

INTERAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G HUMANA EM ADSORVENTES DE QUITOSANA/ALGINATO: AVALIAÇÃO DE ISOTERMAS DE ADSORÇÃO E PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

N. M. Millan¹, A. C. M. Pássaro¹, T. M. Mozetic¹, I. J. Silva Jr² e I. T. L. Bresolin¹

¹ Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

RESUMO – Imunoglobulinas humanas, com destaque à IgG, são anticorpos com ampla aplicação terapêutica no tratamento de doenças do sistema imunológico, o que justifica a sua necessidade de alta pureza, normalmente atingida com métodos cromatográficos. Este trabalho estudou a capacidade de microesferas de quitosana/alginato sem ligantes imobilizados de adsorver IgG humana, em diferentes temperaturas de 4°C, 15°C, 25°C e 37°C com tampões HEPES (pH 6,8) e MES (pH 6,5). Observou-se que a matriz possui afinidade média e que o tampão HEPES proporcionou as maiores capacidades de adsorção, em especial em 4°C, e que ocorre cooperatividade positiva no sistema, que se ajusta melhor ao modelo de Langmuir-Freundlich. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados e revelaram um processo de adsorção espontâneo e a possibilidade de interações hidrofóbicas e adsorção em multicamada.

1. INTRODUÇÃO

Imunoglobulinas humanas são glicoproteínas que atuam no reconhecimento de antígenos. Dentre estas, destaca-se a imunoglobulina da classe G (IgG) por sua ampla aplicação em fins terapêuticos e também diagnósticos, como no tratamento das imunodeficiências primárias. Essas somam mais de 150 doenças e, em sua maioria, resultam em maior suscetibilidade a infecções, doenças autoimunes e neoplasias. A imunoglobulina humana como terapia de reposição de anticorpos tem sido recomendada nesses casos, a fim de reduzir o risco de infecções e suas sequelas (Carvalho *et al.*, 2010).

Essas aplicações requerem IgG com alto grau de pureza, dado que a presença de outros tipos de proteínas pode comprometer a eficácia do processo (Prasanna e Vijayalakshmi, 2010). Atualmente, os processos tradicionais de purificação de imunoglobulinas (como precipitação por adição de sais ou variações de temperatura e pH) vêm sendo substituídos por métodos mais seletivos baseados em cromatografia de adsorção (Lowe *et al.*, 2001). A cromatografia de afinidade tem sido cada vez mais abordada, fazendo-se uso dos mais variados ligantes (proteínas A e G, corantes, aminoácidos, agentes tiofílicos e íons metálicos)

No entanto, dependendo dos grupamentos disponíveis na superfície do próprio suporte cromatográfico, pode-se também pensar em sua utilização sem nenhum ligante imobilizado. Neste sentido, o presente trabalho buscou avaliar a capacidade de adsorção de IgG humana

em microesferas de quitosana/alginate epoxiladas por meio da obtenção de isothermas de adsorção (Langmuir e Langmuir-Freundlich). Também foram levantados os parâmetros termodinâmicos da adsorção: energia livre de Gibbs (ΔG^0), a entalpia (ΔH^0) e a entropia (ΔS^0).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes: HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanosulfônico) e MES (ácido morfolinoetanosulfônico) foram adquiridos da Sigma (EUA). A IgG humana utilizada foi o produto comercial Beriglobina® 160 mg/mL (CSL Behring, Alemanha). O preparo dos tampões foi feito com água destilada. As microesferas de quitosana/alginate epoxiladas foram sintetizadas e fornecidas pelo Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção (GPSA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

2.2. Métodos

2.2.1. Ensaios em batelada: Os experimentos de obtenção de isothermas de adsorção foram realizados em duplicata. Adicionou-se, a tubos eppendorf de 1,5 mL, 5 mg do adsorvente e 1 mL de solução de proteína em tampão (concentração variando de 0,5 a 10,0 mg/mL). Estes tubos foram submetidos a uma agitação de 3 horas em um agitador orbital com incubadora a 120 rpm (Infors HT, UK) e, em seguida, o sobrenadante foi quantificado pelo método de Bradford (1976) a 595 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Evolution 60S, Thermo Scientific, EUA). Foram realizados experimentos em quatro temperaturas (4°C, 15°C, 25°C e 37°C) em meio a dois tampões diferentes: HEPES (pH 6,8) e MES (pH 6,5).

