



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

SOLUBILIDADE DE IMUNOGLOBULINA G EM SOLUÇÕES DE SAIS

PIOVANI*¹, F. P.; MARINHO¹, C. M.; WATANABE², E. O.

¹Aluna da FEQ/UFU ²Professora da FEQ/UFU

Faculdade de Engenharia Química - Universidade Federal de Uberlândia
Avenida João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Campus Santa Mônica, *Uberlândia*,
CEP 38408-144, M - email: erika@feq.ufu.br

RESUMO – A precipitação de proteínas com o uso de sais é uma técnica de purificação frequentemente utilizada em bioprocessos. Neste trabalho estudou-se a precipitação da imunoglobulina G a 5°C com o uso dos sais convencionais sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio. O sal volátil carbamato de amônio, o qual pode passar para a fase vapor com o aumento de temperatura ou abaixamento de pressão também foi utilizado para a precipitação da imunoglobulina G. Os ensaios de solubilidade possibilitaram verificar o efeito dos sais na precipitação da imunoglobulina G e a determinação da constante K_s' da equação de Cohn mostrou-se um parâmetro importante para a avaliação da efetividade dos sais utilizados. Os resultados experimentais indicaram que o sal sulfato de sódio é o mais efetivo para a precipitação de imunoglobulina G, seguido pelos sais sulfato de amônio, e o sal volátil carbamato de amônio. Os valores determinados para a constante K_s' estão de acordo com a série de Hoffmeister, mostrando que este parâmetro é a base teórica desta série liotrópica.

Palavras chave: precipitação, proteína, série liotrópica

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos métodos e técnicas de separação e purificação de bioprodutos é essencial para os avanços da área de pesquisas biotecnológicas. O potencial de aplicação ou uso final de um bioproduto irá depender do nível de pureza, por exemplo: um alto grau de pureza é necessário para aplicações terapêuticas ou estudos de estrutura e função de proteínas e um baixo grau de pureza para aplicações industriais como no caso de indústria de alimentos ou detergentes domésticos (Queiroz *et al.*, 2001).

O objetivo global da purificação de biomoléculas é a remoção de contaminantes indesejados e também a concentração da proteína desejada e sua transferência para um ambiente onde ela permaneça estável e pronta para a aplicação a que se destina. Entre as operações de purificação, a precipitação está presente em mais de metade dos processos e tem a característica de concentrar em alto grau a proteína desejada, sendo geralmente utilizada no início da purificação, entre uma primeira etapa de separação de sólido-líquido e uma primeira etapa de prépurificação, antes da etapa de purificação final.

*Bolsista CNPq.

A precipitação de proteínas e recuperação do precipitado sólido constitui uma das mais importantes operações unitárias de processos de recuperação e purificação de proteínas (Bonnerjea *et al.*, 1986). Dentre os métodos utilizados para a precipitação de proteínas pode-se citar: adição de sais, mudança de pH, adição de solventes ou polímeros orgânicos e desnaturação seletiva. A precipitação com o uso de sais ocorre pela diminuição da solubilidade ocasionada pela dissolução do sal, chamada de “salting-out”, em que os íons competem com a proteína pelas moléculas de água e quando removida a camada de hidratação, as interações proteína-proteína, principalmente as interações hidrofóbicas, se tornam relevantes. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado em “salting-out” devido a sua alta solubilidade em água, à baixa densidade de suas soluções, à posição favorável de seus íons na série de Hofmeister com relação à efetividade de precipitação, à ausência de efeitos desnaturantes e ao fato de prevenir o crescimento de bactérias na solução (Deutscher, 1990), além de ser de baixo custo mesmo em alta pureza (Ladisch, 2001).

Uma desvantagem da precipitação com sais é a existência de sal em ambas as fases formadas. O sistema bifásico formado é constituído de uma fase líquida concentrada em sal e uma fase composta que contém a proteína precipitada com grande proporção de fase líquida salina, podendo também conter sal na fase sólida ligado a ela (Popova *et al.*, 2008). Assim, são necessárias outras operações de purificação para a eliminação do sal da fase precipitado e processamento da fase líquida para sua reutilização ou descarte. Esses tratamentos limitam em parte as aplicações do processo de precipitação por “salting-out” devido ao custo dos mesmos. O uso de eletrólitos voláteis apresenta-se como uma alternativa para o aumento da viabilidade do processo de precipitação por “salting-out”. Isto se dá porque a dissolução e a dissociação destes eletrólitos em solução aquosa gera íons que têm a capacidade de precipitar as proteínas pela mudança de pH (Hofland *et al.*, 2000) ou pelo efeito de salting-out (Watanabe *et al.*, 2006). Além disso, a precipitação é menos afetada por interferentes não protéicos do que

procedimentos de adsorção e cromatografia (Ladisch, 2001) e é de relativo baixo custo.

