o procedimento de Marcuz *et al.* (2021), a medição da resistência ao fluxo de água ultrapura pelos criogéis de PAAm-CS-GA-AGE-IDA foi realizada para monolitos com 1 cm de diâmetro e 3 mL de volume. Os criogéis foram empacotados em coluna C10/10 (Cytiva, EUA) e acoplados a um cromatógrafo de fase líquida de baixa pressão (Bio-Rad, EUA). Vazões de 1,0 a 5,0 mL min⁻¹ foram testadas.

O experimento foi terminado se o fluxo de água fosse obstruído ou se deformações físicas no criogel fossem visíveis.

3.2.8.5. Estudo de degradação *in vitro* do criogel

Para verificar a degradação do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em função do tempo, seguiu-se o procedimento descrito por Kathuria *et al.* (2008) e Guven *et al.* (2020), no qual 12 fragmentos de criogéis secos foram pesados (W_i) e imersos em tubos *Eppendorf* de 2 mL contendo solução de PBS. As amostras foram encubadas em temperatura ambiente por um período de até 6 semanas. Semanalmente, fragmentos em 2 tubos *Eppendorf* foram lavados com água ultrapura e secos em estufa a 60 °C. Os criogéis secos foram pesados novamente (W_f) e a percentagem de degradação foi calculada conforme a Eq. 3.6.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{W_f}{W_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.6})$$

3.2.8.6. Cálculo do rendimento de monômeros do criogel

Conforme o procedimento de Perçin, Idil & Denizli (2019), o rendimento da polimerização do criogel foi determinado. Criogéis recém preparados de PAAm-CS-GA-AGE com 3 mL de volume foram lavados com água, secos em estufa e pesados. Com o conhecimento da massa total de monômeros adicionada durante a síntese, utilizou-se a Eq. 3.7 para calcular o rendimento da polimerização:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_s}{m_t} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.7})$$

no qual, m_s é a massa do criogel seco em estufa e m_t é a massa total de monômeros para a síntese do mesmo volume de criogel.

3.2.8.7. Medição do ponto de carga superficial zero do criogel

O ponto de carga superficial zero do criogel foi determinado seguindo o procedimento de Davranche *et al.* (2003) e Fioravante (2021). Primeiramente, fragmentos de criogéis de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺ e

PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ foram secos em estufa. Em seguida, uma massa conhecida (em torno de 0,30 g) de cada um desses criogéis foi colocada em um béquer com 20 mL de solução de acetato de amônio (CH₃COONH₄; 0,1 mol L⁻¹) e o valor do pH dessa solução foi medido com medidor de pH até que atingisse valor constante, o qual foi identificado como ponto de carga nula.

Em seguida, volumes de solução de ácido acético (CH₃COOH; 0,3 mol L⁻¹) ou solução de hidróxido de amônio (NH₄OH; 0,25 mol L⁻¹) foram adicionados aos béqueres que continham os criogéis, o pH foi monitorado com medidor de pH até que a adição de ácido ou base não gerasse variação no valor de pH maior que 0,01.

A carga superficial (Q) do criogel pode ser calculada pela Eq. 3.8. A Eq. 3.8 pode ser simplificado para o ácido e para a base, para a Eq. 3.9 e Eq. 3.10, respectivamente. Dessa forma, é possível determinar o perfil de uma curva para as cargas superficiais do criogel em função do pH e o ponto de carga superficial nula é o valor de pH no qual a curva obtida intercepta o eixo horizontal:

$$Q = \frac{c_a - c_b + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]}{c_m} \quad (\text{Eq. 3.8})$$

$$Q = \frac{c_a - [\text{H}^+]}{c_m} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

$$Q = \frac{-c_b + [\text{OH}^-]}{c_m} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

onde c_a é a concentração do ácido corrigida (mol L⁻¹), c_b é a concentração da base corrigida (mol L⁻¹) e c_m é a concentração dos sólidos em suspensão (g L⁻¹).

3.2.8.8. Morfologia do criogel

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

Fragmentos dos cortes das seções transversal, longitudinal e superficial dos criogéis de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA foram liofilizados e

recobertos por 20 nm de ouro utilizando o equipamento Sputter Coater K450 (EMITECH, Reino Unido).

3.2.8.9. Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese para a análise qualitativa das proteínas de cada etapa dos experimentos cromatográficos com soro humano foi realizada 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 poliacrilamida. Foram agrupadas as amostras mais concentradas de cada etapa da cromatografia, chamados de *pools*. Foram coletados 75 μL de cada *pool* e adicionados a um tubo *Eppendorf* de 0,5 mL. Ao mesmo tubo *Eppendorf*, adicionou-se 25 μL de tampão de desnaturação contendo SDS e 2 gotas de glicerol, a mistura foi homogeneizada e levadas a aquecimento a 100 °C por 7 minutos para desnaturação. Em seguida, amostras de, no máximo, 15 μL de cada *pool* foram adicionadas aos géis. Os marcadores de proteínas de alta massa molecular e de hIgG foram também adicionados ao gel de eletroforese, nos volumes de 5 μL e 3 μL , respectivamente.

Seguindo o procedimento de Morrissey (1981), a coloração dos géis foi feita com nitrato de prata. Os géis foram submersos em soluções de etanol e ácido acético, por 20 min. Seguiu-se com a revelação com a submersão dos géis em solução de GA, também por 20 min. Após essa etapa, os géis foram lavados com água e submersos em solução de ditiotreitol (5 mg mL⁻¹; DTT), por 20 min. A solução de DTT foi removida e a solução de nitrato de prata (0,1% m/v) foi adicionada aos géis em agitação por 20 min. Os géis foram lavados com água e a solução reveladora de carbonato de sódio (3% m/v) + formaldeído (0,05% v/v) foi adicionada aos géis. A revelação foi finalizada com ácido cítrico (2,3 mol L⁻¹).

3.2.8.10. Imunodifusão radial (RID)

O procedimento foi conduzido de acordo com Lü & Miller (1996), da Silva *et al.* (2014), Mourão, Carmignotto & Bueno (2016) e Carmignotto *et al.* (2017), com a finalidade de quantificar a hIgG presente nas amostras das etapas cromatográficas da melhor condição de purificação. Inicialmente o gel de agarose foi preparado, o qual

possuía as seguintes concentrações para cada um dos reagentes empregados: 1,2% de agarose e 3% de polietilenoglicol (PEG 6000 Da) em tampão TBE (Tris-HCl 90 mmol L⁻¹, ácido bórico 90 mmol L⁻¹ e EDTA 3 mmol L⁻¹). A solução contendo esses reagentes foi aquecida em banho-maria a 60 °C até a dissolução completa da agarose. Em seguida, a solução foi resfriada até a temperatura de 50 °C para ser adicionado o antígeno (anticorpo anti-hIgG (Fab específico) conjugados a peroxidase produzido em cabra), na proporção de 1 µL de antígeno para 1 mL de gel, e a solução resultante foi depositada sob plástico específico para agarose em molde de dimensões 9 cm x 14 cm.

Após a geleificação, orifícios simetricamente espaçados foram perfurados no gel, e foram introduzidos 10 µL de amostras de injeção e dos *pools* referentes às etapas cromatográficas de *flowthrough* (no caso da RID para a curva de ruptura), lavagem, eluição e regeneração. O gel contendo as amostras foi incubado em câmara úmida a temperatura ambiente por 48 h e, em seguida, o gel foi seco por 24 h em temperatura ambiente.

O gel foi corado por submersão por 30 minutos em solução de Coomassie brilliant blue R-250 (0,5% m/v), etanol (45% v/v) e ácido acético (45% v/v). O gel foi descorado por lavagens com solução aquosa contendo etanol (30%) e ácido acético (7%) até a visualização dos halos de precipitação. O diâmetro de cada halo foi medido com um paquímetro e convertido em termos de concentração de hIgG, com base na curva padrão, a qual relaciona linearmente o diâmetro dos halos com o logaritmo da concentração de hIgG. A curva padrão foi construída em triplicata para todos os experimentos de RID realizados.

3.2.8.11. Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteínas totais e de hIgG pré-purificada das frações coletadas durante os procedimentos cromatográficos foi determinada por meio da metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976). As curvas padrões para os experimentos com soro humano e hIgG foram construídas com albumina de soro bovino e hIgG pré-purificada, respectivamente. O coeficiente angular obtido pelas curvas de calibração das soluções de Bradford foi utilizado para o cálculo da concentração de proteínas de cada amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos para o criogel de poliacrilamida e quitosana com íons metálicos imobilizados são analisados nessa seção. Inicialmente, são apresentados os resultados dos procedimentos de síntese e caracterização visual, morfológica e física dos criogéis monolíticos de poliacrilamida e quitosana. Em seguida, foi realizada a análise dos resultados dos experimentos cromatográficos com o criogel que apresentou melhores características após a síntese, incluindo-se, ensaios cromatográficos com íons metálicos imobilizados para adsorção hIgG pré-purificada e hIgG a partir soro humano.

Determinou-se, então, a melhor condição de purificação de hIgG e essa condição foi empregada para os estudos de adsorção de hIgG para a determinação de parâmetros cinéticos, curvas de ruptura e isothermas. As duplicatas dos experimentos apresentados neste capítulo encontram-se nos Apêndices.

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÕES VISUAIS DOS CRIOGÉIS

Criogéis de poliacrilamida e quitosana foram sintetizados utilizando três tipos diferentes de solução de quitosana, com o objetivo de verificar o efeito causado por cada uma delas nos aspectos do monolito. Conforme os tópicos 3.2.1 e 3.2.2, as soluções de quitosana (1% m/v) empregadas foram preparadas com flocos de quitosana do tipo derivado de camarão e $\geq 75\%$ desacetilada (CS), flocos de quitosana de baixa massa molecular (CS_{LM}) ou flocos de quitosana de baixa massa molecular em solução com valor de pH entre 5 e 6 (CS_{LM6}).

4.1.1. Estudos da variação da composição dos criogéis

Os criogéis sintetizados com a solução de quitosana derivada de camarão $\geq 75\%$ desacetilada (CS) foram denominados de PAAm-CS e preparados conforme descrito no tópico 3.2.2, no qual as concentrações de iniciador (APS), de catalisador (TEMED), de monômeros (AAm e MBAm) e CS foram mantidas constantes (Tabela 2).

4.1.1.1. Criogéis sintetizados com GA

Foram utilizados diferentes volumes iniciais do agente de reticulação GA (0, 5 e 10 μL) e do agente de funcionalização AGE (0, 100, 200 e 300 μL), com o objetivo de estudar os efeitos desses compostos nas características físicas, visuais e mecânicas dos criogéis.

De acordo com os resultados obtidos, os criogéis de diferentes composições apresentaram diferenças macroscópicas entre si. Primeiramente, o criogel de PAAm-CS (Figura 18; controle), sintetizado sem a adição de GA ou AGE, foi caracterizado como esponjoso, branco, homogêneo, permeável por gravidade e com estrutura visual uniforme, além de ser capaz de retornar à sua forma original rapidamente quando em contato com água após ser comprimido.

Figura 18 - Criogel monolítico de poliacrilamida e quitosana (PAAm-CS; controle)



Fonte: Autor (2021)

Esses resultados são comparáveis aos obtidos por Arvidsson *et al.* (2003) para criogéis sintetizados com apenas poliacrilamida, os quais são caracterizados pelos autores como homogêneos, opacos, esponjosos e elásticos. Similarmente, Jain & Kumar (2009) sintetizaram criogéis monolíticos de apenas poliacrilamida e quitosana em variadas concentrações e constataram características visuais semelhantes aos criogéis sintetizados neste trabalho. Os autores argumentam que a quitosana se mantém na estrutura do monolito por interações de natureza física, gerando uma rede semi-interpenetrante, como foi explicitado anteriormente no tópico 2.6.

Testes de permeabilidade em cromatógrafo de baixa-pressão mostraram que o criogel foi capaz de suportar vazões de até $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ (velocidade superficial de 458 cm h^{-1}), sem apresentar qualquer resistência ao escoamento da água. Normalmente, procedimentos cromatográficos a baixa pressão operam a vazões entre 0,5 e

2,0 mL min⁻¹ (38 a 154 cm h⁻¹), as quais são inferiores às vazões máximas determinadas para o criogel de PAAm-CS, sendo possível empregá-lo como fase estacionária para cromatografias de baixa pressão.

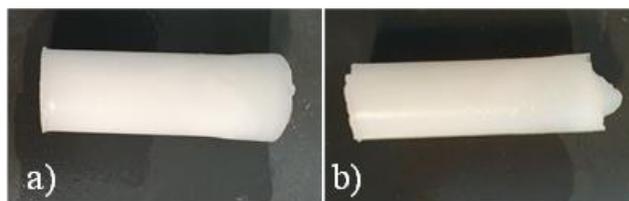
Os criogéis de PAAm-CS-GA, produzidos com a adição de GA (5 ou 10 µL) durante a síntese, foram caracterizados como quebradiços, visualmente heterogêneos, rugosos, frágeis, amarelados (devido à presença de GA) e não esponjosos. Quando comparado ao criogel de PAAm-CS, os criogéis sintetizados com GA possuíram características inadequadas para a sua utilização em ensaios cromatográficos, indicando que a presença do GA impactou negativamente a estrutura do monolito nessas condições de síntese. A presença de GA causa a reticulação das cadeias de quitosana, gerando uma estrutura interpenetrante com as cadeias de PAAm devido à formação de bases de Schiff (JAIN; KUMAR, 2009; YAVAŞER; KARAGÖZLER, 2020).

Entretanto, Yavaşer & Karagözler (2020) sintetizaram com sucesso criogéis de poliacrilamida e quitosana reticulada com GA, sendo eles caracterizados como amarelados, esponjosos, elásticos, opacos e com baixa resistência ao fluxo convectivo. Essas diferenças podem ser explicadas pela variação da quantidade de reagentes, pelo tipo de quitosana empregada e pela temperatura de congelamento utilizada pelos autores, as quais diferem das condições usadas nesse trabalho. Dessa forma, com o objetivo de verificar o efeito do tipo de quitosana nas características dos criogéis, decidiu-se utilizar a quitosana de baixa massa molecular, a qual é a utilizada por Yavaşer & Karagözler (2020) para a síntese de criogéis (ver tópico 4.1.2).

4.1.1.2. Criogéis sintetizados com AGE

Os criogéis sintetizados com AGE (PAAm-CS-AGE) foram obtidos e aqueles com concentrações de 2 e 3% v/v de AGE são mostrados nas Figuras 19a e 19b, respectivamente. Ambas as composições utilizadas forneceram criogéis de características semelhantes aos criogéis de PAAm-CS, sendo eles: homogêneos, elásticos, permeáveis por gravidade, brancos e esponjosos.

Figura 19 – Criogel monolítico de: a) PAAM-CS-AGE(200); b) PAAm-CS-AGE(300)



Fonte: Autor (2021)

Após análise de permeabilidade, os criogéis mostraram-se permeáveis a vazões de até $3,0 \text{ mL min}^{-1}$ (velocidade superficial 229 cm h^{-1}), sendo esse valor menor que o valor obtido para o criogel de PAAm-CS. Embora ainda sejam suficientemente permeáveis para aplicações relacionadas à purificação de biomoléculas, pode-se inferir que o uso do agente de funcionalização AGE pode ter sido um dos responsáveis para a redução da permeabilidade dos monolitos.

Tanto a composição do criogel de PAAm-CS quanto as composições testadas para o criogel de PAAm-CS-AGE mostraram-se viáveis para a aplicação como fase estacionária em cromatografia. Entretanto, a presença de grupos epóxi disponíveis para a imobilização de ligantes na estrutura dos criogéis com AGE, torna-os mais vantajosos em comparação aos criogéis de apenas quitosana e poliacrilamida, visto que ainda é necessário realizar mais uma etapa para a ativação do criogel de PAAm-CS, a qual será explorada no tópico 4.1.1.3.

4.1.1.3. Ativação do criogel de PAAm-CS com ECH

Com o objetivo de se comparar as rotas de adição de grupos epóxi para a imobilização de ligantes, o criogel de PAAm-CS foi ativado com epícloridrina (ECH), conforme o procedimento descrito no tópico 3.2.2.2, e o criogel resultante foi denominado de PAAm-CS-ECH.

Após o procedimento, o criogel foi caracterizado como rígido e quebradiço, evidenciado pela perda da estrutura esponjosa do criogel padrão de PAAm-CS. A permeabilidade do criogel de PAAm-CS-ECH foi verificada em cromatógrafo de baixa pressão, e a vazão máxima suportada foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (velocidade superficial de 77 cm h^{-1}), a qual é consideravelmente inferior à vazão suportada pelos criogéis de PAAm-CS e PAAm-CS-AGE sintetizados previamente. Devido à rigidez e facilidade de

ruptura (fratura), caminhos preferenciais poderiam ter sido formados durante o procedimento de empacotamento do criogel em coluna cromatográfica, o que pode ocasionar em transferência de massa reduzida em ensaios de adsorção.

A utilização de ECH para a ativação da estrutura do monolito é baseada na reação entre os grupos hidroxila ou amins primárias das cadeias de quitosana e o carbono halogenado presente na ECH, disponibilizando grupos epóxi na superfície do criogel para futura imobilização de ligantes (HERMANSON, 2008; MARCUZ *et al.*, 2021).

De acordo com Dragan *et al.* (2012), é possível que tenha ocorrido o *crosslink* das cadeias de quitosana com epícloridrina. Ambos os grupos funcionais da ECH podem reagir com os grupos amino da quitosana, interconectando as cadeias desse polissacarídeo (DRAGAN *et al.*, 2012). Ademais, os grupos amida das cadeias de poli(acrilamida) podem ser parcialmente hidrolisados devido à alta basicidade do meio reacional, ocorrendo a formação de carboxilas (BORLING *et al.*, 1994). Nesse caso, além da ativação da estrutura, o monolito resultante possuiria cadeias poliméricas negativamente carregadas (acrilamida e ácido acrílico) e positivamente carregadas (quitosana) que se interpenetram, sendo uma possível explicação para a alteração significativa dos aspectos físicos do criogel.

Assim, o criogel de PAAm-CS-ECH foi considerado impróprio para a aplicação como fase estacionária em cromatografia. Comparativamente, o uso do AGE durante o processo de síntese proporcionou o preparo de criogéis com características visuais e aspectos mais adequados. Com isso, os criogéis de PAAm-CS-AGE(200) e PAAm-CS-AGE(300) foram utilizados em experimentos posteriores.

4.1.2. Estudo da variação da composição em criogéis sintetizados com solução de CS_{LM}

Para verificar o efeito do tipo de quitosana empregada na síntese de criogéis monolíticos, utilizou-se a quitosana de baixa massa molecular (CS_{LM}). De acordo com o fornecedor (Sigma-Aldrich), a CS_{LM} possui grau de desacetilação entre 75 e 85%, além de massa molecular variável de 50 a 190 kDa e viscosidade de 20 a 300 cP (1% m/v quitosana em 1% v/v ácido acético).

O procedimento empregado para a síntese está descrito no tópico 3.2.2 e as composições de AGE e GA utilizadas estão apresentadas na Tabela 2. Os criogéis contendo poli(acrilamida e quitosana foram sintetizados por 4 rotas diferentes: a) sem GA e sem AGE; b) com apenas GA (10, 20 e 40 μL); c) com apenas AGE (200 e 300 μL) e d) com a adição de ambos os reagentes simultaneamente, variando-se o volume de AGE (200 e 300 μL) enquanto que o volume de GA foi fixado em 20 μL .

Primeiramente, o criogel sem GA e sem AGE foi preparado, o qual foi denominado PAAm-CS_{LM} (Figura 20). Esse criogel foi visualmente caracterizado como homogêneo, permeável por gravidade, esponjoso, branco e capaz de retornar rapidamente à sua forma original quando comprimido e sequencialmente submerso em água. Quando comparado ao criogel sintetizado com a solução de CS, o criogel de PAAm-CS_{LM} foi considerado mais resistente à compressão manual. Além disso, o criogel foi capaz de suportar vazões de até 6,0 mL min⁻¹ (velocidade superficial de 458 cm h⁻¹) em cromatógrafo de baixa pressão.

Figura 20 - Criogel monolítico de poli(acrilamida e quitosana de baixa massa molecular (PAAm-CS_{LM})



Fonte: Autor (2021)

Em seguida, criogéis com diferentes quantidades de GA (10, 20 ou 40 μL) em suas composições foram sintetizados. Os três tipos de criogéis obtidos foram caracterizados como homogêneos, permeáveis, esponjosos e amarelados (Figura 21). Esses aspectos foram também observados para os criogéis sintetizados por Yavaşer & Karagözler (2020) e Jain *et al.* (2015), os quais também continham cadeias de quitosana reticuladas com GA. Esse resultado indica que o tipo de solução de quitosana empregado tem influência nas características finais do criogel, visto que todos os criogéis de PAAm-CS-GA mostraram-se inadequados para uso como fase estacionária em cromatografia.

Figura 21 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CS_{LM}-GA(10); b) PAAm-CS_{LM}-GA(20); e c) PAAm-CS_{LM}-GA(40)



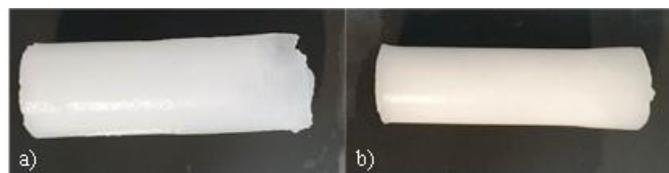
Fonte: Autor (2021)

Diferenças macroscópicas não foram observadas entre os criogéis preparados com 10 e 20 μL de GA (Figura 21a e 21b), sendo estes resistentes à compressão manual e capazes de retornar rapidamente à sua forma original na presença de água. Enquanto que o criogel sintetizado com 40 μL de GA (Figura 21c) foi o mais quebradiço dentre eles, fragmentando-se com maior facilidade quando comprimidos manualmente. De acordo com Jain *et al.* (2015), criogéis de CS reticulada com GA são caracterizados como frágeis. Apesar disso, a presença de cadeias esponjosas de outros polímeros (como a PAAm) é capaz de superar o efeito da instabilidade mecânica e fragilidade proporcionado pela CS reticulada. Assim, a maior quantidade de GA pode ter contribuído para a formação de um criogel no qual as características das cadeias de quitosana são mais evidentes devido à um maior grau de reticulação.

Testes de permeabilidade com os criogéis de PAAm-CS_{LM}-GA(10) e PAAm-CS_{LM}-GA(20) mostraram que, apesar da reticulação das cadeias de quitosana, a estrutura continuou permeável a vazões de até 6,0 mL min^{-1} em cromatógrafo de baixa pressão, assim como o criogel de apenas PAAm-CS_{LM}.

O efeito da presença de AGE na síntese do criogel foi, então, estudado com a adição de 200 ou 300 μL de AGE à mistura reacional. De acordo com a observação dos criogéis obtidos, ambos foram considerados esponjosos, elásticos, brancos e homogêneos (Figura 22a e 22b), não havendo diferenças macroscópicas entre os criogéis preparados. Após ensaios de compressão manual, constatou-se que ambos suportaram a compressão realizada e foram capazes de retornar rapidamente à sua forma inicial sem o aparecimento de deformações macroscópicas permanentes.

Figura 22 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CS_{LM}-AGE(200); e b) PAAm-CS_{LM}-AGE(300)



Fonte: Autor (2021)

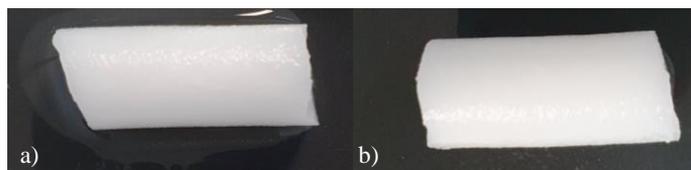
A permeabilidade dos criogéis foi testada e os resultados mostraram que os criogéis suportaram vazões de até $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ em cromatógrafo de baixa pressão, diferenciando-os dos criogéis de PAAm-CS-AGE, os quais foram permeáveis a vazões de até $3,0 \text{ mL min}^{-1}$. Conclui-se que o tipo de solução de quitosana empregado na síntese pode influenciar na estrutura do material e em sua permeabilidade quando o AGE está presente

Por último, preparou-se criogéis com a adição concomitante de GA e AGE. Com base nos resultados anteriores, manteve-se constante o volume de GA ($20 \mu\text{L}$) e utilizou-se volumes de AGE de 200 e $300 \mu\text{L}$, e os criogéis foram denominados de PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(200) e PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(300).

A escolha do volume de GA foi relacionada ao fato de que, dentre os criogéis sintetizados que continham GA, o volume de $40 \mu\text{L}$ mostrou-se inadequado devido a indícios de fragilidade e aspecto quebradiço. Enquanto que, como não foram observadas diferenças macroscópicas entre os criogéis sintetizados com 10 e $20 \mu\text{L}$ de GA, preferiu-se a composição de $20 \mu\text{L}$, visto que é relatado que quantidades maiores de agentes de reticulação da quitosana resultam em um material com poros menores, conseqüentemente, o monolito possuiria maior área superficial disponível para a imobilização de ligantes e adsorção de solutos (MARTÍNEZ-MEJÍA *et al.*, 2019; STEFANOV *et al.*, 2017).

A Figura 23 mostra os criogéis sintetizados nessa etapa. Eles foram caracterizados como homogêneos, brancos, elásticos, esponjosos e permeáveis por gravidade.

Figura 23 - Criogel monolítico de: a) PAAm-CSLM-GA(20)-AGE(200); e b) PAAm-CSLM-GA(20)-AGE(300)



Fonte: Autor (2021)

Ensaio de permeabilidade em cromatógrafo de baixa pressão mostraram que os criogéis suportam vazões de até $6,0 \text{ mL min}^{-1}$, característica compartilhada com todos os monolitos sintetizados com a solução de quitosana de baixa massa molecular. Além disso, os criogéis com ambos os reagentes foram considerados mecanicamente mais resistentes que os criogéis sintetizados com apenas AGE. Devido a essas características, eles foram selecionados para etapas posteriores.

4.1.3. Estudo da variação da composição em criogéis sintetizados com solução de CS_{LM6}

Com o objetivo de verificar o efeito do pH da solução de quitosana durante a síntese, a solução de quitosana de baixa massa molecular foi preparada e o valor de seu pH foi ajustado para 5 ~ 6. Esse teste foi realizado com base no trabalho de Dragan *et al.* (2012), o qual relata que o aumento do pH da solução de quitosana impacta positivamente nas características mecânicas, morfológicas e químicas do criogel de poliacrilamida e quitosana.

Seguindo o procedimento do tópico 3.2.2, foram sintetizados três criogéis distintos utilizando a solução de CS_{LM6} , os quais são mostrados pela Figura 24.

Figura 24 - Criogel monolítico de: a) PAAm- CS_{LM6} ; b) PAAm- CS_{LM6} -GA(20); e c) PAAm- CS_{LM6} -AGE(200)



Fonte: Autor (2021)

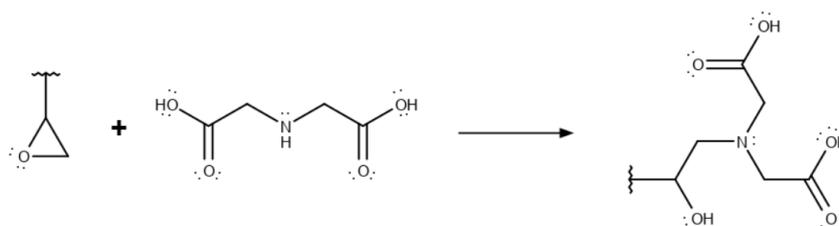
Os criogéis de composições PAAm-CS_{LM6} e PAAm-CS_{LM6}-GA(20) foram caracterizados como homogêneos, rígidos, quebradiços, não esponjosos e fragmentaram quando comprimidos manualmente. O criogel de PAAm-CS_{LM6}-AGE(200) foi incapaz de retornar à sua forma original após contato com água, além de ser flácido e heterogêneo. Devido às características observadas, todas as composições foram consideradas inadequadas para a aplicação como fase estacionária em cromatografia.

As distinções entre as características dos criogéis preparados neste trabalho e por Dragan *et al.* (2012) podem estar relacionadas a diferenças em materiais e procedimentos utilizados durante a síntese, os quais afetam intensamente as características físicas de criogéis monolíticos, como a concentração inicial de monômeros e quitosana, temperatura e tempo de congelamento e concentração de iniciador e catalisador (LOZINSKY; ZUBOV; TITOVA, 1997; ERTÜRK; MATTIASSON, 2014). Dessa forma, os criogéis sintetizados com a solução de quitosana com um valor de pH entre 5 e 6 não foram utilizados em experimentos posteriores.

4.2. IMOBILIZAÇÃO DO AGENTE QUELANTE IDA E QUANTIFICAÇÃO DE Cu^{2+} E Ni^{2+} QUELATADOS PELOS CRIOGÉIS

O IDA foi covalentemente imobilizado à matriz sólida por meio da reação entre sua amina secundária e os grupos epóxi na estrutura do monolito, disponibilizados pelo AGE, originando um grupo álcool secundário e um grupo amino terciário (Figura 25). A reação de abertura do anel é facilitada sob condições básicas. Especificamente sobre a reação com ligantes que possuem grupo amino, é necessário que o valor de pH do meio esteja entre 9 e 11 (HERMANSON, 2008).

Figura 25 - Reação entre os grupos epóxi do AGE e o IDA em meio básico



Fonte: Autor (2021)

Os monolitos selecionados por possuírem as melhores características visuais passaram pelo processo de imobilização do agente quelante IDA, conforme o tópico 3.2.2.3.

Após a imobilização, os criogéis contendo IDA foram descritos como opacos, elásticos, homogêneos e esponjosos, sendo facilmente comprimidos e capazes de retornar rapidamente à sua forma original após contato com água. Observou-se que o acoplamento do ligante à estrutura dos monolitos não impactou em suas características macroscópicas.

Com o intuito de medir a densidade de ligantes imobilizados e a capacidade de formação de ligações de coordenação com íons metálicos de transição (Cu^{2+} e Ni^{2+}), soluções de sulfato de Cu^{2+} ou Ni^{2+} foram alimentadas à coluna cromatográfica, até a saturação do criogel, seguindo o procedimento descrito no tópico 3.2.3 na seção de materiais e métodos.

As cadeias de quitosana são reportadas na literatura por possuírem sítios de coordenação para íons metálicos devido à presença de grupos amino e hidroxila, sendo capazes de adsorver cátions de modo eficiente pelo par de elétrons livres presente no átomo de nitrogênio de seu grupo amino (MONTEIRO; AIROLDI, 1998; WU; TSENG; JUANG, 2001). Além disso, também é relatada a possibilidade de formação de complexos entre as cadeias laterais da poliacrilamida e íons metálicos (SOWWAN *et al.*, 2011; DİNÇER; MUSTAFAEV; BAYÜLKEN, 1997). Dessa forma, para se determinar se a estrutura polimérica dos criogéis monolíticos contendo quitosana seria capaz de adsorver íons metálicos em sítios de interação além dos proporcionados pelo IDA, os criogéis de PAAm-CS e PAAm-CS_{LM}-GA(20) foram utilizados como padrões.

