



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JOSUÉ BRITO GONDIM

**APLICAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PARA EXTRAÇÃO DE
IgG DO PLASMA HUMANO**

RECIFE

2023

JOSUÉ BRITO GONDIM

APLICAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PARA EXTRAÇÃO DE IgG
DO PLASMA HUMANO

Dissertação apresentada ao Programa de Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do Título de mestre.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite.

RECIFE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Gondim, Josué Brito

Aplicação do sistema de duas fases aquosas para extração de IgG do plasma humano / Josué Brito Gondim – 2023.

75 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2023.

Inclui referências e apêndice.

1. Imunoglobulina G 2. Plasma sanguíneo 3. Arboviroses I. Leite, Ana Cristina Lima (orient.) II. Título

616.0793

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -243

JOSUÉ BRITO GONDIM

**APLICAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PARA EXTRAÇÃO DE
IGG DO PLASMA HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovações Terapêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Recife, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovações Terapêuticas. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para Saúde.

Aprovado em: 19/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (Examinador Interno)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Dr^a. Viviane do Nascimento e Silva Alencar (Examinadora Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

A Deus, à santa virgem Maria, à minha mãe, ao meu padrasto, à minha família e todos os que me apoiaram. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua divina misericórdia ter me fornecido forças para superar todas as dificuldades que apareceram ao longo do caminho e me permitiram chegar até o hoje com paz e de cabeça erguida.

À nossa Senhora, por tamanha intercessão e acalento nos momentos mais difíceis que pensei em desistir e ela me acolheu com tamanha ternura.

À minha mãe, Luciana Brito, por tamanho respeito, compreensão e afeto depositados em meus sonhos. Por sempre ter me fornecido forças quando acreditava que tudo estava perdido. Como sou grato em ter sido gerado sem seu ventre, mãe. Você é um exemplo em meio a sociedade, rogo a Deus todos os dias por sua vida e que eu consiga, um dia ser, tão quanto a pessoa espetacular que a senhora é. Essa conquista é toda nossa.

Ao meu Padrasto, Edivaldo Brito, por aprender a conviver com as diferenças e mesmo assim me fornecer tamanho amor nesses longos 20 anos que entrou na minha vida. Obrigado por ser o melhor “papai” que eu poderia sonhar.

À minha tia Queque, Lucicleide Brito por ser exemplo de fé e força. O quanto orgulho eu tenho em ser seu sobrinho. Obrigado por seu apoio por todo sempre.

Ao meu namorado, Otacílio Neto, por tamanha compreensão e paciência em ter dividido todos os anseios dessa etapa da minha vida há mais de 2 estados de distância e nunca ter saído do meu lado. Como sou grato em ter encontrado você nessa correria da vida e saber que pude contar com sua existência e apoio para chegar até aqui. Amo-te!

Aos meus familiares por todo o estímulo e orações que recebi ao longo da minha vida e desses quase dois anos, obrigado pelo amor e carinho.

À minha Orientadora, Prof^a. Dra. Ana Cristina Lima Leite, por ceder o espaço do laboratório o qual coordena e um projeto tão interessante.

Aos meus grandes amigos Renata, Pedro, Thiers, Viviane, Maria, Daiane e Thiago, vocês foram e são pessoas extremamente especiais em minha vida que irei levar sempre no coração. Desejo tudo que existe de mais lindo nesse mundo para a vida de vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovações Terapêuticas (PPGIT) por todo apoio.

À CAPES e o PPSUS por todo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto

E, por fim, a mim mesmo por jamais desistir do meu potencial e não viver através dos “achismos” dos outros.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”

(Josué 1: 9)

Ao meu passado

Eu devo o meu saber, e a minha ignorância

As minhas necessidades

As minhas relações

A minha cultura e o meu corpo

Que espaço meu passado deixa pra minha liberdade hoje?

Não sou escravo dele.

(AnaVitoria/ Rita Lee)

RESUMO

As arboviroses são doenças transmitidas por vírus e são assim classificadas devido à relação dos artrópodes e ao fato de seu ciclo reprodutivo se desenvolver em insetos. Atualmente, as arboviroses têm proporcionado impactos econômicos e sociais significativos no Brasil. O aumento desenfreado das incidências dessas patologias no país desencadeia o cenário de urgência em desenvolver novas estratégias e metodologias de combate e controle dessas patologias. A IgG vem sendo utilizada para tratamento ocasionado por arbovirose, como no caso da síndrome de Guillan-Barré. O fracionamento do plasma com etanol frio ainda é o método mais utilizado para a separação da IgG. Porém, devido ao alto índice de concentração de etanol e o baixo teor de pH, essa tecnologia proporciona uma desnaturação dos hemoderivados. Visando uma aplicação já existente, o presente estudo procurou abordar a separação do plasma através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) e, com isso, realizar a extração da IgG em bolsas de plasma acometidas pelas arboviroses de Dengue, Zika e Chikungunya. Foram utilizadas bolsas de plasma excedentes fornecidas pelo HEMOPE (Hemocentro de Pernambuco). As bolsas foram triadas para a arbovirose do tipo Dengue, Zika e Chikungunya através do teste Elisa utilizando o Kit Panbio e para o teste rápido Kit Abbott. A extração da Imunoglobulina G foi realizada através do SDFA que foi composto por 12,5% de solução de polietilenoglicol (PEG) 3350/mol, 15% de solução de fosfato pH 7,0 e NaCl a 12%. Esta metodologia proporcionou uma separação de Imunoglobulina G específica para as arboviroses do tipo Dengue, Zika e Chikungunya. A demonstração pelo método de eletroforese comprova que a IgG, através do método SDFA foi encontrada apenas na fase PEG. Com essa afirmativa, podemos compreender que o SDFA apresenta uma eficácia para obter a proteína IgG.

