



CRIOGEL DE POLIACRILAMIDA-PECTINA: ADSORÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G BOVINA (bIgG)

Palavras-Chave: Criogel, cromatografia, adsorção.

Autores(as):

Giulia Arena Richitta, UNICAMP

Prof.^a. Sônia Maria Alves Bueno, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A imunoglobulina G bovina (bIgG) é uma glicoproteína presente no plasma bovino, cuja principal função é a ligação e a formação de complexos com antígenos. *In vitro*, a bIgG é empregada nas áreas de analítica, diagnóstico, biossensores, proteômica e terapêutica, sendo, para essas aplicações, necessário uma preparação de alta pureza (ULFMAN et al., 2018). A cromatografia de adsorção é uma das técnicas mais empregadas para a purificação de bIgG. Adsorventes tradicionais empregados como fase estacionária para a purificação de imunoglobulinas apresentam vantagens e limitações, sendo a maior limitação o transporte das moléculas realizado por difusão (BUENO e MIRANDA, 2005). Nas últimas décadas, a literatura tem reportado o uso de monólitos macroporosos como adsorvente, cujo transporte de moléculas é regido pela convecção (ARRUA e IGARZABAL, 2011). Monólitos podem ser sintetizados por diferentes técnicas, sendo uma delas a criogelificação, obtendo-se os criogéis (LOZINSKY 2018).

Os criogéis monolíticos são empregados como fase estacionária de cromatografia devido a sua estrutura macroporosa, advinda dos poros formados a partir do congelamento da água em temperaturas em torno de -15C. Os macroporos do monólito propiciam baixa resistência ao escoamento de fluidos na coluna (Yavaser e Karagozler, 2021). Criogéis podem ser sintetizados a partir de diferentes monômeros, tais como acrilamida, metacrilato, quitosana, alginato, pectina, polivinil álcool, carragena, dentre outros. Não há relatos na literatura consultada de criogéis sintetizados a partir da mistura de acrilamida e pectina, portanto, o estudo de adsorção de proteínas em criogéis a base de acrilamida-pectina é relevante para o desenvolvimento desse material.

Este trabalho teve como objetivo o emprego do criogel monolítico de poliacrilamida-pectina (PAAm-Pec) como fase estacionária de cromatografia líquida de baixa pressão para adsorção de bIgG.

METODOLOGIA:

MATERIAIS

Acrilamida, bisacrilamida e bIgG foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). TEMED (N,N,N',N'-tetra-metilenodiamina), persulfato de amônio, SDS (dodecil sulfato de sódio) foram fornecidos pela Cytiva (EUA). Pectina GENU tipo LM 102-AS foi adquirida de CPKelco (Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico. Água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) foi utilizada para a preparação de todas as soluções.

PREPARAÇÃO DO CRIOGEL MONOLÍTICO

O procedimento empregado para a síntese do criogel de PAAm-Pec foi desenvolvido pela mestrande Giovanna Giatti (GIATTI e BUENO, 2022). Inicialmente acrilamida (4,74% m/v), bisacrilamida (1,26% m/v) e pectina (0,1% m/v) foram dissolvidos em água. Após a degaseificação, a mistura foi resfriada a 4°C e adicionado glutaraldeído (0,05% m/v), persulfato de amônio (2% v/v) e TEMED (2% v/v). Da mistura final, foram pipetados 3,0 mL e estes volumes foram depositados em tubos de vidro de 1,0 cm de diâmetro interno com uma das extremidades vedadas. Posteriormente os tubos com as duas extremidades vedadas foram colocados no freezer a -20°C por 16 h. Uma vez polimerizados, os criogéis contidos nos moldes foram descongelados à temperatura ambiente e lavados com água. O criogel obtido foi denominado PAAm-Pec.

CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL

Para medida da absorção de água, utilizou-se a Equação 1, conforme Marcuz et al. (2021)

$$S_m = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad (\text{Eq. 1})$$

no qual S_m/m 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 (dado em gramas), respectivamente. Para a medida de porosidade (φ), foi utilizada a Equação 2, com base na água expelida pelos poros,

$$\varphi = \frac{m_s - m_u}{\rho_{\text{água}} * V_o} \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo $\rho_{\text{água}}$ a densidade da água Milli-Q à 25 °C, m_s e m_u , massa de criogel saturado de água e massa úmida e V_o , o volume do criogel, medido a partir da imersão em uma proveta. A morfologia do criogel foi determinada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no LRAC, FEQ, Unicamp.

EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS

Os experimentos cromatográficos foram conduzidos em duplicata, em coluna cromatográfica C10/10 (Cytiva, EUA), com 3,0 mL do monolito PAAm-Pec, acoplada ao cromatógrafo BioLogic LP (Bio-Rad, EUA). Inicialmente a coluna cromatográfica foi equilibrada com o tampão de adsorção na vazão de 1,0 mL/min, na temperatura de 25 °C. Os tampões de adsorção estudados foram Tris-HCl (pH entre 7,0 e 9,0), fosfato de sódio (pH entre 6,0 e 7,0) e MOPS (pH de 6,5 e 7,0), todos a 25 mmol/L. Em seguida, a coluna foi alimentada com 1,0 mL de solução de 1,5 mg bIgG /mL no tampão de adsorção e, posteriormente, lavada

com o tampão de adsorção. A eluição foi realizada com tampão de adsorção contendo 1,0 mol/L de NaCl. A regeneração foi realizada sequencialmente com NaOH a 25 mmol/L e água e a coluna foi re-equilibrada com o tampão de adsorção para uso posterior. Durante todo o experimento foram coletadas frações de 2,0 mL e quantificadas em termos de proteína total (BRADFORD, 1976), com bIgG como proteína de referência.

CURVA DE RUPTURA

A curva de ruptura foi obtida saturando o criogel com uma solução de bIgG (30 mL de bIgG em tampão MOPS pH 6,5, na concentração de 1,5 mg/mL), em 2 diferentes vazões de 1,0 mL/min e 2,0 mL/min. Após a saturação, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e na eluição, com o tampão MOPS pH 6,5 contendo 1,0 mol/L de NaCl. Durante o experimento, amostras de 2,0 mL foram coletadas e quantificadas em termos de proteína total (Bradford, 1976). Com os resultados obtidos, foi calculado o tempo útil (tu) e o tempo estequiométrico (te) (Equações 3 e 4), e a capacidade dinâmica (DBC) (Equação 5),

$$tu = \int_0^{t'} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \quad (\text{Eq. 3})$$

$$te = \int_0^{\infty} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \quad (\text{Eq. 4})$$

$$DBC_{x\%} = \frac{C_0 \int_0^{V_{x\%}} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dV}{V_{coluna}} \quad (\text{Eq 5})$$

em que $V_{x\%}$ and V_{coluna} representam os volumes de carregamento da solução a x% do ponto de ruptura e o volume da coluna, respectivamente e tu e te são os tempos útil e estequiométrico, respectivamente. As variáveis C_0 e C são as concentrações de bIgG na solução de alimentação e na saída da coluna, respectivamente. O comprimento de leito não utilizado foi calculado usando a Equação 6,

$$CLNU = \left(1 - \frac{tu}{te}\right)L \quad (\text{Eq 6})$$

no qual L é a altura do leito. A eficiência do leito é dada pela razão entre o tempo útil e o tempo estequiométrico, multiplicado por 100, enquanto a eficiência de recuperação do soluto, foi calculada pela razão entre o tempo útil e o tempo de saturação, dado quando $\frac{C}{C_0} = 0,01$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

CARACTERIZAÇÃO DO CRIOGEL PAAM-Pec

O criogel PAAM-Pec foi homogêneo, branco e opaco. Sua capacidade de absorção de água foi de 5,264 g água/g de adsorvente seco e a porosidade de 72,0%. Segundo a morfologia do material (Figura 1), o tamanho dos poros se apresenta na faixa de 20 a 100 μm (Giatti e Bueno, 2022).