A Tabela 3 mostra o resultado da quantificação de íons Cu^{2+} e Ni^{2+} (μmol do íon metálico/g de criogel seco) eluídos dos criogéis com IDA imobilizado, dos criogéis controle e a diferença entre os valores obtidos, a qual indica a quantidade de íons metálicos que formaram quelatos com o IDA.

Tabela 3 - Quantificação de íons a) Cu^{2+} e b) Ni^{2+} eluídos de diferentes criogéis monolíticos de poliacrilamida e quitosana com IDA imobilizado, do respectivo criogel controle e a diferença da quantidade de íons Cu^{2+} e Ni^{2+} quelatados pelo IDA, em termos de massa de criogel seco e volume de criogel úmido.

a) Cu^{2+}

| Criogel | Cu^{2+} ($\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{g}$ de criogel seco) | | | Cu^{2+} ($\mu\text{mol Cu}^{2+}/\text{mL}$ de criogel) |
|---|--|--------------|----------------|--|
| | Total | Controle | IDA | |
| PAAm-CS-AGE(200)-IDA ^a | 285,89 ± 13,10 | 10,10 ± 0,06 | 275,79 ± 13,16 | 15,47 ± 0,74 |
| PAAm-CS-AGE(300)-IDA ^a | 340,46 ± 9,45 | 10,10 ± 0,06 | 330,36 ± 9,51 | 18,53 ± 0,53 |
| PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(200)-IDA ^b | 476,86 ± 17,54 | 4,20 ± 0,63 | 472,66 ± 16,90 | 27,81 ± 0,99 |
| PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(300)-IDA ^b | 526,20 ± 6,26 | 4,20 ± 0,63 | 522,00 ± 6,89 | 30,71 ± 0,41 |

b) Ni^{2+}

| Criogel | Ni^{2+} ($\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{g}$ de criogel seco) | | | Ni^{2+} ($\mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{mL}$ de criogel) |
|---|--|-------------|--------------|--|
| | Total | Controle | IDA | |
| PAAm-CS-AGE(200)-IDA ^a | 38,50 ± 0,18 | 4,49 ± 0,27 | 33,99 ± 0,36 | 1,91 ± 0,02 |
| PAAm-CS-AGE(300)-IDA ^a | 44,68 ± 1,90 | 4,49 ± 0,27 | 40,17 ± 1,78 | 2,25 ± 0,10 |
| PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(200)-IDA ^b | 35,75 ± 0,74 | 2,01 ± 0,20 | 33,71 ± 0,45 | 1,98 ± 0,03 |
| PAAm-CS _{LM} -GA(20)-AGE(300)-IDA ^b | 43,91 ± 1,30 | 2,01 ± 0,20 | 41,87 ± 0,57 | 2,46 ± 0,03 |

Controle: a: Criogel de PAAm-CS; b: Criogel de PAAm-CS-GA(20)

Fonte: Autor (2021)

De acordo com os resultados obtidos, todos os criogéis sem IDA (controle) interagiram com os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} nas condições estudadas. A quantidade de íons metálicos quelatados pelo IDA foi dependente da quantidade de AGE empregada durante a síntese, da presença de GA e do tipo de íon metálico utilizado.

O aumento da concentração de AGE, de 2 para 3% v/v (aumento de 50% no volume de AGE), proporcionou um acréscimo de aproximadamente 20% da capacidade de quelação dos íons Cu^{2+} e Ni^{2+} . Como a capacidade de adsorção de íons metálicos não cresceu na mesma proporção do aumento do volume de AGE adicionado durante a síntese, foi preferível utilizar as composições de criogel com 200 μL de AGE.

Comparando a quantidade de íons metálicos que interagiram com a matriz nos criogéis padrão, percebe-se que os criogéis com GA interagiram menos com os íons metálicos. Uma provável causa para esse fato é o bloqueio dos grupos amino da quitosana quando a reticulação com GA é realizada, indisponibilizando o par de elétrons

livre do nitrogênio para a realização de ligações de coordenação com os íons Cu^{2+} e Ni^{2+} .

Apesar disso, a quantidade de íons metálicos que interagiram com os criogéis controle é pequena em comparação com a quantidade quelatada pelo IDA. Possivelmente isso ocorreu devido às cadeias de quitosana estarem parcialmente protonadas nas condições de quelação dos íons Cu^{2+} e Ni^{2+} , visto que as soluções de sulfato de Cu^{2+} e Ni^{2+} são levemente ácidas. Ademais, a carga positiva das cadeias de quitosana protonada também causaria repulsão dos cátions metálicos, diminuindo a adsorção dos mesmos pela matriz sólida (ANTHONSEN; SMIDSRØD, 1995).

Simultaneamente, espera-se que a reticulação com GA interfira na estrutura microscópica do criogel, gerando poros menores e, conseqüentemente, disponibilizando uma área superficial maior para a imobilização do IDA, explicando os maiores valores de íons metálicos quelatados pelos criogéis sintetizados com GA.

A quantidade de íons metálicos quelatada nos criogéis com IDA também foi dependente do íon metálico utilizado. É observado que mais íons Cu^{2+} foram quelatados pela matriz que íons Ni^{2+} . De acordo com Irving & Williams (1953), a estabilidade de complexos de metais de transição bivalentes segue a ordem: $\text{Mn} < \text{Fe} < \text{Co} < \text{Ni} < \text{Cu} > \text{Zn}$, a qual é independente da natureza do agente quelante. Dessa forma, pode-se dizer que as diferenças notadas na Tabela 3 estão relacionadas à formação de complexos IDA- Cu^{2+} mais estáveis que complexos IDA- Ni^{2+} . As constantes de estabilidade desses complexos são reportadas na literatura e possuem valores iguais a 10,52 (NAKAGAWA; WADA; HAYAKAWA, 1975) e 8,26 (COOMBS; MARGERUM; NIGAM, 1970), ambos em escala logarítmica em base 10, para os complexos de IDA- Cu^{2+} e IDA- Ni^{2+} , respectivamente. Devido à alta estabilidade de complexos de coordenação contendo íons Cu^{2+} como átomo central e estequiometria 1:1 de íons Cu^{2+} e o agente quelante IDA, alguns autores determinam indiretamente a densidade de IDA imobilizado em matrizes sólidas por meio da quantificação de íons Cu^{2+} adsorvidos após a saturação da fase estacionária com solução de sulfato de cobre (ARVIDSSON *et al.*, 2003).

A respeito dos resultados encontrados para a quantificação de íons metálicos quelatados, trabalhos com criogéis monolíticos (ARVIDSSON *et al.*, 2003; DAINIAK *et al.*, 2005; DAINIAK *et al.*, 2004; CHEEKS *et al.*, 2009; BIBI *et al.*, 2013) com IDA

covalentemente acoplado à matriz sólida obtiveram valores similares aos apresentados na Tabela 3.

Arvidsson *et al.* (2003) imobilizaram IDA em criogel de PAAm-AGE para a utilização como fase estacionária em IMAC para purificação de enzimas e obtiveram o valor de densidade de ligante de 745 μmol de IDA/g de criogel seco (23,3 μmol de IDA/mL de criogel). Dainiak *et al.* (2005) utilizaram um criogel monolítico de PAAm-AGE com IDA imobilizado para cromatografia celular, o criogel apresentou densidade de ligantes de apenas 2 μmol de IDA/mL de criogel. Em outro trabalho, Dainiak *et al.* (2004) imobilizaram IDA em criogéis de PAAm-AGE em forma de discos, obtendo uma densidade de ligantes igual a 22 μmol de IDA/mL de criogel, os quais foram utilizados para purificação de fragmentos de anticorpos a partir do sobrenadante de cultura celular de *E. coli* recombinante. Criogéis produzidos pela copolimerização de ácido metacrílico e glicidil metacrilato foram caracterizados por possuir 770 μmol de IDA/g de criogel seco após a imobilização do agente quelante por meio de grupos epóxi disponibilizados pelo glicidil metacrilato (BIBI *et al.*, 2013). Cheeks *et al.* (2009) sintetizaram criogel de PAAm-AGE e imobilizaram IDA covalentemente à estrutura do material, a capacidade de quelação encontrada para o íon Cu^{2+} foi de 16,7 μmol de Cu^{2+} /mL de criogel.

De acordo com a literatura consultada, a densidade de ligantes/capacidade de quelação de íons metálicos dos criogéis preparados neste trabalho está na mesma ordem de grandeza que os valores obtidos por outros autores para criogéis com aplicação em IMAC, entretanto, os valores obtidos foram menores na maioria das comparações. Essa distinção pode ser explicada pela diferença de concentração de monômeros e condições de síntese, as quais podem impactar na estrutura e composição do criogel e, conseqüentemente, na disponibilidade de grupos ativáveis para a imobilização de ligantes.

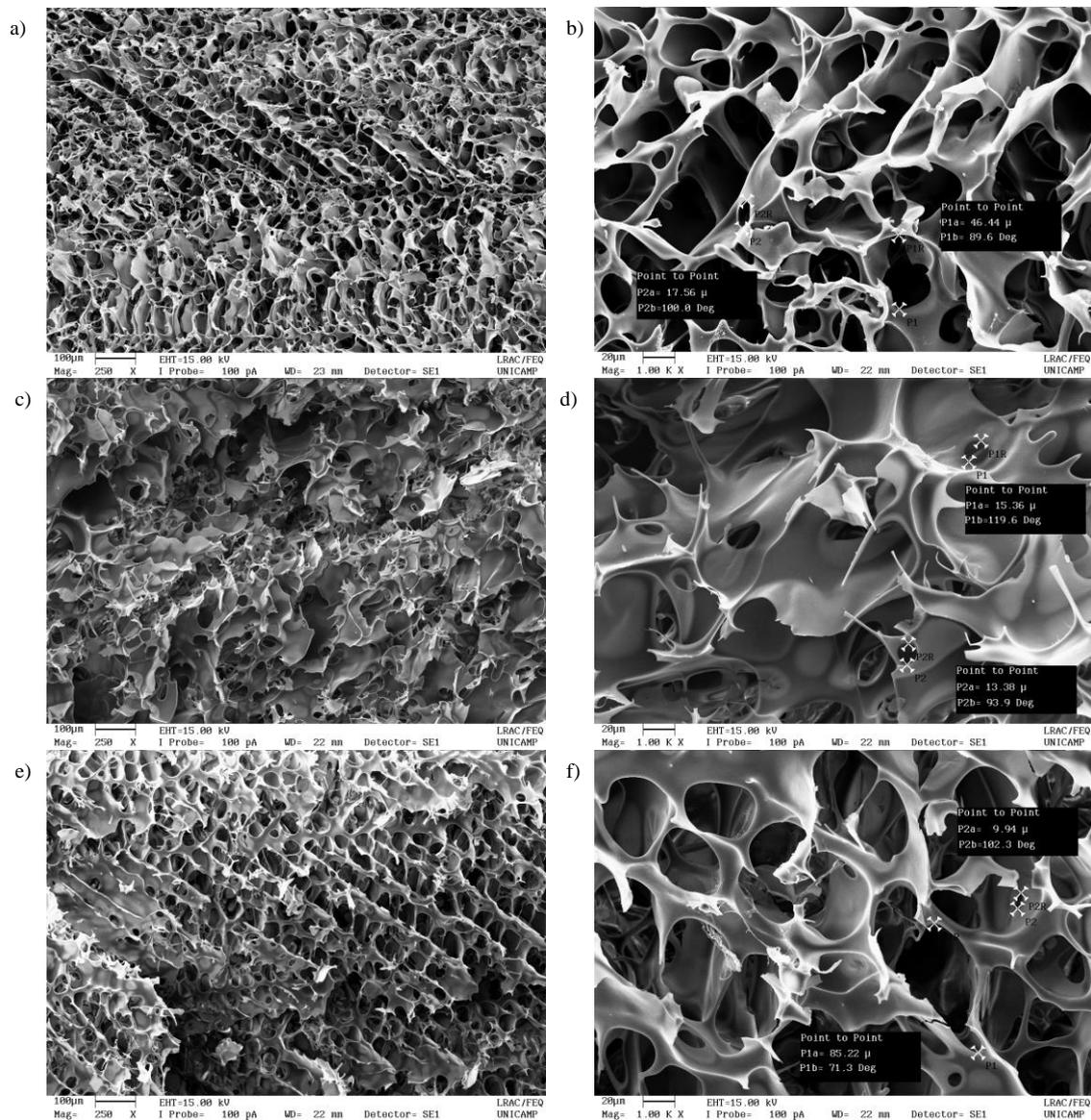
Dessa forma, a composição que se mostrou mais adequada para a utilização em ensaios subsequentes foi a do criogel de PAAm-CS_{LM}-GA(20)-AGE(200)-IDA, visto que a adição de maior quantidade de AGE proporcionou resultados similares em termos de quelação de íons metálicos, e os criogéis sem GA em sua composição possuíram menor capacidade de quelação de íons metálicos e menor permeabilidade. O criogel selecionado foi denominado de PAAm-CS-GA-AGE-IDA e os criogéis controle utilizados em experimentos futuros foram chamados de PAAm-CS e PAAm-CS-GA.

4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A estrutura macroporosa e interconectada, a qual é característica para criogéis monolíticos foi observada por análise de MEV e apresentados nas Figuras 26, 27 e 28, para os criogéis de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA, respectivamente.

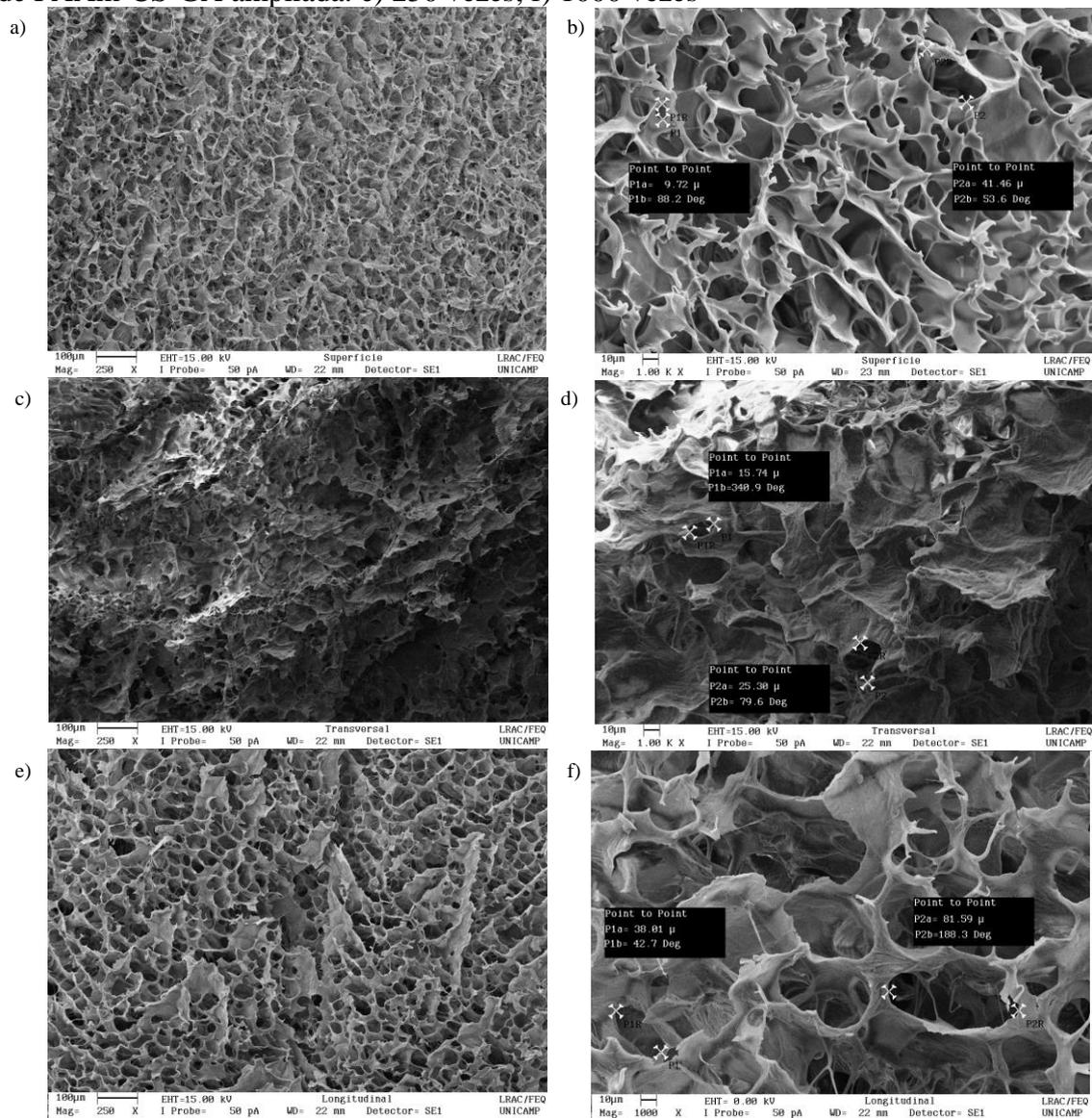
Os criogéis de PAAm-CS (Figura 26) apresentaram macroporos interconectados e heterogêneos, o tamanho dos poros foi medido e variaram de 15 a 150 μm . Estruturas com essas mesmas características também foram observadas para os criogéis de PAAm-CS-GA (Figura 27) e PAAm-CS-GA-AGE-IDA (Figura 28). Entretanto, o tamanho dos poros para esses criogéis foi menor, variando de 10 a 100 μm . Esse resultado pode ser explicado pela presença do agente de reticulação GA, o qual é reportado por ser capaz de reduzir o tamanho dos poros de hidrogéis contendo quitosana (MARTÍNEZ-MEJÍA *et al.*, 2019).

Figura 26 - Imagens obtidas por MEV do criogel PAAm-CS. Superfície do criogel de PAAm-CS ampliada: a) 250 vezes; b) 1000 vezes; Seção transversal do criogel de PAAm-CS ampliada: c) 250 vezes; d) 1000 vezes; Seção longitudinal do criogel de PAAm-CS ampliada: e) 250 vezes; f) 1000 vezes



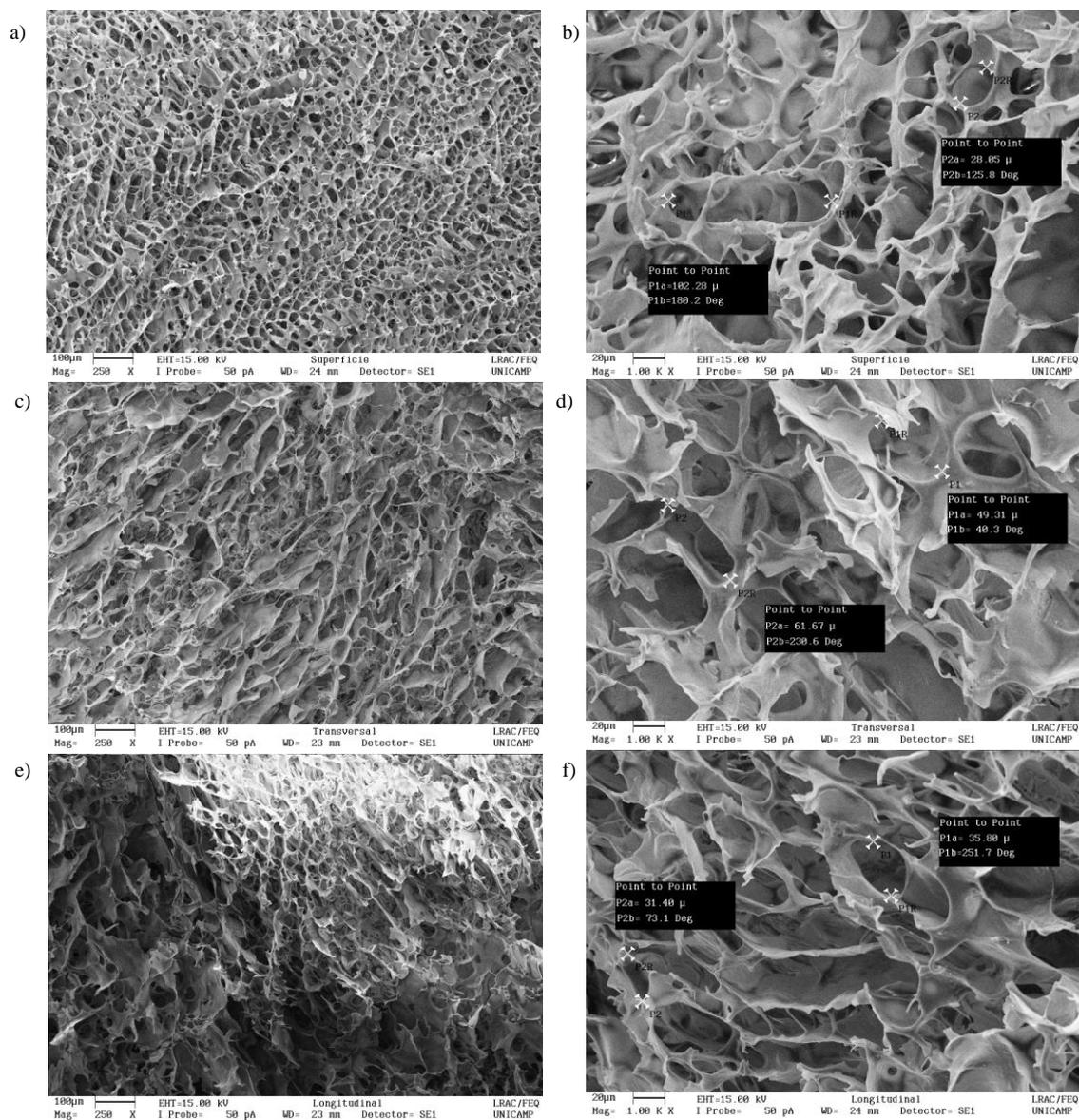
Fonte: Autor (2021)

Figura 27 - Imagens obtidas por MEV do criogel PAAm-CS-GA. Superfície do criogel de PAAm-CS-GA ampliada: a) 250 vezes; b) 1000 vezes; Seção transversal do criogel de PAAm-CS-GA ampliada: c) 250 vezes; d) 1000 vezes; Seção longitudinal do criogel de PAAm-CS-GA ampliada: e) 250 vezes; f) 1000 vezes



Fonte: Autor (2021)

Figura 28 - Imagens obtidas por MEV do criogel PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Superfície do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA ampliada: a) 250 vezes; b) 1000 vezes; Seção transversal do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA ampliada: c) 250 vezes; d) 1000 vezes; Seção longitudinal do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA ampliada: e) 250 vezes; f) 1000 vezes



Fonte: Autor (2021)

O tamanho dos poros dos criogéis preparados são comparáveis aos resultados da literatura para criogéis constituídos de poliacrilamida e quitosana por diversos autores: Jain & Kumar (2009) obtiveram criogéis com poros que variam de 1 a 100 µm; Dragan *et al.* (2012) reportaram criogéis de poliacrilamida e quitosana com poros de tamanho médio de 67 ± 3 µm e, quando reticulado com ECH, o tamanho médio dos poros diminuiu para 34 ± 5 µm. Além disso, os autores analisaram como a massa molecular da

quitosana influencia na espessura das paredes do criogel, indicando que a espessura aumenta com a massa molecular. Yavaşer & Karagözler (2020) prepararam criogéis com diâmetros de poro variando de 200 a 300 μm , os quais foram maiores que o medidos para os criogéis sintetizados neste trabalho.

As diferenças observadas entre os materiais pode ser explicada pelas diferentes concentrações de monômeros e agentes de reticulação empregados, além das condições de polimerização, como a temperatura e taxa de resfriamento, as quais afetam diretamente a cristalização e o tamanho dos cristais de solvente (LOZINSKY, 2002; LOZINSKY, 2008).

Observa-se que, visando a aplicação do suporte sólido em IMAC, poros grandes são vantajosos devido à diminuição de efeitos difusivos e facilidade de acessibilidade das biomoléculas aos ligantes imobilizados nos poros do criogel. A análise por MEV mostrou que o uso do GA e do IDA não obstruiu os poros ou alterou intensamente a estrutura do monolito, sendo possível o emprego desses reagentes para a síntese de criogéis que visam a aplicação em ensaios cromatográficos.

4.4. CARACTERIZAÇÕES FÍSICAS

Os criogéis de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA foram avaliados quanto a aspectos físicos. Primeiramente, foi determinada a capacidade de intumescimento de cada um deles por meio da Eq. 3.2.

Os resultados são apresentados na Tabela 4 em conjunto com valores de absorção de água para os criogéis de poliacrilamida e quitosana descritos por Yavaşer & Karagözler (2020) e Jain & Kumar (2009), e criogéis de poliacrilamida e alginato reportados por Marcuz *et al.* (2021) e Fioravante (2021). A capacidade de intumescimento obtida para criogel de PAAm-CS foi igual a $20,08 \pm 0,90$ g de $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ de criogel seco e a maior dentre os criogéis sintetizados neste trabalho, o valor pode ser explicado pela falta de agentes de reticulação ou funcionalização e pelos poros maiores visualizados na análise por MEV. O criogel de PAAm-CS-GA apresentou menor capacidade de intumescimento, sendo igual a $14,31 \pm 0,95$ g de $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ de criogel seco, esse valor pode estar relacionado à presença do GA na estrutura do material, o qual reticula covalentemente as estruturas de quitosana pelos grupos amino. O criogel de

PAAm-CS-GA-AGE-IDA possui capacidade de intumescimento de $18,07 \pm 0,15$ g de H_2O/g de criogel seco. Carvalho *et al.* (2014) relataram que a capacidade de intumescimento diminui com o aumento da quantidade de grupos epóxi na estrutura do criogel. Além disso, a presença do AGE em criogéis de poliacrilamida promove aumento da resistência do material, entretanto, a capacidade de intumescimento do material tende a diminuir (ARVIDSSON *et al.*, 2003). Simultaneamente, ácidos carboxílicos, disponibilizados pelo IDA, possuem alta hidrofiliabilidade e podem ser responsáveis pela capacidade de intumescimento intermediária obtida (DRAGAN *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Capacidade de intumescimento de criogéis de poliacrilamida e quitosana ou poliacrilamida e alginato derivatizados.

| Criogel | Capacidade de intumescimento (gH₂O/g criogel seco) | Referência |
|---------------------------------|--|-----------------------------|
| PAAm-CS | $20,08 \pm 0,90$ | Este trabalho |
| PAAm-CS-GA | $14,31 \pm 0,95$ | Este trabalho |
| PAAm-CS-GA-AGE-IDA | $18,07 \pm 0,15$ | Este trabalho |
| PAAm-CS-GA | $10,3 \pm 1,35$ | Yavaşer & Karagözler (2020) |
| PAAm-CS | 19,08 | Jain & Kumar (2009) |
| PAAm-Alg ^a -AGE-IDA | $16,89 \pm 0,87$ | Fioravante (2021) |
| PAAm-Alg-AGE-P-Tyr ^b | $14,29 \pm 0,06$ | Marcuz <i>et al.</i> (2021) |

a: Alginato; b: Orto-fosfo-tirosina

Fonte: Autor (2021)

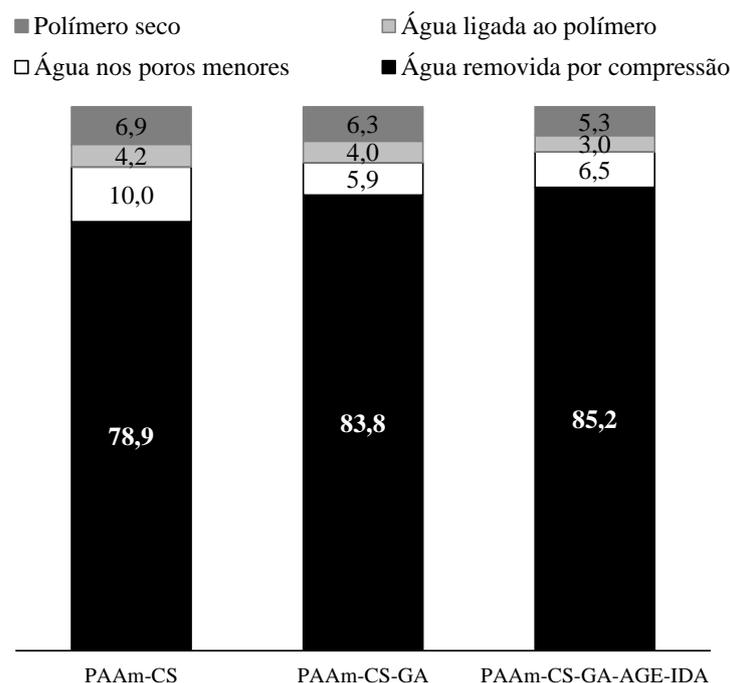
Neste trabalho, a capacidade de intumescimento é da mesma ordem de grandeza que criogéis reportados na literatura. As diferenças podem estar relacionadas à natureza e concentração de reagentes, razão entre monômeros, presença de agentes de reticulação e temperatura de congelamento (PLIEVA *et al.*, 2004; PLIEVA *et al.*, 2006).

A porosidade dos criogéis foi estimada por meio do uso da Eq. 3.3. Os valores obtidos foram de $(73,0 \pm 0,4)\%$, $(71,0 \pm 1,1)\%$ e $(71,6 \pm 2,9)\%$ para os criogéis de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA, respectivamente. Os valores obtidos são próximos a valores da literatura: Jain & Kumar (2009) reportaram a síntese de criogel de PAAm-CS com porosidade de aproximada de 89%. Marcuz *et al.* (2021) sintetizaram criogéis de PAAm-Alg-AGE-P-Tyr e PAAm-Alg-ECH-P-Tyr com porosidades aproximadas de 82,7 e 88,5%, respectivamente. Carvalho *et al.* (2014)

prepararam criogéis de PAAm com diferentes razões entre AAm e MBAm e estimaram porosidades de 71,2 a 88,3% para os monolitos. Mourão *et al.* (2019) apresentaram criogéis de PAAm-Alg com porosidade de 77%. De acordo com a literatura, os valores estimados neste trabalho são característicos para os criogéis monolíticos com porosidade mediana, proporcionando fluxo desimpedido para líquidos viscosos em ensaios cromatográficos para a purificação e separação de biomoléculas.

A capacidade do criogel de se ligar à água presente no ar foi quantificada para os criogéis de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA, e os valores calculados foram de $18,2 \pm 0,9$ mg H₂O/ g criogel seco, $10,6 \pm 0,8$ mg H₂O/ g criogel seco e $10,4 \pm 0,6$ mg H₂O/ g criogel seco. Por meio dos resultados de molhabilidade, foi possível determinar as composições mássicas dos criogéis úmidos, as quais estão apresentadas pela Figura 29.

