

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para Saúde: Vacinas e Biofármacos

Patrícia Nascimento Pereira

Purificação de imunoglobulinas de plasma humano empregando
Cromatografia de troca iônica

São Paulo

2023

Patrícia Nascimento Pereira

**Purificação de imunoglobulinas de plasma humano empregando
Cromatografia de troca iônica**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde: Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para Saúde: Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Dra. Elisabeth Cheng

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Pereira, Patrícia Nascimento

Purificação de imunoglobulinas de plasma humano empregando Cromatografia de troca iônica / Patrícia Nascimento Pereira ; orientador(a) Elisabeth Cheng - São Paulo, 2023.

61 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Plasma humano 2. Purificação de Imunoglobulinas. 3. Hemoderivados. 4. Cromatografia de troca aniônica I. Cheng , Elisabeth . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Patrícia Norimato Pereira, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde: Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 22 de junho de 2023

.....
aluno(a)

De acordo:
Orientador(a):

Aos meus pais, **Maria** e **Dorival**, o sentido da minha vida são vocês.
Obrigada por tanto, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao **Universo**, por tudo que possuo e o que vou alcançar, acredito, confio, entrego e realizo.

Aos meus pais, **Maria** e **Dorival** que tornaram tudo isso possível. Obrigada pelo incentivo, por acreditarem e emocionarem por cada conquista. Foi tudo por vocês, a realização desse sonho é nossa.

À minha família, minha irmã **Priscila**, companheira de vida e profissão. **Vó Joana, tias e primos**, agradeço cada um por lutar junto comigo para alcançar meus objetivos, vocês são tudo de mais valioso na minha vida. E aos meus **cachorrinhos** por tanto amor retribuído.

Ao meu namorado, **Thiago**, por ser tão presente, por tanto amor, carinho, cuidado e incentivo.

Ao **SES-SP**, por financiar e possibilitar o desenvolvimento deste projeto. A **ESIB/CEFOP** pelo curso de Especialização oferecido.

Ao **Instituto Butantan**, uma instituição tão renomada e acolhedora. Foi um sonho ter esse contato com a pesquisa, ciência, natureza, animais e com toda diversidade que proporcionou.

À minha coordenadora de Especialização **Dra. Maria da Graça Salomão** por tantos ensinamentos e conversas. E a todos envolvidos núcleo comum e específico. Foram experiências de aulas incríveis, inovadoras que abriram novos caminhos para o conhecimento no mundo da ciência.

Aos **amigos de especialização**, por tornarem esses períodos mais leves e divertidos em nossos encontros.

À minha orientadora, **Dra. Elizabeth Cheng**, por tanto conhecimento, paciência e dedicação para o meu conhecimento profissional.

A todos do **Laboratório de Desenvolvimento de Processos**, que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”

Frederick Herzberg

RESUMO

NASCIMENTO PEREIRA, Patrícia. **Purificação de imunoglobulinas de plasma humano empregando Cromatografia de troca iônica**. 2023. 61 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para Saúde: Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Os derivados do plasma humano são indispensáveis para utilização no âmbito da saúde pública na prevenção e tratamento de distintas doenças. Mundialmente o mercado de hemoderivados são liderados e competitivos. A IgG é o hemoderivado de maior interesse e corresponde a maior parte do mercado mundial, entretanto a IgM também se tornou alvo de interesse, devido a eficiência da forma pentâmera contribuir com mais benefícios em relação a IgG. Neste projeto, o objetivo principal foi separar as frações contendo as imunoglobulinas IgG e IgM de plasma humano empregando cromatografia líquida. Na primeira etapa utilizou-se a resina de troca aniônica ANX *Sepharose FF* em que 98 % das proteínas presentes no plasma humano foram recolhidas no FT, e esta fração foi aplicada na segunda coluna aniônica em Q *Sepharose FF* empregando um gradiente de pH e salina. Foi possível obter IgG no FT, albumina em pH 5,5 e IgM em pH 4,5. As 3 frações obtidas requerem etapas adicionais de purificação para se obter o produto final.

Palavras-chave: Plasma. Hemoderivados. Imunoglobulinas. IgM. IgG. Cromatografia de troca aniônica.

ABSTRACT

NASCIMENTO PEREIRA, Patrícia. **Purification of immunoglobulins from human plasma using ion exchange chromatography.** 2023. 61 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health: Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Derivatives of human plasma are essential for use in public health in the prevention and treatment of different diseases. Worldwide, the blood products market is leading and competitive. IgG is the blood product of greatest interest and accounts for most of the world market, however IgM has also become a target of interest, due to the efficiency of the pentamer form contributing with more benefits compared to IgG. In this project, the main objective was to separate the fractions containing IgG and IgM immunoglobulins from human plasma using liquid chromatography. In the first stage, the ANX *Sepharose FF* anion exchange resin was used, in which 98 % of the proteins present in human plasma were collected in the FT, and this fraction was applied to the second anion column in Q *Sepharose FF*, using a gradient of pH and saline. It was possible to obtain IgG in the FT, albumin in pH 5.5 and IgM in pH 4.5. The 3 fractions obtained require additional purification steps to obtain the final product.

Keywords: Plasma. Blood products. Immunoglobulins. IgM. IgG. Anion exchange chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mercado de imunoglobulinas a) crescimento por regiões; b) crescimento entre 2022 até 2027.....	21
Figura 2 Principais hemoderivados obtidos do fracionamento do plasma humano. .	22
Figura 3 Esquema de um cromatógrafo líquido.....	24
Figura 4 Esquema da cromatografia de troca iônica em coluna.	26
Figura 5 Estrutura básica simplificada de imunoglobulina G.....	27
Figura 6 Estrutura pentâmera da IgM.....	29
Figura 7 - Purificações realizadas nesse projeto. Esquema das etapas de purificação, partindo-se dos “pools” de plasma, o FT foi separado na primeira purificação realizado em ANX Sepharose FF. Na segunda etapa, em coluna Q Sepharose FF, o FT contendo IgG, albumina e IgM são separadas em frações distintas.....	32
Figura 8 - Cromatograma da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF- Fração do FT.....	43
Figura 9 - Cromatograma da Purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF- Frações da purificação.	43
Figura 10 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF. Canaletas: M: marcador de massa molecular; PFC: “pool” 1/22 de plasma; PFC pH6: “poll” 1/22 de plasma, pH 6, ajustado com 0,25M de ácido cítrico; Plasma 24h: amostra de entrada; As amostras de plasma e FT foram diluídas 40 x, as demais amostras foram aplicadas sem diluição.	44
Figura 11 - Cromatograma da purificação em coluna Q Sepharose do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.....	45
Figura 12 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF. Gel 1 Canaletas: M: marcador de massa molecular; Amostra: amostra de entrada, diluído 6x; FT: diluído 2x; Reequilíbrio: concentrado 2x; pH 8,01: diluído 2x; pH 7,50: concentrado 3x. Gel 2 Canaletas: M: marcador de massa molecular; pH 5,50: diluído 2x; pH 4,50-1: concentrado 3x; pH 4,50-2: concentrado 3x; 300mM: concentrado 3x; 1M: concentrado 3x.....	47

Figura 13 - Cromatograma da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF	49
Figura 14 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF. Canaletas: M: marcador de massa molecular; PFC: “pool” 2/22 de plasma, diluído 40x; PFC pH 6: plasma com pH 6 ajustado com 0,25M de ácido cítrico, diluído 40x; Plasma 24h: amostra de entrada, diluído 40x; FT: diluído 40x; Reequilíbrio: 1x; 200-5 (A): 1x; 200-5 (B): 1x; 200-10:1x; 200-25: 1x; 500: 1x.	51
Figura 15 - Cromatograma da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.....	52
Figura 16 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações em coluna ANX Sepharose FF “pool” 1/22. Canaletas: M: marcador de massa molecular; PFC: “pool” 1/22 de plasma, diluído 40x; PFC pH6: plasma com pH 6 ajustado com 0,25M de ácido cítrico, diluído 40x; Plasma 24h: amostra de entrada, diluído 40x; FT: diluído 40x; Reequilíbrio: 1x; 200-5 (A): 1x; 200-5 (B): 1x; 200-10:1x; 200-25: 1x; 500: 1x.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções tampão utilizadas nas purificações dos “pools” 1/22 e 2/22 de plasma humano em ANX Sepharose FF	35
Tabela 2 - Soluções tampão utilizadas na purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 em ANX Sepharose FF. As condutividades foram medidas no condutivímetro de bancada.	37
Tabela 3 - Soluções tampão utilizadas na purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 em ANX Sepharose FF. As condutividades foram medidas no condutivímetro de bancada.	37
Tabela 4 - Curva de calibração para a quantificação proteica pelo método de Bradford.	38
Tabela 5 - Soluções utilizadas no preparo de um gel de poliacrilamida de 1mm de espessura.	40
Tabela 6 - Curva de calibração para a dosagem de IgM pelo método de Imunoturbidimetria.	41
Tabela 7 - Absorbâncias dos pontos da curva de calibração da dosagem de proteínas pelo método de Bradford da purificação em coluna Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	46
Tabela 8 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	46
Tabela 9 - Dosagem proteínas das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF, segundo o método de Bradford.	47
Tabela 10 - Absorbâncias dos pontos da curva de calibração da dosagem de proteínas pelo método de Bradford da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	49
Tabela 11 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	49
Tabela 12 - Dosagem de proteínas das frações da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF, segundo o método de Bradford.	50

Tabela 13 - Absorbâncias dos pontos da curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.....	53
Tabela 14 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF	53
Tabela 15 - Dosagem proteínas das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF, segundo o método de Bradford.	54
Tabela 16 - Dosagem de IgM das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	46
Gráfico 2 - Proteína total das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	47
Gráfico 3 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	50
Gráfico 4 - Proteína total das frações da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	51
Gráfico 5 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	53
Gráfico 6 - Proteína total das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	55
Gráfico 7 - Dosagem de IgM das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acs: Anticorpos

Ags: Antígenos

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANX: Dimetilaminopropil

CAGR: *Compound Annual Growth Rate*

FF: *Fast flow*

FT: *Flow Through*

Ig: Imunoglobulina

Igs: Imunoglobulinas

IgA: Imunoglobulina A

IgD: Imunoglobulina D

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IVIg: imunoglobulina G de uso intravenoso

kDa: Kilo Dalton

OMS: Organização Mundial da Saúde

PFC: Plasma Fresco Congelado

pI: Ponto Isoelétrico

RIH: Resposta Imune Adquirida Humoral

rpm: rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SUS: Sistema Único de Saúde

VC: Volume de Coluna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Revisão de Literatura	20
1.1.1	Obtenção de plasma para fracionamento	20
1.1.2	Plantas de Fracionamento e mercado de Hemoderivados no mundo	20
1.1.3	Hemoderivados	22
1.1.4	Purificação de proteínas pelo método de Cohn	23
1.1.5	Purificação de proteínas por cromatografia líquida	23
1.1.6	Cromatografia de Troca Iônica	24
1.1.7	Imunoglobulinas	26
1.1.8	Imunoglobulina G	27
1.1.9	Purificação de imunoglobulina G	28
1.1.10	Imunoglobulina M	28
1.1.11	Purificação de imunoglobulina M	29
1.1.12	Albumina	29
1.1.13	Purificação de albumina	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	Geral	31
2.2	Específico	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Materiais	32
3.2	Métodos	33
3.2.1	Preparo do Plasma Humano	33
3.2.2	Purificações	34

3.2.2.1	<i>Purificação do plasma em resina ANX Sepharose FF</i>	34
3.2.2.2	<i>Preparação da amostra de entrada para a coluna Q Sepharose FF</i>	36
3.2.2.3	<i>Purificação do FT ANX em resina Q Sepharose FF</i>	36
3.2.2.4	<i>Métodos Analíticos</i>	38
3.2.2.4.1	<i>Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford</i>	38
3.2.2.4.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	39
3.2.2.4.3	<i>Dosagem de IgM por imunoturbidimetria</i>	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF	42
4.2	Purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 em ANX Sepharose FF	44
4.3	Purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF	48
4.4	Purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF	52
5	DISCUSSÃO	57
5.1	Purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF	57
5.2	Purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 em ANX Sepharose FF	57
5.3	Purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF	58
5.4	Purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF	58
6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os produtos proteicos do plasma são de suma importância para utilização no âmbito da saúde pública, na prevenção e tratamento de distintas doenças.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para manter os estoques regulares, 1,5% a 3% da população doem regularmente sangue. Apesar dos avanços tecnológicos, a doação de sangue permanece insubstituível. No Brasil são coletadas 3,5 milhões/ano de bolsas de sangue, equivalente a 1,8% de doadores em serviços de coleta que fornecem sangue para a rede de Sistema Único de Saúde (SUS) (GANDRA, 2020).

Durante a pandemia do COVID-19, a quarentena gerou um desabastecimento de sangue, a OMS incentiva a doação de sangue para não comprometer o tratamento de pacientes dependentes.

Apenas com uma doação de sangue 450 mL é suficiente para salvar até quatro vidas (VILELA, 2019). Ademais, o organismo repõe em 24 horas o sangue.

As bolsas podem ser aproveitadas para utilização na pesquisa científica e tecnológica.