A proteína estudada neste trabalho foi a imunoglobulina G, um anticorpo, de massa molecular de cerca de 150 kDa e que corresponde a 75% do total de imunoglobulinas séricas presente no soro humano (Ribeiro, 2006). As imunoglobulinas são as principais constituintes do sistema imune humano e atuam no reconhecimento de antígenos. As imunoglobulinas G (IgGs) de origem humana têm sido empregadas como prescrições terapêuticas nos seguintes casos (Souza, 2009): (a) de imunodeficiências congênitas ou adquiridas (por exemplo, AIDS), onde o paciente pode apresentar deficiência global ou de alguma subclasse de IgG; (b) de tratamento de deficiências seletivas de anticorpos, como no caso de inflamações crônicas, no qual a produção de anticorpos é insuficiente para combater a doença; (c) de tratamento de doenças auto-imunes. Por exemplo, no caso da púrpura trombocitopênica, a injeção intravenosa de IgG eleva em poucas horas o nível de plaquetas; (d) de tratamento de alguns tipos de câncer (por exemplo, leucemia linfocítica crônica).

As doenças acima citadas requerem, geralmente, grandes doses de IgG para o seu tratamento, doses essas que podem chegar a vários gramas por paciente por ano (Kempf *et al.*, 2007). A necessidade atual de imunoglobulinas no Brasil é de 8,5 toneladas e essa demanda só é suprida através de importação que chega a um custo de 159 milhões de reais por ano (Hemoderivados, 2011).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi o estudo da precipitação da imunoglobulina G através da determinação da solubilidade da proteína em solução de sais convencionais e voláteis.

Os sais utilizados para a precipitação da IgG neste trabalho foram: sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio. Estes sais foram escolhidos por serem bastante utilizados na precipitação por “salting-out” de proteínas e por permitirem uma comparação entre ânions e cátions dos sais. Por exemplo, pode-se comparar o efeito do ânion em precipitações com o uso do

sulfato de sódio e cloreto de sódio e o efeito do cátion através dos sais sulfato de amônio e sulfato de sódio. Pode-se ainda com estes sais, comparar os resultados da precipitação com sais convencionais e o sal volátil carbamato de amônio.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os sais sulfato de amônio, sulfato de sódio e cloreto de sódio utilizados foram obtidos da Merck (Alemanha) e o carbamato de amônio da Fluka (Alemanha). A proteína imunoglobulina G foi obtida de ZLB Behring.

Métodos

Determinação da concentração da imunoglobulina G: A determinação da concentração de proteína em solução foi realizada através do método apresentado por Bradford (1976). A curva de calibração relacionando a absorbância e a concentração de proteína foi realizada para obtenção da concentração de proteína.

Precipitação da imunoglobulina G com o uso de solução dos sais convencionais e voláteis: Adicionou-se, a um frasco de 1,5 mL de capacidade, a imunoglobulina G a diferentes valores de concentração, água deionizada e solução dos sais convencionais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e do sal volátil carbamato de amônio previamente preparada, de modo a produzir uma mistura de composição desejada. Vedou-se o frasco e agitou-se lentamente. A seguir, o frasco foi mantido em repouso em banho termostático a uma temperatura constante, por um período de 24 horas, após o qual se separou o sobrenadante e o precipitado por centrifugação a 5000 g. As fases sobrenadante e precipitado foram dissolvidas em água ultrapura e a concentração de proteína em cada uma das soluções foi determinada pelo método de Bradford.

Um esquema geral da metodologia experimental pode ser verificado na Figura 1.

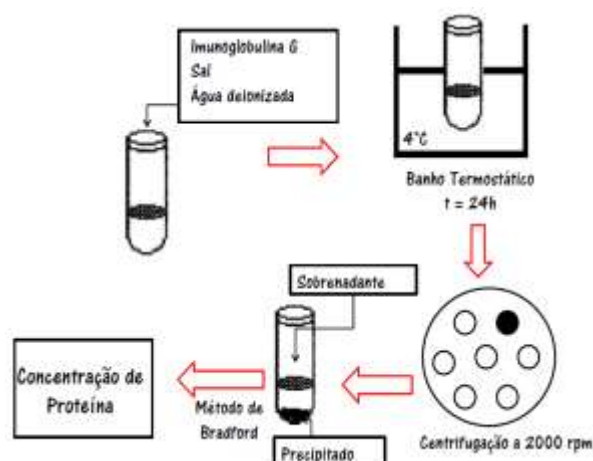


Figura 1 - Esquema do equipamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Precipitação de Imunoglobulina G

As concentrações de imunoglobulina G na fase sobrenadante, representando a solubilidade da proteína, foram determinadas a 5°C em função da porcentagem de saturação dos sais utilizados: sulfato de amônio, sulfato de sódio e carbamato de amônio. A curva de solubilidade da imunoglobulina G em solução dos sais (Figura 1) mostrou uma diminuição da concentração de proteína na fase sobrenadante com o aumento da concentração de sal, evidenciando o efeito “salting-out” na precipitação da proteína.