Figura 29 - Composição mássica do criogel úmido de PAAm-CS, PAAm-CS-GA e PAAm-CS-GA-AGE-IDA, em percentagem



Fonte: Autor (2021)

Os valores obtidos para os três criogéis são comparáveis aos que são descritos na literatura por Plieva *et al.* (2004); Mourão *et al.* (2019) e Marcuz *et al.* (2021) para criogéis de PAAm, PAAm-Alg e PAAm-Alg-AGE. Plieva *et al.* (2004) reportaram que 88%, 6 – 7% e 5 – 6% da massa do criogel úmido de PAAm-AGE correspondem a água

em poros maiores, à água nos poros menores e à água ligada ao polímero, respectivamente. Marcuz (2019) obteve criogéis de PAAm-Alg-AGE, no qual 69% da massa representava água removida por compressão, 18% da massa correspondia a água nos poros menores, 7% da massa é a de água ligada ao polímero e 6% da massa total é atribuída ao material seco. Enquanto que Fioravante (2021) sintetizou criogel de PAAm-Alg-AGE-IDA e determinou que, quando úmido, 67% da massa do monolito é água removida por compressão, 18% é a água em poros menores, 9% da massa é a água ligada ao polímero e 6% é a massa de polímero seco.

4.4.1. Rendimento de monômeros em criogel de PAAm-CS-GA-AGE

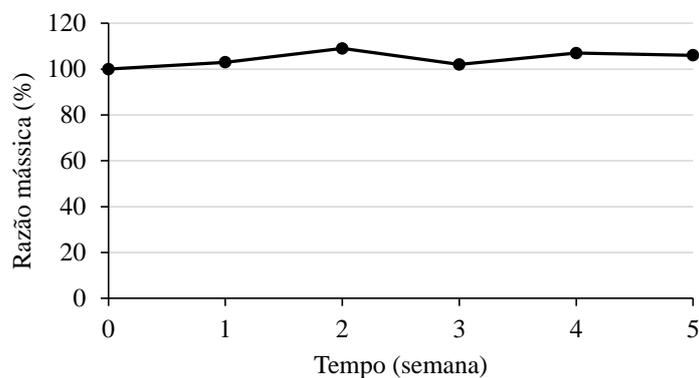
Criogéis recém-preparados de PAAm-CS-GA-AGE foram secos e pesados para a determinação do rendimento em relação aos monômeros utilizados durante a síntese por meio da Eq. 3.7. Considerando a massa de CS, AAm, MBAm, GA e AGE utilizados durante a síntese deveriam ser obtidos 0,844 g de criogel seco, caso o rendimento fosse de 100%. Entretanto, o rendimento de monômeros calculado foi de 58,06%, esse resultado pode ser explicado pelos reagentes e monômeros não terem sido totalmente incorporados à estrutura do monolito. No caso do AGE, a água de lavagem dos criogéis recém-sintetizados apresentava cheiro característico deste reagente, indicando a sua introdução parcial à estrutura dos criogéis

Dinu *et al.* (2018) reportam que criogéis compostos por 15% m/m de AAm e 2% m/m de CS possuíam maior rendimento de monômeros, chegando próximo a 90%. Dragan *et al.* (2012) chegaram em 95% de rendimento em criogéis de PAAm e discutem que razões maiores entre MBAm e AAm causam diminuição no rendimento de monômeros. Além disso, o trabalho relata diminuição no rendimento monomérico quando a CS também é adicionada à mistura reacional e, com isso, os autores realizaram a titulação da água de lavagem com polieletrólitos para a determinação da quantidade de CS não fixada ao criogel, indicando que diminuições de rendimento também podem ser ocasionadas devido à CS removida durante a etapa de lavagem.

4.4.2. Degradação *in vitro* de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA

As características relacionadas à degradação do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA foram determinadas conforme o procedimento descrito em 3.2.8.5 na seção de materiais e métodos. Com o objetivo de verificar se o criogel se degradaria em condições de armazenamento, a sua massa foi pesada semanalmente. Os resultados são apresentados pela Figura 30.

Figura 30 - Estudo da degradação *in vitro* do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em PBS a temperatura ambiente



Fonte: Autor (2021)

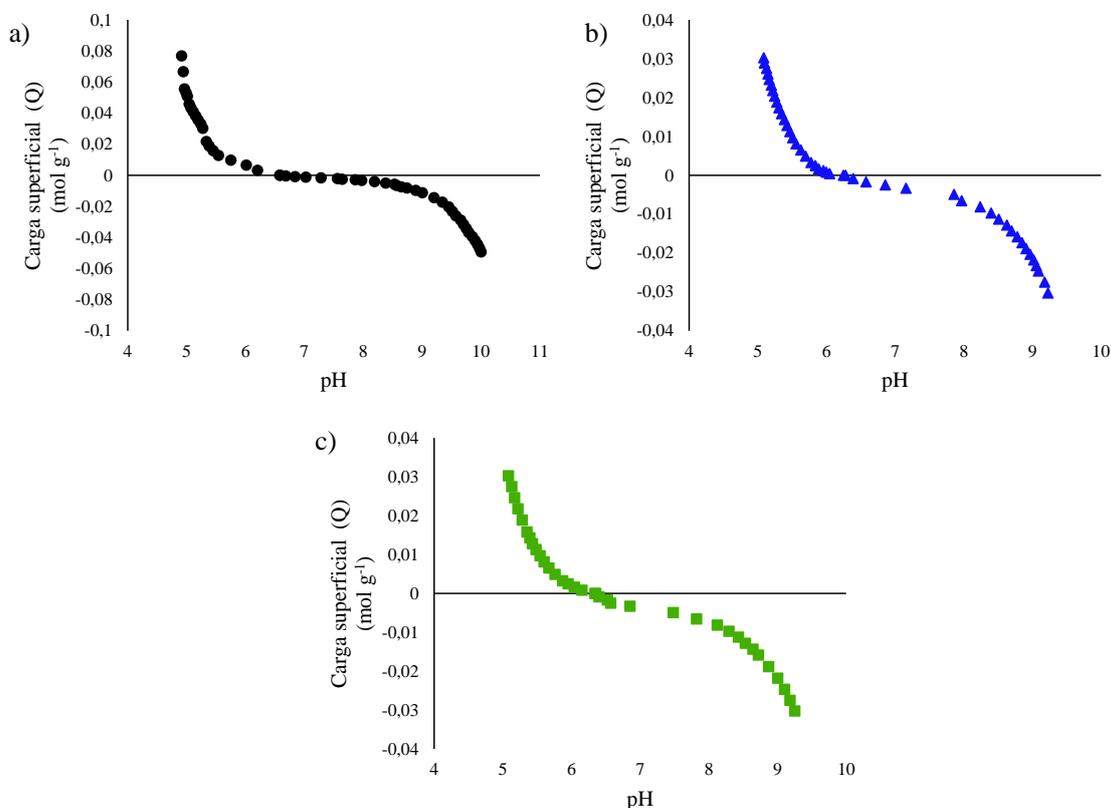
De acordo com o gráfico da Figura 30, a massa das amostras de criogéis continuou estável durante as 6 semanas analisadas. Ademais, não foram observadas fragmentações ou desprendimentos de pedaços do criogel nos tubos *Eppendorf* com as amostras. Possivelmente, a baixa degradabilidade do material é explicada pela reticulação das redes poliméricas de PAAm e CS, gerando cadeias interpenetrantes que se mantêm conectadas entre si.

Güven *et al.* (2020) e Kathuria *et al.* (2008) reportaram que criogéis com grupos facilmente hidrolisáveis são os mais propensos a serem degradados. Além disso, os autores observaram que a taxa de degradação diminuiu com a diminuição de grupos hidrolisáveis disponíveis em criogéis de CS e gelatina e em criogéis de poli(amido aminas). Apesar dos criogéis sintetizados previamente serem empregados em cultivo de células, a produção de monolitos estáveis em condições ambientes e em solução aquosa também é vantajoso para aplicações cromatográficas, as quais necessitam de materiais com alta estabilidade química e mecânica para o uso em vários ciclos de adsorção e dessorção (BAKHSHPUR *et al.*, 2019).

4.4.3. Determinação do ponto de carga zero do criogel

Com o objetivo de se determinar a densidade superficial de cargas no criogel em função do pH, foi realizado o procedimento descrito no tópico 3.2.8.7. O método é baseado nas reações ácido-base que ocorrem entre os grupos funcionais na superfície do material e os íons OH^- e H_3O^+ em solução. As curvas de titulação obtidas para os criogéis de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Cu^{2+} e PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} estão expostas nas Figuras 31a, 31b e 31c, respectivamente. Os pontos de carga zero estão na Tabela 5.

Figura 31 - Curvas de titulação dos criogéis: a) PAAm-CS-GA-AGE-IDA; b) PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Cu^{2+} ; e c) PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+}



Fonte: Autor (2021)

Tabela 5 - Valores de ponto de carga zero dos criogéis de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Cu^{2+} e PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+}

| Criogel | Ponto de carga nula |
|--------------------------------------|---------------------|
| PAAm-CS-GA-AGE-IDA | 6,58 |
| PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Cu^{2+} | 6,22 |
| PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} | 6,35 |

Fonte: Autor (2021)

De acordo com os resultados obtidos, o ponto no qual a densidade de cargas é nula para os criogéis foi alterado na presença dos íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} . Apesar disso, todos os três monolitos encontram-se negativamente carregados em pH neutro. Os valores obtidos podem estar relacionados à presença de grupos amino e ácido carboxílico, gerando um material anfotérico.

Dragan *et al.* (2017) determinaram o ponto de carga zero para criogéis de CS e poli(vinil amina) com e sem Cr^{6+} imobilizado e chegaram no resultado de 5,5 e 4,9, respectivamente, sendo esses valores menores que os determinados para os criogéis de PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Akilbekova *et al.* (2018) obtiveram criogéis de CS e dialdeído dextrana (DDA) com ponto de carga nula próximo à neutralidade. Os autores discutem que a concentração de quitosana no criogel influencia diretamente no ponto isoelétrico do material.

4.5. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS COM hIgG PRÉ-PURIFICADA

Com a finalidade de avaliar a capacidade de adsorção de hIgG pré-purificada (Sigma-Aldrich) no criogel de PAAm-CS-GA (controle) e no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA com e sem íons metálicos imobilizados, experimentos cromatográficos em diferentes condições tamponantes foram realizados conforme o tópico 3.2.4 da seção de materiais e métodos. Os balanços de massa da adsorção da hIgG encontram-se no Apêndice A.

4.5.1. Adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA

A adsorção de hIgG no criogel controle foi avaliada em quatro condições tamponantes: MOPS, fosfato de sódio (NaP) e Tris-HCl a pH 7,0, e MES a pH 5,5. O uso desses tampões é comum em cromatografia de afinidade para a purificação de hIgG (VANÇAN; MIRANDA; BUENO, 2002; PAVAN *et al.*, 2017; MARCUZ *et al.*, 2021). A molaridade das soluções tampão foi mantida em 25 mmol L^{-1} , sendo possível avaliar o efeito da natureza do tampão e do pH na adsorção de hIgG pelo monolito.

A Tabela 6 mostra as quantidades de hIgG adsorvidas pelo criogel de PAAm-CS-GA nos sistemas tamponantes indicados. A proteína foi eluída com o respectivo tampão de adsorção acrescido de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl.

Tabela 6 – hIgG pré-purificada adsorvida em criogel de PAAM-CS-GA nos tampões MOPS, NaP e Tris-HCl a pH 7,0 e tampão MES a pH 5,5. Volume do leito: 3,0 mL. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL do tampão de adsorção.

| Tampão | pH | hIgG adsorvida | | mg hIgG/g de criogel seco |
|----------|-----|----------------|----------------|---------------------------|
| | | Massa (mg) | % ^a | |
| MOPS | 7,0 | 0,08 ± 0,00 | 4,18 | 0,45 |
| NaP | 7,0 | 0,02 ± 0,00 | 0,88 | 0,11 |
| Tris-HCl | 7,0 | 0,01 ± 0,00 | 0,43 | 0,06 |
| MES | 5,5 | 0,12 ± 0,01 | 5,60 | 0,68 |

a: massa de hIgG adsorvida dividida pela massa de hIgG alimentada x 100

Fonte: Autor (2021)

A matriz adsorveu, no máximo, 0,12 mg de hIgG quando o tampão MES a pH 5,5 foi utilizado, seguido de 0,08 mg adsorvidos ao utilizar MOPS a pH 7,0. Enquanto que 0,01 e 0,02 mg de hIgG foram adsorvidos quando o tampão empregado foi Tris-HCl e NaP, respectivamente. Especificamente sobre a condição avaliada com o tampão MES a pH 5,5, a CS encontra-se majoritariamente protonada em seus grupos amino, sendo uma possível explicação para a maior quantidade de hIgG adsorvida dentre as condições estudadas. Além disso, percebe-se que os tampões com carga líquida neutra proporcionaram maior adsorção de hIgG no criogel, provavelmente devido à natureza física das interações entre hIgG e a matriz sólida, pois os grupos funcionais presentes no criogel e nos resíduos de aminoácidos da hIgG não estão solvatados pelas moléculas do tampão, possibilitando maior aproximação e interação.

Observa-se, porém, que a percentagem de hIgG adsorvida foi pequena para todos os tampões, indicando que adsorções não específicas pela matriz de PAAM-CS-GA são desprezíveis nas condições estudadas, o que é desejável para ensaios cromatográficos.

4.5.2. Adsorção de hIgG em criogel de PAAM-CS-GA-AGE-IDA

A capacidade do criogel com o ligante IDA imobilizado (livre de íon metálico) foi avaliada, sendo esperado que a fase estacionária se comporte como trocador de cátions em condições próximas ao pH neutro, visto que as constantes de dissociação dos

prótons dos grupos carboxílicos do IDA possuem valores de 1,73 e 2,73 em IDA imobilizado covalentemente em matrizes sólidas (LUO *et al.*, 2001; BRESOLIN; BRESOLIN; BUENO, 2020).

A Tabela 7 apresenta as quantidades de hIgG adsorvida em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em diferentes tampões e valores de pH. A proteína foi eluída com o respectivo tampão de adsorção acrescido de 1,0 mol L⁻¹ de NaCl.

Tabela 7 - hIgG pré-purificada adsorvida em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA nos tampões MOPS, NaP e Tris-HCl a pH 7,0, tampão MOPS a pH 6,5 e tampão MES a pH 5,5. Volume do leito: 3,0 mL. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL do tampão de adsorção.

| Tampão | pH | hIgG adsorvida | | mg hIgG/g de criogel seco |
|----------|-----|----------------|----------------|---------------------------|
| | | Massa (mg) | % ^a | |
| MOPS | 7,0 | 1,37 ± 0,01 | 61,53 | 7,76 |
| NaP | 7,0 | 0,26 ± 0,03 | 10,05 | 1,47 |
| Tris-HCl | 7,0 | 0,87 ± 0,02 | 47,79 | 4,93 |
| MOPS | 6,5 | 2,56 ± 0,25 | 92,08 | 14,50 |
| MES | 5,5 | 1,90 ± 0,07 | 103,48 | 10,76 |

a: massa de hIgG adsorvida dividida pela massa de hIgG alimentada x 100

Fonte: Autor (2021)

De acordo com os resultados apresentados, moléculas de IDA imobilizadas na estrutura do criogel possibilitaram a adsorção de hIgG pela matriz em todas as condições estudadas.

A pH 7,0, o criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA encontra-se negativamente carregado. A hIgG utilizada nos experimentos é policlonal e possui uma faixa ampla de ponto isoelétrico (pI) (PRIN *et al.*, 1995). Distintos pIs podem justificar a adsorção intermediária de 61,53 e 47,49% da hIgG alimentada no monolito quando os tampões MOPS e Tris-HCl foram utilizados, respectivamente, visto que parte das moléculas de hIgG estão negativamente carregadas, sendo repelidas pela matriz. Enquanto que apenas 10,05% da hIgG foi adsorvida pelo monolito quando o tampão NaP (negativamente carregado) foi empregado, possivelmente indicando a solvatação das moléculas de hIgG positivamente carregadas e, conseqüentemente, reduzindo a sua aproximação aos grupos carboxílicos desprontoados do IDA.

Em tampão MOPS a pH 6,5 e em MES a pH 5,5, 92,08 e 103,48% da hIgG foi adsorvida, respectivamente, sendo esses valores maiores que os obtidos a pH 7,0. Isso

pode ser explicado pelos tampões serem zwitteriônicos, pelos diferentes pIs da hIgG e pela carga superficial total do monolito nas condições de pH avaliadas, as quais favoreceram a adsorção desta proteína.

Matrizes sólidas com IDA imobilizado foram estudadas em cromatografia de troca iônica por diversos autores: El Rassi & Horváth (1986) avaliaram o potencial do IDA covalentemente imobilizado em sílica em reter aminoácidos e proteínas em diferentes valores de pH e chegaram em resultados comparáveis a suportes com íons metálicos quelatados pelo IDA. Luo *et al.* (2001) sintetizaram monolitos macroporosos de poli(glicidil metacrilato-co-etileno dimetacrilato) com IDA e observaram que a separação e retenção de proteínas pela matriz é dependente dos pIs e do pH do meio. Bresolin, Bresolin & Bueno (2020) utilizaram membranas de poli(etileno vinil álcool) com IDA imobilizado para a avaliação da adsorção de anticorpos monoclonais e obtiveram valor de pureza de 94,2%. Fan *et al.* (2021) produziram membranas de poli(tereftalato de butileno) (PBT) modificadas com poli(glicidil metacrilato) e IDA com o intuito de estudar a adsorção de hIgG, os autores reportaram valores altos de pureza e capacidade dinâmica de adsorção para este material, os quais eram dependentes da densidade superficial de grupos ácido carboxílico.

4.5.3. Adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Me²⁺

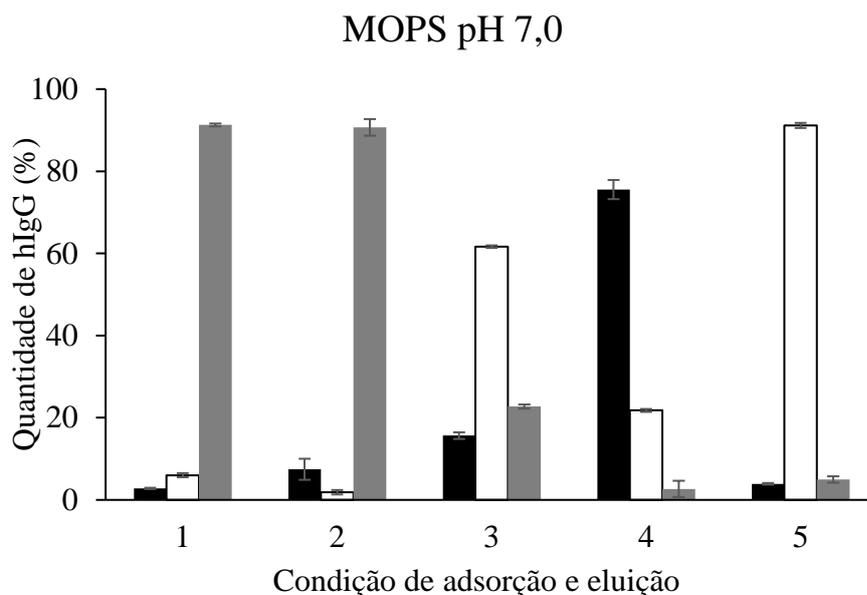
4.5.3.1. PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺

Para a análise de adsorção de hIgG no criogel com íons metálicos imobilizados, solução de sulfato de cobre foi percolada no criogel até a saturação para a formação de complexos de coordenação IDA-Cu²⁺.

Conforme o tópico 3.2.4.2, foram testados os tampões de adsorção MOPS, NaP e Tris-HCl a pH 7,0, e MOPS a pH 6,5 acrescidos ou não de NaCl (100 mmol L⁻¹) e/ou imidazol (2 mmol L⁻¹). O tampão de eluição consistiu de acetato de sódio a pH 4,0 ou do respectivo tampão de adsorção acrescido de imidazol (100 mmol L⁻¹). A regeneração foi feita com solução de EDTA a pH 7,0.

A Figura 32 mostra as quantidades de hIgG (%) obtidas em cada etapa cromatográfica nas condições testadas com tampão MOPS a pH 7,0.

Figura 32 – Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leite: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + NaCl; Eluição: acetato de sódio pH 4,0 + NaCl; **3** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl; **5** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl.



Fonte: Autor (2021)

Na condição 1, percebe-se que cerca de 90% da hIgG é removida da coluna apenas na etapa de regeneração com EDTA em conjunto com os íons Cu²⁺, indicando que a diminuição de pH com o tampão acetato não foi suficiente para que a hIgG fosse desorvida da matriz. Com o intuito de reduzir as interações iônicas entre a matriz e a hIgG, NaCl foi adicionado nas etapas cromatográficas da condição 2 (PRASANNA; VIJAYALAKSHMI, 2010). Os resultados mostraram que mais hIgG foi removida durante a etapa de lavagem em comparação com os resultados da condição 1. Entretanto, em torno de 90% da hIgG continuou sendo coletada apenas na etapa de regeneração com EDTA mesmo em condições com maior força iônica.

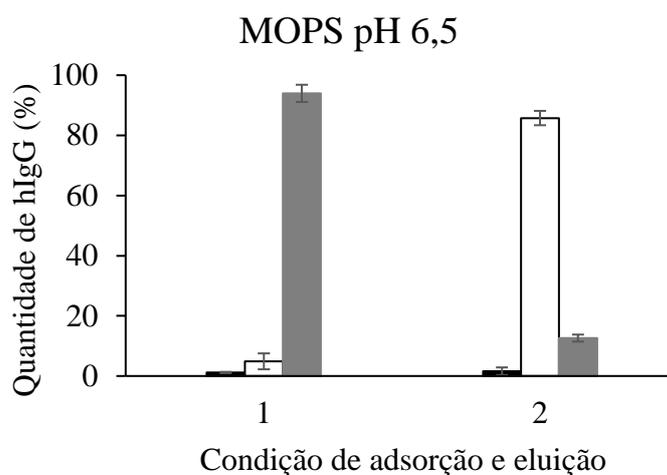
O agente competitivo imidazol foi utilizado para a eluição de hIgG na condição 3. O imidazol livre é capaz de interagir com os sítios de ligação dos íons metálicos quelatados, removendo as proteínas adsorvidas e promovendo a eluição. Isso foi corroborado com o resultado da condição 3, no qual 61,66% da hIgG foi eluída da coluna, e apenas 22,72% foram desorvidas na etapa de regeneração com EDTA. O

ensaio da condição 4 foi realizado para verificar o efeito combinado da presença de NaCl e imidazol no tampão de adsorção. Foi observada uma possível intensificação dos efeitos de bloqueio de interações eletrostáticas e de competição por sítios de interação do Cu^{2+} , visto que 75,57% da hIgG não foi adsorvida no monolito.

Na condição 5, 91,16% da hIgG foi removida da coluna na etapa de eluição com NaCl e imidazol, mostrando-se a mais promissora. O imidazol não foi adicionado ao tampão de adsorção nesta etapa devido aos resultados observados na condição 4.

Com base nos resultados obtidos anteriormente, ensaios com o tampão MOPS a pH 6,5 foram realizados. Os resultados são apresentados pela Figura 33.

Figura 33 - Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Cu^{2+} . Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 6,5; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + imidazol (100 mmol L^{-1}).



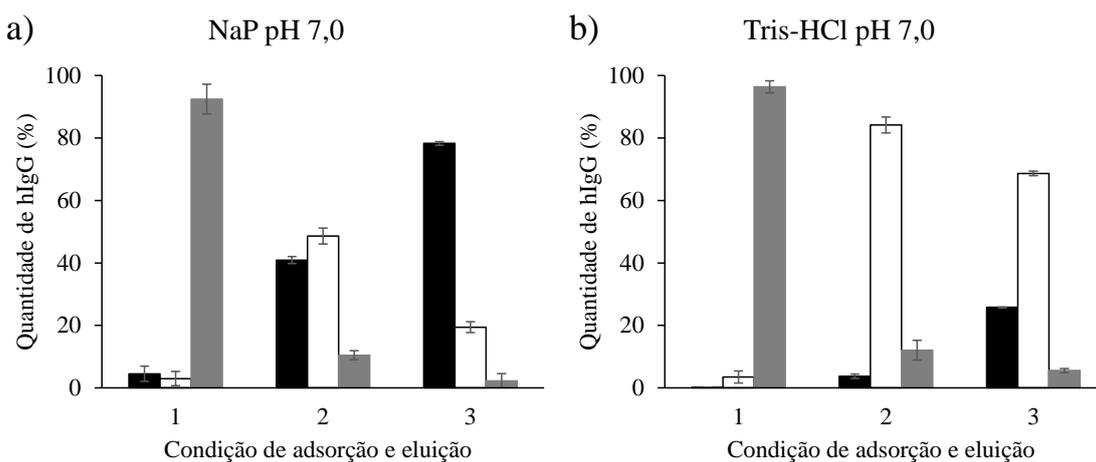
Fonte: Autor (2021)

Na condição 1, 4,89 e 93,91% da hIgG foram removidas da coluna nas etapas de eluição e regeneração, respectivamente, indicando que a diminuição do pH com tampão acetato de sódio continuou ineficiente para dessorção de hIgG. Enquanto que na condição 2, a qual utiliza imidazol para a eluição da proteína, 85,71% da hIgG foi eluída, sendo este valor maior que a percentagem eluída nas mesmas condições, porém a pH 7,0. De acordo com Prasanna & Vijayalakshmi (2010), o valor de pH do sistema tamponante influencia em diversas propriedades, como na nucleofilicidade dos

componentes do tampão, na capacidade de doar/receber elétrons das proteínas e na estabilidade dos complexos metálicos. Conclui-se que a combinação desses fatores é responsável pelos resultados obtidos.

Para os tampões NaP e Tris-HCl, os quais são negativamente e positivamente carregados a pH 7,0, respectivamente, as Figuras 34a e 34b expõem os resultados de adsorção de hIgG no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺ nesses dois sistemas tamponantes.

Figura 34 - Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺ em tampão: a) NaP e b) Tris-HCl a pH 7,0. Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: NaP ou Tris-HCl pH 7,0; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **3** - Adsorção: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: NaP ou Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl.



Fonte: Autor (2021)

Para ambos os tampões, a condição de eluição com tampão acetato de sódio a pH 4,0 (condição 1) foi capaz de remover apenas 2,98 e 3,49% da hIgG alimentada na coluna nos tampões NaP e Tris-HCl a pH 7,0 na etapa de eluição, respectivamente sendo a maior parte dessorvida apenas na etapa de regeneração. Esse resultado também foi observado para os tampões MOPS a pH 7,0 e 6,5, indicando que independentemente do pH e da natureza do tampão, o abaixamento do pH com tampão acetato de sódio não é suficiente para eluir a hIgG adsorvida pelos complexos IDA-Cu²⁺. A condição 2, a qual avalia o acréscimo de imidazol para a eluição da hIgG, mostrou que maior parte das proteínas foi removida da coluna na etapa de eluição.

Observou-se que para o NaP, as quantidades de hIgG lavadas e eluídas foram próximas (40, 91 e 48,61%, respectivamente), enquanto que para o tampão Tris-HCl, 84,18% da hIgG foram removidas na etapa de eluição. Para a última condição, NaCl e imidazol foram adicionados simultaneamente aos tampões, foi observado que houve um aumento da quantidade hIgG não adsorvida pela coluna para ambos os sistemas tamponantes e, especificamente sobre o resultado com NaP, 78,27% da hIgG foi lavada, diferenciando do resultado do Tris-HCl, de apenas 25,80%.

As distinções observadas entre os sistemas com NaP e Tris-HCl podem ser explicadas pelas cargas negativas e positivas das respectivas moléculas de cada tampão e pela natureza policlonal da hIgG pré-purificada utilizada nos experimentos, ocorrendo solvatação das proteínas e dos complexos IDA-Cu²⁺. Além disso, ambos os tampões podem interagir com os sítios de ligação do quelato metálico, competindo fracamente com os resíduos de histidina expostos nas moléculas de hIgG (BRESOLIN *et al.*, 2009).

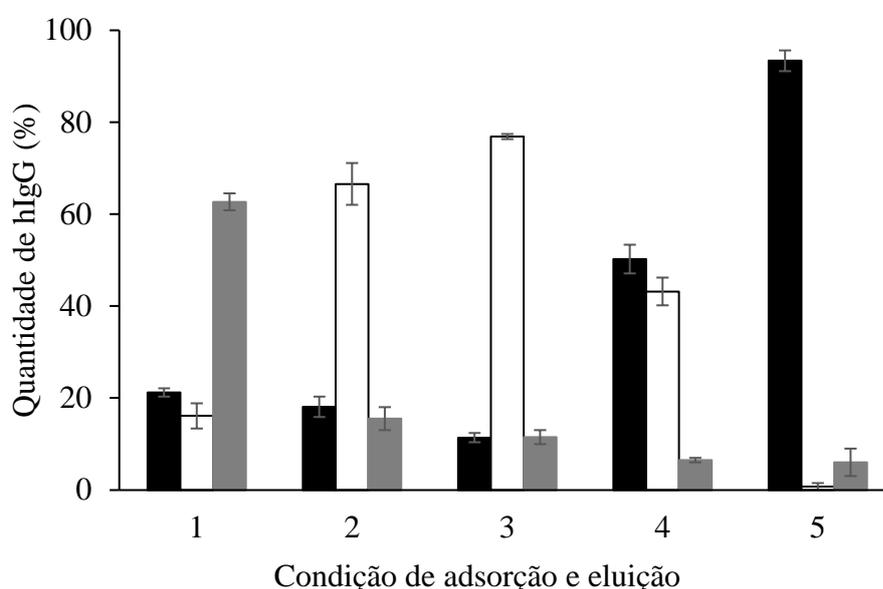
A adsorção de proteínas em criogéis contendo complexos IDA-Cu²⁺ foi estudada por diversos autores. Kumar *et al.* (2006) prepararam um criogel de PAAm-AGE-IDA-Cu²⁺ para a purificação da enzima uroquinase a partir do sobrenadante de cultura celular por IMAC. Utilizando criogéis contendo os mesmos componentes, Carvalho *et al.* (2014) sintetizaram criogéis monolíticos de PAAm-AGE-IDA-Cu²⁺ para a captura de lactoferrina, a qual possui 2 resíduos de histidina expostos em sua superfície, por IMAC. Evli *et al.* (2018) produziram criogéis de PAAm, glicidil metacrilato (GMA) com IDA imobilizado para a adsorção reversível de amilglicosidade em técnicas de IMAC, utilizando o Cu²⁺ como o íon quelatado. Fioravante (2021) preparou monolitos de PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺ para purificar imunoglobulina bovina (bIgG) a partir do soro bovino por ensaios cromatográficos.

4.5.3.2. PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺

O monolito de PAAm-CS-GA-AGE-IDA foi saturado com solução de sulfato de níquel para a análise de adsorção de hIgG no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ em diferentes sistemas tamponantes e condições de eluição, em condições similares às descritas no tópico 4.5.3.1. Devido à menor estabilidade reportada na literatura do complexo IDA-Ni²⁺ em comparação com o complexo IDA-Cu²⁺ (PORATH, 1988), o desprendimento de Ni²⁺ quelatado no criogel foi monitorado durante as etapas

cromatográficas por espectrofotometria a 384 nm e a lixiviação do íon metálico não foi observada. A Figura 35 retrata os resultados obtidos para o monolito com Ni^{2+} imobilizados.