Albumina é a proteína globular do plasma humano com maior abundância, perfazendo cerca de 50% do total de proteínas e peso molecular de aproximadamente 66 kDa.

A imunoglobulina G (IgG) é a segunda proteína das classes de imunoglobulinas (igs) (ou anticorpos), é a mais abundante e presente no plasma humano, perfazendo 75% das Igs e peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Em humanos, possui quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). A IgG de uso intravenoso (IVIg) é atualmente o principal produto das indústrias de fracionamento.

Albumina, fatores de coagulação e igs são derivados do plasma humano e preparados industrialmente conhecidos como planta de fracionamento. De acordo com a OMS, são medicamentos biológicos essenciais para manutenção do sistema mundial de saúde para terapias de diversas doenças crônicas e agudas (COVAS, 2014).

A imunoglobulina M (IgM) é uma das classes de Igs do plasma humano com peso molecular de 950 kDa aproximadamente. O interesse pela IgM tem aumentado, pois ela atua na resposta primária de anticorpos, uma vez que sua forma

pentamérica propicia uma eficácia superior na neutralização de toxinas e na aglutinação bacteriana em comparação com os anticorpos IgG (NORRBY-TEGLUND *et al.*, 2006).

O Pentaglobin®, produzido pela Biotest, é o único produto comercial de imunoglobulina humana enriquecido de IgM, ainda não disponível no Brasil.

Neste projeto utilizamos plasma humano para purificação de imunoglobulinas IgG e IgM. Na primeira etapa, em que utilizamos a resina ANX *Sepharose FF*, são separados o *Flow Through* (FT) e os fatores de coagulação. O FT é a fração das proteínas não adsorvidas e utilizada para a segunda purificação em *Q Sepharose FF* com objetivo de separar a albumina, a IgG e a fração contendo a IgM.

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 Obtenção de plasma para fracionamento

O Plasma Humano é escasso no Brasil e no mundo.

Os hemocomponentes e hemoderivados se originam da doação de sangue por um doador. As bolsas de sangue dos doadores são selecionadas rigorosamente, submetidas à triagem clínica, hematológica e sorológica.

A obtenção de sangue no mundo foi estabelecida (FARRUGIA *et al.*, 2010):

- 7 voluntário, não remunerado, que não recebe nenhuma recompensa pela doação;
- 8 pago, o doador é recompensado monetariamente;
- 9 substituição familiar, doa o sangue para repor o estoque, pois algum familiar teve que usar algum tipo de componente.

No Brasil, a obtenção de sangue foi estabelecida: o sangue e seus derivados não podem ser comercializados, assim como doadores não podem ser remunerados de acordo com a Constituição Federal Brasileira de 1988.

O Estado é responsável por garantir esses produtos à saúde pública.

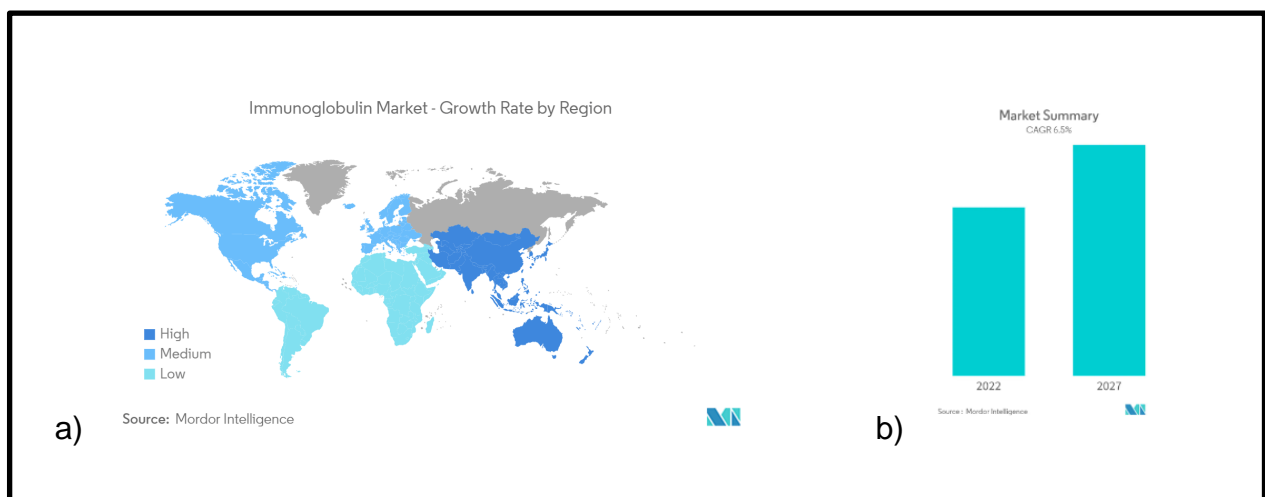
1.1.2 Plantas de Fracionamento e mercado de Hemoderivados no mundo

A comercialização global de fracionamento de plasma é moderadamente competitiva. Globalmente, esse mercado é dominado pelas companhias: Baxter

International Inc., CSL Ltd., Octapharma AG, Kedrion Biopharma Inc., Grifols SA e Biotest AG (IMMUNOGLOBULIN MARKET, 2021; COVAS, 2014).

A América do Norte tem a maior participação no mercado global imunoglobulina (Figura 1a e 1b). O mercado que mais cresce é Ásia-Pacífico e a tendência é crescer o mercado de imunoglobulina entre 2022 até 2027 a uma Taxa de Crescimento Anual composta (*Compound Annual Growth Rate*, CAGR) de 6,5% (figura 1b). (IMMUNOGLOBULIN MARKET, 2021).

Figura 1 Mercado de imunoglobulinas
a) crescimento por regiões; b) crescimento entre 2022 até 2027.



Fonte: IMMUNOGLOBULIN MARKET, 2021.

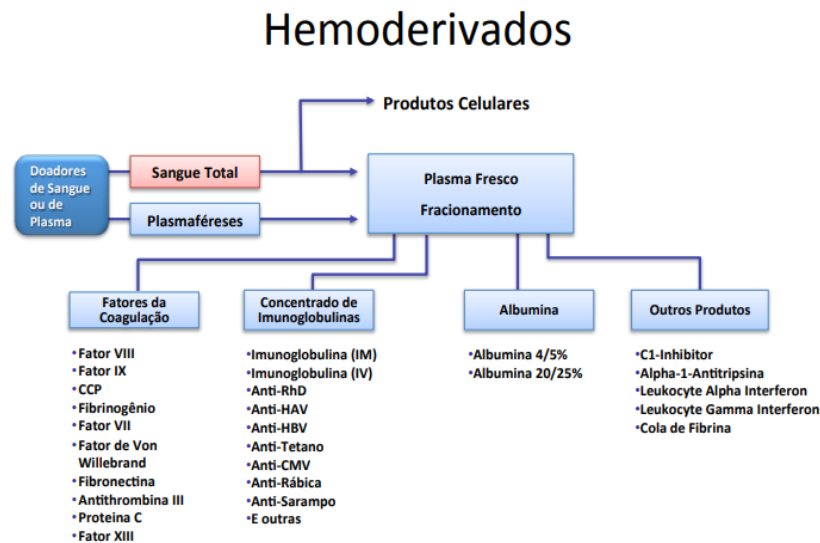
O fracionamento industrial do plasma pode originar mais de 20 diferentes tipos de hemoderivados, como exemplificado na Figura 2.

A OMS declara entre os medicamentos biológicos indispensáveis para a estabilidade do sistema mundial de saúde estão à albumina, os fatores de coagulação e as imunoglobulinas.

A IgG é responsável por quase metade do mercado de hemoderivados mais comercializados. A IVIg se tornou o principal produto das indústrias de fracionamento, perfil que permanece atualmente.

Mundialmente existem 77 plantas de fracionamento, 36,8 milhões de litros de plasma foi processado em 2014 dos quais 43 % na Ásia e região do Pacífico, 35 % Europa, 10 % EUA e 12 % distribuídos pelas demais regiões mundiais (COVAS, 2014).

Figura 2 Principais hemoderivados obtidos do fracionamento do plasma humano.



Fonte: COVAS, 2014.

O Brasil é dependente da importação de hemoderivados, o que representa um expressivo gasto na saúde. O Ministério da Saúde compra de empresas estrangeiras esses medicamentos biológicos para atender a necessidade da população. No Brasil, existe a fábrica de hemoderivados e biotecnologia, Hemobrás, vinculada ao Ministério da Saúde, localizada em Goiana, Pernambuco e todo plasma coletado no Brasil pelos hemocentros públicos é enviado para ser processado lá, embora esta fábrica ainda não esteja em funcionamento.

1.1.3 Hemoderivados

Os primeiros medicamentos provenientes de plasma foram às antitoxinas diftérica e tetânica, que são imunoglobulinas produzidas em cavalos (COHN *et al.*, 1946).

Historicamente, o uso terapêutico com proteínas de plasma surgiu quando Edwin Cohn desenvolveu o fracionamento de plasma por precipitação com etanol a frio para isolar albumina, para tratar lesões e perda de sangue em campos de batalha (COHN *et al.*, 1946).

O Sangue Total após a coleta é submetido à centrifugação que resulta na separação dos hemocomponentes: hemácias, leucócitos, plaquetas e plasma. O plasma pode ser utilizado para o fracionamento e produção de hemoderivados.

Os Hemoderivados são produzidos a partir do fracionamento do plasma humano. O plasma humano contém proteínas de suma importância terapêutica para o tratamento de diversas doenças, entre as quais algumas são causadas pela falta ou ausência de alguma das proteínas (COVAS, 2014).

O plasma congelado até 8 horas após a coleta e estocado em freezer -20° C possui validade de um ano ou em freezer -30° C por dois anos e é chamado de Plasma Fresco Congelado (PFC). Pode ser utilizado em transfusões ou para a produção de hemoderivados e hemocomponentes.

O plasma congelado entre 8 e 24 horas após a coleta passa a ser classificado como Plasma Comum e tem validade de 5 anos. Este plasma não pode ser utilizado para obter fatores de coagulação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

1.1.4 Purificação de proteínas plasmáticas pelo método de Cohn

Edwin Cohn na década de 1940 desenvolveu o método para purificação de proteínas de plasma humano com o objetivo de isolar albumina e tratar perda de sangue e lesões em campos de batalha. O sangue usualmente é coletado com citrato. É conhecido como o principal método para purificação de proteínas de plasma humano baseado em precipitações sucessivas com etanol em baixas temperaturas, e variação de pH (COHN *et al.*, 1946). Os precipitados são separados por centrifugação e as proteínas de interesse continuam sendo fracionadas (COHN *et al.*, 1946). O etanol é utilizado pelo fato de possuir baixo peso molecular, baixa toxicidade, ser pouco volátil a baixas temperaturas e bacteriostático.

1.1.5 Purificação de proteínas por cromatografia líquida

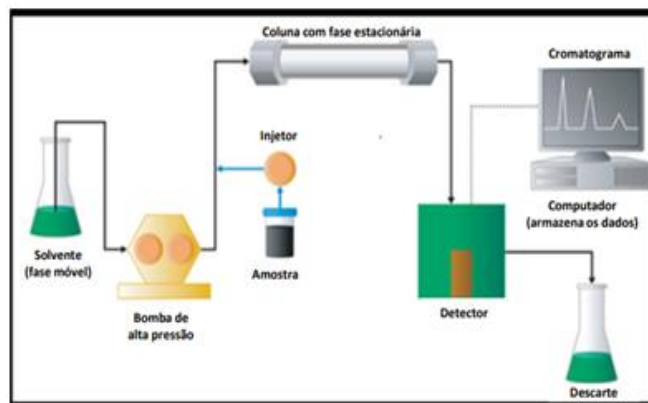
Os métodos cromatográficos têm sido utilizados para purificações de hemoderivados. Atualmente, as plantas de hemoderivados utilizam cromatografia em coluna por ter a maior capacidade para amostras e obter produtos com maiores graus de purezas (Figura 3).

A cromatografia líquida é um método físico-químico de separação e identificação dos componentes de uma mistura, por meio de duas fases, que estão em contato íntimo (COLLINS *et al.*, 2005). Uma das fases permanece estacionária (resina), enquanto a outra se move através dela, fase móvel (solução tampão).

São conhecidos diferentes tipos de cromatografias: troca iônica (aniônica ou catiônica), gel filtração (ou exclusão de tamanho), afinidade e hidrofobicidade (ou solubilidade) (COLLINS *et al.*, 2005).

No topo da coluna é aplicada uma amostra contendo as proteínas que serão adsorvidas ou não. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária (corrida cromatográfica), cada um dos componentes da mistura é seletivamente retido pela fase estacionária e arrastado pela fase móvel, que resulta em velocidades e tempo de migração específico. A velocidade de migração será acometida pela adsorção (interação com a fase estacionária) e solubilidade (interação com a fase móvel) de cada componente da mistura (VALIM, 2020).

Figura 3 Esquema de um cromatógrafo líquido.



Fonte: VALIM, 2020.

1.1.6 Cromatografia de Troca Iônica

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada e os solutos, com cargas de sinais contrários, são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser eluídos, por outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária ou por variação de pH (Figura 4) (COLLINS *et al.*, 2005).