2.2.2. Determinação das isothermas de adsorção: Cada ponto da isoterma foi obtido com a média das duplicatas e a capacidade de adsorção foi obtida com um balanço de massa (Equação 1). Os gráficos de q^* em função de C^* foram construídos e os parâmetros dos modelos de Langmuir (Equação 2) e Langmuir-Freundlich (Equação 3) foram ajustados, por regressão não linear usando o software OriginPro8® (OriginLab Corporation, EUA)..

$$q^* = \frac{V_{sol}(C_0 - C^*)}{m_{ads}} \quad (1)$$

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_d + C^*} \quad (2)$$

$$q^* = \frac{q_m (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (3)$$

Em que q^* é a quantidade de proteína adsorvida por grama de adsorvente (mg/g), C^* é a concentração de proteína na fase líquida (mg/mL) em equilíbrio com q^* , C_0 é a concentração inicial de proteína na fase líquida (mg/mL), m_{ads} é a massa de adsorvente (g) e V_{sol} é o volume da solução (mL) em contato com o adsorvente. A variável q_m é a capacidade máxima de proteínas adsorvidas (em mg/g), K_D e $K_{D(LF)}$ são as constantes de dissociação e de dissociação aparente (mol/L), respectivamente, e n é a constante de Langmuir-Freundlich.

2.2.3 Determinação dos parâmetros termodinâmicos: A partir das constantes de dissociação obtidas pelo ajuste dos parâmetros ao modelo de Langmuir e com o auxílio do software Origin[®], foram determinadas as propriedades termodinâmicas da adsorção, tais como ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 . A ΔG^0 foi determinada pela definição da energia livre de Gibbs (Equação 4) ao se considerar ΔG nulo no equilíbrio. A constante K_d se relaciona com a temperatura por meio da relação de Van't Hoff na forma integrada e linearizada (Equação 5). Já o valor de ΔS^0 foi encontrado pela relação de Gibbs-Helmholtz (Equação 6).

$$\Delta G = \Delta G^0 - RT \ln K_d \quad (4)$$

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^0}{RT} + J \quad (5)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (6)$$

Em que R é a constante universal dos gases e J é a constante de integração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isotermas de Adsorção

Os parâmetros obtidos pelo ajuste não linear dos dados de adsorção de IgG no adsorvente utilizando-se o tampão HEPES (25 mmol/L e pH 6,8) estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção (HEPES 25 mmol/L, pH 6,8).

Temperatura (°C)	Langmuir			Langmuir-Freundlich			
	Q_m (mg/g seca)	K_d (mol/L)	R^2	Q_m (mg/g seca)	$K_{d(LF)}$ (mol/L)	n	R^2
4	919,66 ± 418,58	(2,93 ± 2,13) × 10 ⁻⁵	0,920	455,21 ± 76,50	(1,54 ± 0,59) × 10 ⁻⁵	2,37 ± 0,89	0,953
15	285,40 ± 26,02	(6,61 ± 1,91) × 10 ⁻⁶	0,962	226,01 ± 6,95	(2,62 ± 0,61) × 10 ⁻⁷	2,16 ± 0,30	0,993
25	340,13 ± 24,63	(9,05 ± 2,17) × 10 ⁻⁶	0,962	285,78 ± 14,01	(6,45 ± 1,28) × 10 ⁻⁶	1,67 ± 0,27	0,984
37	387,64 ± 54,03	(2,10 ± 0,68) × 10 ⁻⁶	0,955	284,15 ± 22,23	(1,76 ± 0,41) × 10 ⁻⁵	1,86 ± 0,41	0,979

Pelos coeficientes de correlação na Tabela 1, próximos de 1,0, percebe-se que os dois modelos se ajustaram bem. No entanto, o modelo de Langmuir-Freundlich teve um ajuste melhor, pois se aproxima mais de um sistema não ideal ao considerar a existência de sítios não uniformes e de heterogeneidade das interações entre proteína e adsorvente. (Bresolin *et al.*, 2010) Percebe-se também que Langmuir-Freundlich apresentou $n > 1$ no ajuste, indicando cooperatividade positiva: a adsorção de uma molécula de IgG favorece a adsorção de outra, possivelmente devido à característica heterogênea da adsorção. (Bresolin *et al.*, 2010)

Em seu trabalho, Gondim *et al.* (2014) abordou ensaios em leito fixo de adsorção de IgG humana nas mesmas microesferas de quitosana/alginato utilizadas neste trabalho, porém

com o corante Cibacron Blue F3GA imobilizado. Neste caso, obteve-se que, a uma temperatura de 25°C e tampão HEPES de mesma força iônica (25 mmol/L) e mesmo pH (6,8), o modelo de Langmuir fornecia um valor de Q_m de 93,3 mg/g seca e o de Langmuir-Freundlich, 85,4 mg/g seca. Estes valores, quando comparados com aqueles que estão na Tabela 1 para 25°C, se mostram inferiores nos dois modelos. Isto sugere que a matriz sem ligantes imobilizados possui, quando usada em ensaios de batelada, uma capacidade de adsorção maior que a matriz com Cibacron Blue F3G4 imobilizado em ensaios de leito fixo.