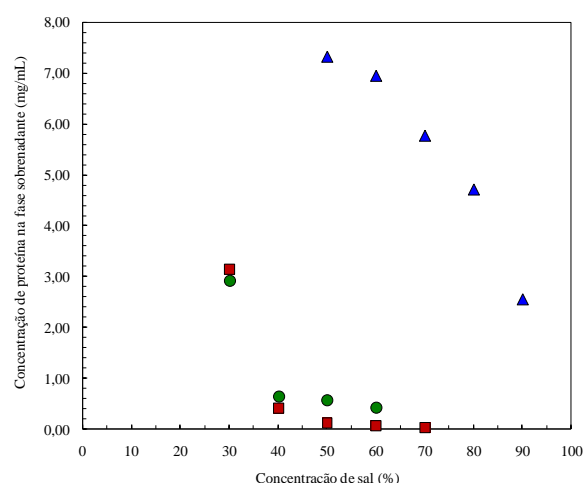


Figura 1 - Solubilidade da imunoglobulina G a 5°C em solução dos sais: sulfato de amônio (○), sulfato de sódio (□), carbamato de amônio (Δ). Concentração inicial de imunoglobulina G de 30 mg/mL.

Verifica-se na Figura 1 que o sal sulfato de sódio é capaz de precipitar maior quantidade de imunoglobulina G, já que a concentração de proteína na fase sobrenadante é menor utilizando-se este sal como agente precipitante. O sal carbamato de amônio é o agente precipitante menos efetivo, pois a concentração de imunoglobulina G na fase sobrenadante apresenta-se em quantidade maior do que aquela apresentada utilizando-se os sais sulfato de amônio e sulfato de sódio.

O sal cloreto de sódio também foi utilizado para a precipitação de imunoglobulina G. No entanto, esta proteína mostrou-se totalmente solúvel à solução de cloreto de sódio a diferentes valores de saturação do sal, de modo que não foi possível a precipitação da imunoglobulina G utilizando o sal cloreto de sódio como agente precipitante. Deste modo, sugere-se que o sal cloreto de sódio promove o “salting-in” da imunoglobulina G, ou seja, ocorre o favorecimento da dissolução da proteína em solução deste sal.

Modelagem da precipitação por “salting-out” de proteínas

A solubilidade da proteína em solução de sal pode ser expressa matematicamente através da equação de Cohn (1925):

$$\log S = \beta' - K_s' C_{\text{sal}} \quad (5)$$

em que S é a solubilidade da proteína em miligramas por mililitro, C_{sal} é a concentração do sal em mol por quilograma de água, K_s' é uma constante específica do sal e da proteína e β' é uma constante que depende da temperatura, do pH e da proteína utilizada.

Para a determinação dos parâmetros K_s' e β' , as concentrações de sal foram calculadas em mol/kg (molal) e foi realizada uma regressão linear conforme indicado na Equação 5. Na Tabela 1 apresentam-se os valores de K_s' e β' .

Tabela 2 – Parâmetros β' e K_s' da equação de Cohn para a imunoglobulina G em solução de sais a 5°C.

Sal	K_s'	β'
Sulfato de amônio	0,53	1,3
Sulfato de sódio	1,52	1,9
Carbamato de amônio	0,14	1,7

Os íons mais efetivos para precipitação de proteínas em solução aquosa por “salting-out” são chamados de íons cosmotrópicos, ou seja, aqueles que criam e mantêm a estrutura de água ao redor da proteína. Os íons caotrópicos, por outro lado, são aqueles que quebram a estrutura de água ao redor da proteína e tem efeito oposto aos íons cosmotrópicos. Os caotrópicos promovem a dissolução e o desnovelamento e desnaturação da proteína. A ordem de efetividade dos sais em relação a sua ação como cosmotrópico ou caotrópico é chamada de série liotrópica ou série de Hoffmeister (Ladisch, 2001).