A resina é um polímero sintético com grupos carregados, podendo ser catiônicos ou aniônicos. As resinas de troca catiônica são trocadoras de cargas positivas, sendo assim carregadas negativamente. As resinas de troca aniônica são trocadoras de cargas negativas, ou seja, a resina é carregada positivamente.

Os termos forte e fraco especificam a faixa na qual o estado de ionização dos grupos funcionais varia com o pH. Os trocadores iônicos fortes não têm variação da capacidade com variações de pH, sem ganhar ou perder prótons. Os trocadores iônicos fracos têm variação da capacidade com alteração do pH, podem ganhar ou perder prótons. Esses termos não se referem à intensidade com que os grupos funcionais se ligam às proteínas (CYTIVA, 2022).

Em pH abaixo de seu Ponto Isoelétrico (pI), a molécula carrega uma carga líquida positiva e se liga a um trocador de catiônico. Em um pH acima de seu pI, a molécula carregará uma carga líquida negativa e se ligará a um trocador aniônico.

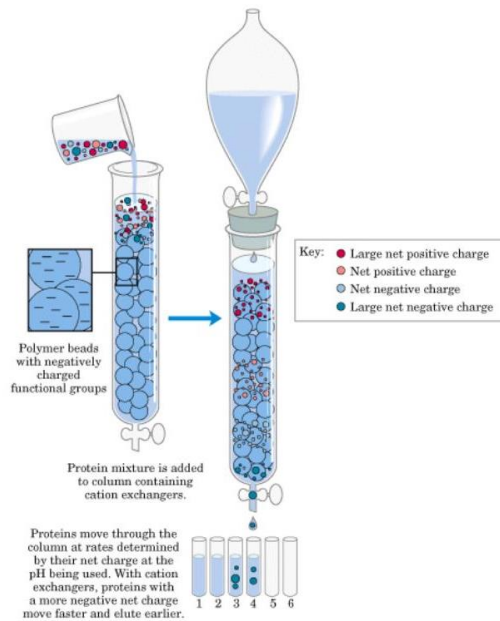
A ANX *Sepharose Fast Flow* (FF) é uma resina de troca aniônica fraca e apresenta grupos aminos terciários (grupos dietilaminopropil) ligados a uma matriz de agarose com ligações cruzadas de 4%.

A Q *Sepharose Fast Flow* é uma resina de troca aniônica forte e apresenta aminos quaternárias ligadas a uma matriz de agarose com ligações cruzadas de 6%.

Ambas as resinas possuem tamanho da partícula de 90 μm (CYTIVA, 2022).

A cromatografia de troca iônica possui facilidade de execução e escalonamento, alta resolução e adsorção. É a mais comumente usada quando se trata de purificação de proteínas (KILIKIAN, 2005).

Figura 4 Esquema da cromatografia de troca iônica em coluna.



Fonte: Augusto, 2022.

1.1.7 Imunoglobulinas

Imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas de conformação globular, circulantes na corrente sanguínea. As Igs são os principais mediadores da Resposta Imune Adquirida Humoral (RIH), nesse caso conhecido como Anticorpos em resposta ao antígeno que estimularam a sua produção (MONTASSIER, 2017).

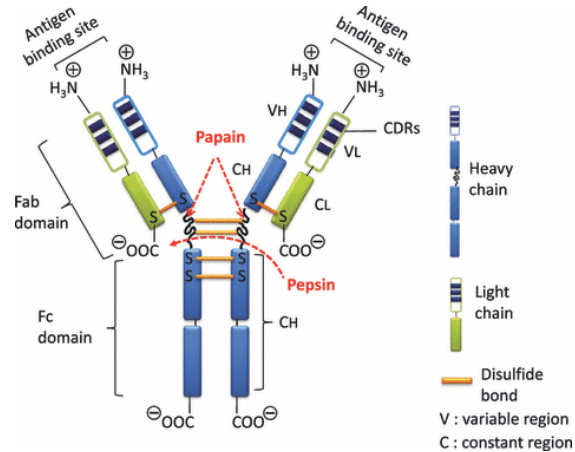
As Igs são divididas em cinco classes diferentes especializadas: Imunoglobulinas G, M, A, D e E (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), sendo IgG o mais predominante (atrás apenas da Albumina) e atua em conjunto com a IgM na proteção imediata e a longo prazo contra infecções. As Igs são compostas por quatro cadeias como unidade básica dividido em um par idêntico de cadeias leves de aproximadamente 25 kDa, e um par idêntico de cadeias pesadas com massa molecular de aproximadamente 50 a 70 kDa. A Figura 5 representa a estrutura da IgG, uma vez que todas as Igs possuem a estrutura básica em forma de “Y”.

A variação da composição de aminoácidos e sua sequência na cadeia pesada determinam a especificidade das Igs (MALE, 2005).

É importante conhecer todas as características das imunoglobulinas para purificá-las, dado que os métodos cromatográficos são determinados de acordo com essas características.

Além disso, as Igs são usadas em pacientes e a obtenção de imunoglobulina (Ig) humano para o uso terapêutico no Brasil pode ser obtido via Sistema de Saúde Suplementar (regulamentado pela ANVISA) ou via SUS (GOUDOURI *et al*, 2017).

Figura 5 Estrutura básica simplificada de imunoglobulina G.



Fonte: BURNOUF, 2010.

1.1.8 Imunoglobulina G

A IgG é o segundo anticorpo a ser produzido durante uma resposta imune. Na literatura, foi identificado que a IgG possui resposta imune tardia na proteção contra numerosos vírus, bactérias, fungos e infecções parasitárias. Possui memória imunológica.

É a segunda proteína em abundância presente no plasma, constitui as classes das imunoglobulinas (Figura 5).

As bandas das cadeias pesada e a leve da IgG são de 50 kDa e 25 kDa respectivamente. A IgG monômero tem massa molecular de 150 kDa. A IgG circulante está presente na concentração de 6,5 a 16,5 mg/mL com meia vida de aproximadamente 23 dias em adultos saudáveis.

São compostas por quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

Atualmente, a IgG é a Ig de maior interesse clínico e corresponde a mais da metade do mercado mundial.

1.1.9 Purificação de Imunoglobulina G

Comumente, a purificação de IgG é por cromatografia de troca iônica para proteínas por ser a mais simples e baixo custo. Nessas purificações, a IgG não é adsorvida à coluna e é recolhida no FT (VERINAUD, 2016).

O ponto isoelétrico da IgG para as quatro subclasses é de 7,2 - 8,6 (ADRIANE, 2013).

1.1.10 Imunoglobulina M

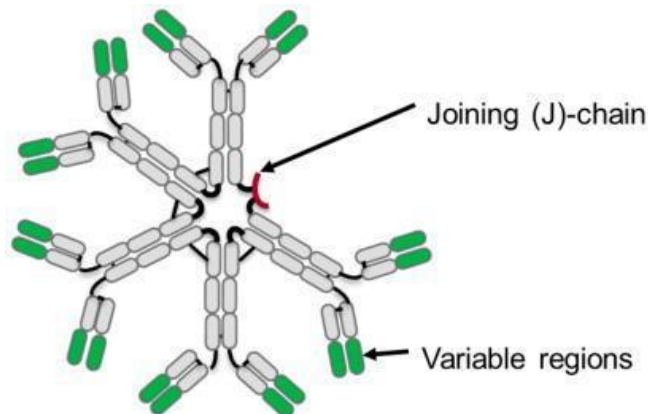
A IgM é o primeiro anticorpo a ser produzido durante uma resposta imune. Na literatura, foi identificado que a IgM possui resposta imune imediata e natural na proteção contra numerosos vírus, bactérias, fungos e infecções parasitárias. (EHRENSTEIN *et al.*, 2010).

As bandas das cadeias pesada e a leve da IgM tem 76 kDa e 25 kDa respectivamente. A IgM circulante está presente na concentração de 1 a 2 mg/ml. O monômero de IgM tem massa molecular de 190 kDa. O pentâmero de 970 kDa é a forma circulante predominante (Figura 6) e ocasionalmente apresenta-se na forma de hexâmetro. As cinco cadeias da IgM, são ligadas entre si por pontes dissulfeto e por uma cadeia polipeptídica chamada de cadeia J. A cadeia J une os cinco monômeros da IgM, confere mais eficiência à resposta imune e facilita a polimerização correta (BEZERRIL, 2002).

O Pentaglobin® é um produto comercializado de imunoglobulina humana enriquecido de IgM produzido pela Biotest. É uma solução injetável de concentração 50 mg/mL (a cada 1 mL de solução injetável 50,0 mg de proteína humana plasmática). Em sua composição contém 95% de imunoglobulina humana, distribuída nas 3 classes de Igs da seguinte forma: em 50,0 mg, 6 mg (12%) são de IgM, 6 mg (12%) de IgA e 38 mg (76%) de IgG.

O uso de IgM na preparação proporciona mais eficiência do que com IgG, uma vez que a forma pentâmera da IgM contribui para uma eficácia superior na neutralização de toxinas e aglutinação bacteriana em relação a IgG.

Figura 6 Estrutura pentâmera da IgM.



Fonte: KEYT *et al.*, 2020.

1.1.11 Purificação de Imunoglobulina M

Na literatura, não há muitos trabalhos específicos para produção [purificação] de IgM e a maioria utiliza a cromatografia de troca iônica por ser a mais comum, simples e de baixo custo (VERINAUD, 2016).

O ponto isoelétrico da IgM encontra-se no intervalo de de pH 4 - 9,1.

Quando a proteína de interesse se liga ao trocador iônico, o tampão utilizado para equilíbrio da coluna é usado novamente para remover todas as moléculas que não se ligam, a coleta dessa fração é denominada, “flow through” (FT). A eluição das imunoglobulinas ligadas à coluna é feita aumentando a força iônica do tampão (pela adição de NaCl ou alterando o pH). Conforme a concentração de NaCl aumenta, os íons Cl^- competem com as proteínas que estão ligadas à matriz, e assim as proteínas eluem da coluna. Ao alterar o pH para a eluição das moléculas da coluna, as proteínas com menor carga líquida são as primeiras a serem deslocadas. A maioria dos trabalhos descrevem que a IgG não é adsorvida e é recolhida no FT, enquanto a IgM é adsorvida à coluna, indicando que a IgM tem maior afinidade às resinas de troca aniônica.

1.1.12 Albumina

A albumina é uma proteína globular composta apenas por aminoácidos em maior concentração perfazendo 50 a 60% das proteínas totais do plasma

correspondente a (20 mg/mL), meia-vida de 21 dias e peso molecular aproximado de 66 kDa.

Estruturalmente, é uma proteína plasmática, com cargas negativas, periferia hidrofílica e centro hidrofóbico. Solúvel em água ou em soluções salinas concentradas, quando exposta ao calor excessivo, acontece a desnaturação.

Albume significa clara de ovos e “Albus” que quer dizer “branco” do latim. Por essa razão a albumina é conhecida como a proteína da clara do ovo, onde é encontrada em grande quantidade.

Dependendo de sua localização, a albumina é denominada de formas distintas: seroalbumina, ovoalbumina e lactoalbumina, presentes no plasma, clara do ovo e leite respectivamente.

A albumina também é usada no tratamento de queimaduras, hemorragias e em pessoas que passaram por cirurgias plásticas.

Edwin Cohn isolou a albumina para tratar perda de sangue e lesões em campos de batalha (COHN *et al.*, 1946).

Segundo a OMS, a albumina constitui um dos medicamentos biológicos mais importantes para o sistema mundial de saúde (COVAS, 2014).

1.1.13 Purificação de Albumina

A purificação de albumina é descrita em muitos trabalhos na literatura, entre os quais muitos utilizaram a cromatografia de troca iônica por ser a mais comum, simples e de baixo custo.

O ponto isoelétrico da albumina encontra-se no intervalo de pH 4,7 - 4,9. Em pH igual ao seu pI as proteínas tendem a precipitar, pois tendo as cargas neutras, apresentam a camada de solvatação menos organizada. Em pH abaixo de seu pI, a molécula carrega uma carga líquida positiva e se liga a um trocador de catiônico. Em um pH acima de seu pI, a molécula carregará uma carga líquida negativa e se ligará a um trocador aniônico (ADRIANE, 2013).

A purificação de albumina em coluna de troca aniônica é ideal, pois é adsorvida, devido sua estrutura com cargas negativas em pH neutro.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral deste projeto é a purificação das imunoglobulinas IgG e IgM a partir de plasma humano, empregando cromatografia de troca aniônica.

2.2 Específicos

Obter *Flow Through* (FT) da Purificação de plasma humano em coluna ANX Sepharose FF;

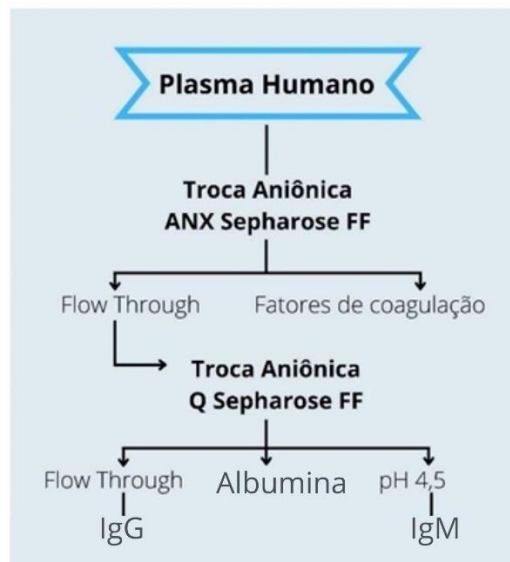
Separar as frações que contém albumina, IgG e IgM a partir do FT da ANX Sepharose FF.