Também se infere da Tabela 1 que ambos os modelos forneceram o maior valor de Q_m a 4°C. Com relação a K_d , o modelo de Langmuir mostrou uma maior afinidade entre a IgG e a matriz na em 37°C, enquanto que para Langmuir-Freundlich isso ocorreu a 15°C. Todos os dados de K_d obtidos se mostraram condizentes com os valores típicos de sistemas de pseudobioafinidade (faixa de 10^{-2} a 10^{-7} mol/L), indicando um nível médio de afinidade (Bresolin *et al.*, 2010).

Por sua vez, os parâmetros obtidos pelo ajuste não linear dos dados de adsorção em meio tampão MES (25 mmol/L e pH 6,5) estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear dos modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção (MES 25 mmol/L, pH 6,5).

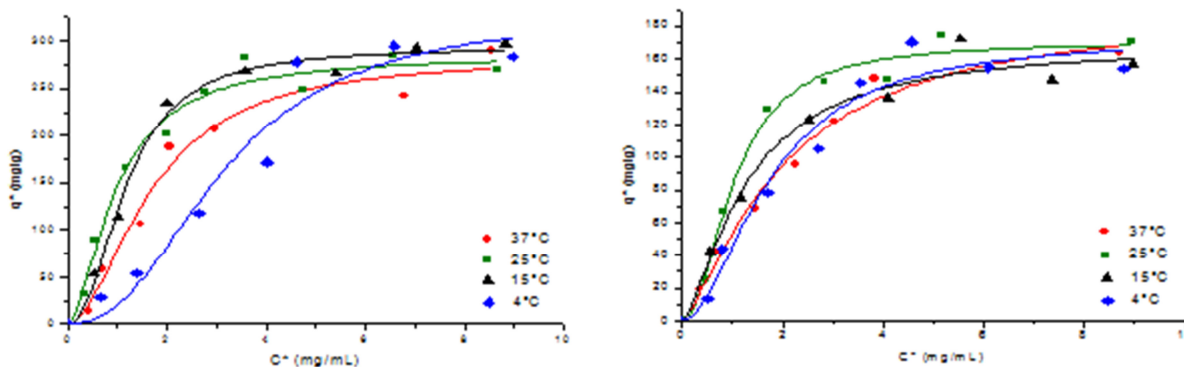
Temperatura (°C)	Langmuir			Langmuir-Freundlich			
	Q_m (mg/g seca)	K_d (mol/L)	R^2	Q_m (mg/g seca)	$K_{d(LF)}$ (mol/L)	n	R^2
4	430,73 ± 69,72	(1,48 ± 0,58) x 10 ⁻⁵	0,936	319,90 ± 31,77	(1,11 ± 0,32)x10 ⁻⁵	1,86 ± 0,47	0,967
15	154,87 ± 12,13	(6,84 ± 1,80) x 10 ⁻⁶	0,969	134,04 ± 12,63	(4,62 ± 1,77)x10 ⁻⁶	1,46 ± 0,41	0,976
25	215,68 ± 20,60	(8,59 ± 2,50) x 10 ⁻⁶	0,960	170,59 ± 7,20	(4,62 ± 1,02)x10 ⁻⁶	2,01 ± 0,33	0,989
37	362,14 ± 34,65	(1,94 ± 0,42) x 10 ⁻⁵	0,979	302,20 ± 30,52	(1,72 ± 0,30)x10 ⁻⁵	1,35 ± 0,23	0,987

Assim como com o tampão HEPES, ambos os modelos tiveram coeficientes de correlação próximos de 1,0, com Langmuir-Freundlich apresentando o melhor ajuste. O maior valor de Q_m , nos dois modelos, se deu em 4°C. Quanto à constante K_d , observou-se uma maior afinidade entre IgG e suporte em 15°C no modelo de Langmuir e em 15°C e 25°C (as constantes foram iguais) em Langmuir-Freundlich. Foi observado cooperatividade positiva novamente e que os valores de K_d também se situam na faixa característica de sistemas de pseudobioafinidade, igualmente com afinidade média.

No trabalho de Gondim *et al.* (2014), não foi feito o ajuste para os dados de adsorção em meio a tampão MES. Porém, ao se investigar apenas a influência do pH em quatro tampões diferentes que incluíam MES (pH = 6,7) e HEPES (pH = 6,8) em ensaios batelada, verificou-se também que a adsorção em tampão HEPES possuía resultados maiores que a adsorção em tampão MES.