Figura 35 - Quantidade de hIgG (%) obtida nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} . Injeção: aproximadamente 2 mg de hIgG em 1,0 mL de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0; Eluição: acetato de sódio pH 4,0; **2** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **3** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + Imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** - NaP pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **5** – Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl.



Fonte: Autor (2021)

Primeiramente, o abaixamento de pH do meio com tampão acetato de sódio (condição 1) não foi capaz de promover a dessorção da hIgG retida na coluna. Esse comportamento também foi observado para o quelato IDA- Cu^{2+} , indicando que a interação entre quelato e proteína continua intensa em acetato de sódio a pH 4,0. Apesar do rompimento de interações de coordenação entre os quelatos metálicos e os resíduos de histidina devido à protonação do anel imidazol ($\text{pK}_a = 6,0$) a pH 4,0, interações de natureza eletrostática, hidrofóbicas e de van der Waals podem estar ocorrendo entre a matriz e outros resíduos de aminoácidos expostos na superfície das moléculas de hIgG, retendo-as na matriz (WONG *et al.*, 1991).

As condições 2 e 3 representaram a eluição de hIgG pela adição de imidazol em pH 7,0 e pH 6,5, respectivamente. Nestas condições, 66,56 e 76,90% da hIgG foi desorvida da coluna durante a etapa de eluição, e ambos os sistemas se mostraram promissores devido à alta capacidade de adsorção de hIgG e de desorção da proteína sem a necessidade de adição de EDTA.

Em relação à condição 4, o uso do tampão NaP para a adsorção de hIgG mostrou que a quantidade de hIgG lavada e eluída são semelhantes entre si, sendo iguais a 50,26 e 43,17%, respectivamente. Este resultado foi análogo ao obtido para a adsorção de hIgG pelo quelato IDA-Cu²⁺ nesta mesma condição tamponante.

Finalmente, 93,39% da hIgG foi removida na etapa de lavagem da condição 5, a qual corresponde ao sistema com tampão Tris-HCl na presença de imidazol e NaCl. A alta condutividade do tampão minimiza interações de natureza eletrostática e favorece interações de coordenação entre a proteína e o adsorvente. Entretanto, as moléculas de Tris possuem efeito competidor fraco pelos sítios de adsorção dos quelatos metálicos, impedimento a interação entre o quelato IDA-Ni²⁺ e as moléculas de hIgG, explicando a alta percentagem de hIgG obtida na etapa de lavagem.

A quantidade de hIgG adsorvida nos criogéis contendo complexos IDA-Ni²⁺ foi menor para todos os sistemas tamponantes quando comparada à quantidade adsorvida na matriz com IDA-Cu²⁺, corroborando a regra de Sulkowski (1989), a qual indica que a força de retenção de hIgG é maior para adsorventes contendo íons Cu²⁺ que para adsorventes contendo Ni²⁺.

4.6. ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA PURIFICAÇÃO DE hIgG A PARTIR DO SORO HUMANO

Com o objetivo de verificar se os criogéis monolíticos sintetizados seriam seletivos para a purificação de hIgG a partir do soro humano, ensaios cromatográficos em condições variadas foram realizados, conforme o tópico 3.2.4 da seção de materiais e métodos. Nesta etapa, foram avaliadas a quantidade de proteínas totais adsorvidas e a seletividade das fases estacionárias de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺ e PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺.

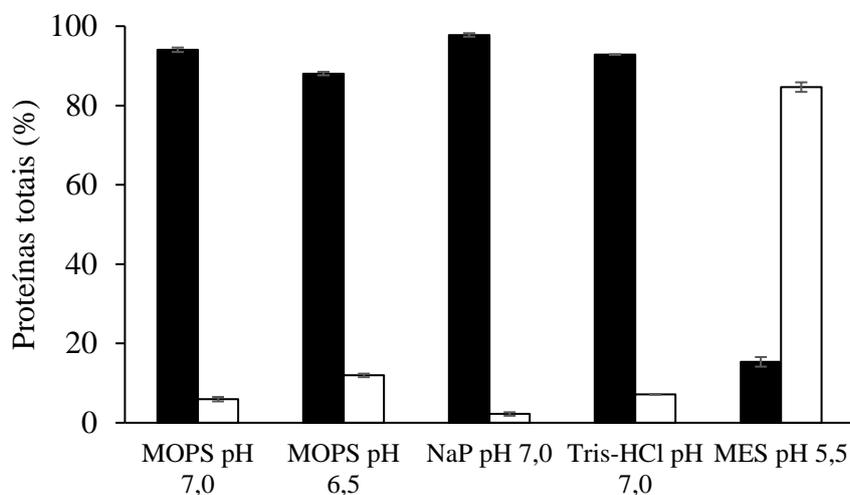
Os resultados foram apresentados em termos de proteínas totais adsorvidas e não-adsorvidas. Os cromatogramas com as eletroforeses, balanços de massa das cromatografias e as duplicatas encontram-se no Apêndice B.

4.6.1. Purificação de hIgG a partir do soro humano em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA

Para experimentos realizado com PAAm-CS-GA-AGE-IDA, os tampões MOPS, NaP, Tris-HCl a pH 7,0, MOPS a pH 6,5 e MES a pH 5,5 foram utilizados para a diluição do soro humano. A eluição das proteínas adsorvidas no criogel foi realizada no respectivo tampão de adsorção acrescido de NaCl ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$). As Figura 36 e 37 apresentam a percentagem de proteínas totais do soro humano adsorvidas no criogel e as eletroforeses para cada condição, respectivamente.

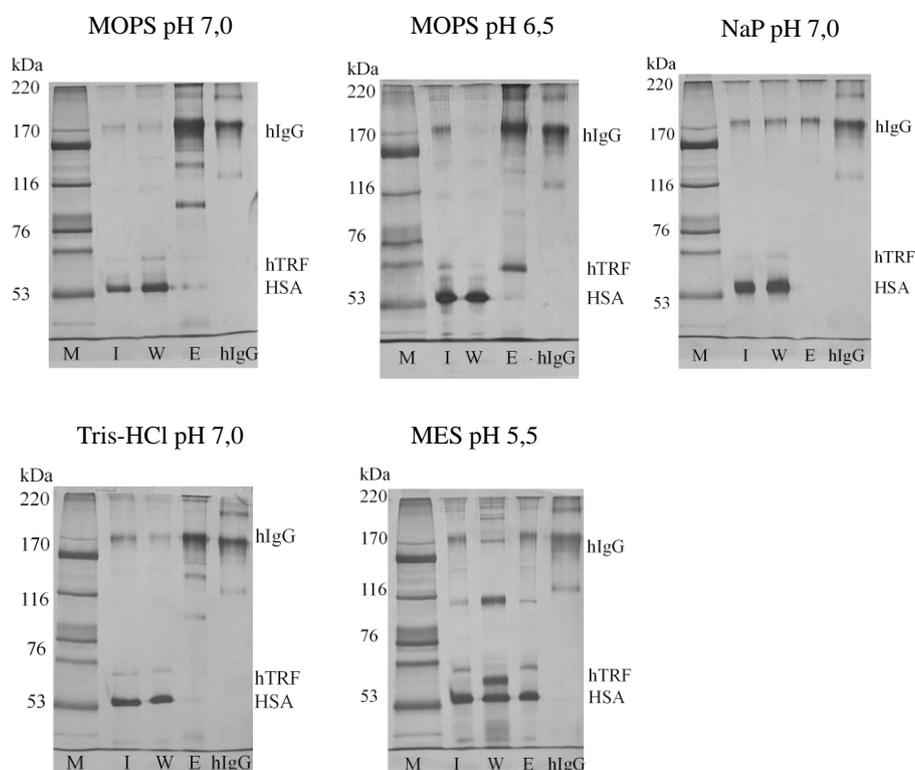
A pH 7,0, 5,95 e 7,14% de proteínas totais foram adsorvidas no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em tampões MOPS e Tris-HCl, respectivamente. Os perfis eletroforéticos para os ensaios cromatográficos nos tampões citados mostram que a hIgG foi eluída com outras proteínas em ambos os sistemas tamponantes, evidenciado pela presença de bandas intensas além da banda correspondente a hIgG. Em contraste, apenas a banda de hIgG foi observada na pista da eluição para o tampão NaP, indicando seletividade para a adsorção desta proteína. Apesar da seletividade, apenas 2,94% das proteínas totais foram intensamente adsorvidas pelo monolito, o que pode ter ocorrido devido ao fato de que as moléculas de hIgG positivamente carregadas foram solvatadas pelas moléculas negativamente carregadas do tampão fosfato, reduzindo a aproximação das proteínas pela matriz.

Figura 36 – Proteínas totais (%) do soro humano não adsorvidas (●) e adsorvidas (○) em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA em diferentes sistemas tamponantes. Injeção: 1,025 mL de soro humano ($3,5 \text{ mg mL}^{-1}$; diluído 15 vezes). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: $2,0 \text{ mL min}^{-1}$.



Fonte: Autor (2021)

Figura 37 – Eletroforeses SDS-PAGE sob condições não redutoras (7,5% em acrilamida) das frações cromatográficas em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA realizadas com injeção de soro humano diluído 15 vezes nos sistemas tamponantes indicados. M: marcador de massa molecular; I: injeção; W: pool das frações de lavagem; E: pool das frações mais concentradas da eluição; hIgG: marcador de IgG humana (Sigma-Aldrich); hTRF: transferrina humana; HSA: albumina do soro humano.



Fonte: Autor (2021)

No sistema tamponante MOPS a pH 6,5, 11,94% das proteínas totais foram adsorvidas, sendo este valor maior que o obtido para o MOPS a pH 7,0. A eletroforese desta condição mostrou uma banda tênue correspondente à hIgG na pista da lavagem e uma banda intensa para a hIgG na pista da eluição, indicando grande adsorção desta proteína. Entretanto, o mesmo comportamento foi observado para a banda correspondente à hTRF, evidenciando a pouca seletividade da matriz nesta condição.

Para a condição tamponante MES a pH 5,5, 84,68% das proteínas totais adsorvidas e desorvidas da coluna na etapa de eluição. Isso pode ser explicado pela carga superficial total do criogel ser positiva e grande parte das proteínas do soro humano serem carregadas negativamente, como a HSA ($pI = 4,9$) e a hTRF ($5,2 < pI < 5,9$) (PUTNAM, 1984) a pH 5,5, sendo fortemente adsorvidas na matriz. Ambas as etapas de lavagem e eluição apresentaram as mesmas bandas existentes na pista da injeção, apontando adsorção de várias das proteínas do soro humano.

Com exceção do tampão NaP, as condições tamponantes analisadas não proporcionaram boa seletividade para a hIgG. Possivelmente, a existência de grupos ácido carboxílico desprotonados na matriz promoveram interações de natureza eletrostática, as quais são não-específicas, entre os grupos funcionais presentes no monolito de PAAm-CS-GA-AGE-IDA e resíduos de aminoácidos expostos na superfície das proteínas do soro humano.

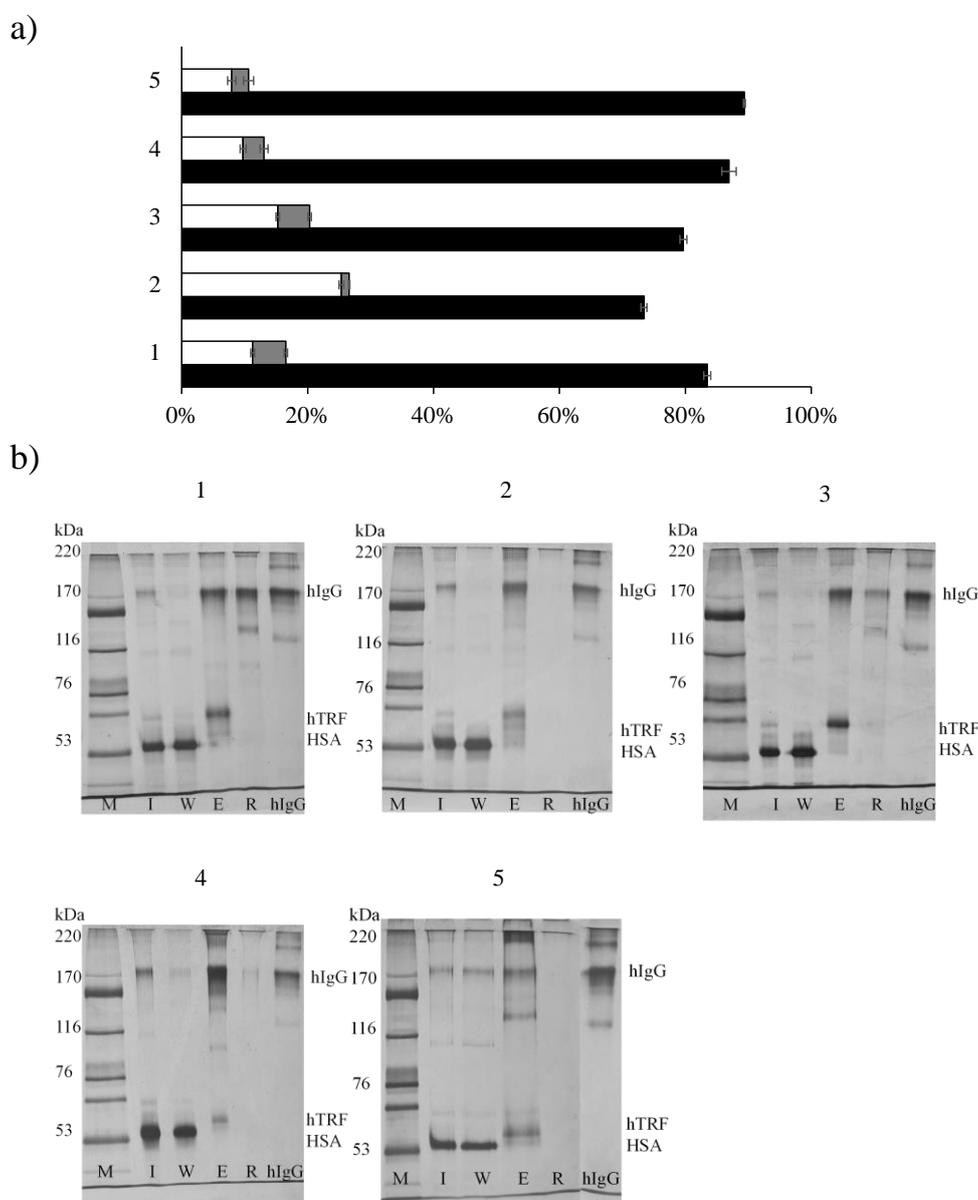
4.6.2. Purificação de hIgG a partir do soro humano em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Me²⁺

4.6.2.1. PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺

A fim de verificar se o criogel com íons Cu²⁺ quelatados propiciaria a adsorção seletiva de hIgG, foram realizados ensaios cromatográficos diluindo soro humano em tampões escolhidos com base nos resultados apresentados na seção 4.5.3.1. Dessa forma, o efeito do pH, da força iônica e da natureza do tampão foram avaliados. A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada com a adição de imidazol (100 mmol L⁻¹) no respectivo tampão de adsorção. A regeneração da coluna foi realizada em EDTA a pH 7,0. A Figura 38a apresenta a percentagem de proteínas totais do soro não

adsorvidas e adsorvidas, enquanto a Figura 38b mostra as eletroforeses obtidas para cada condição.

Figura 38 – a) Proteínas totais (%) e b) perfis eletroforéticos de SDS-PAGE obtidos nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Injeção: 75 µL de soro humano diluído em 1,050 mL (15 vezes) de tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **2** - Adsorção: MOPS pH 7,0 + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl; **3** - Adsorção: MOPS pH 6,5 + imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** - NaP pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **5** – Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl.



A quantidade de proteínas totais adsorvidas pelo quelato IDA-Cu²⁺ variou conforme as condições do sistema tamponante. Quando o tampão MOPS foi utilizado, uma quantidade maior de proteínas totais foram adsorvidas em comparação com os sistemas tamponantes Tris-HCl e NaP, explicado pelo caráter zwitteriônico do tampão MOPS. A maior percentagem de proteínas totais adsorvidas no criogel e dessorvidas na etapa de eluição (25,37%) foi obtida na condição 2, a qual não possui imidazol no tampão de adsorção. A diminuição do valor de pH do tampão MOPS contendo imidazol de 7,0 para 6,5, causou um aumento na quantidade de proteínas totais dessorvidas da coluna durante etapa de eluição, de 11,27% para 15,26%. Os perfis eletroforéticos das frações cromatográficas dos experimentos realizados com tampão MOPS mostraram baixa seletividade, visualizado pela presença de bandas de hTRF na pista da eluição, principalmente ao empregar a condição a pH 6,5.

Para os ensaios realizados em tampão NaP (condição 4), 9,74% das proteínas totais foram obtidas na etapa de eluição. Nesse ensaio, as moléculas de fosfato podem atuar como competidores fracos, sendo possível que realizem interações eletrostáticas com a matriz e com as proteínas do soro humano e, até mesmo, de coordenação com os íons Cu²⁺ quelatados, competindo com os sítios de interação do adsorvente. A eletroforese da condição 4 mostra pouca seletividade, devido à presença da banda de hTRF e de outra impureza na faixa de 100 kDa.

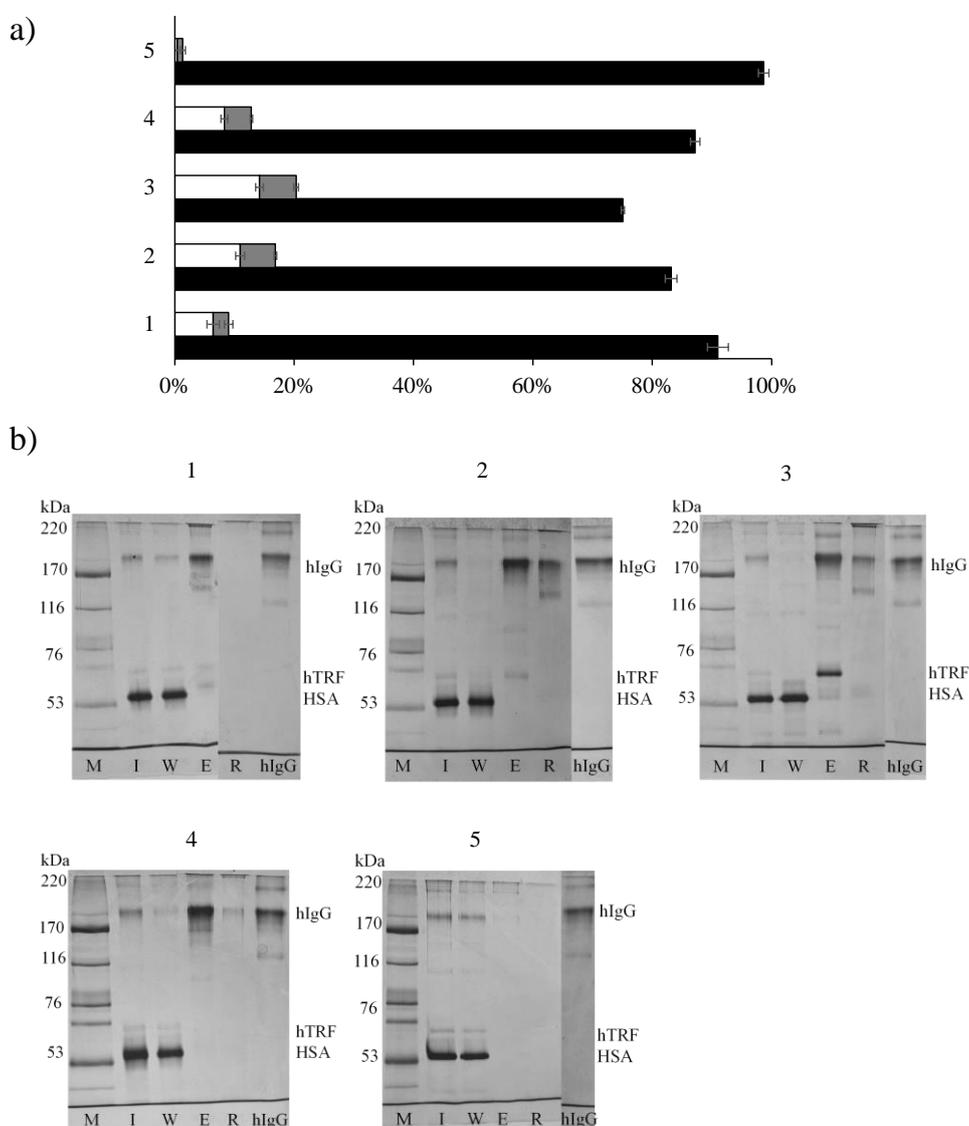
Na condição 5, 7,95% das proteínas totais foram adsorvidas no criogel na presença do tampão Tris-HCl. Especificamente nesta condição, NaCl foi adicionado ao tampão na concentração de 1,0 mol L⁻¹ com o objetivo de reduzir as interações de natureza eletrostática no sistema e favorecer as interações de coordenação entre as proteínas e os íons Cu²⁺ quelatados. Apesar disso, a pista da eluição da eletroforese desta condição mostrou pequena seletividade, sendo possível observar bandas referentes à hIgG, HSA e hTRF.

4.6.2.2. PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺

Ensaio cromatográfico de purificação de hIgG a partir do soro humano foram realizados com íons Ni²⁺ quelatados no criogel. Os resultados da adsorção de proteínas totais e os respectivos perfis eletroforéticos das etapas cromatográficas são mostradas

pela Figura 39, nas quais são observadas as influências do valor de pH, força iônica e natureza do tampão nos resultados de adsorção.

Figura 39 – a) Proteínas totais (%) e b) perfis eletroforéticos obtidos nas etapas cromatográficas em coluna de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Injeção: 75 µL de solução de soro humano diluído em 1,050 mL (15 vezes) em tampão de adsorção. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: Lavagem: ●; Eluição: ○; Regeneração: ●. Tampão: **1** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl; **2** – Adsorção: MOPS pH 7,0 + imidazol; Eluição: MOPS pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **3** – Adsorção: MOPS pH 6,5 + Imidazol; Eluição: MOPS pH 6,5 + Imidazol (100 mmol L⁻¹); **4** – NaP pH 7,0 + imidazol; Eluição: NaP pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); **5** – Tris-HCl pH 7,0 + imidazol + NaCl; Eluição: Tris-HCl pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹) + NaCl



Fonte: Autor (2021)

Dentre as condições avaliadas com tampão MOPS a pH 7,0, a condição 1 proporcionou menor percentagem de proteínas totais dessorvidas da coluna na etapa de eluição (6,42%), isso pode ser explicado pela maior força iônica do sistema tamponante, o qual contém NaCl, acarretando em redução das interações eletrostáticas não específicas e em favorecimento das interações de coordenação entre os íons Ni^{2+} quelatados e as proteínas. Já na condição 2, 10,96% das proteínas totais foram dessorvidas durante a eluição devido à menor força iônica do sistema, permitindo que interações eletrostáticas entre a matriz e a superfície das proteínas ocorram. Em tampão MOPS a pH 6,5 (condição 3), 14,18% das proteínas totais foram obtidas na etapa de eluição, indicando o favorecimento da adsorção de proteínas do soro. A maior adsorção de proteínas nessa condição foi corroborada pelo perfil eletroforético obtido, o qual evidencia que as bandas de hIgG e hTRF estavam brandas na pista da lavagem e intensas na pista da eluição. Apesar das diferenças em quantidades de proteínas totais adsorvidas, os perfis eletroforéticos das condições 1, 2 e 3 foram equivalentes, sendo possível notar bandas de hIgG e hTRF em suas respectivas eletroforeses, indicando baixa seletividade do criogel nesses sistemas tamponantes.

Para a condição 4 (tampão NaP), 8,33% das proteínas foram dessorvidas durante a etapa de eluição e apenas a banda de hIgG foi observada na pista da eluição da eletroforese referente a esse sistema tamponante.

Finalmente, no sistema da condição 5, o qual é composto por Tris-HCl contendo NaCl, 0,45% das proteínas totais foram dessorvidas durante a etapa de eluição, indicando que tanto a carga do tampão, a alta força iônica do meio e o efeito competidor fraco do Tris interferiram na adsorção de proteínas nesta condição. De acordo com o perfil da eletroforese para a condição 5, as pistas da injeção e lavagem foram semelhantes e não foi possível observar bandas de proteínas nas pistas da eluição e regeneração.

Comparando os resultados dos ensaios cromatográficos realizados nos criogéis contendo Cu^{2+} e Ni^{2+} quelatados, nas mesmas condições tamponantes, conclui-se que os criogéis contendo Cu^{2+} foram capazes de adsorver mais proteínas totais em termos de massa e percentagem, entretanto, com menor seletividade. Isso pode ser explicado pelo fato da retenção de proteínas pelos íons Ni^{2+} quelatados requerer que mais de um ou que *clusters* de resíduos de histidina estejam expostos na superfície da proteína, enquanto

que para a adsorção de proteínas por quelatos contendo Cu^{2+} , apenas um resíduo de histidina exposto é necessário (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009).

4.6.3. Determinação da melhor condição de purificação de hIgG a partir de soro humano pelo criogel

Por meio da análise dos resultados obtidos nos ensaios cromatográficos para purificação de hIgG a partir do soro humano, a melhor condição de purificação foi escolhida com base nos perfis eletroforéticos e na quantidade de proteínas totais eluídas.

O sistema tamponante NaP utilizado para a purificação do soro humano no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} foi o que proporcionou maior potencial devido à quantidade de proteínas adsorvidas e, também, à presença de apenas a banda de hIgG na pista da eluição da eletroforese. Além disso, a maioria das proteínas adsorvidas foram desorvidas da coluna durante a etapa de eluição.

Dessa forma, o experimento de imunodifusão radial (RID) foi realizado para avaliar a pureza da hIgG obtida nas frações da eluição. O balanço de massa da RID encontra-se na Tabela 8. A curva de calibração da RID encontra-se no Apêndice C.

Tabela 8 - Balanço de massa do ensaio cromatográfico para purificação de hIgG a partir de soro humano no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} . Lavagem: NaP a pH 7,0 + imidazol (2mmol L^{-1}); Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L^{-1}); Regeneração: EDTA a pH 7,0 (100 mmol L^{-1}).

| Frações | Bradford | | Imunodifusão radial | | | |
|-------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| | PT ^a (mg) | Rendimento (%) ^b | hIgG ^c (mg) | Rendimento (%) ^d | Pureza ^e (%) | FP ^f |
| Injeção | 6,50 ± 0,47 | 100,00 | 0,43 ± 0,01 | 100,00 | 6,69 ± 0,71 | 1,00 |
| Lavagem | 6,38 ± 0,88 | 98,23 ± 6,42 | 0,20 ± 0,02 | 45,80 ± 3,88 | 3,22 ± 0,81 | 0,47 ± 0,07 |
| Eluição | 0,27 ± 0,01 | 4,16 ± 0,14 | 0,24 ± 0,01 | 55,64 ± 4,84 | 88,60 ± 1,28 | 13,41 ± 1,61 |
| Regeneração | 0,05 ± 0,01 | 0,72 ± 0,14 | 0,02 ± 0,00 | 3,93 ± 0,21 | 36,86 ± 5,13 | 5,65 ± 1,36 |
| Recuperação | 6,70 ± 0,88 | 103,10 ± 6,15 | 0,45 ± 0,01 | 105,37 ± 1,17 | | |

^a Proteínas totais estimadas pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência

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

^c Massa de hIgG estimada por RID

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

^e Massa de hIgG dividida pela massa de proteína total em cada etapa x 100

^f Pureza de cada etapa dividida pela pureza da solução de injeção

Fonte: Autor (2021)

De acordo com o balanço de massa apresentado, 55,64% da hIgG da amostra de soro humano foi recuperada durante a etapa de eluição com 88,60% de pureza e fator de purificação de 13,41, corroborando com o perfil eletroforético obtido para esta condição.

Babac *et al.* (2006) sintetizaram criogéis de PAAm e AGE com concanavalina A imobilizada para purificação de hIgG a partir do soro humano e obtiveram 85% de pureza. Alkan *et al.* (2009) purificaram anticorpos a partir de sangue e plasma humano e reportaram pureza de aproximadamente 85% e 95% para hIgG eluída, respectivamente, utilizando criogel monolítico de poli(hidroxietil metacrilato) (PHEMA) com proteína A imobilizada covalentemente à matriz. O ligante 2-mercapto etanol imobilizado em criogéis a base de metacrilato na forma de discos, para purificação de hIgG a partir do plasma humano por cromatografia tiofílica foi utilizado por Bakhshpour, Bereli & Şenel (2014). Os materiais utilizados forneceram pureza próxima de 89% e rendimento de 81% para a hIgG dessorvida. Prasanna, Kamalanathan & Vijayalakshmi (2015) imobilizaram L-histidina em discos monolíticos e obtiveram pureza de aproximadamente 90% para a hIgG a partir do soro humano. Mourão *et al.* (2019) determinaram a pureza da hIgG após cromatografia em criogéis monolíticos de PAAm-Alg e PAAm-Alg com P-Tyr imobilizado e obtiveram valores de 96,6 e 105,1% de pureza, respectivamente. Bresolin, Bresolin & Bueno (2020) produziram membranas de poli(etileno vinil álcool) com IDA imobilizado para a purificação de anticorpos monoclonais a partir do sobrenadante de cultura de hibridomas e reportaram pureza de 94,2% para a hIgG. Sharma *et al.* (2020) sintetizaram criogéis esféricos híbridos de alginato e fibroína de seda de aranha (Alg-SSF) e verificaram que o material foi capaz de purificar, sem ligantes imobilizados, hIgG a partir do soro humano, sendo obtida pureza de 80% e rendimento de 91% após duas etapas de purificação.