3 METODOLOGIA

Nesse projeto foram estudadas as purificações a partir de plasma humano com dois “pools” de plasma (“Pool” 1/22 e “Pool” 2/22).

A primeira purificação do plasma em coluna ANX *Sepharose FF*, teve como objetivo obter o *Flow Through* (FT), fração em que se encontram as imunoglobulinas. O FT obtido na ANX *Sepharose FF* foi aplicado em coluna Q *Sepharose FF* com objetivo de obter as frações enriquecidas de IgG, albumina e IgM (Figura 7).

Figura 7 - Purificações realizadas nesse projeto. Esquema das etapas de purificação, partindo-se dos “pools” de plasma, o FT foi separado na primeira purificação realizado em ANX *Sepharose FF*. Na segunda etapa, em coluna Q *Sepharose FF*, o FT contendo IgG, albumina e IgM são separadas em frações distintas.



Fonte: próprio autor, 2023.

3.1 Materiais

As bolsas de Plasma Fresco Congelado com aproximadamente 200 mL coletados em bolsas com pH aproximado de 7,4 foram cedidas gentilmente pela Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo e armazenadas em freezer -80° C até a utilização.

Os equipamentos utilizados foram: Cromatógrafo NGC Discover Chromatography Systems da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura), controlado pelo ChromLab Software; Fonte para eletroforese Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura); Sistema de imagem para revelação de gel Loccus (Loccus, Brasil), controlado pelo programa L-Pix Image DS; Leitor de microplacas de 96 poços Loccus LMR 96-8 (Loccus, Brasil); pHmetro PG 2000 GEHAKA (GEHAKA, Brasil); Condutivímetro de bancada AJ Micronal AJX 515 (AJMicronal, Brasil). O sistema para preparação de géis de poli(acrilamida) utilizado foi o Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura).

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada do sistema MilliRiOs da Millipore® (Merck Millipore, Brasil); a água foi filtrada em Stericup 0,22µm GV PVDF Millipore® (Merck Millipore, Brasil).

As resinas da GE Healthcare utilizadas foram: ANX *Sepharose Fast Flow* (FF) e Q *Sepharose Fast Flow* (FF).

Para realização dos testes analíticos foram utilizados: Dual Color Standards Bio-rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura); Protein Unstained Standards Bio-rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura); Protein Assay da Bio-rad (Bio-Rad Laboratories, Singapura); Albumina Sérica Bovina (BSA) Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Brasil); IgM Mono Kovalent (Kovalent, Rio de Janeiro, Brasil); Calibrador de proteínas TOPKAL MULTI TURBI Kovalent (Kovalent, Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo do Plasma Humano

O Plasma humano foi utilizado como amostra de entrada na primeira coluna de purificação ANX *Sepharose FF*.

Para utilização, as bolsas de plasma foram retiradas do freezer -80° C um dia antes da purificação e deixadas em câmara fria para descongelar.

Para a preparação do “pool” 1/22 foram usadas seis bolsas de Plasma Fresco Congelado (PFC) e para a preparação do “pool” 2/22 foram usadas cinco bolsas de PFC. Este procedimento evita o rompimento das bolsas devido ao choque térmico.

No dia da purificação, as bolsas foram colocadas em banho a 37° C até que estivessem totalmente descongeladas. O plasma foi reunido em um béquer e o

volume medido em uma proveta. O uso de “pools” de plasma visa eliminar as diferenças individuais, uma vez que cada bolsa vem de um doador.

O pH do plasma é 7,4. Para as purificações, o pH foi ajustado para pH 6,0 com ácido cítrico 0,25 M, na proporção 4 mL de ácido cítrico a cada 100 mL de plasma.

Foram separadas 10 alíquotas de 1 mL antes e 10 alíquotas de 1 mL após ajuste do pH e armazenadas em freezer -80° C para realização de análises.

O volume total obtido nos “pools” 1/22 e 2/22 foram de aproximadamente 1.200 mL cada.

3.2.2 Purificações

Para o preparo da purificação, foram feitas separações dos materiais e etiquetas. O programa da purificação no software ChromLamb foi elaborado com as condições experimentais (fluxo, volume de amostra e etapas da purificação) de acordo com a purificação de interesse. A coluna foi conectada ao cromatógrafo. Os tubos do cromatógrafo foram lavados com água, as bolhas retiradas do sistema e preenchidos com seus respectivos tampões. O tubo de amostra foi preenchido com a solução de equilíbrio antes da entrada da amostra para purificação. A sonda de pH do cromatógrafo foi calibrada com tampões pH 7,00 e 4,00.

A partir das frações recolhidas foram retiradas alíquotas em dez unidades de 1 mL cada. As frações e as alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C.

3.2.2.1 Purificação do plasma em resina ANX Sepharose FF

A purificação do plasma humano foi realizada em coluna XK 26/20 contendo 57 mL de resina ANX *Sepharose FF*.

As soluções tampão utilizadas foram citrato 25 mM pH 6,0 contendo diferentes concentrações de NaCl e CaCl₂ conforme mostrado na Tabela 1.

O fluxo da fase móvel utilizado na purificação foi de 25 mL/min, exceto na entrada da amostra em que foi de 15 mL/min e no reequilíbrio em que foi de 20 mL/min.

Para retirar a solução em que foram estocadas, as colunas foram lavadas com água purificada. O procedimento foi controlado observando-se o pH e a condutividade.

Na purificação empregando o “pool” 1/22, a coluna foi inicialmente lavada com 1 volume de coluna (VC) de tampão 500/5 para abaixar o pH da coluna. Na segunda purificação esta lavagem não foi necessária. O equilíbrio da coluna foi realizado com 10 VC do tampão 85/5. 10 VC de plasma (“pool” 1/22 ou “pool” 2/22) foram aplicados à coluna e 10 VC de tampão 85/5 são eluidos para eluir as proteínas não adsorvidas. As frações coletadas foram denominadas FT e Reequilíbrio, respectivamente. Após o reequilíbrio, foi realizado um aumento na concentração de sal para 200 mM com 10 VC do tampão 200/5. Posteriormente, aumentou-se concentração de cálcio para 10 mM com 5 VC do tampão 200/10 e depois 25 mM de cálcio com o tampão 200/25. Em seguida foram aplicados 5 VC do tampão 200/5 e por fim 5 VC do tampão 500/5.

A coluna ANX *Sepharose FF* foi lavada após cada experimento com NaCl 2 M, NaOH 0,5 M, com repouso de 1 hora, e água Milli-Q. A ANX *Sepharose FF* armazenada com Etanol 20% após a purificação do “pool” 1/22 e ANX *Sepharose FF* armazenada com Etanol 20% em tampão citrato 25 mM, NaCl 85 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 6 após a purificação do “pool” 2/22. Os tubos do cromatógrafo foram lavados com NaOH 0,5 M, água, Ácido Acético 50 mM e finalizado com água purificada.

Ao final das purificações, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de proteínas totais pelo método de Bradford e em gel de poliacrilamida.

Tabela 1 - Soluções tampão utilizadas nas purificações dos “pools” 1/22 e 2/22 de plasma humano em ANX *Sepharose FF*

	Tampão citrato 25 mM pH 6,0		Volume (mL)
	NaCl (mM)	CaCl ₂ (mM)	
Tampão 85/5	85	5	10 VC
Tampão 200/5	200	5	15 VC
Tampão 200/10	200	10	5 VC
Tampão 200/25	200	25	5 VC
Tampão 500/5	500	5	5 VC

Fonte: próprio autor, 2023.

3.2.2.2 *Preparação da amostra de entrada para a coluna Q Sepharose FF*

A segunda etapa de purificação foi realizada em coluna XK26/20 resina Q *Sepharose FF*. A amostra de entrada foi o FT da purificação em ANX *Sepharose FF*.

O FT foi retirado do freezer -80° C e mantido em freezer -20° C “overnight”. No dia seguinte, a amostra foi descongelada em banho 37° C até obter o conteúdo homogêneo e ficou em temperatura ambiente até descongelar completamente.

A amostra da coluna Q *Sepharose FF* precisa estar 10 vezes diluída em relação ao plasma. Para fazer o cálculo da diluição, consideramos inicialmente os volumes de entrada de plasma e o volume do FT. Como os valores estavam ao redor de 1,3 x, foi realizada uma primeira diluição com o tampão 85/5 para 1,6x, a fim de uniformizar a porcentagem de tampão 85/5. Em seguida as amostras foram diluídas até 10x com o tampão de equilíbrio da coluna Q *Sepharose FF* (Tris-HCl 100 mM pH 8,0).

Foram feitas alíquotas de dez unidades de 400 µL cada do FT coletado, do FT 1,6 x e do FT 10 x. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80° C análises dessas frações.

3.2.2.3 *Purificação do FT da ANX Sepharose FF em Q Sepharose FF*

A segunda purificação foi realizada em coluna de Q *Sepharose FF* de 52 mL e utilizou como amostra de entrada o FT da purificação em ANX *Sepharose FF*.

A amostra de entrada da purificação foi o FT do “pool” 1/22 ou “pool” 2/22.

As soluções tampão utilizadas foram com gradiente de pH e sal e as condutividades de cada tampão estão apresentados na Tabela 2 e 3, nomeadas de acordo com as molaridades e pH. As condutividades de cada tampão foram ajustadas com água em condutivímetro de bancada. Para isso, é necessário encontrar o equilíbrio entre pH e condutividade. Essas duas variáveis são controladas minuciosamente até atingir pH e condutividade desejados.

O fluxo da purificação determinado foi de 25 mL/min, exceto para o equilíbrio da coluna 20 mL/min e entrada da amostra 15 mL/min.

Para diminuir o pH, a coluna foi lavada com 2 VC de tampão NaCl 1 M pH 4,5 antes do tampão de equilíbrio. Na segunda purificação esta lavagem não foi necessária. O equilíbrio da coluna foi realizado com 5 VC tampão de equilíbrio.

Aplicou-se 5 VC de amostra, em seguida, uma lavagem de 10 VC, com tampão de equilíbrio (reequilíbrio). As coletas dessas frações foram denominadas FT e Reequilíbrio, respectivamente. A eluição das proteínas que adsorveram à coluna foi feita com cada solução tampão.

Ao final da purificação, as amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de proteínas totais pelo método de Bradford, eletroforese em gel de poliacrilamida e imunoturbidimetria para IgM (somente para o “pool” 2/2).

Tabela 2 - Soluções tampão utilizadas na purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 em ANX Sepharose FF. As condutividades foram medidas no condutivímetro de bancada.

Solução Tampão	Condutividade da solução (mS/cm)	Volume (VC)
Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0	5,05	15
Tampão Tris-HCl 100 mM, CaCl ₂ 15 mM, pH 8,0	28,5	5
Tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5	1,549	5
Tampão acetato 100 mM, pH 5,5	6,53	5
Tampão acetato 100 mM, pH 4,5	2,85	5
Tampão acetato 100 mM, NaCl 300 mM, pH 4,5	31,0	5
Tampão acetato 100 mM, NaCl 1 M, pH 4,5	67,2	5

Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 3 - Soluções tampão utilizadas na purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 em ANX Sepharose FF. As condutividades foram medidas no condutivímetro de bancada.

Solução Tampão	Condutividade da solução (mS/cm)	Volume (VC)
Tampão de equilíbrio: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0	5,05	15
Tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5	1,581	5
Tampão acetato 100 mM, pH 5,5	6,53	5
Tampão acetato 100 mM, pH 4,5	3,58	5
Tampão acetato 100 mM, NaCl 300 mM, pH 4,5	31,0	5

Tampão acetato 100 mM, NaCl 1 M, pH 4,5

65,3

5

Fonte: próprio autor, 2023.

3.2.2.4 Métodos Analíticos

3.2.2.4.1 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

Bradford é método colorimétrico que quantifica proteínas totais em determinada amostra.

A quantificação de proteínas totais das frações coletadas nas purificações foi realizada pelo método de Bradford em microplacas de 96 poços. O reagente de Bradford foi diluído conforme instruções do fabricante (1 parte do reagente de Bradford para 4 partes de água).

As proporções aplicadas na placa foram de 10 μ L de amostra para 200 μ L do reagente de Bradford.

O padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA) de concentração de 2 mg/mL foi utilizada para construir a curva de calibração. De acordo com o fabricante o intervalo linear da curva é entre 0,05 mg/mL e 0,5 mg/mL.

As amostras com valores de absorbância acima da curva de calibração foram diluídas com solução salina 0,9% (m/v). As amostras foram lidas no leitor de microplacas no comprimento de onda 595nm.

Os valores de proteínas presentes em cada amostra são obtidos através do cálculo da concentração em função da absorbância através da equação da reta obtida pela curva de calibração. A curva de calibração foi construída todas as vezes que o teste foi realizado. A Tabela 4 mostra como foi preparada a curva de calibração.

Tabela 4 - Curva de calibração para a quantificação proteica pelo método de Bradford.

