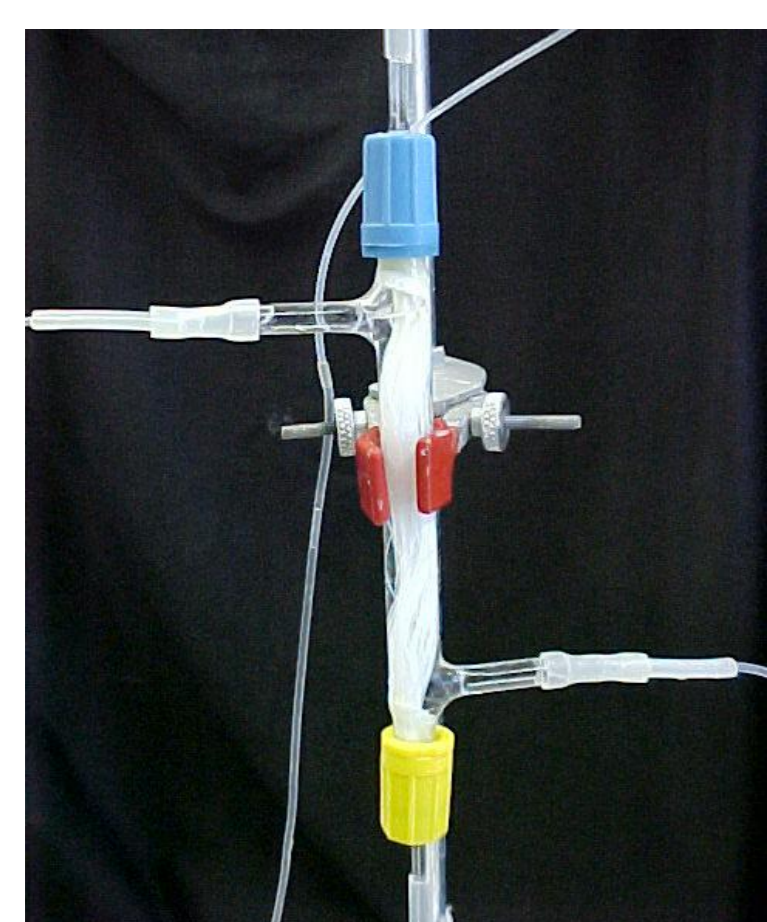


Renato Rodrigues Fioritti, Sônia Maria Alves Bueno
 Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química,
 Departamento de Processos Biotecnológicos
 CEP 13083-970 - Campinas – SP
sonia@feq.unicamp.br

Palavras-chave: Membranas de Afinidade – IgG Humana – IMAC.

Introdução



Cartucho de fibras ocas de PEVA-CM-Asp-Ni(II)

Imunoglobulina G humana (IgG)

- ✓ Sintetizada pelo organismo humano em resposta à introdução de um antígeno;
- ✓ Massa molecular de aproximadamente 150 kDa, composta de duas cadeias pesadas de 50 kDa e duas cadeias leves de 25 kDa, conectadas por ligações dissulfeto.