Quanto a trabalhos empregando a técnica de IMAC para a purificação de anticorpos, Tishchenko *et al.* (2002) isolaram o anticorpo HRP-específico, isotipo IgG₁ de fluído ascítico murino utilizando esferas porosas de glicidil metacrilato-co-etileno dimetacrilato (GMA-co-EDMA) funcionalizadas com o quelato IDA-Ni²⁺ alcançando pureza de 84% e rendimento de 79%. Bayramoglu, Senel & Arica (2006) produziram esferas de glicidil metacrilato (GMA) e metil metacrilato (MMA) com L-histidina imobilizada na presença de braço espaçador e íons Cu²⁺ quelatados para purificação de hIgG a partir do soro humano, os autores alcançaram rendimento de 87,5% e pureza de

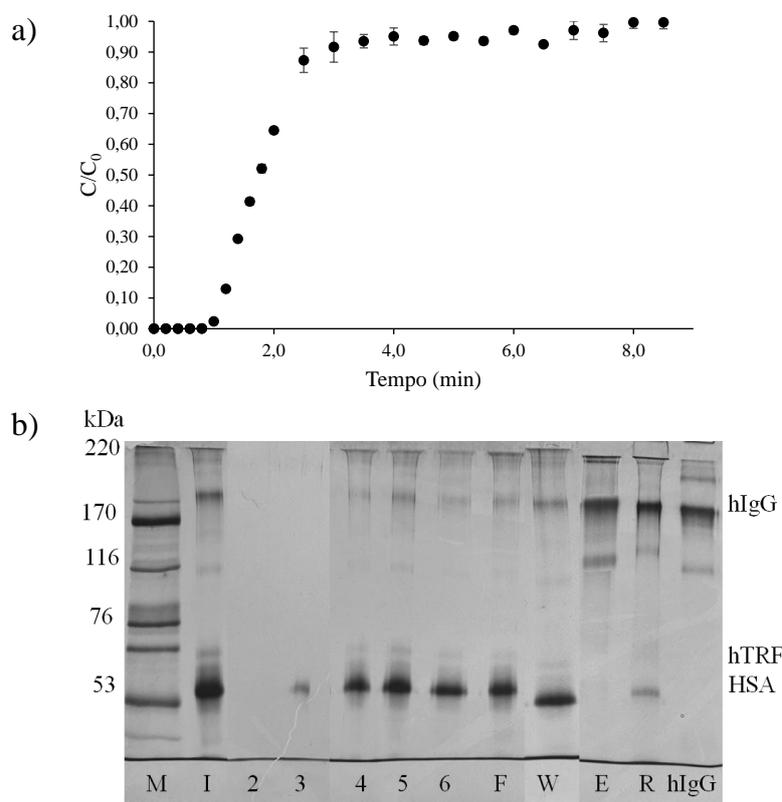
90% para a hIgG. Yavuz *et al.* (2012) produziram membranas de PHEMA-N-metacrilóil-L-histidina com íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} quelatados para purificação de hIgG a partir do plasma humano e obtiveram 94,1% de pureza para a hIgG. Bakhshpour *et al.* (2016) sintetizaram criogéis de PHEMA e polietilenoimina (PEI) com íons Cu^{2+} imobilizados e obtiveram 90% de pureza na purificação de hIgG a partir do plasma humano. A hIgG do plasma humano foi purificada por Ribeiro *et al.* (2008) em membranas de fibra-oça poli(etileno vinil álcool) com íons Ni^{2+} imobilizados nos agentes quelantes IDA e TREN, reportando valores de 99% de pureza na melhor condição de purificação. Fioravante (2021) obteve 75,31 e 88,06% de pureza de bIgG a partir do soro bovino utilizando criogéis monolíticos de PAAm-Alg-AGE-IDA- Cu^{2+} e PAAm-Alg-AGE-IDA, respectivamente.

Dessa forma, a pureza da hIgG alcançada neste trabalho foi equivalente à de trabalhos que utilizam métodos cromatográficos para a purificação de anticorpos a partir de fluídos biológicos. Entretanto, o rendimento obtido para a hIgG foi menor quando comparado aos rendimentos reportados na literatura. Isso pode ser explicado pelo criogel selecionado para a realização dos ensaios cromatográficos possuir densidade de íons Ni^{2+} adsorvidos igual a $33,71 \mu\text{mol Ni}^{2+}/\text{g}$ criogel seco, a qual é menor que a densidade de íons Ni^{2+} adsorvidos pelo IDA nos trabalhos de Ribeiro *et al.* (2008), Fioravante (2021) e Tishchenko *et al.* (2002).

4.7. CURVA DE RUPTURA DO SORO HUMANO EM CRIOGÉIS DE PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+}

A fim de determinar a capacidade dinâmica de adsorção (DBC) e verificar se o criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA- Ni^{2+} seria seletivo para hIgG em condições de saturação, o ensaio descrito no tópico 3.2.5 foi realizado. Na Figura 40a é apresentada a curva de ruptura de proteínas do soro humano para o monolito e o perfil eletroforético é mostrado na Figura 40b. Os balanços de massa e os cromatogramas do experimento e da duplicata da curva de ruptura encontram-se no Apêndice D.

Figura 40 – a) Curva de ruptura de proteínas do soro humano obtida para criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Leito: 3,0 mL de criogel. Tampão de adsorção: NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹). Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹). Injeção: 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão de adsorção (concentração aproximada de 3,1 mg mL⁻¹ em termos de proteínas totais, volume total de 33 mL de solução contendo soro humano). Massa total de proteína alimentada: 99,85 mg; b) Eletroforese da curva de ruptura. Legenda: I – Alimentação; F – *Flowthrough*; W - Lavagem; E – Eluição; R - Regeneração. M: marcador de alta massa molecular; I: alimentação; 2 a 6: primeiras frações (volume de 1,0 mL cada) do *flowthrough* coletadas; F: *pool* das demais frações do *flowthrough*; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.



Fonte: Autor (2021)

De acordo com os resultados obtidos, a ruptura ($C/C_0 = 0,1$) ocorreu no tempo de 1,2 min e volume de 2,4 mL, aproximadamente. O perfil da curva mostra uma zona de transferência de massa estreita, indicando que maior parte da capacidade do sólido foi utilizada até o ponto de ruptura, o que é ideal por indicar uso eficiente do comprimento do adsorvente (MCCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

Utilizando as Eqs. 2.3, 2.4 e 2.5, a capacidade dinâmica de adsorção a 10% ($DBC_{10\%}$) foi determinada em termos de proteínas totais por meio da análise da curva de ruptura obtida. Foram calculados os valores de $DBC_{10\%}$ iguais a $2,43 \pm 0,10$ e

4,08 ± 0,21 mg proteínas totais/mL de criogel para os métodos de Boi *et al.* (2020) e Zhu *et al.* (2019), respectivamente. A diferença entre os valores obtidos pode ser explicada pelas aproximações necessárias para o cálculo da DBC_{10%}, por exemplo, em Boi *et al.* (2020), foi preciso realizar estimativas sobre o volume morto do sistema (V_{sis}). Utilizando solução de IgG pré-purificada, Kang *et al.* (2016) e Zhu *et al.* (2019) calcularam a DBC_{10%} para resinas de agarose com peptídeos imobilizados covalentemente à matriz, ambos os trabalhos obtiveram valores de DBC_{10%} em torno de 35 mg de hIgG/mL de resina, sendo este valor muito maior que o obtido neste trabalho para proteínas totais. Isso pode ser explicado pela maior densidade de ligantes, maior área superficial das resinas e ausência de outras proteínas além da hIgG na solução de alimentação.

Para a determinação da pureza da hIgG removida da coluna durante a etapa de eluição, o ensaio de RID foi realizado com os *pools* das frações de cada etapa da curva de ruptura e os resultados são apresentados na Tabela 9.

O criogel continuou seletivo para a hIgG em condições de saturação, visto que apenas a banda de hIgG foi visualizada na pista da eluição, o que também ocorreu quando apenas 75 µL de soro humano diluído 15 vezes foram alimentados à coluna em experimentos cromatográficos, reportados na seção 4.6. As pistas das primeiras amostras analisadas do *flowthrough* mostram que apenas HSA foi obtida até a amostra 3 e, hIgG, hTRF e HSA não foram retidas na coluna a partir da quarta fração.

A pureza e a massa da hIgG obtida na etapa de eluição foi de 96,19% e 0,60 mg hIgG/mL de criogel (10,19 mg hIgG/g criogel seco). O resultado da eletroforese da pista da regeneração mostra a presença de HSA além da hIgG, corroborando o resultado de pureza obtida para esta etapa cromatográfica, de 25,28%.

Tabela 9 - Balanço de massa da curva de ruptura para purificação de hIgG a partir de soro humano no criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Lavagem: NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); Regeneração: EDTA a pH 7,0 (100 mmol L⁻¹).

| Frações | Bradford | | Imunodifusão radial | | | |
|-------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| | PT ^a (mg) | Rendimento (%) ^b | hIgG ^c (mg) | Rendimento (%) ^d | Pureza ^e (%) | FP ^f |
| Injeção | 99,85 ± 12,04 | 100,00 | 7,68 ± 0,82 | 100,00 | 7,71 ± 0,11 | 1,00 |
| Flowthrough | 84,21 ± 10,67 | 84,34 ± 0,52 | 5,26 ± 1,13 | 67,70 ± 7,44 | 6,18 ± 0,55 | 0,80 ± 0,08 |
| Lavagem | 13,29 ± 2,84 | 13,31 ± 4,51 | 0,83 ± 0,34 | 0,11 ± 0,06 | 5,96 ± 1,25 | 0,77 ± 0,15 |
| Eluição | 1,87 ± 0,02 | 1,87 ± 0,21 | 1,80 ± 0,01 | 23,69 ± 2,66 | 96,19 ± 1,53 | 12,48 ± 0,02 |
| Regeneração | 0,23 ± 0,07 | 0,23 ± 0,10 | 0,05 ± 0,01 | 0,82 ± 0,07 | 25,28 ± 4,86 | 3,29 ± 0,68 |
| Recuperação | 99,60 ± 7,78 | 99,75 ± 4,30 | 7,94 ± 0,77 | 103,48 ± 0,95 | | |

^a Proteínas totais estimadas pelo método de Bradford, com BSA como proteína de referência

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

^c Massa de hIgG estimada por RID

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

^e Massa de hIgG dividida pela massa de proteína total em cada etapa x 100

^f Pureza de cada etapa dividida pela pureza da solução de injeção

Fonte: Autor (2021)

Os valores de pureza e quantidade de hIgG adsorvida são comparáveis a estudos de diversos autores presentes na literatura: Marcuz *et al.* (2021) reportaram criogéis de PAAm-Alg-ECH-P-Tyr capazes de adsorver 12,62 mg de hIgG/mL de criogel com 95,0% de pureza, sendo este valor de hIgG adsorvida muito maior do que o obtido neste trabalho, provavelmente devido à maior densidade de grupos epóxi disponibilizados para imobilização do ligante P-Tyr no criogel após ativação da matriz com ECH. Fioravante (2021) sintetizou criogéis de PAAm-Alg-AGE-IDA e PAAm-Alg-AGE-IDA-Cu²⁺, obtendo 4,94 e 1,58 mg de hIgG/mL de criogel na etapa de eluição, respectivamente, sendo o resultado para o criogel contendo Cu²⁺ similar ao obtido nesse trabalho. Pavan *et al.* (2017) imobilizaram o ligante P-Tyr em géis de agarose por ativação com CNBr e reportaram adsorção de 0,16 mg de hIgG/mL gel com 91% de pureza a partir do plasma humano. Prasanna & Vijayalakshmi (2010) utilizaram discos monolíticos de CIM-IDA-Ni²⁺ para purificação de anticorpos monoclonais de fluídos ascíticos murinos e obtiveram capacidade de adsorção de 0,5 mg IgG/mL de disco e 90,9% de pureza.

4.8. CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE hIgG

A cinética de adsorção de hIgG no criogel PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ foi estudada conforme o procedimento descrito no tópico 3.2.6. Soluções de 0,5 mg de hIgG/mL e 2,0 mg de hIgG/mL em tampão NaP a pH 7,0 contendo 2 mmol L⁻¹ de imizadol foram recirculadas na coluna contendo o monolito. Os dados experimentais da cinética foram utilizados para a determinação do tempo de equilíbrio de adsorção. A Tabela 10 exhibe os valores dos tempos de equilíbrio obtidos para cada condição de concentração avaliada.

Tabela 10 – Tempos de equilíbrio (min) estimados para as concentrações de 0,5 mg hIgG mL⁻¹ e 2,0 mg hIgG mL⁻¹.

| Concentração (mg hIgG/mL) | Tempo de equilíbrio (min) |
|------------------------------|------------------------------|
| 0,5 | 15 |
| 2,0 | 20 |

Fonte: Autor (2021)

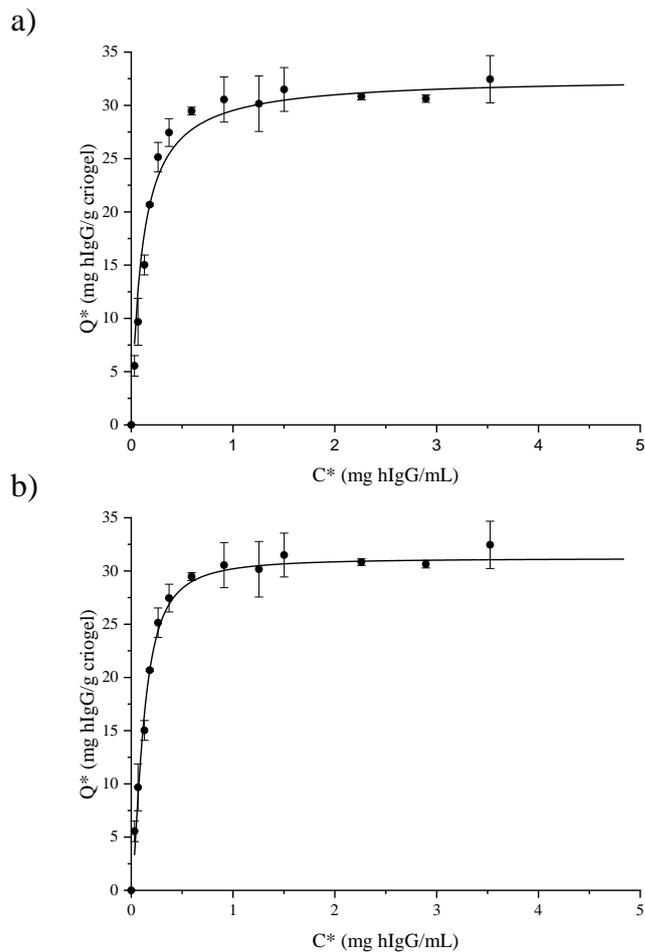
Observando os dados experimentais, o tempo de equilíbrio foi alcançado em aproximadamente 15 min para a concentração de 0,5 mg hIgG/mL e em 20 min para a concentração de 2,0 mg hIgG/mL. O alcance rápido na condição de equilíbrio pode ser atribuída à morfologia dos criogéis, os quais possuem macroporos que permitem o acesso da hIgG aos sítios de interações com os íons Ni²⁺ quelatados na superfície do material (DRAGAN *et al.*, 2017).

4.9. ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE hIgG

As isotermas de adsorção de hIgG no criogel monolítico de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ foram obtidas por meio de experimentos em batelada na melhor condição tamponante selecionada previamente (tampão NaP a pH 7,0 contendo 2 mmol L⁻¹ de imidazol), no equilíbrio, a 25 °C, como descrito no tópico 3.2.7. Por meio dos ajustes de parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, foram obtidas a capacidade máxima de adsorção (Q_m) e as constantes de dissociação (K_d e K_{d(LF)}) do complexo IDA-Ni²⁺-hIgG. Os pontos experimentais, a curva ajustada e os

valores dos parâmetros para cada modelo estudado encontram-se na Figura 41 e na Tabela 11, respectivamente.

Figura 41 – Dados experimentais de adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹) a 25 °C (●) e curvas ajustadas dos modelos de: a) Langmuir e b) Langmuir-Freundlich



Fonte: Autor (2021)

Tabela 11 - Parâmetros obtidos por meio do ajuste não-linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de hIgG em criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹) a 25 °C.

| Parâmetros | |
|---|---------------------|
| Q _m exp (mg hIgG/g criogel) | 31,84 |
| Langmuir | |
| Q _m calc (mg hIgG/g criogel) | 32,62 ± 0,52 |
| K _d (mol L ⁻¹) × 10 ⁶ | 0,11 ± 0,01 |
| R ² | 0,9762 |
| χ ² | 4,26 |
| Langmuir-Freundlich | |
| Q _m calc (mg hIgG/g criogel) | 31,19 ± 0,28 |
| K _{d(LF)} (mol L ⁻¹) × 10 ⁶ | 3,00E-02 ± 8,00E-03 |
| n | 1,61 ± 0,13 |
| R ² | 0,9933 |
| χ ² | 1,19 |

Fonte: Autor (2021)

Os valores para a capacidade máxima (Q_m) determinados pelos dois modelos foram similares ao valor de Q_m experimental, sendo iguais a 32,62 ± 0,52 mg hIgG/g criogel e 31,19 ± 0,28 mg hIgG/g criogel para os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich, respectivamente. Simultaneamente, ambos os modelos apresentaram R² > 0,97 e χ² > 1, entretanto, para o modelo de Langmuir-Freundlich, os valores para esses coeficientes indicaram melhor ajuste por estarem mais próximos de 1.

Em relação a K_d e K_{d(LF)}, os respectivos valores obtidos foram de 1,1 × 10⁻⁷ e 3,0 × 10⁻⁸ mol L⁻¹. Ambos os valores estão ligeiramente abaixo da faixa que caracteriza valores típicos de constante de dissociação de sistemas de pseudobioafinidade, de 10⁻² a 10⁻⁶ (VIJAYALAKSHMI, 1989), indicando alta afinidade entre a hIgG adsorvida e o criogel contendo íons Ni²⁺ quelatados. Comparativamente, Ribeiro *et al.* (2008) determinaram K_d do modelo de Langmuir para o complexo IDA-Ni²⁺-hIgG em membranas de poli(etileno vinil álcool) (PEVA) e obtiveram valores de ordem de grandeza entre 10⁻⁵ e 10⁻⁶ mol L⁻¹. Densidade de ligantes, concentração de proteínas, efeitos estéricos e acessibilidade das proteínas aos sítios de interação podem ter contribuído para a maior afinidade do complexo nos criogéis sintetizados neste trabalho, sendo comparáveis aos valores de K_d reportados por Knecht *et al.* (2008) iguais a 10⁻⁶ a

10^{-8} mol L⁻¹ em estudo da dissociação de oligopeptídeos compostos por *tags* de polihistidina em complexos NTA-Ni²⁺.

Em relação ao parâmetro *n* do modelo de Langmuir-Freundlich, o qual indica se existe heterogeneidade da superfície e cooperatividade entre as moléculas de hIgG, o valor obtido neste trabalho foi de $1,61 \pm 0,03$ ($n > 1$). Dessa forma, conclui-se que há ocorrência de interações proteína-proteína ou heterogeneidade da superfície. Devido à baixa força iônica do sistema tamponante utilizado, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e de coordenação com o quelato metálico podem estar ocorrendo entre o adsorvente e a hIgG. Ademais, há possibilidade da ocorrência de interações multiponto, nas quais um complexo IDA-Ni²⁺ captura mais de uma molécula de hIgG ou uma molécula de hIgG é adsorvida por mais de um complexo IDA-Ni²⁺. Dessa forma, desvios das suposições do modelo de Langmuir (adsorção do adsorbato ocorre em sítios de adsorção definidos; os sítios de adsorção são uniformes; cada sítio pode ser ocupado por apenas uma molécula do adsorbato em monocamada; não há interação lateral entre as moléculas adsorvidas) possivelmente ocorrem neste sistema, explicando o menor R² obtido para o modelo de Langmuir.

Bakhshpour *et al.* (2016) obtiveram capacidade de adsorção máxima teórica (Q_m) de 75,0 mg hIgG/g em criogéis de PHEMA-PEI-Cu²⁺. Prasanna, Kamalanathan & Vijayalahshmi (2015) sintetizaram discos monolíticos com histidina imobilizada para a purificação de hIgG e reportaram o valor de Q_m de 19.83 mg hIgG/mL disco e K_d na ordem de 10^{-6} para o disco de etilenodiamina (EDA). Naik, Raina & Lali (2011) produziram esferas de polimetacrilato com triptofano imobilizado como ligante de pseudobioafinidade para a purificação de hIgG. Os valores de Q_m e K_d obtidos pelos autores foi de 78 mg hIgG/mL gel e $5,31 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente. Bresolin, Bresolin & Bueno (2020) avaliaram as isotermas de adsorção de anticorpos monoclonais em membranas de PEVA-IDA e chegaram em valores de 71,7 mg/g adsorvente e $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para, respectivamente, Q_m e $K_{d(LF)}$ do modelo de Langmuir-Freundlich.

Concomitantemente, Hahn, Schlegel & Jungbauer (2003) obtiveram K_d na ordem de 10^{-8} mol L⁻¹ para adsorventes com proteína A como ligante para a purificação de hIgG. Ao contrário de íons metálicos imobilizados, aminoácidos e corantes, a

proteína A é um ligante bioespecífico, possuindo alta afinidade pelas moléculas de IgG, explicando os valores de K_d encontrados por esses autores.

No sistema tamponante utilizado, a capacidade máxima de adsorção do criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ pode ser considerada como intermediária em comparação a Q_m de outros adsorventes de IgG reportados na literatura. Entretanto, as constantes de dissociação obtidas mostram alta afinidade do complexo IDA-Ni²⁺-hIgG, quando comparados a outros ligantes pseudobioespecíficos para a captura de IgG.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, criogéis monolíticos de poliacrilamida e quitosana foram sintetizados, estudando o efeito da presença dos reagentes GA e AGE durante a síntese, além do efeito do tipo de solução de CS utilizada. Por meio dos grupos epóxi disponibilizados pelo AGE, foi possível imobilizar covalentemente o agente quelante IDA à estrutura do criogel. Ensaios de caracterizações físicas, morfológicas, mecânicas e visuais foram realizados para a seleção da melhor condição de síntese do criogel. De acordo com os resultados, o criogel sintetizado com quitosana de baixa massa molecular, 20 μL de GA e 200 μL de AGE foi o mais adequado para ser utilizado como fase estacionária em cromatografia de baixa pressão. Além disso, este criogel foi capaz de quelatar 472,76 e 33,71 μmol de íons Cu^{2+} e Ni^{2+} , respectivamente.

Em seguida, foram realizados estudos de adsorção de hIgG pré-purificada no criogel na presença ou não dos íons metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} em diferentes condições de adsorção e eluição. De acordo com os resultados obtidos, a natureza do tampão, íon metálico, força iônica e valor de pH afetaram diretamente nos resultados de adsorção e eluição da hIgG. As condições mais promissoras de adsorção foram empregadas em experimentos cromatográficos de purificação de hIgG a partir do soro humano.

Dentre os sistemas tamponantes avaliados e baseando-se em quantidades de proteínas totais adsorvidas e perfis eletroforéticos, foram selecionados o criogel contendo íons Ni^{2+} quelatados e o tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L^{-1}). A imunodifusão radial desta condição mostrou que a hIgG foi eluída da coluna com pureza de 88% e rendimento de 55%, exibindo potencial para a purificação da hIgG.

Na melhor condição tamponante, foram realizados experimentos para a curva de ruptura e experimentos cinéticos de adsorção de hIgG, sendo possível determinar parâmetros dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich. Os ensaios de adsorção de hIgG para construção das isotermas de adsorção mostraram que o modelo de Langmuir-Freundlich representou melhor os dados experimentais, com valor de Q_m igual a $31,19 \pm 0,28$ mg hIgG/ g criogel e $K_{d(LF)}$ igual a $3,00 \times 10^{-8}$ mol L^{-1} ($R^2 = 0,9933$ e $\chi^2 = 1,19$). Quando esses valores são comparados aos valores reportados na literatura, esses resultados mostram a alta afinidade do complexo IDA- Ni^{2+} -hIgG, apesar da capacidade máxima de adsorção possuir valor intermediário.

Portanto, pode-se dizer que o criogel constituído de PAAm, CS, GA, AGE e IDA imobilizado com íons Ni^{2+} quelatados possui potencial para ser utilizado como fase estacionária em cromatografia para purificação de hIgG a partir do soro humano. Além disso, o criogel preparado poderia ser testado como fase estacionária em cromatografia de afinidade utilizando outros ligantes e íons metálicos.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Por meio da análise dos resultados de síntese dos criogéis e de purificação da hIgG a partir do soro humano, percebe-se que determinados aspectos podem ser aprofundados em trabalhos subsequentes, tais como:

Síntese e caracterização do criogel de poliacrilamida-quitosana

Avaliar como a temperatura de congelamento interfere na criogelificação e nas características físicas do criogel; estudar composições de criogéis com diferentes concentrações quitosana; caracterizar o monolito quanto ao seu potencial zeta; testar outros íons metálicos quelatados, como Co^{2+} e Zn^{2+} , para verificar como influenciam na adsorção de hIgG no criogel; analisar o efeito de outros ligantes, como agentes quelantes, aminoácidos, corantes, etc. na adsorção de íons metálicos e proteínas no criogel.

Ensaio cromatográfico

Examinar diferentes sistemas tamponantes e avaliar o efeito do valor de pH, natureza do tampão, condutividade, entre outros, em mais condições; observar a purificação e separação de outras proteínas no criogel; avaliar o potencial de purificação de fragmentos de hIgG no criogel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKILBEKOVA, D.; SHAIMERDENOVA, M.; ADILOV, S.; BERILLO, D. Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 324-333, 2018.

AL-GHOUTI, M. A.; DA'ANA, D. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 39, p. 122383, 2020.

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

ALVARENGA, L. M.; DE MOURA, J.; BILLIALD, P. Recombinant Antibodies: Trends for Standardized Immunological Probes and Drugs. In: THOMAZ-SOCCOL, V.; PANDLEY, A.; RESENDE, R. R. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s. l.]. Elsevier, 2017, p. 97-121.

ANTHONSEN, M. W.; SMIDSRØD, O. Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced ¹H-NMR chemical shifts. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 303-305, 1995.

ANTHONSEN, M. W.; SMIDSRØD, O. Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced ¹H-NMR chemical shifts. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 4, p. 303-305, 1995.

ARNOLD, F. H. Metal-affinity Separations: A New Dimension in Protein Processing. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 151-156, 1991.

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

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

ARRUA, R. D.; TALEBI, M.; CAUSON, T. J.; HILDER, E. F. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 1–12, 2012.

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.

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

BAKHSHPUR, 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.

BAKHSHPUR, M.; BERELI, N.; ŞENEL, 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.

BAKHSHPUR, M.; IDIL, N.; PERÇİN, I.; DENIZLI, A. Biomedical Applications of Polymeric Cryogels. *Applied Sciences*, v. 9., n. 3, p. 553-575, 2019.

BARROSO, T.; HUSSAIN, A.; ROQUE, A. C. A.; AGUIAR-RICARDO, A. Functional monolithic platforms: Chromatographic tools for antibody purification. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 671–681, Jun. 2013.

BAYRAMOGLU, G.; SENEL, A. U.; ARICA, M. Y. Effect of spacer-arm and Cu(II) ions on performance of L-histidine immobilized on poly(GMA/MMA) beads as an affinity ligand for separation and purification of IgG. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p. 229-239, 2006.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**: 5ed, Nova York. W. H. Freeman, 2002.

BERTOLINI, J. The purification of plasma proteins for therapeutic use. In: SIMON, T. L.; MCCULLOUGH, J.; SNYDER, E. L.; SOLHEIM, B. G.; STRAUSS, R. G. **Rossi's Principles of Transfusion Medicine**. [s. l.] John Wiley & Sons, 2016, 302-320.

BIBI, N.S.; SINGH, N.K.; DSOUZA, R.N.; AASIM, M.; FERNÁNDEZ-LAHOURE, 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.

BIERMANN, C. J. **Handbook of Pulping and Papermaking**. 2nd ed. [s. l.]. Academic Press, 1996.

BLOCK, H.; MAERTENS, B. SPRIESTERBACH, A.; BRINKER, N.; KUBICEK, J.; FABIS, R.; LABAHN, J.; SCHÄFER, F. Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. In: BURGESS, R. R.; DEUTSCHER, M. R. **Methods in Enzymology**. [s. l.] Academic Press, v. 463, 2009, p. 439-473.

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. 225-232, 1995.

BOI, C.; MALAVASI, A.; CARBONELL, R. G.; GILLESKIE, G. A direct comparison between membrane adsorber and packed column chromatography performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, p. 460629.

BOOTH, R. J. Antibody Response: In: FRANK, G. *Encyclopedia of Stress*. [s. l.], Academic Press, 2007, p. 199-205.

BORLING, D.; CHAN, K.; HUGHES, T.; SYDNASK, R. Pushing out the oil with conformance control. **Oilfield Review**, v. 6, n. 2, p. 44-58, 1994.

BOWEN, A.; CASADEVALL, A. The Role of the Constant Region in Antibody-Antigen Interactions: Redefining the Modular Model of Immunoglobulin Structure. In: PUTTERMAN, C.; COWBURN, D.; ALMO, S. **Structural Biology in Immunology: Structure and Function of Novel Molecules of Immunologic Importance**. [s. l.] Academic Press, 2017, p. 145-170.

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.

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

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.; 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.

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.

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.

BUCHACHER, A.; CURLING, J. M. Current Manufacturing of Human Plasma Immunoglobulin G. In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, E.; ŁAČKI, K. GALLIHER, P. **Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes**. [s. l.], Elsevier, 2017, p. 857-876.

CALLERI, E.; AMBROSINI, S.; TEMPORINI, C.; MASSOLINI, G. New monolithic chromatographic supports for macromolecules immobilization: Challenges and opportunities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 64–76, 2012.

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

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; SILVA JR., 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.

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, p. 241-262, 2014.

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.

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.

CHEN, J. P.; WANG, C. H. Microfiltration Affinity Purification of Lactoferrin and Immunoglobulin G from Cheese Whey. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 701-706, 1991.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L.; MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J. N.; MELIN, M.; TAYLOR, H. L. Preparation and Properties of Serum Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 3, p. 459-475, 1946.

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

COOMBS, L. C.; MARGERUM, D. W.; NIGAM, P. C. Mechanism of Tetracyanonickelate Formation from Mono(aminocarboxylate)nickel (II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 2081-2087, 1970.

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

ÇORMAN, M. E.; ARMUTCU, C.; BERELI, N.; ELKAK, A. Histidine-epoxy-activated sepharose beads embedded poly(2-hydroxyethyl methacrylate) cryogels for pseudobiospecific adsorption of human immunoglobulin G. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 54, n. 12, p. 915-922, 2017.

DAINIYAK, M. B.; KUMAR, A.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 93-98, 2004.

DAINIYAK, M. B.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Cell Chromatography: Separation of Different Microbial Cells Using IMAC Supermacroporous Monolithic Columns. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 644-649, 2005.

DARNELL, M. C.; SUN, J. Y.; MEHTA, M.; JOHNSON, C.; ARANY, P. R.; SUO, Z.; MOONEY, D. J. Performance and biocompatibility of extremely tough alginate/polyacrylamide hydrogels. **Biomaterials**, v. 34, p. 8042-8048, 2013.

DAVRANCHE, M.; LACOUR, S.; BORDAS, F.; BOLLINGER, J-C. An Easy Determination of the Surface Chemical Properties of Simple and Natural Solids. **Journal of Chemical Education**, v. 80, n. 1, p. 73-78, 2003.

DINÇER, B.; MUSTAFAEV, M. I.; BAYÜLKEN, S. High-Performance Liquid Chromatography Study of Water-Soluble Ternary Polyacrylamide-Metal-Protein Complexes. **Journal of applied polymer science**, v. 65, n. 1, p. 37-40, 1997.

DINU, M. V.; DINU, I. A.; LAZAR, M. M.; DRAGAN, E. S. Chitosan-based ion imprinted cryo-composites with excellent selectivity for copper ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 140-149, 2018.

DRAGAN, E. S.; DINU, M. V. Advances in porous chitosan-based composite hydrogels: Synthesis and applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 146, p. 104372, 2020.