Pontos da Curva	BSA 0,5mg/mL (%)	BSA 0,5mg/mL (μ L)	NaCl 0,9% (μ L)	Concentração BSA (mg/mL)
P5	100	10	-	0,500

P4	75	30	10	0,375
P3	50	10	10	0,250
P2	25	10	30	0,125
P1	10	10	90	0,050
Branco	0	-	20	0

Fonte: próprio autor, 2023.

3.2.2.4.2 *Eletoforese em gel de poliacrilamida*

Na eletroforese em poliacrilamida, a mobilidade eletroforética depende do peso molecular e da carga elétrica, em que as moléculas menores migram mais rápido do que as maiores, gerando diferentes bandas, reveladas por corante específico a proteínas.

Os géis de 1 mm de espessura foram preparados de acordo com as condições experimentais descritas na Tabela 5. Foi seguido o protocolo descrito por Laemmli (1970). O dodecilsulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico, é responsável por desnaturar as proteínas e envolvê-las com cargas negativas, garantindo que todas irão migrar para o polo positivo e a característica redutora devido à presença de β -mercaptoetanol no tampão de amostra.

Após aplicação do gel de separação, foi aplicado isopropanol para o gel se manter reto nas laterais e lavado com água. Após a polimerização deste gel, foi aplicado sobre este, o gel de empilhamento com concentração de 4% (v/v).

O tampão de amostra foi concentrado 5x e compõe-se de SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v) ou 0,1 mg/mL, tampão Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, β -mercaptoetanol 1,4% (v/v) ou 0,2M, Glicerina 10% e água Milli-Q para completar o volume.

Conforme o resultado do teste de Bradford foi necessário diluir ou concentrar as amostras. A diluição foi feita com NaCl 0,9% (m/v). As amostras que precisavam ser concentradas foram precipitadas com acetona gelada na proporção 1:4 (amostra: acetona), mantidas por 10 minutos no freezer (-20°C), e em seguida centrifugadas por 10 minutos com 7000 rotações por minuto (rpm), à 4°C. O sobrenadante foi descartado. O “pellet” contendo as proteínas foram ressuspensas com NaCl 0,9% (m/v). Em seguida foram adicionados 10 μ L de tampão de amostra

(5x) a 40 µL de amostra. Submeteu-as no vórtex e a um “spin” na centrifuga, as amostras foram aquecidas a aproximadamente 98° a 100°C por 10 minutos.

Após a montagem do sistema e imersão dos géis na cuba, acrescentou-se o tampão de corrida diluído no dia do experimento, da solução 10x concentrada (Tris base 25mM, Glicina 0,192M e SDS 0,1%).

Quinze microlitros de cada amostra e 5 µL de padrão de massa molecular de foram aplicadas ao gel.

A corrida foi realizada deixando-se a uma tensão de 90 V por 15 minutos e o restante da corrida à 180 V. Retirou cuidadosamente os géis do suporte e fez lavagens 3x com água no intervalo de 10 minutos cada.

Para a coloração os géis foram deixados na presença da solução corante composta de: Sulfato de Alumínio 5% (p/v), Etanol 96% 10% (v/v), Coomassie Brilliant Blue – G250 0,02% (p/v), Ácido orto fosfórico 85% 2% (v/v) e água até completar o volume, sob agitação por aproximadamente 2 horas. Quando necessário, os géis foram deixados na presença do descorante (Etanol 96% 10% (v/v), Ácido orto fosfórico 85% 2% (v/v) e água para completar o volume) sob agitação por 20 minutos. Ao final deixou os géis em Ácido Acético 0,5 M. O gel foi escaneado pelo Densitômetro Loccus (Loccus, Brasil).

Tabela 5 - Soluções utilizadas no preparo de um gel de poliacrilamida de 1mm de espessura.

Espessura do gel: 1 mm	Gel de separação	Gel de empilhamento
Concentração	10%	4%
Sol. acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	1,67 mL	325 µL
Tampão Tris-HCl 1,5M, SDS 0,4%, pH 8,8 (4x)	1,25 mL	-
Tampão Tris-HCl 0,5M, SDS 0,4%, pH 6,8 (4x)	-	0,625 mL
H ₂ O Milli Q	2 mL	1,5 mL
APS 10%	50 µL	25 µL
Temed	7,5 µL	5 µL
Volume total	5 mL	2,5 mL

Fonte: próprio autor, 2023.

3.2.2.4.3 Dosagem de IgM por Imunoturbidimetria

Para a dosagem de IgM foi utilizado o calibrador de proteína Topkal Multi Turbi. O valor de referência para o lote utilizado é de 3,70 mg/mL. A curva de calibração foi construída com base na concentração específica de cada proteína indicada no manual do fabricante. Para a curva de calibração do teste para IgM seguimos as instruções do fabricante para os pontos da curva de calibração: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160.

Utilizou microplaca, ao invés de cubeta, como indicado pelo fabricante. Diminuímos o volume, mantendo a proporção dos componentes do teste. Para a dosagem de IgM com o reagente IgM Mono. Após a mistura da amostra com o reagente, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 10-15 minutos. A leitura da placa foi realizada em Leitor de Microplaca, no comprimento de onda de 340 nm. A Tabela 6 mostra como foi preparada a curva de calibração.

Tabela 6 - Curva de calibração para a dosagem de IgM pelo método de Imunoturbidimetria.

Pontos	Diluição	IgM (mg/mL)	Preparo das amostras	
			Calibrador	NaCl 0,9% (µL)
1	1:10	0,359	10 µL calibrador	90
2	1:15	0,269	30µL do 1:10	10
3	1:20	0,180	20µL do 1:10	20
4	1:40	0,090	20µL do 1:20	20
5	1:160	0,023	10µL do 1:40	30
Branco	-	zero	-	12

Fonte: próprio autor, 2023.

4 RESULTADOS

Neste projeto, estudamos a purificação de imunoglobulinas IgG e IgM a partir do plasma humano. Foram realizadas 2 etapas de purificação, a primeira em resina ANX *Sepharose FF*. Em seguida os FTs da ANX seguiram para a coluna Q *Sepharose FF*.

4.1 Purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX *Sepharose FF*

Devido a um problema na elaboração do programa para a corrida no cromatógrafo, a purificação foi adiada para o dia seguinte e o plasma permaneceu à temperatura ambiente por um dia.

A resina baixou durante a eluição do tampão de equilíbrio 85/5 com fluxo de 25 mL/min e voltou a subir com a amostra de entrada com fluxo de 15 mL/min e a condutividade de 15,1 mS/cm. Isto acontece quando o topo da coluna não está tão fortemente empacotamento ou se há um pequeno entupimento na entrada da resina. A segunda hipótese foi descartada uma vez que não foi observado o aumento da pressão no sistema. Além disso, quando se diminuiu o fluxo para a entrada da amostra a resina voltou à altura inicial, indicando que não houve diluição da amostra. É importante observar que o abaixamento da resina não afeta a purificação. Foram aplicados 560 mL (10 VC) de plasma.

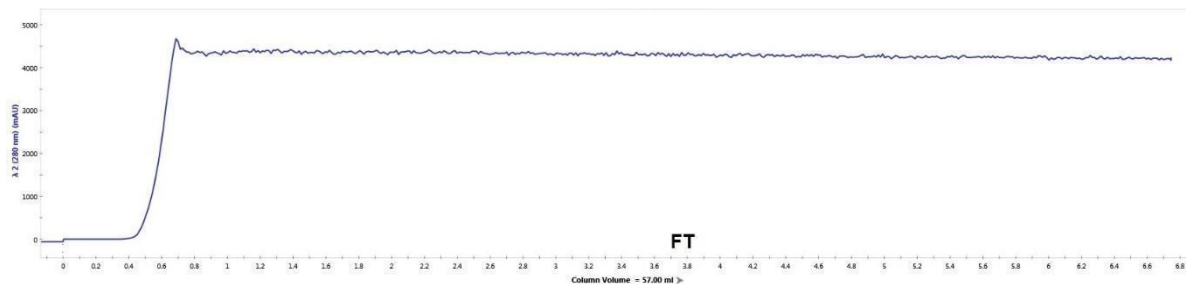
Após o início da corrida, o cromatógrafo parou de registrar o cromatograma. Então, terminada a entrada a amostra, a corrida foi interrompida para reiniciarmos o computador. A purificação foi retomada a partir da entrada do tampão de equilíbrio para a lavagem das proteínas não adsorvidas. Por esta razão a purificação foi registrada em 2 figuras. A Figura 8 mostra o início da purificação com o pico do FT e a Figura 9 apresenta o restante do FT e as demais frações da purificação.

Na etapa de eluição do tampão 200-5 (B), entrou ar no sistema, pois o volume de solução tampão era inferior ao que era necessário para a purificação, resultando no volume da fração coletada inferior ao esperado. Porém não houve prejuízo para a purificação, pois, este tampão foi usado somente para diminuir a concentração de cálcio no sistema e não para eluição de proteínas.

O FT está 1,39x diluído em relação ao plasma. Para cálculo, utilizamos o volume coletado do FT, 790 mL dividido pelo volume do plasma humano aplicado à coluna, 570 mL.

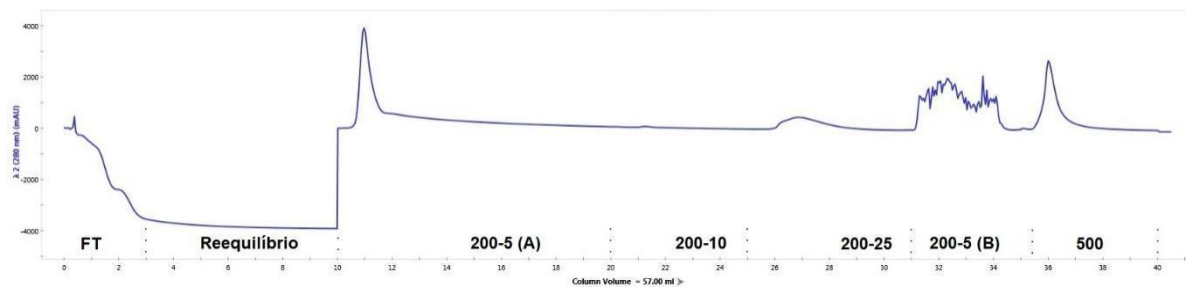
Além do FT, o cromatograma apresentou picos nas frações 200-5 (A), 200-25 e 500.

Figura 8 - Cromatograma da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF- Fração do FT.



Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 9 - Cromatograma da Purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF- Frações da purificação.

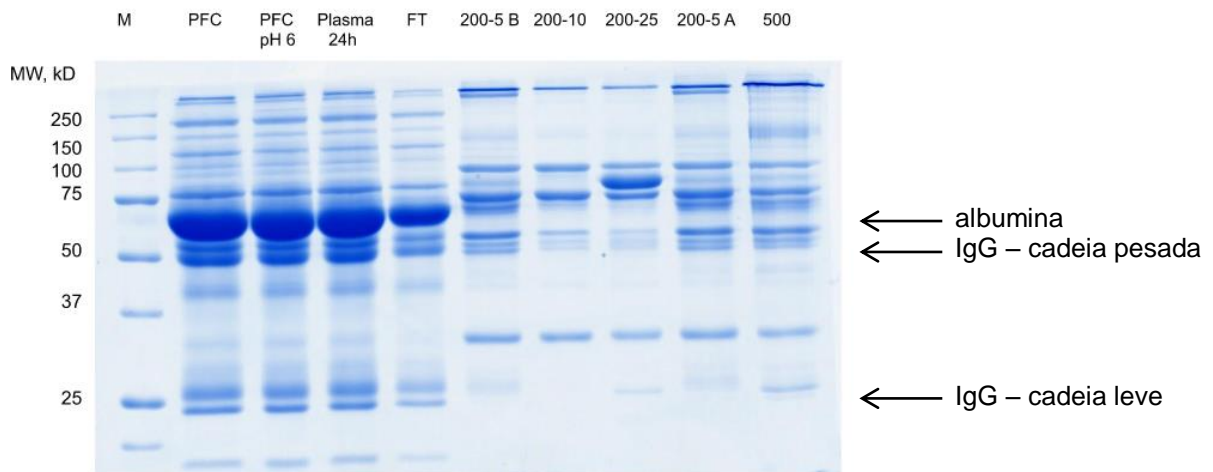


Fonte: próprio autor, 2023.

A análise em gel de poliacrilamida está representado na Figura 10, e mostra que o perfil proteico do FT é semelhante ao perfil proteico do plasma humano. Era esperado obter a semelhança entre o Plasma e o FT. Além disso, o perfil das demais frações coletadas é semelhante ao observado em purificações anteriores realizadas no laboratório. É possível observar as bandas de albumina (66 kDa) e da IgG (25 kDa e 50 kDa) no gel, conforme indicado na Figura 10. Essas bandas podem ser facilmente identificadas, porque são as proteínas mais abundantes do plasma. Devido à sua baixa concentração e por estar numa mistura de proteínas, não foi possível visualizar a banda da cadeia pesada de IgM. Sabe-se que a cadeia

leve de IgM, por tem a mesma massa da cadeia leve de IgG, está na mesma posição da cadeia leve dessa proteína.

Figura 10 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF. Canaletas: M: marcador de massa molecular; PFC: “pool” 1/22 de plasma; PFC pH6: “poll” 1/22 de plasma, pH 6, ajustado com 0,25M de ácido cítrico; Plasma 24h: amostra de entrada; As amostras de plasma e FT foram diluídas 40 x, as demais amostras foram aplicadas sem diluição.