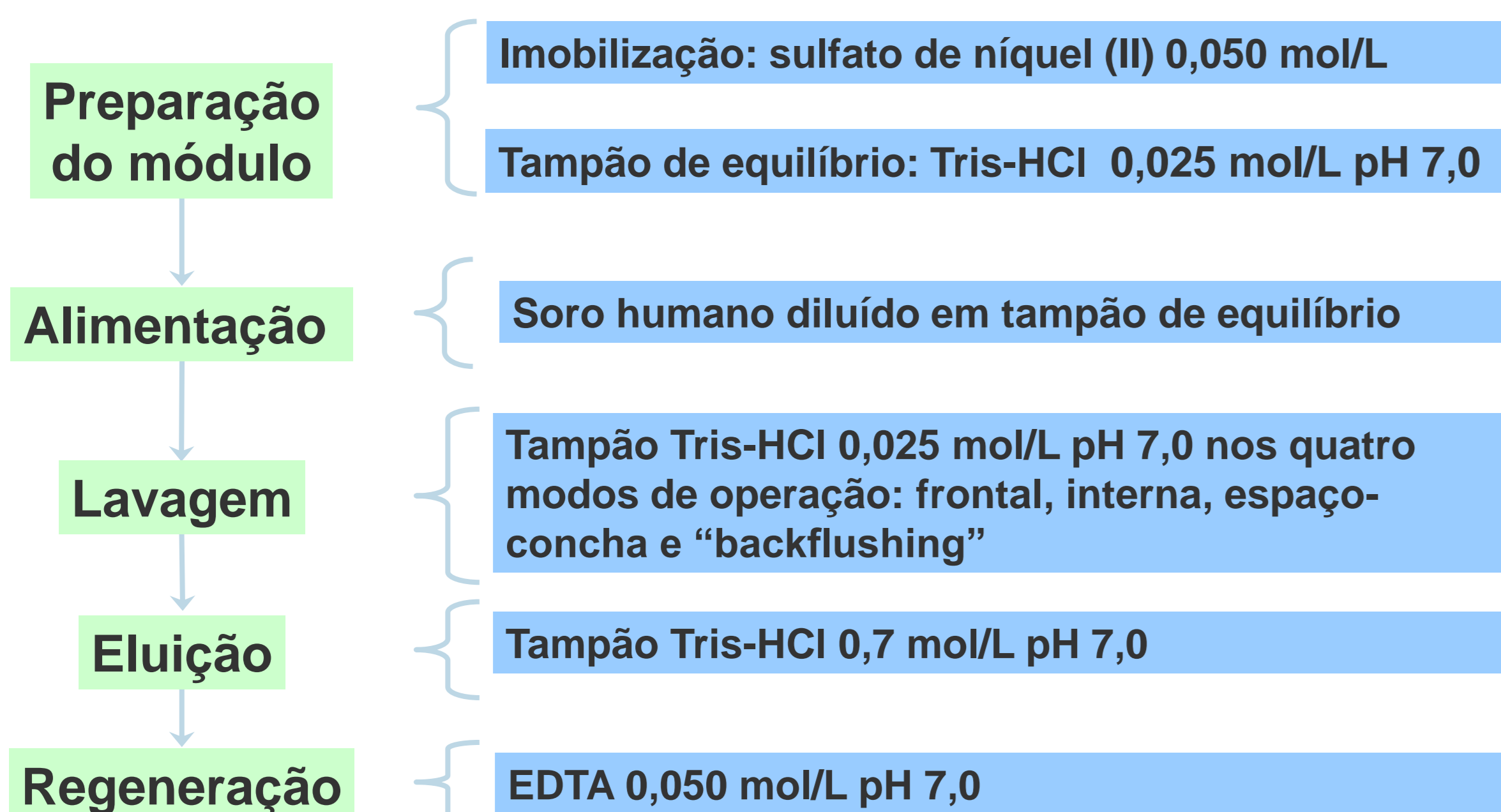
Os métodos cromatográficos utilizando-se membranas de afinidade foram introduzidos nos anos 80 e, desde então, são utilizados como uma alternativa eficiente aos géis cromatográficos tradicionais, pois integram as operações de filtração com a cromatografia de afinidade. O princípio da separação consiste na adsorção da biomolécula de interesse a um ligante imobilizado no interior dos poros da membrana. A solução contendo a biomolécula a separar passa através da membrana por convecção, ao contrário dos géis, facilitando o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante. Estes sistemas apresentam a vantagem de proporcionar o tratamento de grandes volumes por unidade de tempo.

Objetivo

Este trabalho visou a determinação de curvas de ruptura (“breakthrough”) de solução de soro em membranas de fibras ocas de álcool poli(etileno) vinílico (PEVA) contidas em módulo em escala laboratorial de filtração, utilizando Ni(II) imobilizado ao agente quelante ácido aspártico carboxi-metilado (CM-Asp). As curvas de ruptura permitem determinar a capacidade dinâmica das membranas de afinidade, um parâmetro importante no escalonamento do processo.

Metodologia

Cromatografia com membranas de afinidade



Realizaram-se filtrações injetando 10, 40 e 80 mL de soro humano diluído em 2,5, 10 e 20 vezes, respectivamente, com vazão de alimentação em 1,4 mL/min e vazão de filtrado em 0,7 mL/min para análise de seus efeitos na purificação de IgG. Realizou-se, também, filtração com vazão de alimentação em 3,0 mL/min e vazão de filtrado em 1,5 mL/min.