DRAGAN, E. S.; HUMELNICU, D.; DINU, M. V. Development of chitosan-poly(ethyleneimine) based double network cryogels and their application as superadsorbents for phosphate. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 17-25, 2019.

DRAGAN, E. S.; HUMELNICU, D.; DINU, M. V.; OLARIU, R. I. Kinetics, equilibrium modeling, and thermodynamics on removal of Cr(VI) ions from aqueous solution using novel composites with strong base anion exchanger microspheres embedded into chitosan/poly(vinyl amine) cryogels. **Chemical Engineering Journal**, v. 333, p. 675-691, 2017.

DRAGAN, E. S.; LAZAR, M. M.; DINU, M. V.; DOROFTEI, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 204-206, p. 198-209, 2012.

DRAGAN, E. S.; PERJU, M. M.; DINU, M. V. Preparation and characterization of IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and chitosan and their interaction with ionic dyes. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 270-281, 2012.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9-14, 2015.

EL RASSI, Z.; HORVÁTH, C. Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminoacetic acid-bonded stationary phases on silica support. **Journal of Chromatography**, v. 359, p. 241-253, 1986.

ERNST-CABRERA, K.; WILCHEK, M. Polymeric supports for affinity chromatography and high-performance affinity chromatography. **Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia**, v. 19, n. 1, p. 145-154.

EROL, K.; BOLAT, M.; TATAR, D.; NIGIZ, C.; KÖSE, D. A. Synthesis, characterization and antibacterial application of silver nanoparticle embedded composite cryogels. **Journal of Molecular Structure**, v. 1200, p. 1-8, 2020.

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

EVLI, S.; ORHAN, H.; AKTAŞ, P. S.; UYGUN, M.; UYGUN, D. A. Metal-chelated cryogels for amyloglucosidase adsorption: application for continuous starch hydrolysis. **Bulletin of Materials Science**, v. 41, p. 140-148, 2018.

ERZENGIN, M.; ÜNLÜ, N.; ODABAS, M. A novel adsorbent for protein chromatography: Supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu²⁺-attached sporopollenin particles. **Journal of Chromatography A**, v. 218, p. 484–490, 2011.

FAN, J.; BOI, C.; LEMMA, S. M.; LAVOIE, J.; CARBONELL, R. G. Iminodiacetic Acid (IDA) Cation-Exchange Nonwoven Membranes for Efficient Capture of Antibodies and Antibody Fragments. **Membranes**, v. 11, p. 530-545, 2021.

FIORAVANTE, I. F. Criogel Monolítico de PAAm-Alg-AGE-IDA: Efeito dos Íons Metálicos Cobre e Níquel na Adsorção de IgG Bovina. 2021. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2021.

FREITAS, S. S. Despirogenação de Soro Antiofídico: Adsorção Seletiva em Membrana de Quitosana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n.1-3, p. 335-360, 2001.

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

GAMA, M. R.; ROCHA, F. R. P.; BOTTOLI, C. B. G. Monoliths: Synthetic routes, functionalization and innovative analytical applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 115, p. 39-51, 2019.

GARCÍA-GONZÁLEZ, A.; ZAVALA-ARCE, R. E.; ÁVILA-PÉREZ, P.; RANGEL-VAZQUEZ, N. A.; SALAZAR-RÁBAGO, J. J.; GARCÍA-RIVAS, J. L.; GARCÍA-

GAITÁN, B. Experimental and theoretical study of dyes adsorption process on chitosan-based cryogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 75-84, 2021.

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

Global Monoclonal Antibodies (MAbS) Market Report (2021-2030): COVID-19 Impact and Recovery – ResearchAndMarkets.com. Business Wire, Dublin, 30 de julho de 2021. Disponível em: <<https://www.businesswire.com/news/home/20210730005194/en/Global-Monoclonal-Antibodies-MAbS-Market-Report-2021-2030-COVID-19-Impact-and-Recovery---ResearchAndMarkets.com>> Acesso em: 09 de setembro de 2021.

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. 1123-1134, 2020.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; NAVARRO, R. Metal ion biosorption on chitosan for the synthesis of advanced materials. **Journal of Material Science**, v. 49, p. 5505-5518, 2014.

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

GUO, J.; LIN, H.; WANG, J.; LIN, Y.; ZHANG, T.; JIANG, Z. Recent advances in bio-affinity chromatography for screening bioactive compounds from natural products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, p. 182–197, 2019.

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

GUVEN, M. N.; DEMIRCI, G.; ALTUNCU, S.; GULYUZ, U.; OKAY, O.; ACAR, H. Y.; AVCI, D. Alendronate-functionalized poly(amido amine) cryogels of high toughness for biomedical applications. **Polymer**, v. 190, p. 122248, 2020.

HAGE, D. S.; ANGUIZOLA, J. A.; LI, R.; MATSUDA, R.; PAPASTAVROS, E.; PFAUNMILLER, E.; SOBANSKY, M.; ZHENG, X. Affinity chromatography. In: **Liquid Chromatography (Second Edition)**. 2nd ed. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 319–341.

HAHN, R.; SCHLEGEL, R.; JUNGBAUER, A. Comparison of protein A affinity sorbents. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 35-51, 2003.

HARRISON, H. H. Patient-Specific Microheterogeneity Patterns of Monoclonal Immunoglobulin Light Chains and Revealed by High Resolution, Two-Dimensional Electrophoresis. **Clinical Biochemistry**, v. 25, p. 235-243, 1992.

HEADS, J. T.; ADAMS, R.; D'HOOGHE, L. E.; PAGE, M. J. T.; HUMPHREYS, D. P.; POPPLEWELL, A. G.; LAWSON, A. D.; HENRY, A. J. Relative stabilities of IgG1 and IgG4 Fab domains: Influence of the light-heavy interchain disulfide bond architecture. **Protein Science**, v. 21, n. 9, p. 1315-1322, 2012.

HENDERSON, T. M. A.; LADEWIG, K.; HAYLOCK, D. N.; MCLEAN, K. M.; O'CONNOR, A. J. Cryogels for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 21, p. 2682, 2013.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 3^a ed. Academic Press, 2013.

HINOJOSA, C. D. Silk Cryogels in Microfluidics. 2012. 78 f. Dissertação (Master of Science in Mechanical Engineering) – Portland State University, Portland, 2012.

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

HOUSE, J. E. **Inorganic Chemistry**: 3ed. [s. l.], Academic Press, 2020.

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

INCI, I.; KIRSEBOM, H.; GALAEV, I. G.; MATIASSON, B.; PISKIN, E. Gelatin cryogels crosslinked with oxidized dextran and containing freshly formed hydroxyapatite as potential bone tissue-engineering scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 7, n. 7, p. 584-588, 2012.

IRVING, H.; WILLIAMS, R. J. P. The stability of transition-metal complexes. **Journal of the Chemical Society**, p. 3192-3210, 1953.

JAIN, E.; DAMANIA, A.; SHAKYA, A. K.; KUMAR, A.; SARIN, S. K.; KUMAR, A. Fabrication of macroporous cryogels as potential hepatocyte carriers for bioartificial liver support. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 761–771, 2015.

JAIN, E.; KARANDE, A. A.; KUMAR, A. Supermacroporous polymer-based cryogel bioreactor for monoclonal antibody production in continuous culture using hybridoma cells. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 170–180, 2011.

JAIN, E.; KUMAR, A. Designing Supermacroporous Cryogels Based on Polyacrylonitrile and a Polyacrylamide–Chitosan Semi-interpenetrating Network. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 20, n. 7-8, p. 877–902, 2009.

KAR, S.; KAUR, T.; THIRUGNANAM, A. Microwave-assisted synthesis of porous chitosan-modified montmorillonite-hydroxyapatite composite scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 628-636, 2016.

KATHURIA, N.; TRIPATHI, A.; KAR, K. K.; KUMAR, K. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. **Acta Biomaterials**, v. 5, p. 406-418, 2009.

KHÖR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.

KISTLER, P.; NITSCHMANN, H. Large Scale Production of Human Plasma Fractions: Eight Years Experience with the Alcohol Fractionation Procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier. **Vox Sanguinis**, v. 7, n. 4, p. 414-424, 1962.

KNECHT, S.; RICKLIN, D.; EBERLE, A. N.; ERNST, B. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. **Journal of Molecular Recognition**, v. 22, p. 270-279, 2009.

KRULJEC, N.; BRATKOVIČ, T. Alternative Affinity Ligands for Immunoglobulins. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, p. 2009-2030, 2017.

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.

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

KUTLUSOY, T.; OKTAY, B.; APOHAN, N. K.; SÜLEYMANOĞLU, M.; KURUCA, S. E. Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 366–378, 2017.

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

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

LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 48-63, 2007.

LOZINSKY, V. I. ChemInform Abstract: Cryogels on the Basis of Natural and Synthetic Polymers: Preparation, Properties and Applications. **ChemInform**, v. 33, n. 47, 2010.

LOZINSKY, V. I. Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 71, n. 6, p. 489-511, 2002.

LOZINSKY, V. I. Polymeric cryogels as a new family of macroporous and supermacroporous materials for biotechnological purposes. **Russian Chemical Bulletin**, v. 57, n. 5, p. 1015-1032, 2008.

LOZINSKY, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 445-451, 2003.

LOZINSKY, V. I.; PLIEVA, F. M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation**, v. 10, p. 163-188, 2002.

LOZINSKY, V. I.; ZUBOV, A. L.; TITOVA, E. F. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 2. Entrapped cells resemble porous fillers in their effects on the properties of PVA-cryogel carrier. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 182-190, 1997.

LÜ, X.; 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.

LUO, Q.; ZOU, H.; XIAO, X.; GUO, Z.; KONG, L.; MAO, X. Chromatographic separation of proteins on metal immobilizes iminodiacetic acid-bound molded monolithic rods of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 225-264, 2001.

LYNCH, K. B.; REN, J.; BECKNER, M. A.; HE, C.; LIU, S. Monolith columns for liquid chromatographic separations of intact proteins: A review of recent advances and applications. *Analytica Chimica Acta*, v. 1046, p. 48-68, 2019.

MAKKLIANG, F.; KANATHARANA, P.; THARAVANGKUL, P.; THAMMAKHET-BURANACHAI, C. A polypyrrole-chitosan cryogel stir-bead micro-solid phase extractor for the determination of phthalate esters in contact lenses storage solutions and in artificial saliva in contact with baby teethers. **Analytica Chimica Acta**, v. 985, p. 69-78, 2017.

MARCUZ, C. Adsorção de IgG Humana no Criogel Monolítico de Acrilamida-Alginato-Alil-O-Fosto-L-Tirosina. 2019. 98 f. 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 phosphor-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, p. 122530, 2021.

MARTÍNEZ-MEJÍA, G.; VÁZQUEZ-TORRES, N. A.; CASTELL-RODRÍGUEZ, A.; del RÍO, J. M.; COREA, M.; JIMÉNEZ-JUÁREZ, R. Synthesis of new chitosan-glutaraldehyde scaffolds for tissue engineering using Schiff reactions. **Colloids and Surfaces A**, v. 579, p. 123658, 2019.

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

MEHTA, K. K.; VEDANTHAM, G. Next-Generation Process Design for Monoclonal Antibody Purification. In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, E.; ŁĄCKI, K. GALLIHER, P. **Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes**. [s. l.], Elsevier, 2017, p. 793-811.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759–769, 2011.

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.

MONTEIRO JR.; O. A. C.; AIROLDI, C. Some Thermodynamic Data on Copper-Chitin and Copper-Chitosan Biopolymer Interactions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 212, p. 212-219, 1999.

MOONEY, J. T.; FREDERICKS, D. P.; CHRISTENSEN, T.; SCHIØDT, C. B.; HEARN, M. T. W. N-terminal processing of affinity-tagged recombinant proteins purified by IMAC procedures. **Journal of Molecular Recognition**, v. 28, n. 7, p. 401-412, 2015.

MOONEY, J. T.; FREDERICKS, D. P.; HEARN, M. T. Use of phage display methods to identify heptapeptide sequences for use as affinity purification ‘tags’ with novel chelating ligands in immobilized metal ion affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 92-99.

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

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

MOURÃO, C. A.; MARCUZ, C.; HAUPT, K.; BUENO, S. M. A. Polyacrylamide-alginate (PAAm-Alg) and phospho-L-tyrosine-linked PAAm-Alg monolithic cryogels: Purification of IgG from human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 1129, p. 121783, 2019.

MURPHY, C.; DEVINE, T.; O’KENNEY, R. Technologies advancements in antibody purification. **Antibody Technology Journal**, v. 6, p. 17-32, 2016.

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

NAKAGAWA, G.; WADA, H.; FUJITA, Y. Calmagite: The Formation Constants of Zinc(II) Chelates and Its Use as a Metal Indicator. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 46, p. 489-493, 1973.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**: 4ed, Nova York, W. H. Freeman, 2005.

NILSEN-NYGAARD, J.; STRAND, S. P.; VÅRUM, K. M.; DRAGET, K. I.; NORDGÅRD, C. T. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. **Polymers**, v. 7, p. 552-579, 2015.

ODABAS, S.; FEICHTINGER, G. A.; KORKUSUZ, P.; INCI, I.; BILGIC, E.; YAR, A. S.; CAVUSOGLU, T.; MENEVSE, S.; VARGEL, I.; PISKIN, E. Auricular cartilage repair using cryogel scaffolds loaded with BMP-7 expressing primary chondrocytes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 7, n. 10, p. 831-840, 2013.

ONCLEY, J. L.; MELIN, M.; CAMERON, J. W.; GROSS, P. M., Jr. The Separation of the Antibodies, Isoagglutinins, Prothrombin Plasminogen and β 1-Lipoprotein into Subfractions of Human Plasma. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 2, p. 541-550, 1949.

ONO, K.; SAITO, Y.; YURA, H.; ISHIKAWA, K.; KURITA, A.; AKAIKE, T.; ISHIHARA, M. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 49, n. 2, p. 289–295, 2000.

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.

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

PEARSON, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533–3539, 1963.

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.

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

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

PFAUNMILLER, E. L.; PAULEMOND M. L.; DUPPER, C. M.; HAGE, D. S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 7, p. 2133–2145, 2012.

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.; KARLSSON, M.; AGUILAR, M. R.; GOMEZ, D.; MIKHALOVSKY, S.; GALAEV, I. Y. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. **Soft Matter**, v. 1, p. 303-309, 2005.

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

PLIEVA, F.; BOBER, B.; DAINIAK, M.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Macroporous polyacrylamide monolithic gels with immobilized metal affinity ligands: The effect of porous structure and ligand coupling chemistry on protein binding. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, p. 305-312, 2006.

PORATH, J. High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. **Journal of Chromatography**, v. 443, p. 3-11, 1988.

PORATH, J. IMAC – Immobilized metal ion affinity-based chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 7. n. 7, p. 254-259, 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, n. 5536, p.

598-599, 1975.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. **Biochemistry**, v. 22, n. 7, p. 1621-1630, 1983.

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, n. 3, 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 and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 39-55, 2010.

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

PRZYBYCIEN, T. M.; PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 469-478, 2004.

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.

RAY, S. S.; GUSAIN, R.; KUMAR, N. Chapter five – Adsorption equilibrium isotherms, kinetics and thermodynamics. In: RAY, S. S.; GUSAIN, R.; KUMAR, N. **Micro and Nano Technologies, Carbon Nanomaterials-Based Adsorbents for Water Purification** [s.l.] Elsevier, 2020, p. 101-118.

REYNOLDS, T. D.; RICHARDS, P. A. **Unit Operations and Processes in Environmental Engineering**. Boston: PWS Pub. Co, 1996.

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.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 639–654, 2007.

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.

SHARMA, M.; TAVARES, A. P. M.; NUNES, J. C.; 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, n. 15, p. 3491-3511, 2002.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: A Comparative Analysis Using Various Isotherm Models. **Analytical Biochemistry**, v. 288, p. 126-140, 2001.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Interactions of Proteins with Immobilizes Metal Ions: Role of Ionic Strength and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 61-72, 2001.

SHUKLA, A. A.; HUBBARD, B.; TRESSEL, T.; GUHAN, S.; LOW, D. Downstream processing of monoclonal antibodies – Application of platform approaches. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 28-39, 2007.

SILVA, L. C. A.; SERRACCHIANI, M. M.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Separation of human Fab fragments on negative move Ni(II)-TREN-agarose chromatography. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 715-723, 2014.

SIMONIN, J-P. On the comparison of pseudo-first order and pseudo-second order rate laws in the modeling of adsorption kinetics. **Chemical Engineering Journal**, v. 300, p. 254-263, 2016.

SINGH, N. K.; DSOUZA, R. N.; GRASSELLI, M.; FERNANDEZ-LAHOIRE, M. High capacity cryogel-type adsorbents for protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 143–148, 2014.

SOWWAN, M.; MAKHARZA, S.; SULTAN, W.; GHABBOUN, J.; TEIR, M. A.; DWEIK, H. Analysis, characterization and some properties of polyacrylamide-Ni(II) complexes. **International Journal of Physical Sciences**, v. 6, n. 27, p. 6280-6285, 2011.

STEFANOV, I.; PÉREZ-RAFAEL, S.; HOYO, J.; CAILLOUX, J.; PÉREZ, O. O. S.; HINOJOSA-CABALLERO, D.; TZANOV, T. Multifunctional Enzymatically Generated Hydrogels for Chronic Wound Application. **Biomacromolecules**, v. 18, p. 1544-1555, 2017.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1985.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. **BioEssays**, v. 10, n. 5, p. 170-175, 1989.

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

SUN, L.; FENG, X.; ZHONG, T.; ZHANG, X. Preparation of supermacroporous cryogels with improved mechanical strength for efficient purification of lysozyme from chicken egg white. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 15, p. 3315-3326, 2020.

SUN, S.; TANG, Y.; FU, Q.; LIU, X.; DU, W.; GUO, L.; ZHAO, Y. Preparation of agarose/chitosan composite supermacroporous monolithic cryogels for affinity purification of glycoproteins. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 893-890, 2012.

THÖMMES, J.; ETZEL, M. Alternatives to Chromatographic Separations.

Biotechnology Progress, v. 23, n. 1, p. 42-45, 2007.

TIE, Y.; CALONDER, C.; VAN TASSEL, P. R. Protein Adsorption: Kinetics and history dependence. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 268, p. 1-11, 2003.

TIEN, C. Chapter 3 – Adsorption Equilibrium Relationships, Isotherms Expressions, Their Determinations, and Predictions. In: TIEN, C. **Introduction to Adsorption**. Elsevier, 2019, p. 23-85.

TISHCHENKO, G.; DYBAL, J.; MÉSZÁROSOVÁ, K.; SEDLÁKOVÁ, Z.; BLEHA, M. Purification of the specific immunoglobulin G₁ by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters). **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 115-126, 2002.

TISHCHENKO, G.; HODROVÁ, B.; ŠIMŮNEK, J.; BLEHA, M. Nickel and copper complexes of a chelating methacrylate sorbent in the purification of chitinases and specific immunoglobulin G₁ by immobilized metal ion affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 983, p. 125-132, 2003.

TODOROVA-BALVAY, D.; PITIOT, O.; BOURHIM, M.; SRIKRISHNAN, T.; VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. **Journal of Chromatography B**, v. 808, p. 57-62, 2004.

TURNER, R. J. **Immunology: A comparative approach**. 1ed. [s. l.]: Wiley-Blackwell, 1994.

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

VANÇAN, S.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. 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.

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by

chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2004.

VELOSO, C. H.; FILIPPOV, L. O.; FILIPPOVA, I. V.; OUVRARD, S.; ARAUJO, A. C. Adsorption of polymers onto iron oxides: Equilibrium isotherms. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n. 1, p. 779-788, 2020.

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

WANG, Y.; QIAN, J.; ZHAO, N.; LIU, T.; XU, W.; SUO, A. Novel hydroxyethyl chitosan/cellulose scaffolds with bubble-like porous structure for bone tissue engineering, **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 44-51, 2017.

WONG, J. W.; ALBRIGHT, R. L.; WANG, N. H. L. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications. **Separation and Purification Methods**, v. 20, n. 1, p. 49-106, 1991.

WOOF, J. M. Immunoglobulin-Fc Receptor Interactions. In: BRADSHAW, R. A.; DENNIS, E. A. **Handbook of Cell Signaling**. [s.l.], Academic Press, 2009, p. 41-48.

WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Kinetic modelling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. **Water Research**, v. 35, n. 3, p. 613-618, 2001.

YANG, X. DEBELI D. K.; SHAN, G.; PAN, P. Selective adsorption and high recovery of La³⁺ using graphene oxide/poly (N-isopropyl acrylamide-maleic acid) cryogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122335, 2020.

YAVAŞER, R.; KARAGÖZLER, A. A. Reactive Green 5-Decorated Polyacrylamide/Chitosan Cryogel: An Affinity Matrix for Catalase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 1191-1206, 2020.

YAVUZ, H.; BERELI, N.; ARMUTÇU, C.; YILMAZ, F.; DENIZLI, A. Antibody Purification from Human Plasma by Metal-Chelated Affinity Membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, p. 3476-3484, 2012.

ZACHARIOU, M.; HEARN, M. T. W. Adsorption and selectivity characteristics of several human serum proteins with immobilised hard Lewis metal ion-chelate adsorbents. **Journal of Chromatography A**, v. 890, n. 1, p. 95-116, 2000.

ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E. Membrane Chromatography: Preparation and Applications to Protein Separation. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 6, p. 1003–1019, Mar. 1999.

ZHANG, H. LIU, C.; CHEN, L.; DAI, B. Control of ice crystal growth and its effect on porous structure of chitosan cryogels. **Chemical Engineering Science**, v. 201, p. 50–57, 2019.

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, n. 4, p. 1671-1679, 2019.

APÊNDICE A. BALANÇOS DE MASSA DE CROMATOGRAFIAS COM hIgG PRÉ-PURIFICADA

A.1 – Criogel de PAAm-CS_{LM}-GA(20) (Controle) em diferentes sistemas tamponantes

Tabela A.1. 1 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0 e tampão MES a pH 5,50 (25 mmol L⁻¹). Leito: 3,0 mL. Eluição: Respectivo tampão + NaCl (1,0 mol L⁻¹). Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS pH 7,0 | | Tris-HCl pH 7,0 | | NaP pH 7,0 | | MES pH 5,5 | |
|---------|-------------|--------|-----------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 1,95 ± 0,20 | 100,00 | 1,68 ± 0,14 | 100,00 | 2,62 ± 0,27 | 100,00 | 2,19 ± 0,16 | 100,00 |
| L | 1,74 ± 0,18 | 89,37 | 1,80 ± 0,11 | 106,88 | 2,80 ± 0,26 | 106,79 | 2,09 ± 0,05 | 95,28 |
| E | 0,08 ± 0,00 | 4,18 | 0,01 ± 0,00 | 0,43 | 0,02 ± 0,00 | 0,88 | 0,12 ± 0,01 | 5,60 |
| Rec. | 1,82 ± 0,18 | 93,55 | 1,80 ± 0,11 | 107,31 | 2,82 ± 0,27 | 107,67 | 2,21 ± 0,07 | 100,89 |

A.2 – Criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA, PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺ e PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺ em diferentes condições de eluição, natureza do tampão e pH

Tabela A.2. 1 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS a pH 6,5 e 7,0, Tris-HCl e NaP a pH 7,0, tampão MES a pH 5,50. Leito: 3,0 mL de PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Eluição: Respectivo tampão + NaCl (1,0 mol L⁻¹). Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS pH 7,0 | | Tris-HCl pH 7,0 | | NaP pH 7,0 | | MES pH 5,5 | | MOPS pH 6,5 | |
|---------|-------------|--------|-----------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 2,22 ± 0,10 | 100,00 | 1,81 ± 0,05 | 100,00 | 2,56 ± 0,28 | 100,00 | 1,83 ± 0,10 | 100,00 | 2,78 ± 0,30 | 100,00 |
| L | 0,67 ± 0,11 | 29,99 | 1,08 ± 0,05 | 59,67 | 2,30 ± 0,08 | 89,71 | 0,02 ± 0,00 | 1,07 | 0,31 ± 0,02 | 11,13 |
| E | 1,37 ± 0,01 | 61,53 | 0,87 ± 0,02 | 47,79 | 0,26 ± 0,03 | 10,05 | 1,90 ± 0,07 | 103,48 | 2,56 ± 0,25 | 92,08 |
| Rec. | 2,04 ± 0,11 | 91,52 | 1,95 ± 0,05 | 107,46 | 2,55 ± 0,11 | 99,76 | 1,92 ± 0,07 | 104,54 | 2,87 ± 0,23 | 103,21 |

Tabela A.2. 2 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0. Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Eluição: Tampão acetato a pH 4,0 (25 mmol L⁻¹). Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS | | Tris-HCl | | NaP | |
|---------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 2,22 ± 0,11 | 100,00 | 2,14 ± 0,14 | 100,00 | 2,38 ± 0,23 | 100,00 |
| L | 0,07 ± 0,01 | 2,94 | 0,00 ± 0,00 | 0,17 | 0,12 ± 0,07 | 5,66 |
| E | 0,14 ± 0,01 | 6,33 | 0,08 ± 0,05 | 3,86 | 0,08 ± 0,06 | 3,40 |
| R | 2,16 ± 0,10 | 97,45 | 2,21 ± 0,10 | 103,01 | 2,34 ± 0,10 | 98,17 |
| Rec. | 2,36 ± 0,10 | 106,72 | 2,29 ± 0,15 | 107,04 | 2,54 ± 0,24 | 107,23 |

Tabela A.2. 3 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹). Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-

IDA-Cu²⁺. Eluição: Respetivo tampão + imidazol (100 mmol L⁻¹). Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS | | Tris-HCl | | NaP | |
|---------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 2,05 ± 0,21 | 100,00 | 1,93 ± 0,01 | 100,00 | 2,14 ± 0,19 | 100,00 |
| L | 0,35 ± 0,18 | 16,82 | 0,07 ± 0,01 | 3,64 | 0,93 ± 0,06 | 43,45 |
| E | 1,35 ± 0,00 | 65,84 | 1,58 ± 0,07 | 81,74 | 1,11 ± 0,16 | 52,00 |
| R | 0,50 ± 0,00 | 24,21 | 0,23 ± 0,06 | 11,67 | 0,24 ± 0,01 | 11,03 |
| Rec. | 2,19 ± 0,18 | 106,86 | 1,87 ± 0,03 | 97,05 | 2,28 ± 0,21 | 106,48 |

Tabela A.2. 4 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS, Tris-HCl e NaP a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹). Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Eluição: Respetivo tampão + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (100 mmol L⁻¹). Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS | | Tris-HCl | | NaP | |
|---------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 2,12 ± 0,38 | 100,00 | 2,25 ± 0,10 | 100,00 | 2,12 ± 0,09 | 100,00 |
| L | 1,62 ± 0,30 | 76,01 | 0,57 ± 0,02 | 25,43 | 1,80 ± 0,06 | 85,15 |
| E | 0,50 ± 0,14 | 23,68 | 1,52 ± 0,09 | 67,75 | 0,45 ± 0,02 | 21,07 |
| R | 0,08 ± 0,05 | 3,57 | 0,12 ± 0,01 | 5,44 | 0,06 ± 0,06 | 2,60 |
| Rec. | 2,19 ± 0,48 | 103,26 | 2,22 ± 0,10 | 98,62 | 2,30 ± 0,09 | 108,83 |

Tabela A.2. 5 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampão MOPS a pH 6,5. Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Eluição: MOPS a pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹) ou tampão acetato de sódio a pH 4,0. Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS pH 6,5 + Imidazol (100 mmol L ⁻¹) | | Acetato pH 4,0 (25 mmol L ⁻¹) | |
|---------|--|--------|--|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 2,53 ± 0,21 | 100,00 | 2,10 ± 0,48 | 100,00 |
| L | 0,04 ± 0,00 | 1,76 | 0,03 ± 0,01 | 1,30 |
| E | 2,20 ± 0,15 | 86,89 | 0,12 ± 0,08 | 5,62 |
| R | 0,33 ± 0,05 | 13,00 | 2,00 ± 0,41 | 95,43 |
| Rec. | 2,57 ± 0,48 | 101,65 | 2,15 ± 0,51 | 102,35 |

Tabela A.2. 6 - Cromatografia hIgG pré-purificada em tampões MOPS a pH 6,5 e 7,0, Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹), NaP a pH 7,0 +

imidazol (2 mmol L⁻¹). Leito: 3,0 mL de criogel de PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Eluição: Respectivo tampão + imidazol (100 mmol L⁻¹) ou acetato de sódio a pH 4,0. Regeneração: EDTA a pH 7,0. Quantificação pela metodologia de Bradford (1976). PT: Proteínas Totais; I: Injeção; L: Lavagem; E: Eluição; R: Regeneração; Rec.: Recuperação.

| Frações | MOPS pH 7,0 | | Tris-HCl pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L ⁻¹) | | NaP pH 7,0 | | MOPS pH 7,0 (E: acetato) | | MOPS pH 6,5 | |
|-------------|-------------|--------|---|--------|-------------|--------|--------------------------|--------|-------------|--------|
| | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % | PT (mg) | % |
| I | 2,35 ± 0,31 | 100,00 | 2,17 ± 0,16 | 100,00 | 2,89 ± 0,24 | 100,00 | 2,26 ± 0,05 | 100,00 | 2,45 ± 0,13 | 100,00 |
| L | 0,45 ± 0,09 | 19,19 | 2,00 ± 0,05 | 92,53 | 1,52 ± 0,04 | 52,55 | 0,50 ± 0,02 | 21,92 | 0,23 ± 0,03 | 9,58 |
| E | 1,65 ± 0,24 | 70,26 | 0,02 ± 0,02 | 0,75 | 1,32 ± 0,21 | 45,68 | 0,38 ± 0,06 | 16,68 | 1,91 ± 0,04 | 77,87 |
| R | 0,38 ± 0,01 | 15,98 | 0,13 ± 0,06 | 5,80 | 0,20 ± 0,02 | 6,93 | 1,47 ± 0,04 | 64,85 | 0,25 ± 0,04 | 10,11 |
| Rec. | 2,48 ± 0,34 | 105,43 | 2,15 ± 0,00 | 99,08 | 3,04 ± 0,27 | 105,16 | 2,34 ± 0,00 | 103,45 | 2,39 ± 0,10 | 97,57 |

APÊNDICE B. CROMATOGRAMAS, BALANÇOS DE MASSA E ELETROFORESES DOS ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS REALIZADOS COM SORO HUMANO

Figura B. 1 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0; W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0; E - Eluição: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana.