Fonte: próprio autor, 2023.

Embora tenham ocorrido algumas intercorrências durante a purificação, o perfil do gel de poliacrilamida obtido é bastante semelhante ao observado em purificações anteriores de plasma com esta coluna. Desta forma, o FT da ANX Sepharose FF “pool” 1/22 foi utilizado como amostra de entrada na coluna Q Sepharose FF.

4.2 Purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF

A purificação do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF foi realizada para a separação da IgG, albumina e IgM.

Este experimento foi realizado com base nos experimentos realizado por OLIVEIRA (2022), repetimos as condições experimentais em que foi feito um gradiente de pH (8,0; 7,5, 5,5 e 4,5), seguido de um gradiente de sal em pH 5,5 (NaCl 300 mM e 1 M) em tampão acetato 100 mM pH 5,5. Adicionamos uma etapa

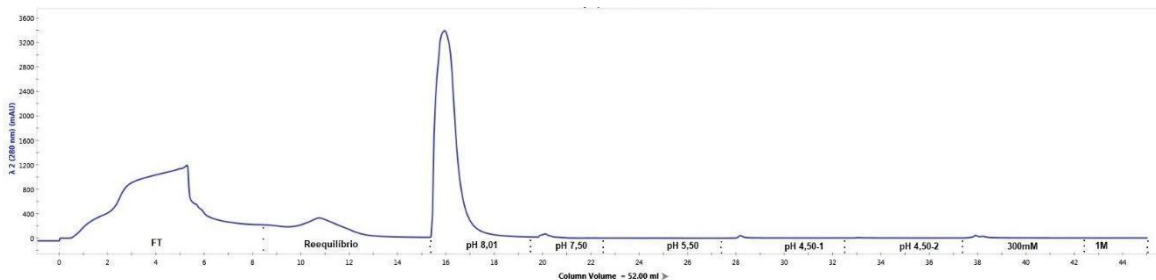
em pH 8,0, em que introduzimos CaCl_2 15 mM antes da eluição com tampão Tris-HCl 100 mM de pH 7,5. Além disso, a gradiente de sal foi realizado em pH 4,5 e não em pH 5,5.

O FT da ANX *Sepharose FF* foi aplicado, 260 mL (5VC) à coluna, correspondendo a 688,6 mg de proteína.

A condutividade da amostra de entrada foi ajustada de 6,43 mS/cm para 5,05 mS/cm (condutímetro) com a adição de 93 mL de água purificada até atingir a mesma condutividade do tampão de equilíbrio pH 8,0. O fluxo durante a entrada da amostra foi de 15 mL/min. Durante a entrada da amostra foi observada uma proteína de coloração azul no topo da coluna, que eluiu no reequilíbrio.

O perfil do cromatógrafo (Figura 11) mostrou picos maiores (FT, reequilíbrio e pH 8,0 com CaCl_2) e picos menores quase imperceptíveis (pH 7,5 e pH 4,50-1). O pico do pH 4,5 foi dividido no momento da coleta para pH 4,50-1 e pH 4,50-1, uma vez que essa fração junto ficaria muito diluída.

Figura 11 - Cromatograma da purificação em coluna Q *Sepharose* do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX *Sepharose FF*.



Fonte: próprio autor, 2023.

A curva de calibração na Tabela 7 e 8 e Gráfico 1 com os resultados do teste de Bradford, mostrados na Tabela 9 e no Gráfico 2 indicam que as proteínas eluam nas frações FT e em pH 8,0 com CaCl_2 15 mM.

O gel 1 mostrado na Figura 12 corrobora este resultado. O gel de poilicarilamida representado no gel da Figura 12 mostra que a banda de aproximadamente 66 kDa indica que a albumina foi coletada em pH 8,0 isso explica a coloração da fração amarela no momento da coleta. Porém, era esperado a coleta da Albumina na fração do pH 5,5. A IgG não adsorveu à coluna e foi coletada no FT, pode-se observar as bandas da cadeia pesada 50 kDa e cadeia leve 25 kDa da IgG.

A eluição com o CaCl_2 foi introduzido para verificar a possibilidade de eluir o FVII de coagulação. Entretanto a concentração de 15 mM foi muito alta e o tampão eluiu também as demais proteínas adsorvidas da coluna.

Tabela 7 - Absorbâncias dos pontos da curva de calibração da dosagem de proteínas pelo método de Bradford da purificação em coluna Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.

P5	P4	P3	P2	P1	Branco
0,913	0,753	0,601	0,518	0,452	0,338

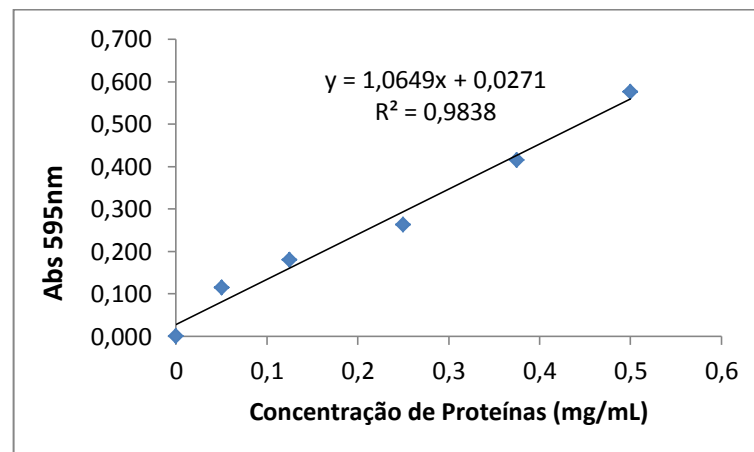
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 8 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.

Pontos da curva	% BSA 0,5mg/mL	BSA 0,5mg/mL (μL)	NaCl 0,9% (μL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Abs 595nm
P5	100	10	-	0,5	0,575
P4	75	30	10	0,375	0,415
P3	50	10	10	0,25	0,263
P2	25	10	30	0,125	0,180
P1	10	10	90	0,05	0,114
Branco	0	-	20	0	0,000

Fonte: próprio autor, 2023.

Gráfico 1 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



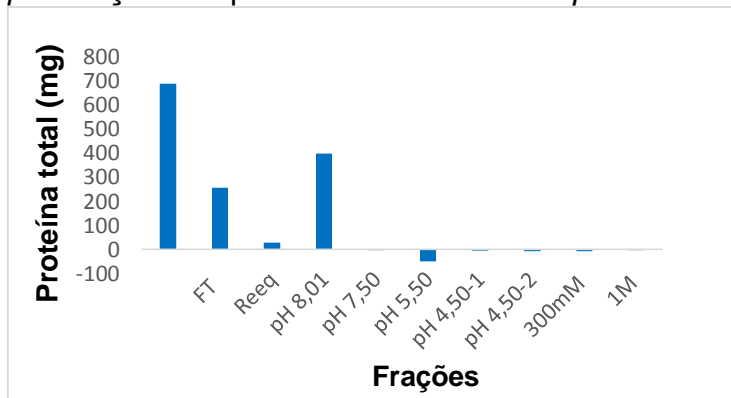
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 9 - Dosagem proteínas das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF, segundo o método de Bradford.

Amostra	Volume Fração (mL)	Abs 595nm	Diluição	[proteína] curva (mg/mL)	[proteína] amostra (mg/mL)	Proteína total (mg)	% Recuperação
Amostra de entrada	260	0,193	17	0,16	2,65	689	100
FT	430	0,133	6	0,10	0,60	257	37
Reequilíbrio	380	0,107	1	0,08	0,08	29	4
pH 8,01	250	0,196	10	0,16	1,59	397	58
pH 7,50	105	0,001	1	-0,02	0	0	0
pH 5,50	270	-0,001	7	-0,03	0	0	0
pH 4,50-1	270	0,006	1	-0,02	0	0	0
pH 4,50-2	270	-0,006	1	-0,03	0	0	0
300 mM	270	-0,003	1	-0,03	0	0	0
1 M	130	0,001	1	-0,02	0	0	0
Totais						683	99

Fonte: próprio autor, 2023.

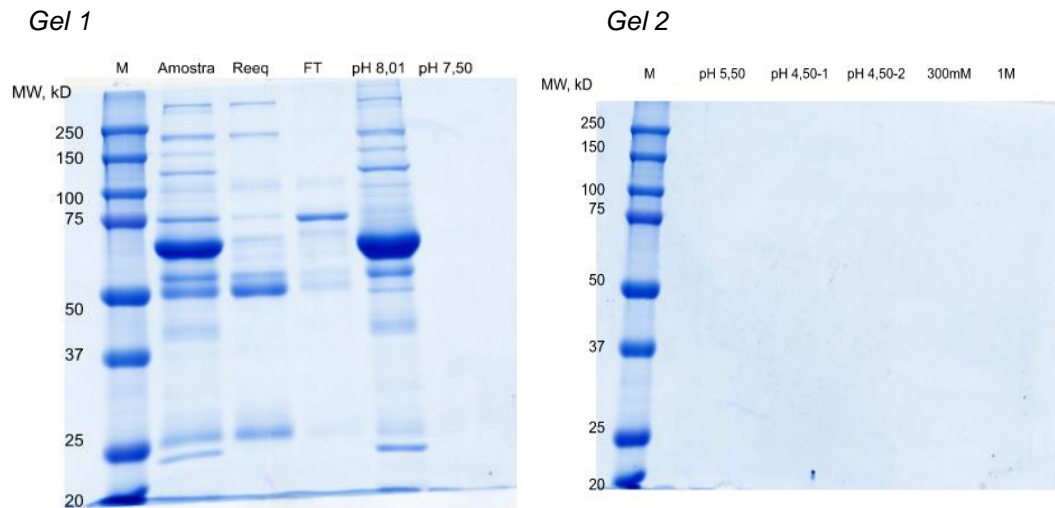
Gráfico 2 - Proteína total das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 12 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX Sepharose FF. Gel 1 Canaletas: M: marcador de massa molecular; Amostra: amostra de entrada, diluído 6x; FT: diluído 2x; Reequilíbrio: concentrado 2x; pH 8,01: diluído 2x; pH 7,50:

concentrado 3x. Gel 2 Canaletas: M: marcador de massa molecular; pH 5,50: diluído 2x; pH 4,50-1: concentrado 3x; pH 4,50-2: concentrado 3x; 300mM: concentrado 3x; 1M: concentrado 3x.



Fonte: próprio autor, 2023.

4.3 Purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF

A purificação de plasma em ANX *Sepharose FF* foi realizada novamente empregando o “pool” 2/22.

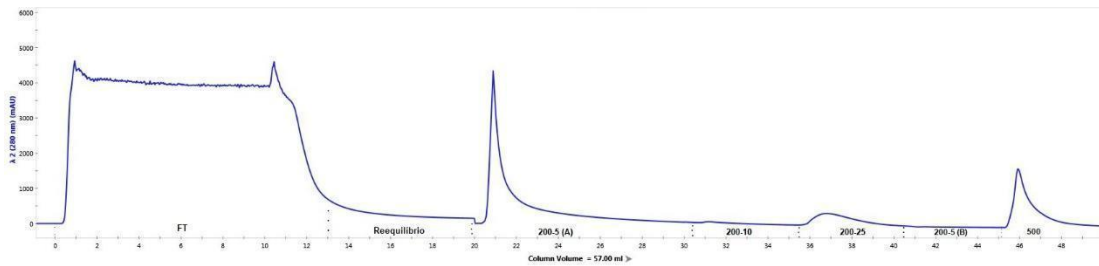
O plasma utilizado nesta purificação do “pool” 2/22 foi aplicado logo após o descongelamento das bolsas em banho a 37°C e atingir temperatura ambiente. A condutividade da amostra foi de 15,1 mS/cm.

As soluções tampão, programa da purificação contendo fluxo, volume de amostra e etapas da purificação utilizadas foram as mesmas da purificação do “pool” 1/22.

Inicialmente, passou-se tampão de equilíbrio (85/5) e a resina baixou, mas a purificação continuou até o final com a resina baixa e fluiu normalmente.

O perfil do cromatógrafo obtido na purificação está apresentado da Figura 13. O FT 1,31x diluído em relação ao plasma com 37618 mg de proteínas. O FT é o pico de interesse para a purificação em Q *Sepharose FF*. Além do FT, o cromatograma apresentou diferentes picos (200-5 (A), 200-25 e 500) com quantidades de proteínas no teste Bradford (tabela 7).

Figura 13 - Cromatograma da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF



Fonte: próprio autor, 2023.

As Tabelas 10 e 11 e o Gráfico 3 mostram os dados da curva de calibração do teste de Bradford. Os resultados do teste de Bradford, indicados na Tabela 12 e Gráfico 4, mostra que 98 % das proteínas totais não foram adsorvidas e foram recolhidas no FT. A recuperação total de proteínas foi de 99 %.

Tabela 10 - Absorbâncias dos pontos da curva de calibração da dosagem de proteínas pelo método de Bradford da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.