Como os íons cosmotrópicos aumentam a tensão superficial da água e favorecem o “salting-out” das proteínas e a constante K_s' pode ser relacionada às interações eletrostáticas no meio e à variação da tensão superficial do meio pela presença do sal (Melander e Horváth, 1977), pode-se dizer que a constante K_s' constitui a base teórica da série de Hoffmeister. Deste modo, um sal com alta capacidade de induzir o “salting-out” de uma proteína deve ter um elevado valor para a constante K_s' .

Nos ensaios aqui apresentados, o parâmetro K_s' apresentou valores distintos para as soluções salinas utilizadas, sendo que a solução de sulfato de sódio apresentou o maior valor para o parâmetro K_s' seguido pelos sais sulfato de amônio e carbamato de amônio, respectivamente. Comparando-se os valores de K_s' para os diferentes sais utilizados (Tabela 1), verificou-se que os sais que possuem o ânion sulfato SO_4^{2-} (sulfato de sódio e sulfato de amônio) são os mais efetivos para a indução da precipitação por “salting-out”, seguido do ânion carbamato NH_2COO^- (carbamato de amônio). Os ânions sulfato e carbamato mostraram-se íons cosmotrópicos, favorecendo a precipitação da imunoglobulina G, enquanto que o íon cloreto mostrou-se um íon caotrópico, dissolvendo a proteína.

Esta sequência segue a série de Hofmeister, que apresenta a seguinte ordem de efetividade dos sais: citrato > sulfato > fosfato > nitrato > tiocianato (Ladisch, 2001), comprovando que o parâmetro K_s' representa uma base quantitativa para a série de Hofmeister. Além disso, segundo Shih *et al.* (1992), sais constituídos de ânions polivalentes

(SO_4^{2-} , por exemplo) possuem maior valor de K_s' do que aqueles compostos de ânions monovalentes como o NH_2COO^- .

Como o ânion sulfato é comum para os dois sais estudados, uma comparação entre os cátions Na^+ e NH_4^+ pode ser realizada. Pela série de Hofmeister, sabe-se que o cátion Na^+ é mais efetivo para a indução do “salting-out” do que o cátion NH_4^+ (Scopes, 1994). Apesar dos ânions exercerem uma influência maior do que os cátions na indução do “salting-out” de soluções de proteínas, segundo Bénas *et al.* (2002) os cátions podem afetar a solubilidade de proteínas em até uma ordem de magnitude na mesma força iônica. Observando-se os resultados experimentais verificou-se que de fato, o cátion Na^+ foi mais efetivo para a indução do “salting-out” da imunoglobulina G do que o cátion NH_4^+ .

Na Figura 1, observou-se que para uma concentração de sal de 60%, a concentração de proteína na fase sobrenadante é aproximadamente sete vezes menor ao se precipitar a IgG com o sal sulfato de sódio (0,06 mg/mL) em relação ao sal sulfato de amônio (0,42 mg/mL), indicando que o sulfato de sódio é capaz de precipitar uma maior quantidade de imunoglobulina G do que o sulfato de amônio.

Comparando-se os sais convencionais sulfato de amônio e sulfato de sódio e o sal volátil carbamato de amônio, verificou-se tanto pelos resultados experimentais como pelos valores da constante K_s' que o sal volátil é menos efetivo para a precipitação de imunoglobulina G do que os sais convencionais. Apesar deste resultado desfavorável para o carbamato de amônio, não se pode descartar totalmente o uso deste sal na precipitação de IgG. O sal volátil pode ser removido das fases sobrenadante e precipitado por variação das condições de temperatura e pressão, reduzindo as etapas subsequentes de separação e purificação da proteína, ocasionando menor custo e menor perda da quantidade de proteína durante estas etapas. Estudos realizados por Watanabe *et al.* (2006) de precipitação de tripsina com o uso do carbamato de amônio sugerem que a remoção do sal volátil é possível através de redução de pressão com manutenção da atividade da proteína.

O parâmetro β' , varia independentemente da natureza do sal usado, mas é influenciado pela proteína, pH e temperatura. Apesar do uso da imunoglobulina G na determinação da solubilidade em todas as soluções de sais na mesma temperatura de 5°C, o parâmetro β' apresentou valores relativamente próximos, mas não totalmente iguais. Isto ocorre, pois os valores de pH das soluções salinas são diferentes entre si: o pH da solução de sulfato de sódio é igual a 5,7, do sulfato de amônio é igual a 5,4 e do carbamato de amônio é aproximadamente igual a 10,0.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudada a precipitação de imunoglobulina G a 5°C induzida pela adição dos sais sulfato de amônio, sulfato de sódio, cloreto de sódio e carbamato de amônio. Ensaio de solubilidade possibilitaram verificar o efeito dos sais na precipitação da proteína e a determinação da constante K_s' mostrou-se um parâmetro importante para a avaliação da efetividade dos sais utilizados. Os resultados experimentais indicaram que o sal sulfato de sódio é o mais efetivo para a precipitação de imunoglobulina G, seguido pelos sais sulfato de amônio e o sal volátil carbamato de amônio. O sal cloreto de sódio não foi capaz de induzir o “salting-out” da imunoglobulina G nesta temperatura, ocorrendo um aumento da solubilidade da proteína em solução deste sal.