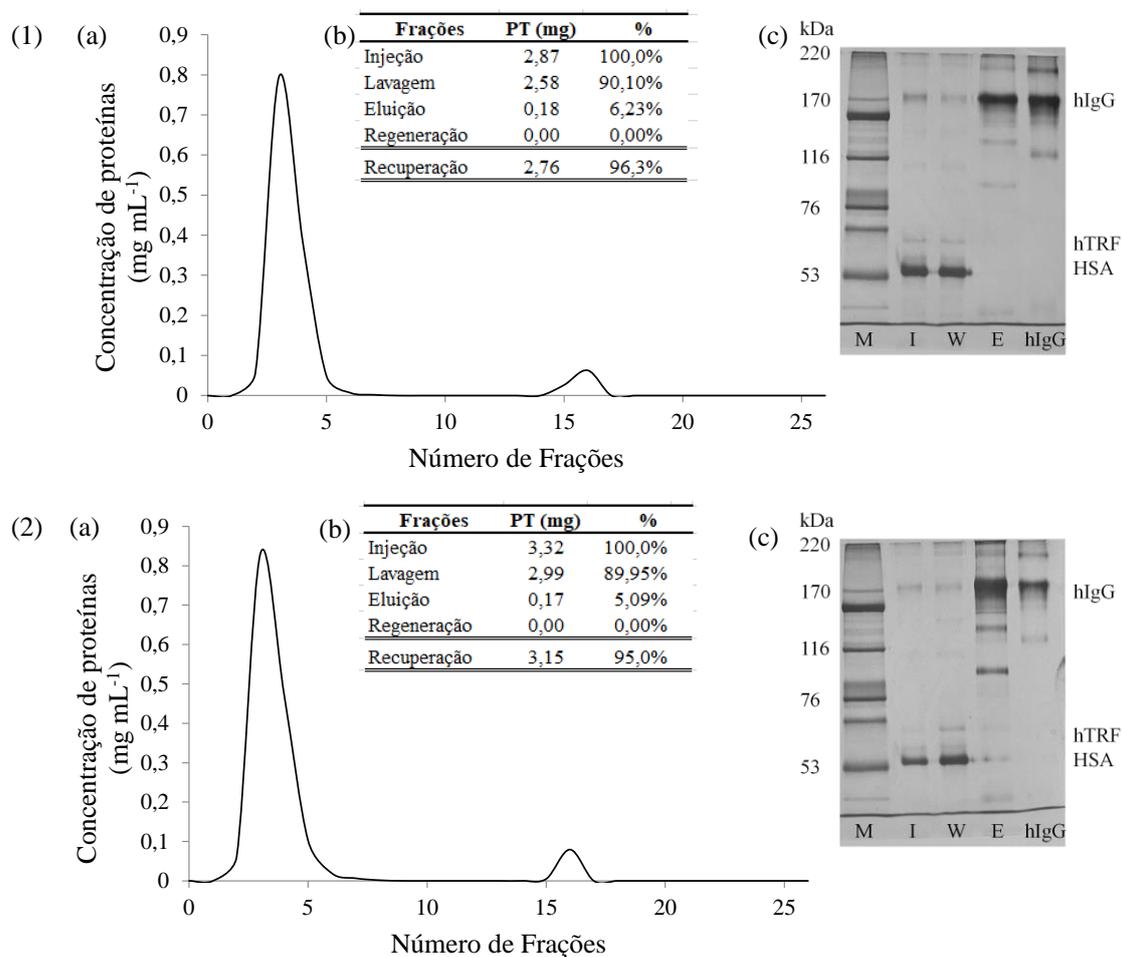


Figura B. 2 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão Tris-HCl a pH 7,0; W - Lavagem: Tampão Tris-HCl a pH 7,0; E - Eluição: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana.

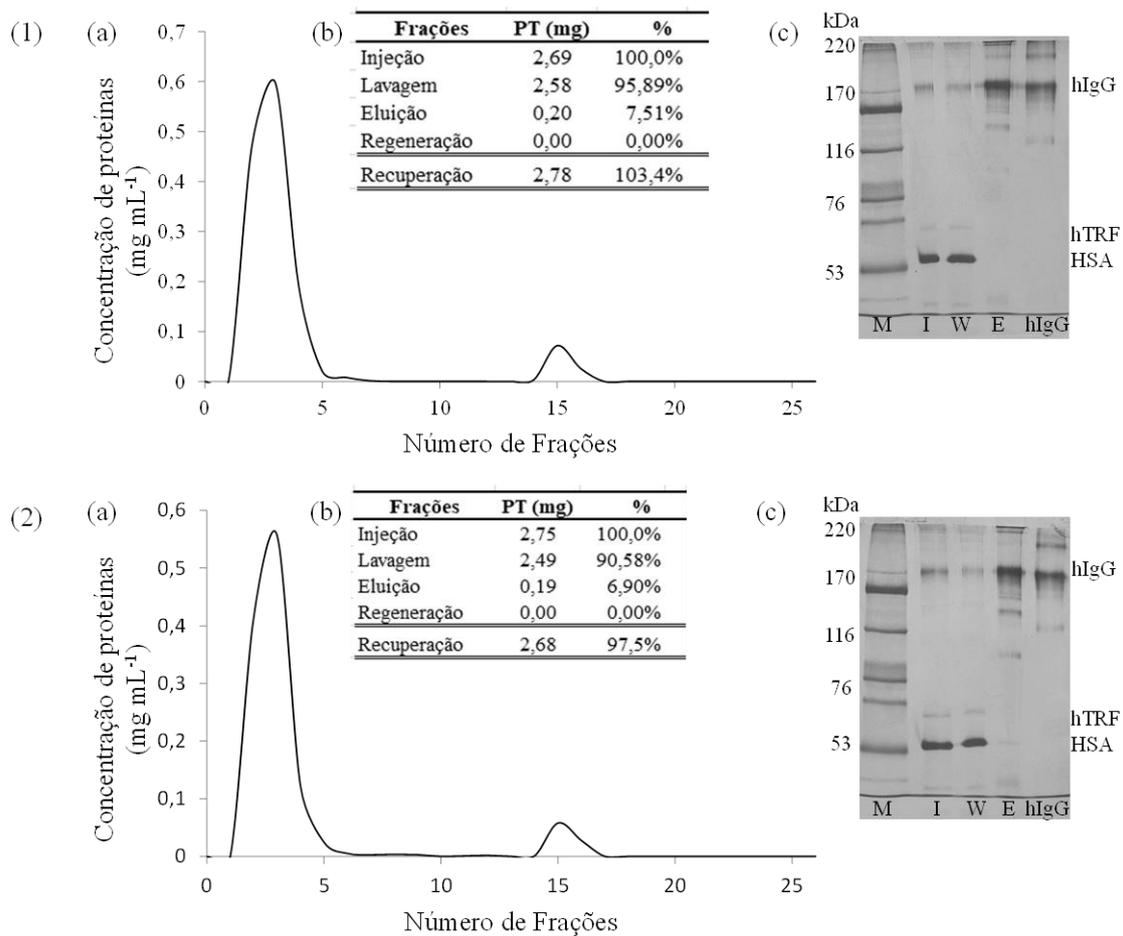


Figura B. 3 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão NaP a pH 7,0; W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0; E - Eluição: Tampão NaP a pH 7,0 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana.

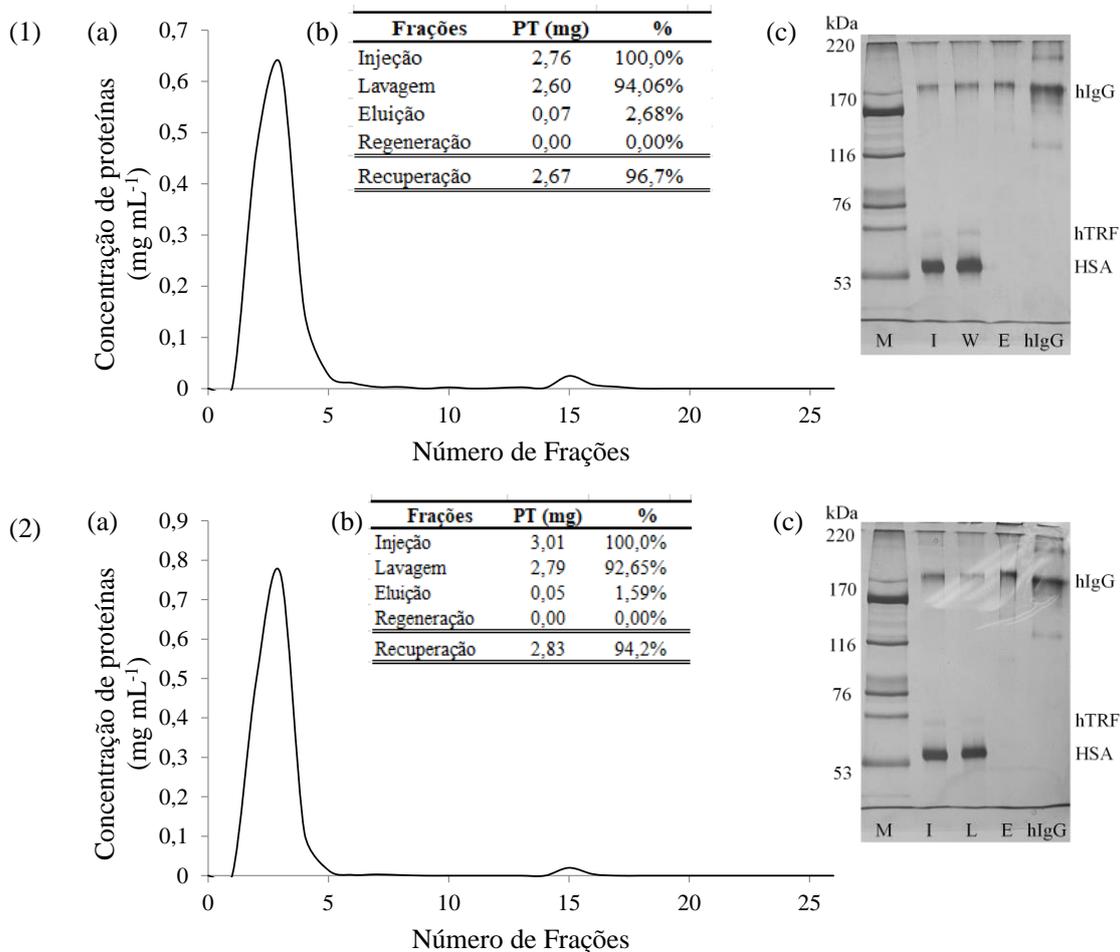


Figura B. 4 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MES a pH 5,5; W - Lavagem: Tampão MES a pH 5,5; E - Eluição: Tampão MES a pH 5,5 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana.

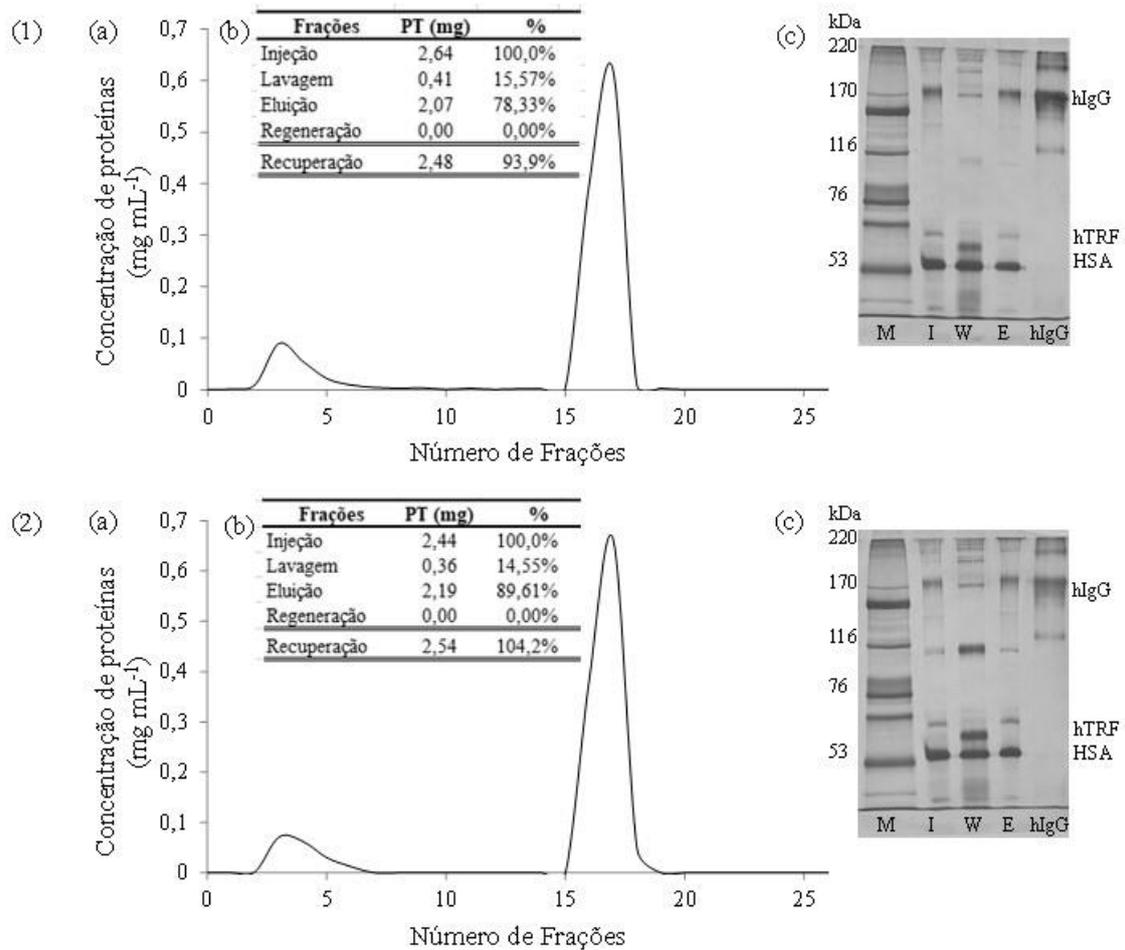


Figura B. 5 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 6,5; W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 6,5; E - Eluição: Tampão MOPS a pH 6,5 + NaCl (1,0 mol L⁻¹). M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina humana; HSA: albumina humana.

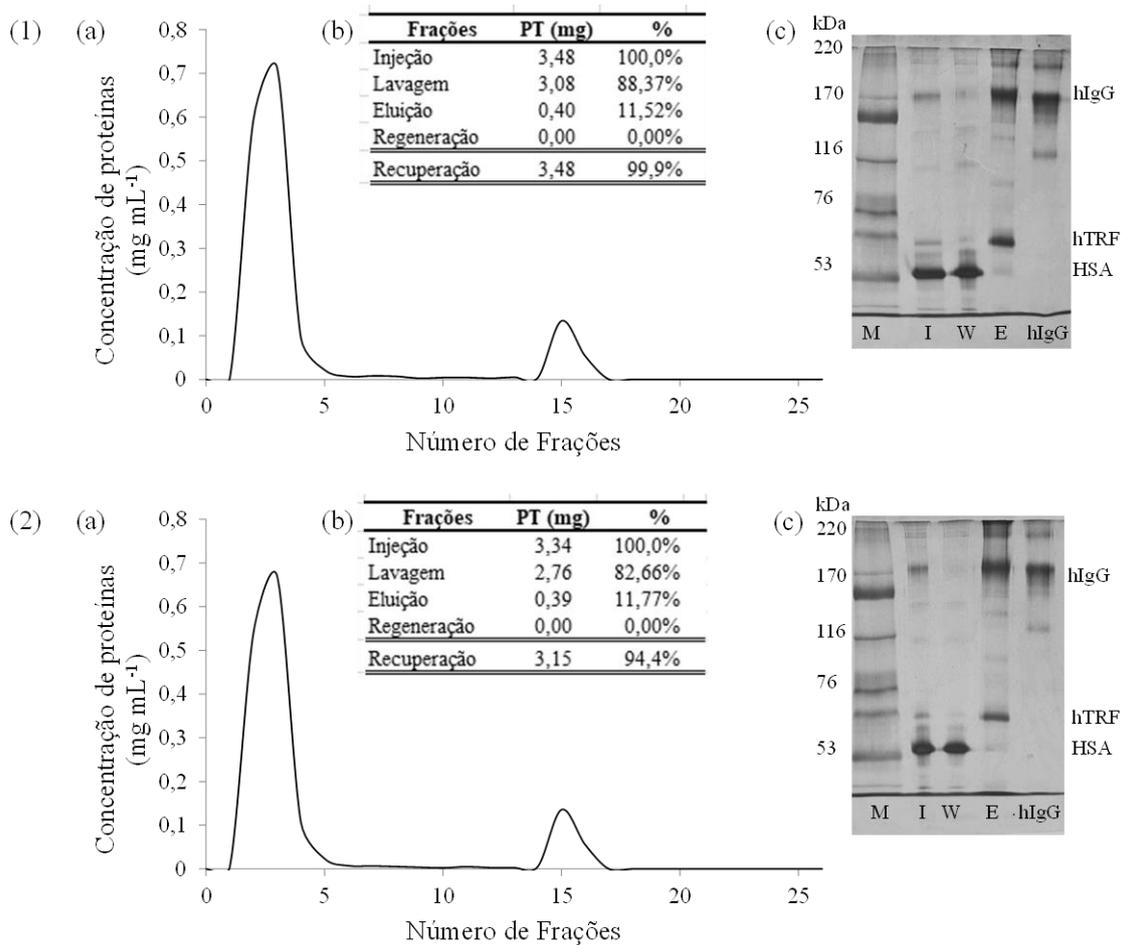


Figura B. 6 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão MOPS a pH 7,0 + Imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

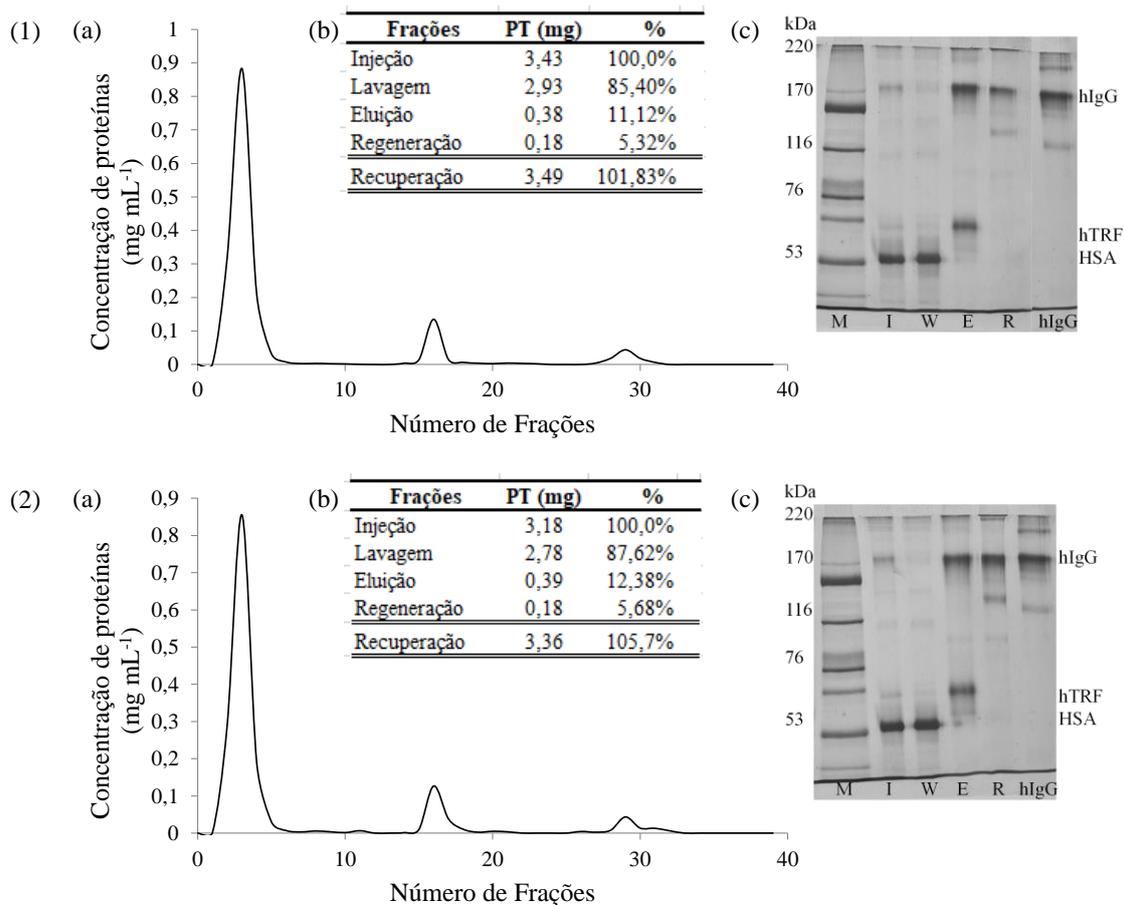


Figura B. 7 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + Imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

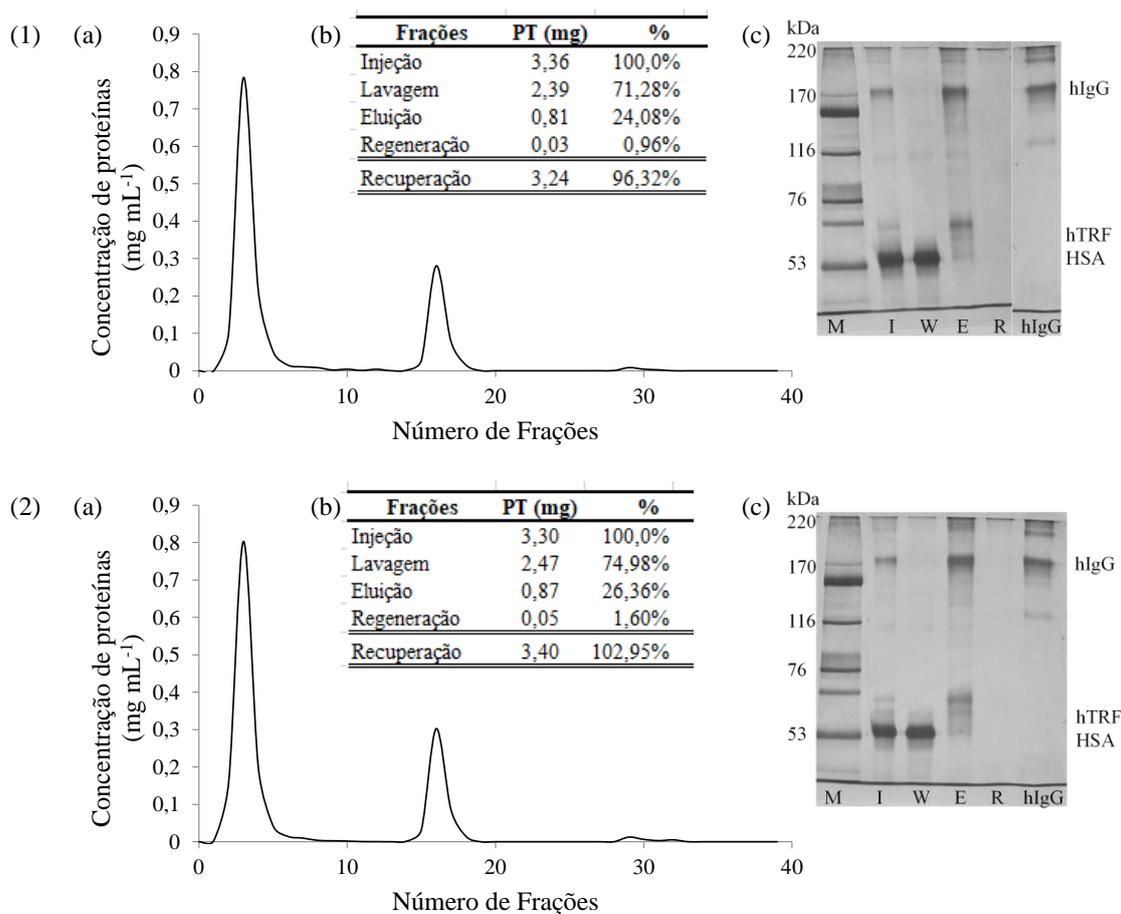


Figura B. 8 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + Imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

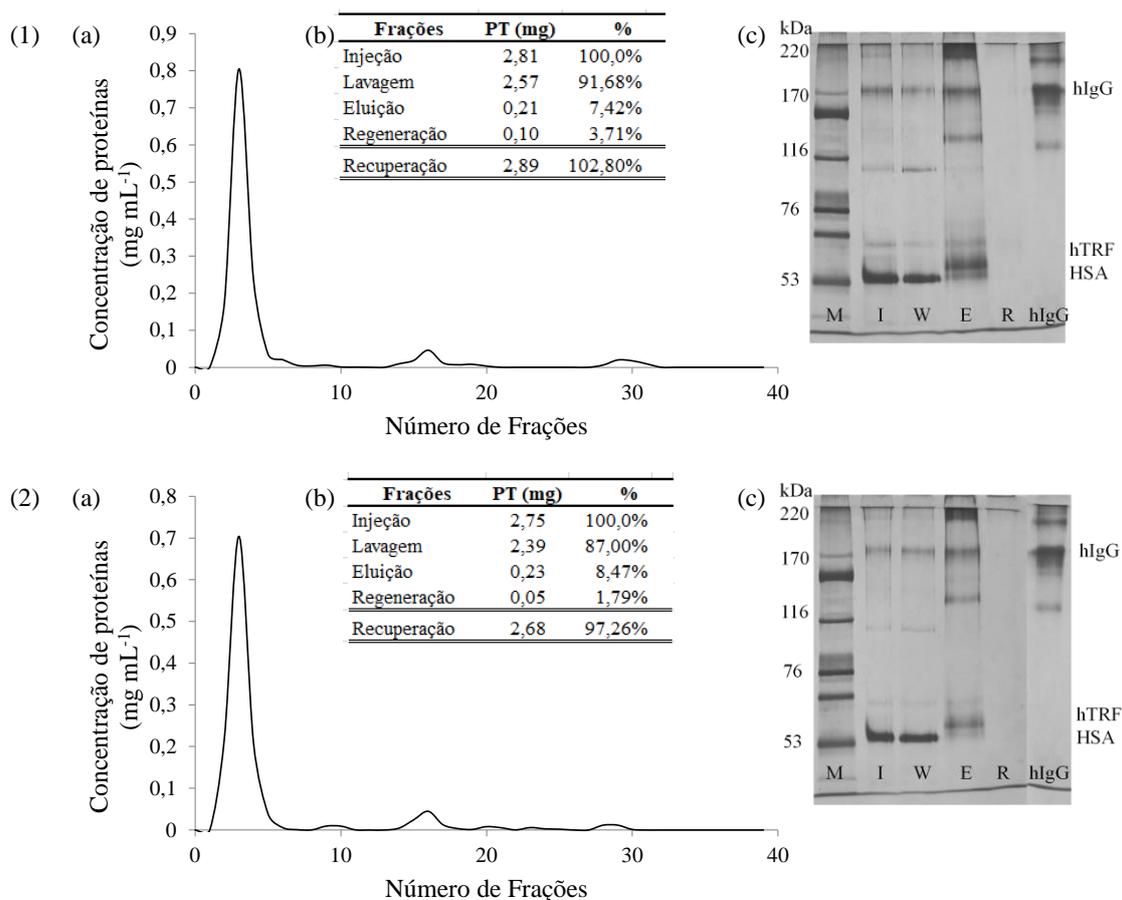


Figura B. 9 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão NaP a pH 7,0 + Imizadol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

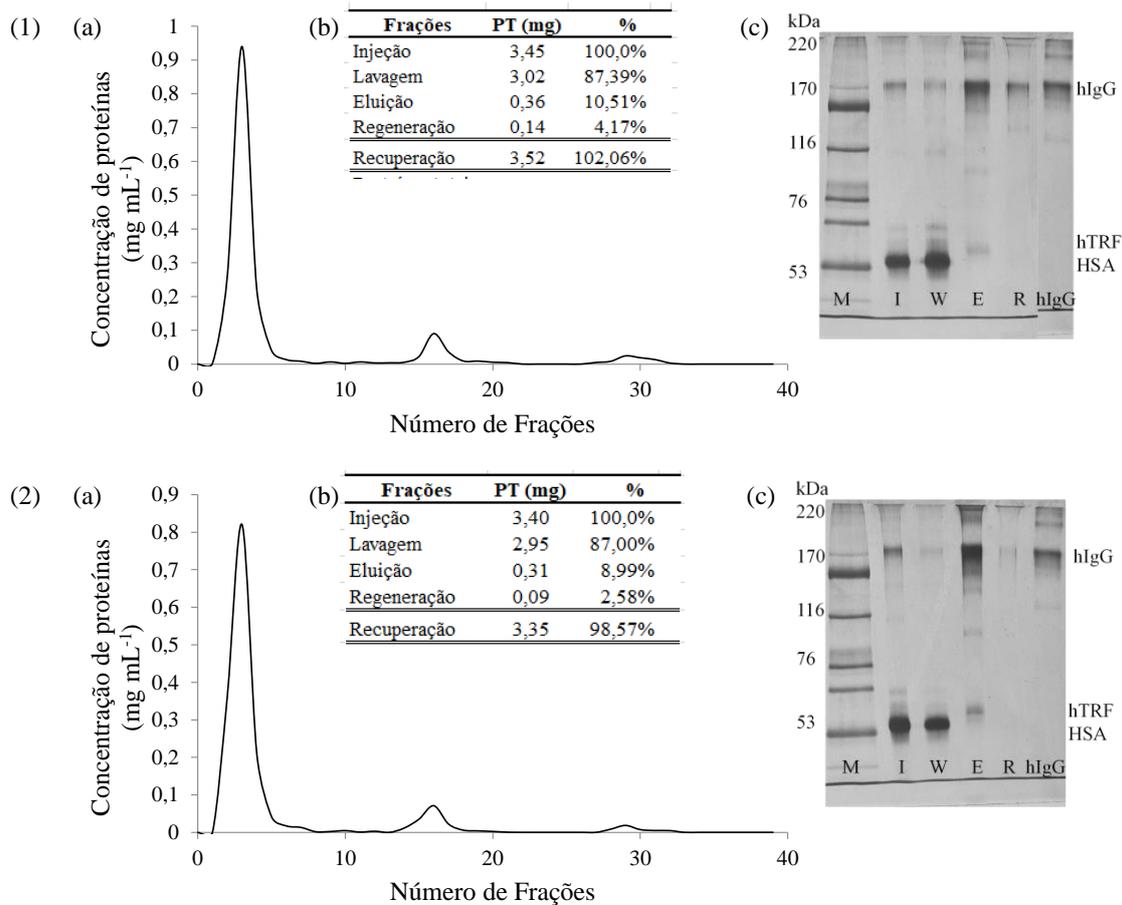


Figura B. 10 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Cu²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 6,5 + Imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