P5	P4	P3	P2	P1	Branco
0,946	0,797	0,672	0,498	0,402	0,350

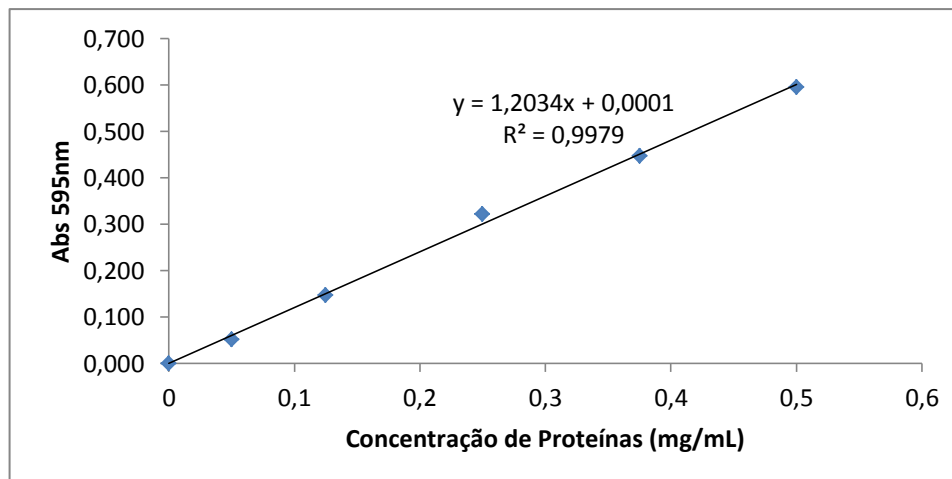
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 11 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.

Pontos da curva	% BSA 0,5mg/mL	BSA 0,5mg/mL (µL)	NaCl 0,9% (µL)	Concentração de proteínas (mg/mL)	Abs 595nm
P5	100	10	-	0,5	0,596
P4	75	30	10	0,375	0,447
P3	50	10	10	0,25	0,322
P2	25	10	30	0,125	0,148
P1	10	10	90	0,05	0,052
Branco	0	-	20	0	0,000

Fonte: próprio autor, 2023.

Gráfico 3 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

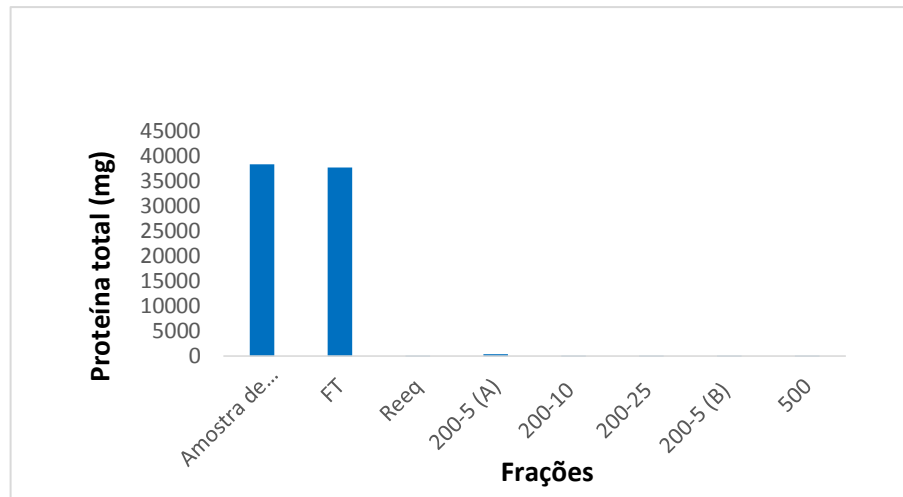
Tabela 12 - Dosagem de proteínas das frações da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF, segundo o método de Bradford.

Amostra	Volume Fração (mL)	Abs 595nm	Diluição	[proteína] curva (mg/mL)	[proteína] amostra (mg/mL)	Proteína total (mg)	% Recuperação
Amostra de entrada	570	0,202	400	0,17	67	38253	100
FT	750	0,151	400	0,13	50	37618	98
Reequilíbrio	405	0,175	2	0,15	0	118	0
200-5 (A)	580	0,130	6	0,11	1	376	1
200-10	285	0,130	2	0,11	0	62	0
200-25	290	0,057	6	0,05	0	82	0
200-5 (B)	290	0,028	2	0,02	0	13	0
500	260	0,132	3	0,11	0	85	0
Total						38355	99

Fonte: próprio autor, 2023.

A análise em gel de poliacrilamida está representada na Figura 14, e mostra que o perfil proteico desta purificação é semelhante à observada na purificação anterior. Também observamos que o perfil proteico do FT é semelhante ao perfil do plasma, que é coerente com o fato de que mais de 90% das proteínas do plasma eluem no FT.

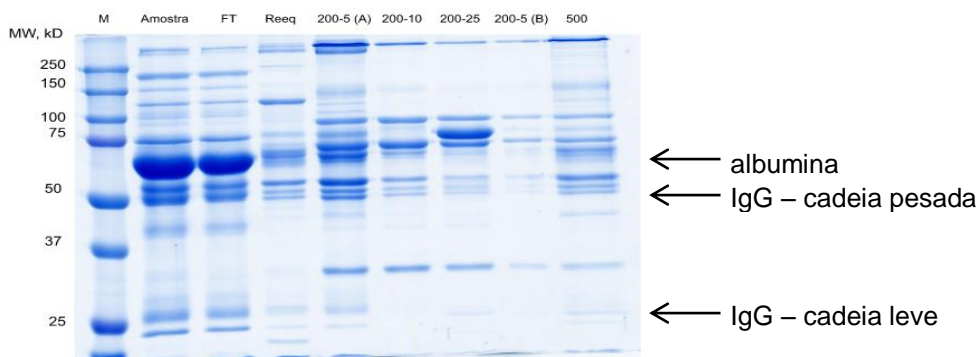
Gráfico 4 - Proteína total das frações da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

Finalmente, o FT desta purificação em ANX Sepharose FF foi utilizado como amostra de entrada na coluna Q Sepharose FF.

Figura 14 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF. Canaletas: M: marcador de massa molecular; PFC: “pool” 2/22 de plasma, diluído 40x; PFC pH 6: plasma com pH 6 ajustado com 0,25M de ácido cítrico, diluído 40x; Plasma 24h: amostra de entrada, diluído 40x; FT: diluído 40x; Reequilíbrio: 1x; 200-5 (A): 1x; 200-5 (B): 1x; 200-10:1x; 200-25: 1x; 500: 1x.



Fonte: próprio autor, 2023.

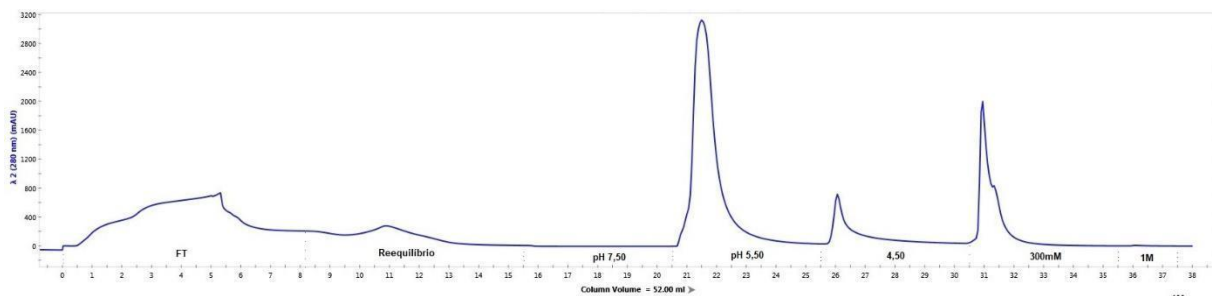
4.4 Purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 em ANX Sepharose FF

Nesta purificação, a etapa em pH 8,0 com o CaCl_2 15mM no tampão Tris-HCl 200 m foi retirada do protocolo (Tabela 2). A condutividade de 6,65 mS/cm para 5,05 mS/cm foi ajustada em condutímetro de bancada com 110 mL de água até atingir a mesma condutividade do tampão de equilíbrio pH 8,00.

Foram aplicados 260 mL (5 VC) do FT da ANX à coluna Q Sepharose FF.

O perfil do cromatógrafo obtido na purificação está apresentado da Figura 15. Observamos picos no FT, no Reequilíbrio, em pH 5,5, pH 4,5 e pH 4,5 contendo NaCl 300 mM. Durante a entrada da amostra foi observada uma proteína de coloração azul no topo da coluna, que eluiu com o tampão acetato 100 mM contendo NaCl 300mM pH 4,5.

Figura 15 - Cromatograma da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

As Tabela 13 e 14 e Gráfico 5 mostram os dados da curva de calibração do teste de Bradford. Os resultados do teste de Bradford estão apresentados na Tabela 15 e no Gráfico 6. O perfil cromatográfico está de acordo com o observado no Gráfico 6.

Tabela 13 - Absorbâncias dos pontos da curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.

P5	P4	P3	P2	P1	Branco
0,904	0,791	0,620	0,538	0,404	0,343

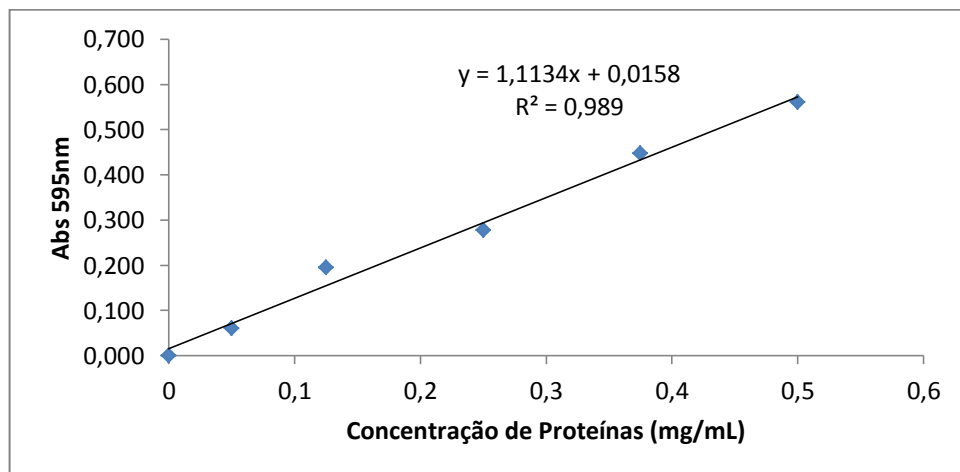
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 14 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF

Pontos da curva	% BSA 0,5mg/mL	BSA 0,5mg/mL (µL)	NaCl 0,9% (µL)	Conc Prot (mg/mL)	Total (µL)	Abs 595nm
P5	100	10	-	0,5	80	0,561
P4	75	30	10	0,375	40	0,448
P3	50	10	10	0,25	20	0,277
P2	25	10	30	0,125	40	0,195
P1	10	10	90	0,05	100	0,061
Branco	0	-	20	0		0,000
Totais usados		70	160			

Fonte: próprio autor, 2023.

Gráfico 5 - Curva de calibração da dosagem de proteínas da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

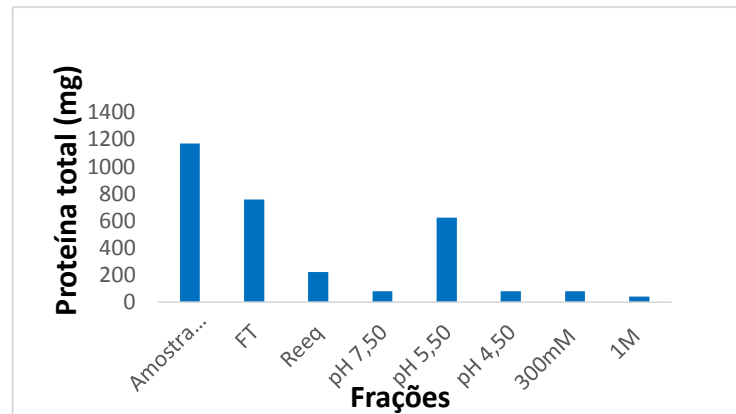
O gel de poliacrilamida representado na Figura 16, mostra que a IgG saiu no FT, pois observamos as bandas de 50 kDa e 25 kDa, que correspondem às cadeias pesadas e leves, respectivamente. Também observamos a banda de 75 kDa majoritária no Reequilíbrio. Ainda não identificamos esta proteína. A albumina, de 66 kDa eluiu em pH 5,5. Estes resultados corroboram os resultados do cromatograma e do teste de Bradford.

Tabela 15 - Dosagem proteínas das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF, segundo o método de Bradford.

Amostra	Volume Fração (mL)	Abs 595nm	Diluição	[proteína] curva (mg/mL)	[proteína] amostra (mg/mL)	Proteína total (mg)	% Recuperação
Amostra de entrada	260	0,349	15	0,30	4	1167	100
FT	420	0,349	6	0,30	2	754	65
Reequilíbrio	368	0,349	2	0,30	1	220	19
pH 7,50	268	0,349	1	0,30	0	80	7
pH 5,50	260	0,349	8	0,30	2	622	53
pH 4,50	268	0,349	1	0,30	0	80	7
300 mM	270	0,349	1	0,30	0	81	7
1 M	130	0,349	1	0,30	0	39	3
Totais						1877	161

Fonte: próprio autor, 2023.