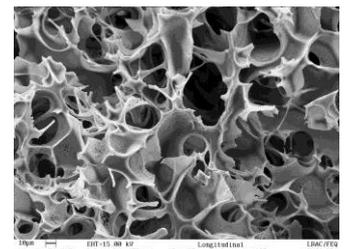


Figura 1 - Corte da seção longitudinal aumentada 1000x para o criogel PAAM-Pec. Fonte: MEV realizada pela aluna de mestrado Giovanna Giatti

CROMATOGRAFIA EM PAAm-Pec

A adsorção de bIgG em PAAm-Pec foi estudada em três sistemas tamponantes, Tris-HCl, NaP e MOPS, em diferentes valores de pH (Figura 2). Todos os tampões propiciaram a adsorção de bIgG no criogel PAAm-Pec, porém, Tris-HCl e NaP foram pouco eficientes quando comparados ao MOPS, o qual propiciou a maior adsorção de bIgG a pH 6,5. Nesta condição, 60% da bIgG alimentada foi adsorvida (Figura 3).

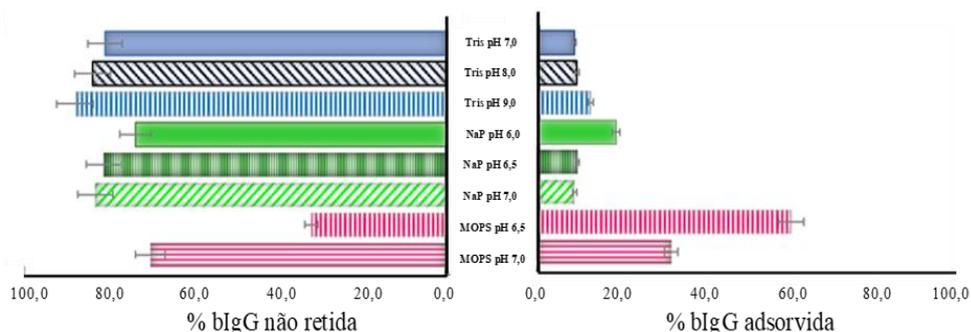


Figura 2 - Porcentagem de bIgG adsorvida e não retida no criogel PAAm-PEC em função do sistema tamponante e pH na temperatura de 25 °C

Fonte: Autoral

As diferenças apresentadas pelos tampões nas quantidades de bIgG adsorvidas em PAAm-Pec podem estar relacionadas a carga associada a cada sistema tamponante. O tampão Tris-HCl apresenta-se positivamente carregado, enquanto o NaP é carregado negativamente e o MOPS tem comportamento zwitteriônico na faixa de pH estudada.

A bIgG apresenta pontos isoelétricos na faixa de pH entre 6,4 a 8,5 (Wang et al., 2014), apresentando, portanto, cargas positivas, neutras e negativas dentro do intervalo de pH entre 6,4 a 8,5. Acima de pH 8,5, as moléculas de bIgG apresentam somente cargas negativas. Assim, é possível observar diminuição de adsorção com aumento do valor do pH para NaP e MOPS, os quais apresentam carga total negativa acima de seu valor de pKa, e aumento de adsorção para Tris-HCl. Outro ponto a se ressaltar é que o MOPS propiciou a maior eficiência de adsorção, o que pode estar relacionado a seu caráter zwitteriônico.

CURVA DE RUPTURA

A curva de ruptura de adsorção de bIgG em MOPS pH 6,5 foi executada em duplicada, em 2 diferentes vazões. Com os resultados obtidos, a DBC de bIgG em PAAm-Pec, a eficiência da coluna e o comprimento do leito não utilizado, foram calculados (Figura 4). Segundo os resultados apresentados na Tabela 1, a vazão de 1,0 mL/min apresentou os melhores resultados de adsorção de bIgG.

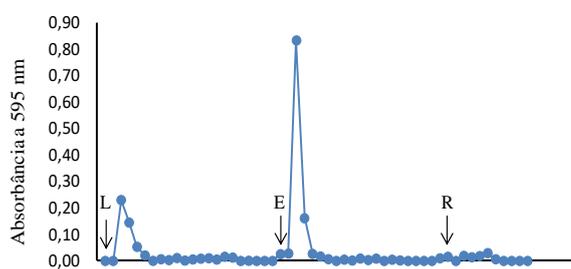


Figura 3 - Perfil cromatográfico de bIgG no criogel PAAm-PEC em tampão MOPS pH 6,5 na temperatura de 25 °C. L, etapa de lavagem (MOPS pH 6,5); E, etapa de eluição (MOPS pH 6,5 contendo 1,0 mol/L NaCl) e R, etapa de regeneração (25 mmol/L NaOH). Fonte: Autoral