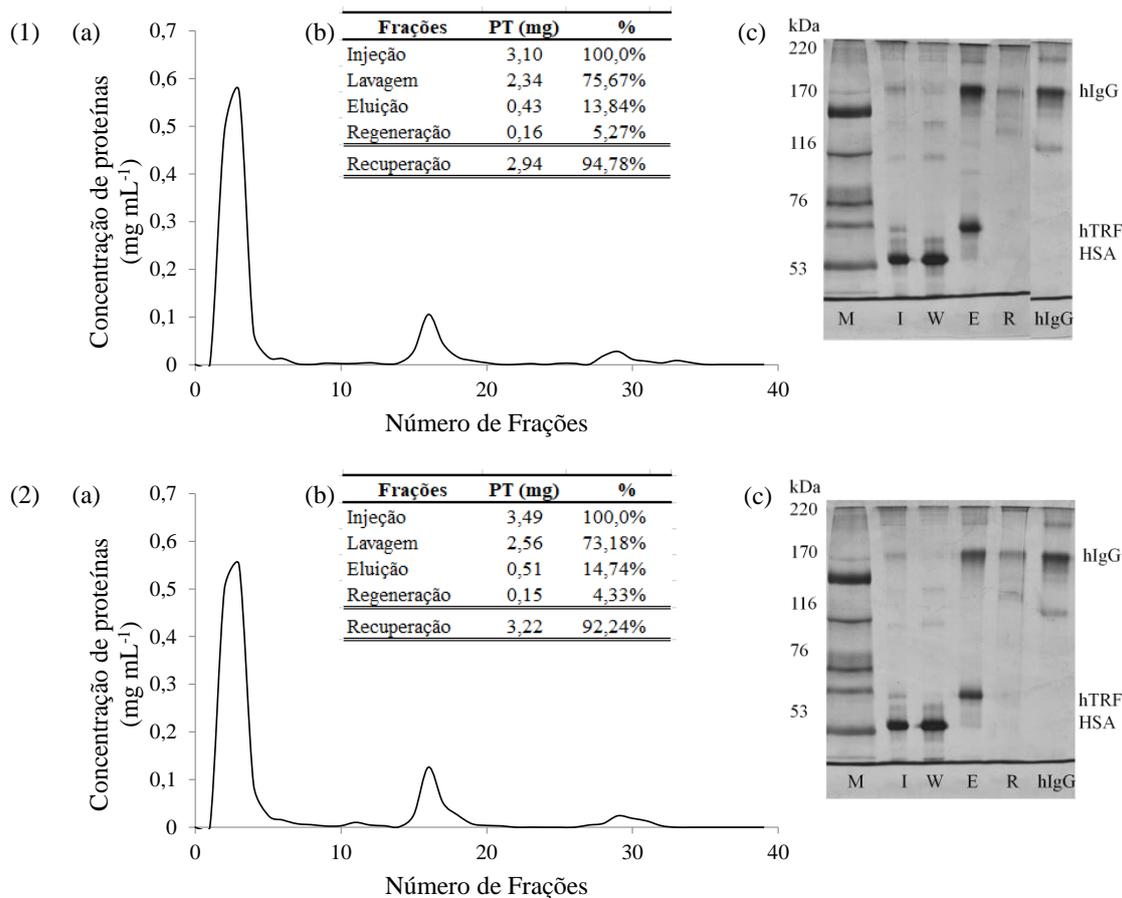


Figura B. 11 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: MOPS a pH 7,0 + NaCl (100 mmol L⁻¹) + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

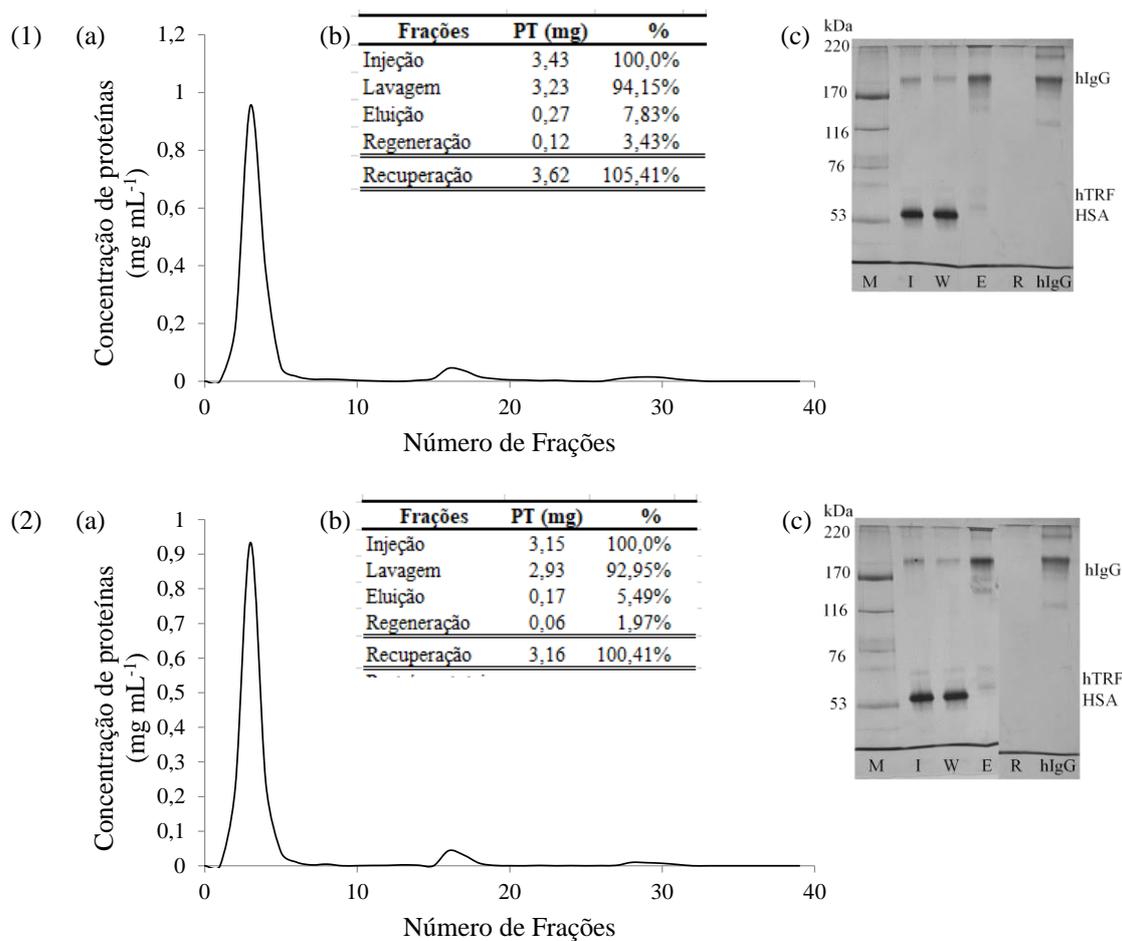


Figura B. 12 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: MOPS a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

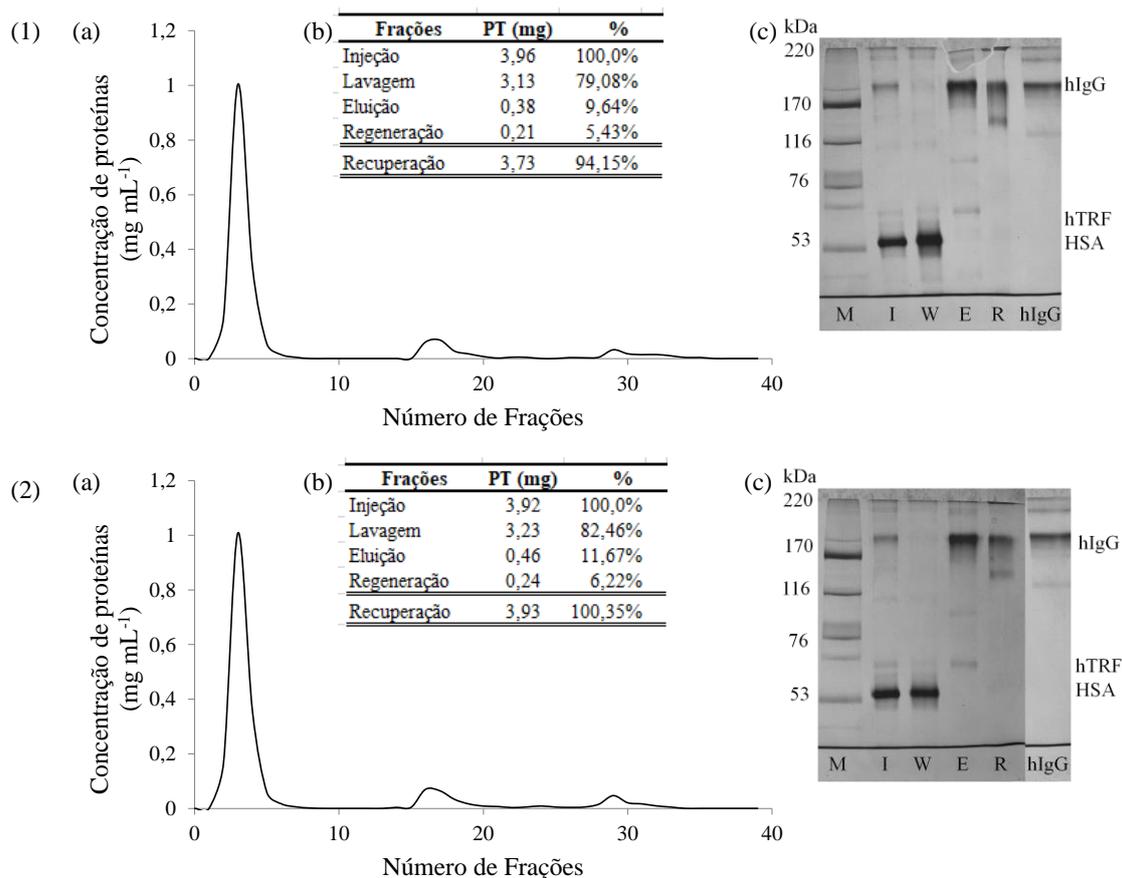


Figura B. 13 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão MOPS a pH 6,5 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: MOPS a pH 6,5 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

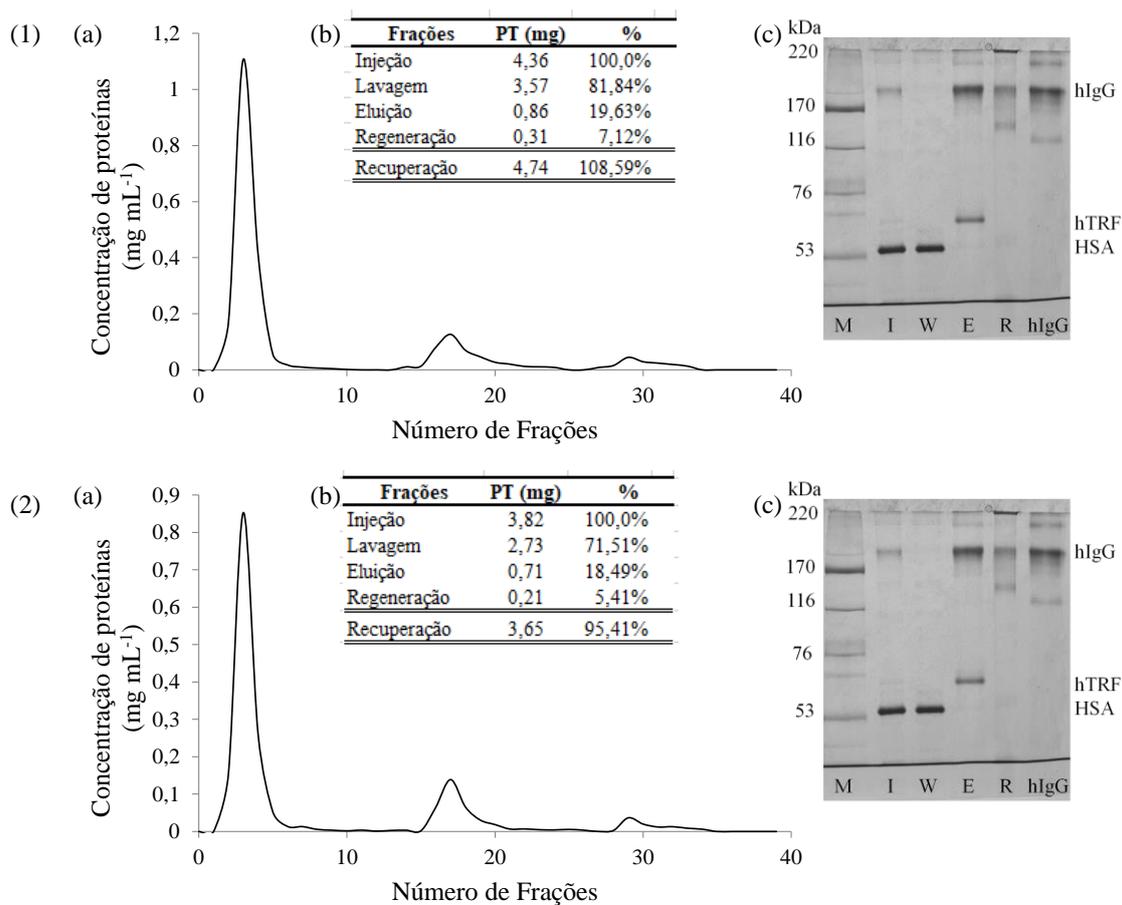


Figura B. 14 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAM-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: Solução EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

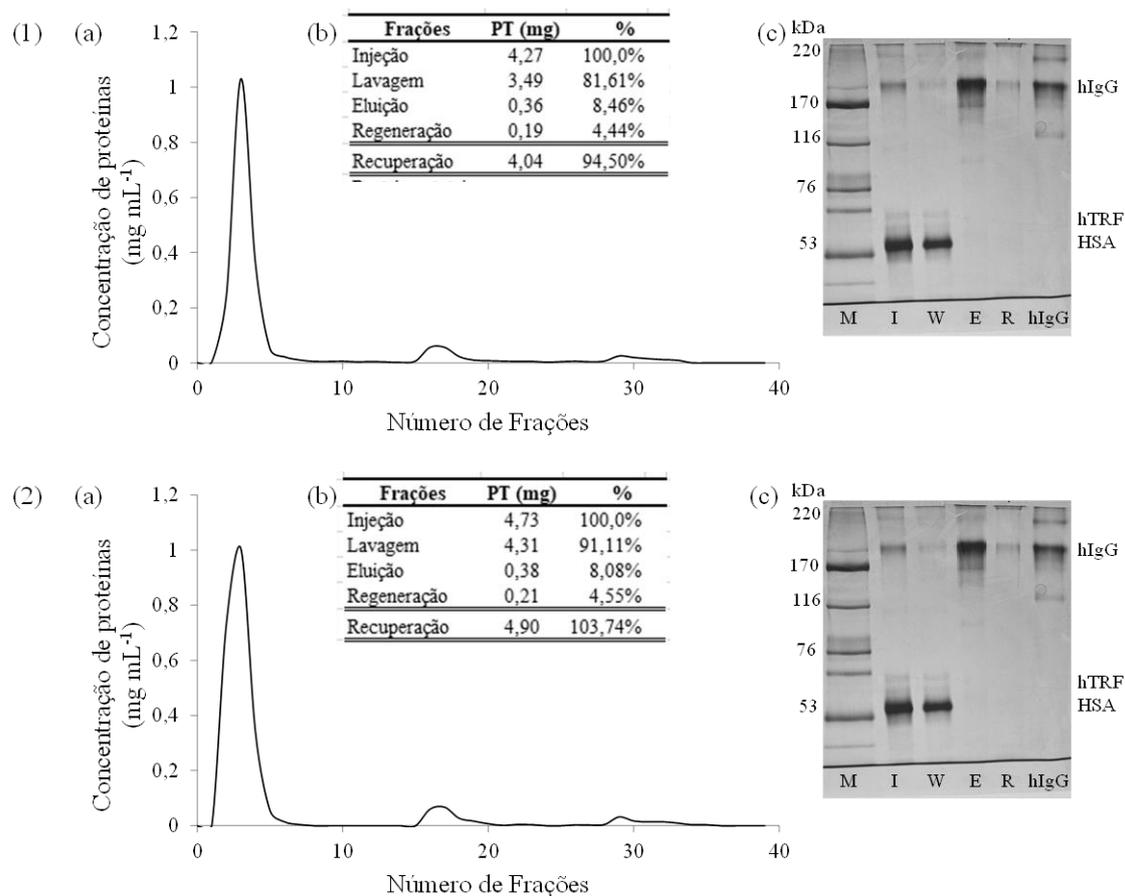
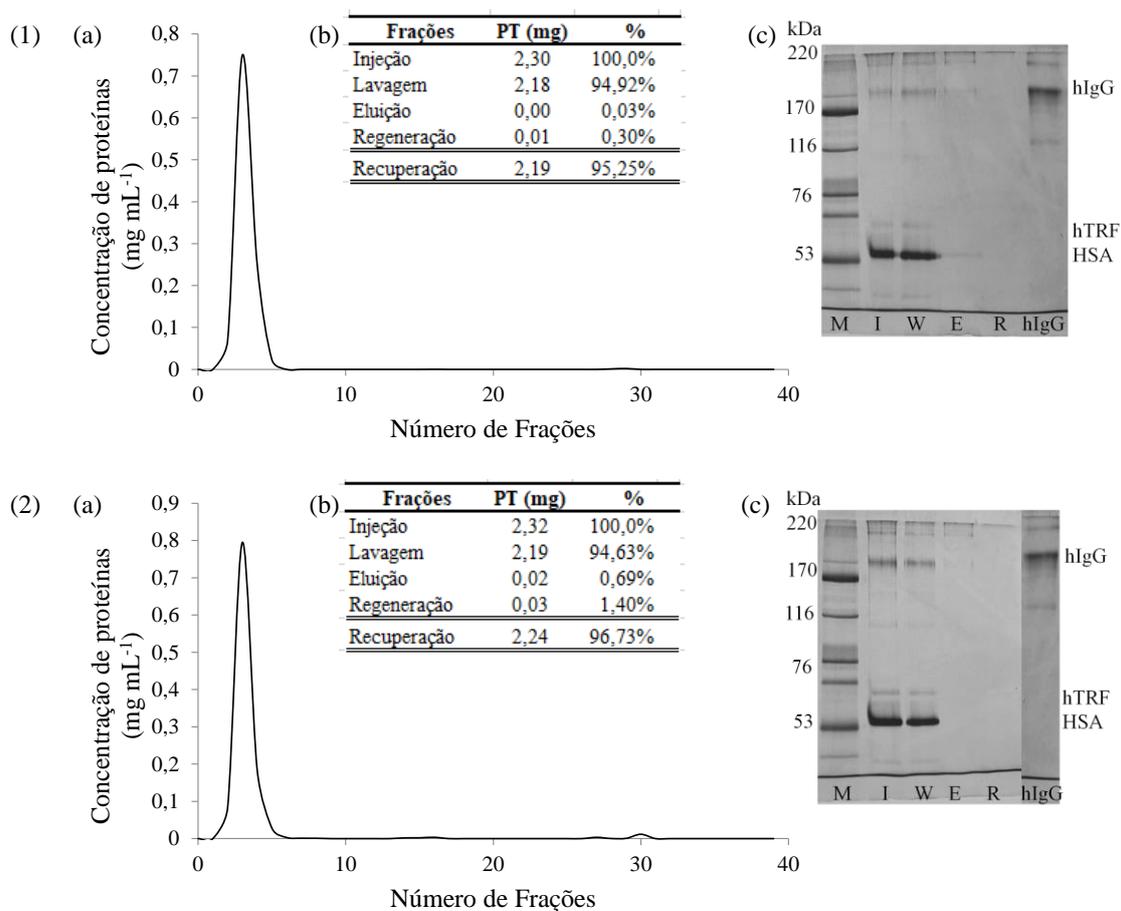
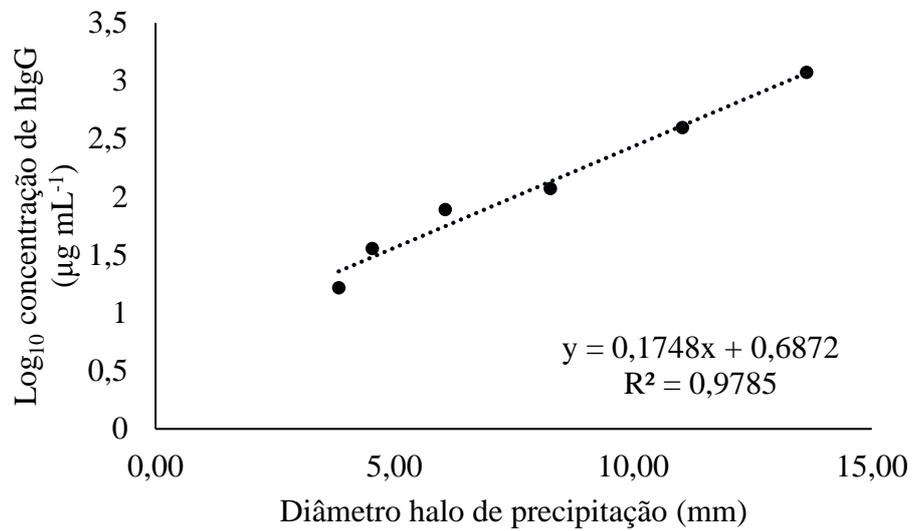


Figura B. 15 - Experimento (1) e duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da cromatografia de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 75 µL de soro em 1050 µL de tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); W - Lavagem: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (2 mmol L⁻¹); E - Eluição: Tampão Tris-HCl a pH 7,0 + NaCl (1000 mmol L⁻¹) + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações de eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; IgG: marcador de hIgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.



APÊNDICE C. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE hIgG PARA OS EXPERIMENTOS DE IMUNODIFUSÃO RADIAL

Figura C. 1 – Curva de calibração de hIgG para os experimentos de imunodifusão radial (RID)



APÊNDICE D. CROMATOGRAMAS, BALANÇOS DE MASSA E ELETROFORESES DOS ENSAIOS DE CURVA DE RUPTURA REALIZADOS COM SORO HUMANO

Figura D. 1 - Experimento (1) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da curva de ruptura de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 38 mL de 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); F – *Flowthrough*: Proteínas não adsorvidas durante a injeção; W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; 2 a 6: primeiras frações (*Volume*: 1,0 mL cada) do *flowthrough* coletadas; F: *pool* das demais frações do *flowthrough*; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.

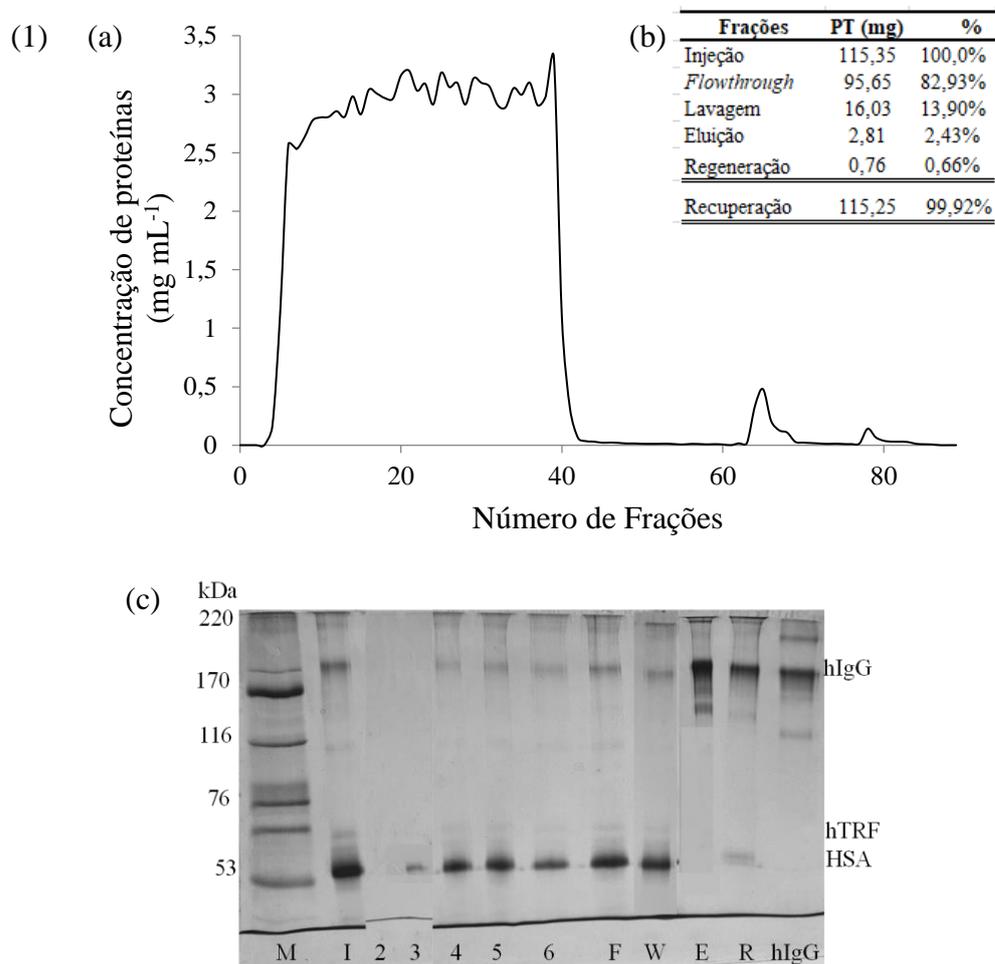
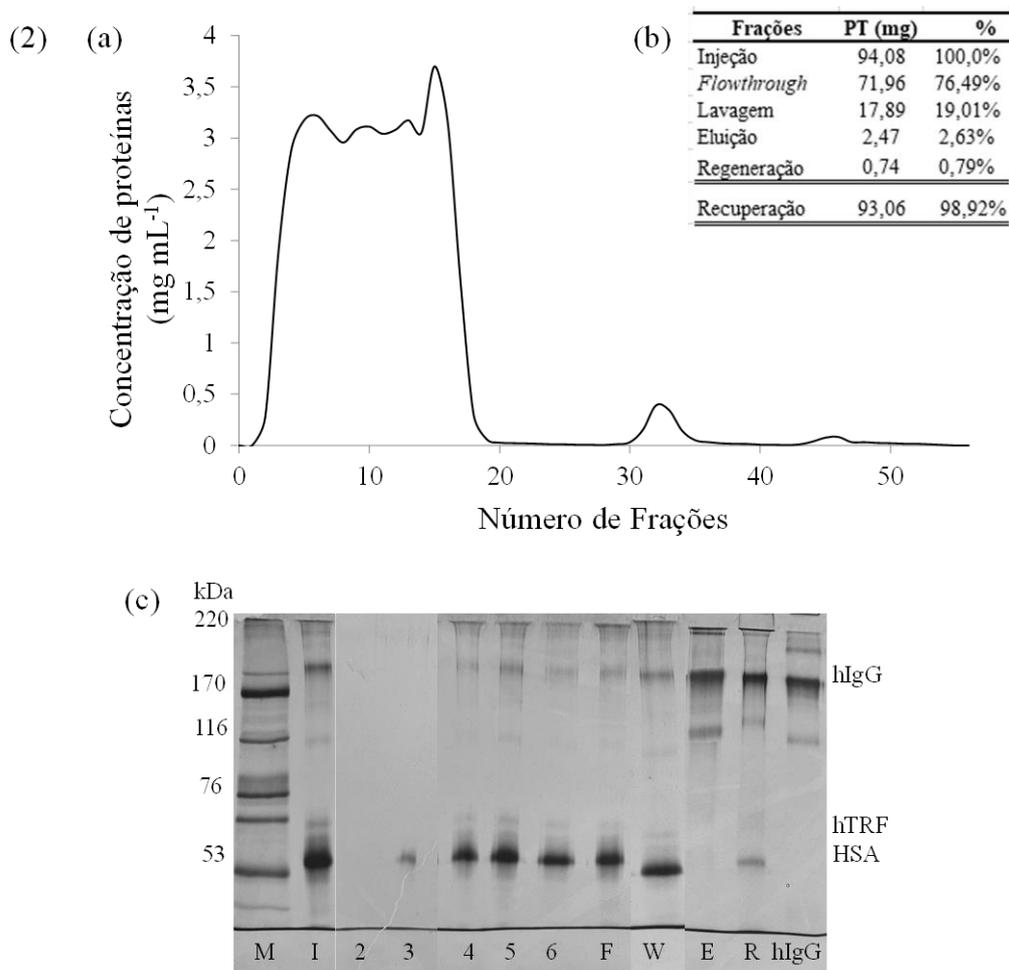


Figura D. 2 – Duplicata (2) para obtenção de cromatograma (a), balanço de massa (b) e eletroforese (c) da curva de ruptura de adsorção de proteínas do soro humano em PAAm-CS-GA-AGE-IDA-Ni²⁺. Leito: 3,0 mL. Vazão: 2,0 mL min⁻¹. Legenda: I - Injeção: 28 mL de 2,0 mL de soro humano diluído 15 vezes em tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); F – *Flowthrough*: Proteínas não adsorvidas durante a injeção; W - Lavagem: Tampão NaP a pH 7,0 + imidazol (2 mmol L⁻¹); E – Eluição: NaP a pH 7,0 + imidazol (100 mmol L⁻¹); R - Regeneração: EDTA a pH 7,0. M: marcador de alta massa molecular; I: injeção; 2 a 6: primeiras frações (Volume: 1,0 mL cada) do *flowthrough* coletadas; F: *pool* das demais frações do *flowthrough*; W: *pool* das frações de lavagem mais concentradas; E: *pool* das frações da eluição mais concentradas; R: *pool* das frações da regeneração mais concentradas; hIgG: marcador de IgG humana; hTRF: transferrina; HSA: albumina.



APÊNDICE E. MEDIDA DE CONDUTIVIDADE DOS TAMPÕES UTILIZADOS NOS ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS

Tabela B. 1 - Condutividade (mS cm^{-1}) mensurada nos tampões preparados

| Tampão | pH | Condutividade (mS cm^{-1}) |
|--|-----|--|
| MES (25 mmol L^{-1}) | 5,5 | 0,39 |
| MES (25 mmol L^{-1}) + NaCl (1 mol L^{-1}) | 5,5 | 66,34 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) | 6,5 | 0,39 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + NaCl (1 mol L^{-1}) | 6,5 | 66,15 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 6,5 | 0,36 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 6,5 | 7,46 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) | 7,0 | 0,76 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) | 7,0 | 10,50 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + NaCl (1 mol L^{-1}) | 7,0 | 66,52 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 7,0 | 0,72 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 7,0 | 4,94 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 7,0 | 10,09 |
| MOPS (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 7,0 | 14,71 |
| NaP (25 mmol L^{-1}) | 7,0 | 3,05 |
| NaP (25 mmol L^{-1}) + NaCl (1 mol L^{-1}) | 7,0 | 66,44 |
| NaP (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 7,0 | 3,06 |
| NaP (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 7,0 | 7,00 |
| NaP (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 7,0 | 12,52 |
| NaP (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 7,0 | 14,76 |
| Tris-HCl (25 mmol L^{-1}) | 7,0 | 2,06 |
| Tris-HCl (25 mmol L^{-1}) + NaCl (1 mol L^{-1}) | 7,0 | 66,50 |
| Tris-HCl (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 7,0 | 2,13 |
| Tris-HCl (25 mmol L^{-1}) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 7,0 | 7,28 |
| Tris-HCl (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + Imidazol (2 mmol L^{-1}) | 7,0 | 11,34 |
| Tris-HCl (25 mmol L^{-1}) + NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + Imidazol (100 mmol L^{-1}) | 7,0 | 16,19 |