Na Figura 1, observam-se as isotermas obtidas, para os dois tampões, com o modelo de melhor ajuste, que foi Langmuir-Freundlich.

Figura 1 - Isotermas de adsorção de IgG em matriz quitosana/alginato com tampão HEPES 25 mmol/L e pH 6,8: ajuste não linear dos parâmetros segundo o modelo de Langmuir (esquerda) e Langmuir-Freundlich (direita).



Pela Figura 1, observa-se que há concordância com o R^2 da Tabela 1 e da Tabela 2.

3.2. Determinação dos Parâmetros Termodinâmicos

Os valores de ΔG° e ΔS° , calculados pela Equação 4 e pela Equação 6, respectivamente, e o valor de ΔH° , encontrado pelo coeficiente angular da Equação 5, estão na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos para a adsorção de IgG em matriz de quitosana/alginato com tampão HEPES (25 mmol/L e pH 6,8) e MES (25 mmol/L e pH 6,5).

Tampão	Temperatura (°C)	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (J/mol)	ΔS° (J/mol)
MES	4	-252,74	+261,11	+912,87
	15	-281,02		+976,15
	25	-285,19		+957,42
	37	-275,99		+890,71
HEPES	4	-237,18	+535,33	+857,71
	15	-281,80		+979,82
	25	-283,92		+954,08
	37	-273,94		+884,97

Pela Tabela 3, nota-se que todos os casos para ΔG° foram negativos, indicando reação espontânea e, conseqüentemente, processo favorável de adsorção. Os valores positivos de ΔS° indicam aumento na desordem total do sistema e o ΔH° positivo, por sua vez, sugere a contribuição de interações hidrofóbicas.

A existência de interações de natureza hidrofóbica sugere, a princípio, que deve ocorrer um aumento da capacidade de adsorção e da afinidade com o aumento da temperatura, contudo isso não foi observado. Voltando-se à Tabela 1 e à Tabela 2, nota-se que, nos dois tampões, o aumento de temperatura gerou o resultado esperado ao se passar de 15°C a 37°C, mas que o maior valor ocorreu em 4°C. Uma possível explicação está na natureza heterogênea

da adsorção. Havendo essa heterogeneidade, um número maior de moléculas de IgG adsorvidas à matriz pode favorecer o aparecimento de uma segunda camada de adsorção que seria governada por interações hidrofóbicas (proteína-proteína).

4. CONCLUSÕES

Foi verificado que a matriz de quitosana/alginato sem corantes imobilizados apresentou resultados significativos de adsorção de IgG humana, tendo afinidade média e, em geral, maiores valores de Q_m com o tampão HEPES, que teve o maior valor a 4°C. O modelo de Langmuir-Freundlich apresentou o melhor ajuste para as isotermas dos dois tampões, indicando que há cooperatividade positiva no sistema. Os resultados para o tampão HEPES também se mostraram melhores que aqueles obtidos em matriz com Cibacron Blue F3G4 imobilizado em ensaios de leito fixo. Por fim, verificou-se que o processo de adsorção, no caso, é termodinamicamente favorável e que há a contribuição de interações hidrofóbicas, que podem governar uma segunda camada de adsorção por meio de interações proteína-proteína.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro recebido para a realização do presente trabalho (processos 2014/23893-3 e 2016/18005-7).

6. REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRESOLIN, I. T. L.; RIBEIRO, M. B.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; AUGUSTO, E. F. P.; VIJAYALAKSHMI, M. A.; BUENO, S. M. A. Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) as a technique for IgG1 monoclonal antibodies purification: the effect of chelating ligand and support. *Appl. Biochem. Biotechnol.* V. 160, p. 2148-2165, 2010.
- CARVALHO, B. T. C; CONDINO-NETO, A.; SOLE, D.; FILHO, N. R; I Consenso brasileiro sobre o uso de imunoglobulina humana em pacientes com imunodeficiências primárias. *Ver. Bras. Alerg. Immunopatol.* V. 33, nº 3, p. 104-116, 2010.
- GONDIM, D.R.; DIAS, N.A.; BRESOLIN, I.T.L.; BAPTISTIOLLI, A.M.; AZEVEDO, D.C.S.; SILVA Jr, I.J. Human IgG Adsorption using Dye-Ligand Epoxy Chitosan/Alginate as Adsorbent: Influence of Buffer System. *Adsorption*, v. 20, p. 925-934, 2014.
- LOWE, C.R., LOWE, A.R., GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 561-574, 2001.
- PRASANNA, R.R., VIJAYALAKSHMI, M.A. Characterization of chelate methacrylate nonolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 3660-3667, 2010.