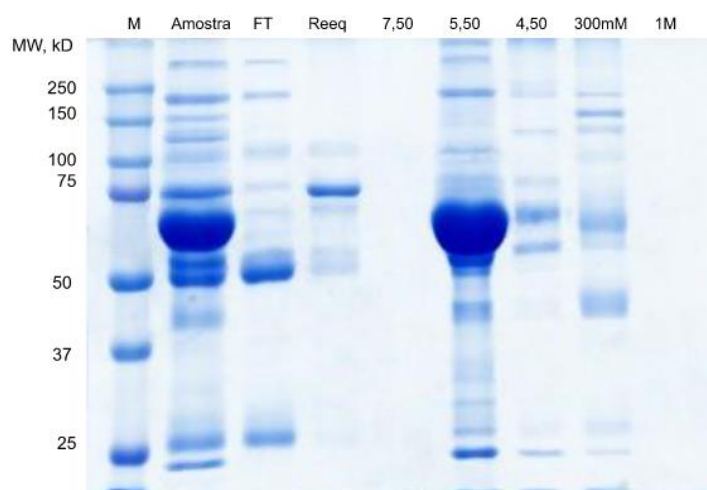
Gráfico 6 - Proteína total das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

Na dosagem de IgM por imunotubidimetria (Tabela 16 e Gráfico 7) os resultados indicam que IgM foi recuperada na fração 4,5 com rendimento de 43 %.

Figura 16 - Análise em gel de poliacrilamida 10% em condições redutoras das frações em coluna ANX Sepharose FF “pool” 1/22. Canaletas: M: marcador de massa molecular; PFC: “pool” 1/22 de plasma, diluído 40x; PFC pH6: plasma com pH 6 ajustado com 0,25M de ácido cítrico, diluído 40x; Plasma 24h: amostra de entrada, diluído 40x; FT: diluído 40x; Reequilíbrio: 1x; 200-5 (A): 1x; 200-5 (B): 1x; 200-10:1x; 200-25: 1x; 500: 1x.



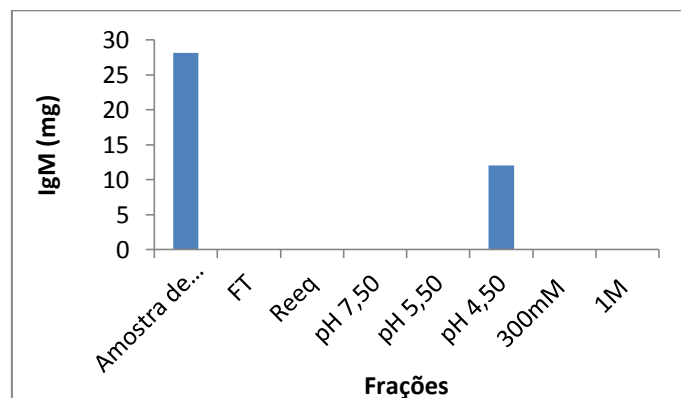
Fonte: próprio autor, 2023.

Tabela 16 - Dosagem de IgM das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do "pool" 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.

Amostra	Volume Fração (mL)	Abs 595nm	Diluição	[IgM] curva (mg/mL)	[IgM] amostra (mg/mL)	IgM total (mg)	% Recuperação
Amostra de entrada	260	0,075	1	0,108	0,11	28	100
FT	420	0,013	1	0,012	0	0	0
Reequilíbrio	368	0,003	1	-0,003	0	0	0
7,50	268	0,007	1	0,003	0	0	0
5,50	260	0,019	1	0,022	0	0	0
4,50	268	0,034	1	0,045	0,04	12	43
300 mM	270	0,01	1	0,008	0	0	0
1 M	130	0,009	1	0,006	0	0	0
Totais						12	43

Fonte: próprio autor, 2023.

Gráfico 7 - Dosagem de IgM das frações da purificação em Q Sepharose FF do FT da purificação do "pool" 2/22 de plasma em ANX Sepharose FF.



Fonte: próprio autor, 2023.

5 DISCUSSÃO

5.1 Purificação do “pool” 1/22 de plasma em ANX *Sepharose FF*

A purificação do “pool” 1/22 de plasma alcançou o objetivo esperado, isto é, a separação do FT contendo as proteínas de interesse, IgM, IgG e albumina, das demais proteínas presentes no plasma.

O “pool” de plasma não foi utilizado imediatamente após o descongelamento, pois, antes de iniciar a purificação, tivemos imprevistos, havia problemas no programa da purificação que demorou a ser resolvido e levando em conta a duração da purificação, limpeza da coluna e limpeza dos tubos e coletor, decidiu-se iniciar a purificação no dia seguinte. O plasma permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas na bancada.

Notou-se que no dia seguinte o plasma mudou a tonalidade para esverdeado, mas a análise em gel de poliacrilamida mostrou que não houve mudança no perfil proteico das amostras de plasma antes do ajuste de pH, após o ajuste de pH e após 24 h na bancada.

Durante a aplicação da amostra o cromatógrafo parou de mostrar o cromatograma. Decidiu-se continuar a purificação até entrar toda a amostra. Assim que entrou a amostra interrompemos a purificação e reiniciamos o equipamento e continuamos a partir do Reequilíbrio. Ao final, emitiram-se dois cromatogramas separados, entretanto não tivemos problemas na purificação devido a isto.

5.2 Purificação em Q *Sepharose FF* do FT da purificação do “pool” 1/22 de plasma ANX *Sepharose FF*

Na literatura, a albumina tem mais afinidade do que IgG à coluna de troca aniônica, logo, o que observamos na nossa purificação, em que a albumina está adsorvida à coluna e a IgG não corroboram a literatura.

Esta não atingiu o objetivo esperado, muito provavelmente devido à alta concentração de sais no tampão Tri-HCl contendo CaCl_2 15 mM, o que pode ter causado a eluição de todas as proteínas adsorvidas.

Diante desses resultados, decidiu-se repetir as purificações com um novo “pool” de plasma, “pool” 2/22.

5.3 Purificação do “pool” 2/22 de plasma em resina ANX Sepharose FF

A purificação do plasma humano “pool” 2/22 obteve o objetivo esperado, a purificação do plasma do “pool” 2/22 para separar o FT e utilizar na Q *Sepharose FF*.

Essa purificação foi possível o obter cromatograma total da purificação.

O plasma foi utilizado logo após o preparo do “pool”.

Considerou-se outro ponto importante para esta purificação a concentração de proteínas do plasma 67 mg/mL e do FT 50 mg/mL. A concentração de proteínas no plasma e no FT é semelhante, uma vez que praticamente toda proteína aplicada à coluna elui no FT. Esta observação corrobora o perfil semelhante dessas frações no gel de eletroforese em poliacrilamida.

5.4 Purificação em Q *Sepharose FF* do FT da purificação do “pool” 2/22 de plasma em ANX *Sepharose FF*

A purificação do FT da ANX “pool” 2/22 em Q *Sepharose FF* foi bem-sucedida uma vez que foi possível separar as frações contendo a albumina, a IgG e a IgM.

A separação das frações pode ser observada no cromatograma.

OLIVEIRA (2022) observou que a IgM elui em pH 4,5. Resultado semelhante foi observado por VERINAUD (2016), em que a IgM eluiu em pH 4,0. Nosso resultado corrobora estes trabalhos.

Em relação ao produto comercial Pentaglobin®, a porcentagem de IgM presente na fração pH 4,5 foi de 43 %, enquanto no Pentaglobin® a conteúdo de IgM é de 12 %. Entretanto o conteúdo de imunoglobulinas no Pentaglobin® é de 95%. Precisamos realizar a dosagem de IgA para sabermos o conteúdo de imunoglobulinas da nossa fração de IgM.

Além dessa fração, a albumina foi adsorvida à coluna e foi recolhida em pH 5,5, enquanto a IgG foi recuperada no FT com alto grau de pureza.

Portanto, os resultados do teste de Bradford, da análise em gel de poliacrilamida e da dosagem de IgM corroboram o cromatograma da purificação.

Em vista disso, os objetivos deste projeto foram alcançados com a purificação do “pool” 2/22.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que:

O plasma humano é um material biológico abundante em proteínas, em virtude disso, a purificação de uma determinada proteína é desafiadora.

Na primeira coluna foram separados os fatores de coagulação. Na segunda coluna foram separadas as frações contendo albumina, IgG e IgM. Entretanto, a pureza destas proteínas ainda é baixa, requerendo mais etapas de purificação.

As 3 frações importantes foram obtidas e a continuação das purificações será estudada futuramente.

Portanto, apesar dos desafios, os objetivos foram alcançados de forma satisfatória.

REFERÊNCIAS¹

- ADRIANE. **PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS**. 2013. 18 slides. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/427823/LOT2007/quartaaula.Purificacao.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2023.
- AUGUSTO, Ohara. **Cromatografias**. 2022. Disponível em: <https://eaulas.usp.br/portal/video.action?idItem=16180>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- BEZERRIL, Bruno. **IV - IMUNOGLOBULINAS**. 2002. 10 p Trabalho de Disciplina (Medicina) - Universidade Federal da Bahia. Disponível em: http://www.medicina.ufba.br/imuno/roteiros_imuno/imunoglobulinas_01_2.pdf. Acesso em: 5 jan. 2023.
- BIOTEST FARMACÊUTICA LTDA. **PENTAGLOBIN®**. Bula de remédio. 2022. Disponível em: https://buladeremedio.net/biotest_farmaceutica ltda/0/pentaglobin_12115463-repaired.pdf. Acesso em: 20 nov. 2022.
- BRASIL. **Constituição**. República Federativa do Brasil de 1988. CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL DE 1988. Brasília, DF, 1988. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em: 27 dez. 2022.
- BURNOUF, M. Radosevich, T. **Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance**. Vox Sanguinis International Blood Transfusion Society. France, 2009, p. 12-28.
- COHN, E.J. *et al.* **Preparation and Properties of Serum and 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. USA, 1946. 459–475 p
- COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**, f. 227. 2005. 453 p.
- COVAS, Dimas. **Hemoderivados no Brasil**. 2014. 22 p. Disponível em: https://www.al.sp.gov.br/spl/2017/07/Acessorio/1000050996_1000084539_Acessorio.pdf. Acesso em: 20 nov. 2022.
- CYTIVA. **ANX Sepharose Fast Flow and Q Sepharose Fast Flow**. Cytiva life sciences. 2022. Disponível em: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us>. Acesso em: 27 dez. 2022.
- EHRENSTEIN, Michael. *et al.* **The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator**. Nature Reviews Immunology. 2010. 778–786 p.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

FARRUGIA, A. *et al.* **Payment, compensation and replacement – the ethics and motivation of blood and plasma donation.** Vox Sanguinis International Society of Blood Transfusion. USA, 2010. 202–211 p

GANDRA, Alana. **Salgueiro incentiva doação de sangue para o carnaval no Rio.** Agência Brasil. 2020. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2020-02/salgueiro-incentiva-doacao-de-sangue-para-o-carnaval-no-rio>. Acesso em: 20 set. 2022.

IMMUNOGLOBULIN MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECAST (2022 - 2027). Mordor Intelligence. 2021. Disponível em: https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/immunoglobulin-market?gclid=Cj0KCQiAtbqdBhDvARIsAGYnXBPBkX2gSEiByjtBjmjzg_Mon-IXcaOOC5TJbUrzf02bqYk0zShJS_gaAj0QEALw_wcB. Acesso em: 20 nov. 2022.

KEYT, Bruce. *et al.* **Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies.** Antibodies. USA, 2020.

KILIKIAN, Beatriz Vahan. *et al.* **Purificação de Produtos Biotecnológicos:** Operações e processos com aplicação industrial. Editora Blucher, v. 1, f. 380, 2005. 760 p.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature. 1970. 680–685 p.

MALE, David K. **Immunology.** Elsevier Health Sciences, v. 1, f. 282, 2005. 563 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **GUIA para uso de hemocomponentes.** Brasília - DF, 2015. 138 p. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes_2ed.pdf. Acesso em: 20 nov. 2022.

MONTASSIER, Helio. **ANTICORPOS E IMUNOGLOBULINAS.** 2017. 63 slides. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/anticorpos-e-imunoglobulinas.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2022.

NORRBY-TEGLUND, A. *et al.* **Intravenous polyclonal IgM-enriched immunoglobulin therapy in sepsis: a review of clinical efficacy in relation to microbiological aetiology and severity of sepsis.** Journal of Internal Medicine. Suécia, 2006. 509–516 p.

OLIVEIRA, Isabela. **Purificação de IgM a partir de plasma humano empregando colunas de troca iônica.** Botucatu, 2022. 91 p Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista.

VALIM, Paulo. **Tipos de Cromatografia.** Ciência em ação. 2020. Disponível em: <https://cienciaemacao.com.br/tipos-de-cromatografia/>. Acesso em: 27 dez. 2022.

VERINAUD, Claudia. **DESENVOLVIMENTO DE DUAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE IgM A PARTIR DE PLASMA HUMANO**. 154 p Tese (Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia) - USP/ IB/ IPT, São Paulo, 2016.

VILELA, Pedro. **Só doação regular de sangue mantém estoques, diz ministério**. Agência Brasil. 2019. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-11/so-doacao-regular-de-sangue-mantem-estoques-diz-ministerio>. Acesso em: 20 nov. 2022.