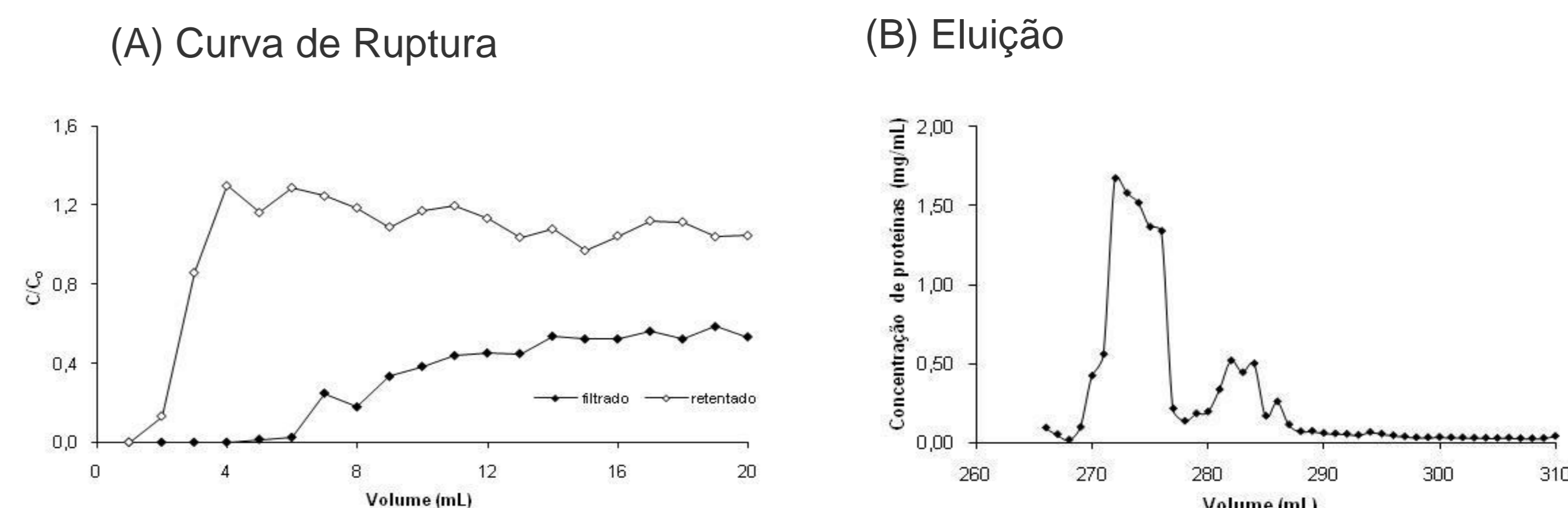
Análise das frações cromatográficas

Dosagem de proteína total: método de Bradford [1]

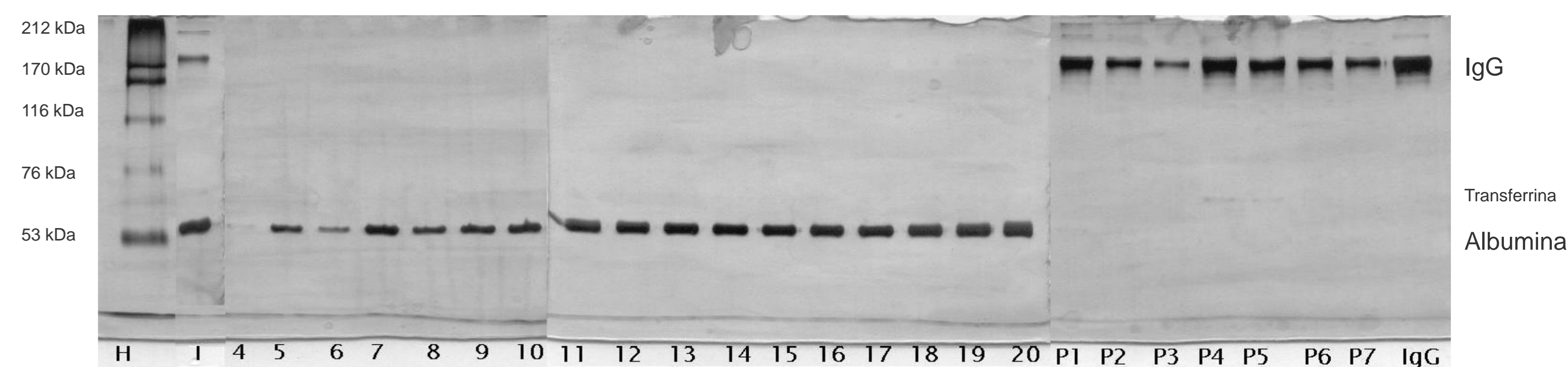
Eletroforese SDS-PAGE: condições não redutoras, gel a 7,5% de poli(acrilamida) [2], e revelação com nitrato de prata [3]

Resultados

Injeção de soro humano diluído em dez vezes



(C) Eletroforese



Cromatografia em membranas PEVA com Ni(II) imobilizado ao CM-Asp com injeção de 40 mL de soro diluído em 10 vezes, com vazão de alimentação em 1,4 mL/min (A) Curva de ruptura para os efluentes filtrado e retentado. (B) Curva cromatográfica da etapa da eluição. (C) Eletroforese das amostras. Legenda: H – marcador de alta massa molecular; I – injeção; 1 a 20 – amostras da alimentação; P1 a P7 – amostras da eluição.

Quantificação de proteínas totais

Vazão de Alimentação	1,4 mL/min	3,0 mL/min
Injeção (mg)	276,84	208,68
Filtrado (mg)	43,64	20,61
Retentado (mg)	139,81	110,99
Lavagem (4 modos) (mg)	117,35	54,89
Eluição (mg)	12,91	4,83
Regeneração (mg)	0,96	0,72
Proteína adsorvida (mg)	13,87	5,55
Proteína adsorvida (mcg/cm ²)	122,77	49,20

Conclusões

Alimentando-se soro humano diluído 10 vezes e mantendo a vazão de alimentação em 1,4 mL/min e de filtrado em 0,7 mL/min, as membranas de PEVA-CM-Asp-Ni(II) em módulos de filtração apresentaram seletividade para IgG, segundo eletroforese SDS-PAGE. Aumentando-se a vazão de alimentação para 3,0 mL/min, a quantidade de proteínas adsorvidas é bem menor, devido ao baixo tempo de residência no leito.

Referências Bibliográficas

- [1] BRADFORD, M. M. Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.
- [2] LAEMMLI, U. K. Nature, 227, 680-685, 1970.
- [3] MORRISSEY, J. H. Anal. Biochem., 117, 307-310, 1981.