Comparando-se a efetividade dos íons, verificou-se que a precipitação da imunoglobulina G foi mais efetiva utilizando o sal sulfato de amônio em relação ao sal carbamato de amônio, demonstrando que o ânion sulfato possui maior capacidade de induzir o “salting-out” da IgG. A efetividade dos cátions pode ser comparada com a precipitação da proteína utilizando-se os sais sulfato de sódio e sulfato de amônio. Os dados experimentais de solubilidade da IgG obtidos em solução destes sais mostraram que o cátion sódio é mais efetivo na precipitação da imunoglobulina G do que o cátion amônio. Estes resultados estão de acordo com a série de Hoffmeister, mostrando que o parâmetro K_s' é a base teórica desta série liotrópica.

REFERÊNCIAS

- BÉNAS, P., LEGRAND L., RIÈS-KAUTT, M. (2002) "Strong and specific effects of cations on lysozyme chloride solubility". *Acta Crystallographica Section D*, 58, 1582-1587.
- BONNERJEA, J., OH, S., HOARE, M., DUNNIL, P. (1986) "Protein purification: the right step at the right time". *Biotechnology*, 4, 954-958.
- BRADFORD, M. M. (1976) "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- COHN, E. J. (1925) "The Physical Chemistry of the Proteins". *Physiological Review*, 5, 349-428.
- DEUTSCHER, M. P. (1990) *Methods in Enzymology*, v. 182, San Diego, Academic Press, 894p.
- HEMODERIVADOS, ANBIO, Associação Nacional de Biossegurança, disponível em: http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr07_hemo_derivados.pdf, acessado em abril de 2011.
- HOFLAND, G.W., DE RIJKE, R., THIERING, R., VAN DER WIELEN, L.A.M., WITKAMP, G.J. (2000) "Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid". *Journal of Chromatography B*, 743, 357-368.
- KEMPF, C., STUCKI, M., BOSCHETTI, N. (2007) "Pathogen inactivation and removal procedures used in the production of intravenous immunoglobulins". *Biologicals*, 35, 35-42.
- LADISCH, M.R. (2001), *Bioseparations Engineering: Principles, Practices, and Economics*, New York: John Wiley & Sons, 2001, 735p.
- MELANDER W.R., HORVÁTH, C. (1977) "Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183, 200-215.
- POPOVA, E., WATANABE; E. O., PESSÔA FILHO, P. A., MAURER, G. (2008) "Phase equilibria for salt-induced lysozyme precipitation: Effect of salt concentration and pH". *Chemical Engineering and Processing*, 47, 1026-1033.
- QUEIROZ, J.A., TOMAZ, C.T., CABRAL, J. M. S. (2001) "Hydrophobic interaction chromatography of proteins". *Journal of Biotechnology*, 87, 143-159.
- RIBEIRO, MARIANA BORSOI (2006), *Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu (II) e Ni(II) imobilizados: Efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-ASP*. Campinas: FEQ/UNICAMP, Campinas-SP (tese de doutorado), 148p.
- SCOPES, R. K. (1994), *Protein Purification*, New York: Springer-Verlag New York Inc., 3th ed., 380p.
- SHIH, Y.C., PRAUSNITZ, J.M., BLANCH, H.W. (1992) "Some characteristics of protein precipitation by salts". *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1155-1164.
- SOUZA, MARIA CRISTIANE MARTINS (2008), *Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose*, Campinas: FEQ/UNICAMP, Campinas-SP (dissertação de mestrado), 165p.
- WATANABE, E.O., PESSÔA FILHO, P.A., MIRANDA, E.A., MOHAMED R.S. (2006) "Evaluation of the use of volatile electrolyte system produced by ammonia and carbon dioxide in water for the salting-out of proteins: precipitation of porcine trypsin". *Biochemical Engineering Journal*, 30, 124-126.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFU e ao CNPq pelo apoio financeiro. Agradecimentos aos Profs. Drs. Everson A. Miranda (UNICAMP) e Pedro de A. Pessôa Filho (POLI-USP) por cederem gentilmente os sais utilizados neste trabalho.