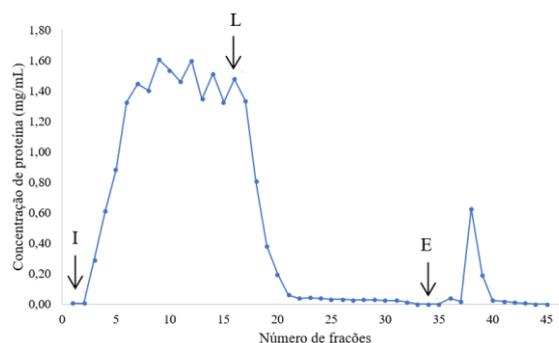


Figura 3 - Perfil da curva de ruptura de adsorção de bIgG no criogel PAAm-PEC. a 25 °C. I, Injeção 30 mL de bIgG a 1,5 mg/mL; L, lavagem (MOPS pH 6,5); E, Eluição (MOPS pH 6,5 contendo 1,0 mol/L NaCl). Fonte: Autoral

Vazão (mL/min)	CLNU (cm)	DBC	Eficiência de recuperação (%)	Eficiência de utilização (%)
1,0	1,75	3,73	74,4	41,8
2,0	2,63	3,13	24,7	12,2

Tabela 1 - Resultados para capacidade dinâmica (DBC), comprimento de leito não utilizado (CLNU) e eficiências de recuperação e utilização do criogel em diferentes vazões. Fonte: Autoral

O CLNU na vazão de 2 mL/min foi de 2,63 cm, o qual é muito próximo ao comprimento total do leito utilizado, de 3 cm. Dessa forma, menores vazões resultam em maior aproveitamento do leito, visto que esse apresentará menor área não utilizada. Além disso, a diminuição da vazão resultou em maior capacidade de adsorção de bIgG dinâmica, além de aumentar tanto a eficiência de recuperação como a de utilização do leito. Portanto, faz-se necessário a definição de uma vazão de operação a qual potencialize a eficiência e reduza o comprimento do leito não utilizado.

CONCLUSÕES:

Foi possível observar que o criogel monolítico de base poliacrilamida-pectina tem porosidade adequada e características adequadas para ser utilizado como fase estacionária em estudos cromatográficos para purificação de proteínas. O criogel apresentou diferentes comportamentos de adsorção de bIgG em função do sistema tamponante e do valor de pH empregado. O sistema tamponante que propiciou melhores resultados de adsorção de bIgG em PAAm-Pec foi o MOPS em pH 6,5. Os resultados obtidos mostram que o criogel PAAm-Pec é promissor e deve ser estudado em diferentes condições, como vazão, temperatura, concentração proteica, a fim de otimizar a adsorção de bIgG.

BIBLIOGRAFIA

- ARRUA R.D., IGARZABAL C.I.A. Macroporous monolithic supports for affinity chromatography. *J Sep Sci*, vol 34, p. 1974-1987, 2011.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, vol 72, p. 248-54, 1976.
- ERTURK G., MATTIASSON B., Cryogels-versatile tools in bioseparation. *J Chromatogr A*, vol 1357, p. 24-35, 2014.
- GIATTI G, BUENO SMA, Synthesis and characterization of polyacrylamide-pectin cryogel for adsorptive processes. 14º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, 23 a 25 de Novembro, Brasília, DF, Brasil, 2022.
- LOZINSKY VI, Cryostructuring of polymeric systems. Cryogels and cryotropic gel-formation: Terms and definitions. *Gels* vol 77, p. 1-12, 2018.
- MARCUZ, C.; MOURÃO, C. A.; HAUPT, K.; BUENO, S. M. A. Performance of phospho-L-tyrosine immobilized onto alginate/ polyacrylamide-based cryogels: Effect of ligand coupling on human IgG adsorption and Fab fragments separation. *J Chromatogr B*, vol 1165, p. 122530, 2021.
- ULFMAN LH, LEUSEN JHW, SAVELKOUL HFJ, WARNER JO AND VAN NEERVEN RJJ. Effects of bovine immunoglobulins on immune function, allergy, and infection. *Front Nutr*, vol 5, p. 52, 2018.
- YAVAŞER R, KARAGÖZLER AA, Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. *Proc Biochem*, vol 101, p. 137-146, 2021.