Palavras-Chave: Hemoderivados; Imunoglobulina G; Sistema de duas fases aquosas.

ABSTRACT

Arboviruses are diseases transmitted by viruses and are classified as such due to the relationship between arthropods and the fact that their reproductive cycle develops in insects. Currently, arboviruses have had significant economic and social impacts in Brazil. The unbridled increase in the incidence of these pathologies in the country triggers the urgency to develop new strategies and methodologies to combat and control these pathologies. IgG has been used to treat arboviruses, as in the case of Guillan-Barré syndrome. Plasma fractionation with cold ethanol is still the most used method for separating IgG. However, due to the high ethanol concentration and low pH content, this technology provides denaturation of blood products. Aiming at an already existing application, the present study sought to address the separation of plasma through the aqueous two-phase system (SDFA) and, therefore, perform the extraction of IgG in plasma bags affected by Dengue, Zika and Chikungunya arboviruses. Surplus plasma bags provided by HEMOPE (Hemocentro de Pernambuco) were used. The bags were screened for Dengue, Zika and Chikungunya arboviruses using the Elisa test using the Panbio Kit and the Abbott Kit rapid test. The extraction of Immunoglobulin G was carried out using SDFA, which was composed of 12.5% polyethylene glycol (PEG) 3350/mol solution, 15% phosphate solution pH 7.0 and 12% NaCl. This methodology provided a specific separation of Immunoglobulin G for arboviruses such as Dengue, Zika and Chikungunya. The demonstration using the electrophoresis method proves that IgG, through the SDFA method, was found only in the PEG phase. With this statement, we can understand that SDFA is effective in obtaining IgG protein.

Keywords: Hemoderivatives; Immunoglobulin G; Two-Phase Aqueous System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Curva epidemiológica Chikungunya: 2019-2022.....	21
Figura 2 –	Sintomas de infecção apresenta quando acometido pelo vírus da arbovirose.....	22
Figura 3 –	Estrutura da Imunoglobulina.....	26
Figura 4 –	Sistema de Duas Fases aquosas.....	29
Figura 5 –	Sistema de Duas Fases Aquosas Dengue.....	36
Figura 6 –	Sistema de Duas Fases Aquosas das amostras de Dengue.....	39
Figura 7 –	Eletroforese das Amostras 1/2/3.....	41
Figura 8 –	Eletro da amostra 4 para Dengue.....	42
Figura 9 –	Amostra Zika.....	44
Figura 10 –	Amostra 9 utilizando PEG 3.350.....	45
Figura 11 –	Amostra 10 utilizando PEG 4.000.....	46
Figura 12 –	Amostra 11 utilizando PEG 8.000.....	46
Figura 13 –	SDFA para amostra Chikungunya.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Testes das bolsas de Plasma Elisa.....	38
Tabela 2	– Elisa das amostras 6, 9 e 14.....	40
Tabela 3	– Elisa das amostras 4.....	40
Tabela 4	– Bolsa de Plasma para Zika.....	43
Tabela 5	– Teste Elisa da amostra 5.....	44
Tabela 6	– Bolsa de Plasma para Chikungunya.....	48
Tabela 7	– Teste de Elisa da amostra 8.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação dos casos de Arboviroses no estado de Pernambuco.....	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – Artralgia

CHIKV – Chikungunya

DC – Dengue Clássica

DCC – Dengue com Complicação

DENV – Dengue

DF – Doença Febril

EC – Erupções Cutâneas

DIE – Doenças Infecciosas Emergentes

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

HEMOPE – Fundação de Pernambuco de Hematologia e Hemoterapia

HIV – Vírus de Imunodeficiência Humana

HTLV – Vírus Linfotrópicos T Humano

IgG – Imunoglobulina

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PEG – Polietilenoglicol

PICS – Práticas Integrativas e Complementares em Saúde

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integradas e Complementares

SDFA – Sistema de Duas Fases Aquosas

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SH – Síndrome Hemorrágica

SN – Síndrome Neurológica

SUS – Sistema Único de Saúde

TT – Transferência Tecnológica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	17
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ARBOVIROSE.....	17
2.2 TIPOS DE ARBOVIROSE	18
2.2.1 Arbovirose Tipo Dengue	18
2.1.2 Arbovirose Tipo Zika	18
2.1.3 Arbovirose Chikungunya	18
2.3 ARBOVIROSES NO BRASIL.....	19
2.4 ARBOVIROSES NO ESTADO DE PERNAMBUCO	20
2.7 FASE CLINICA.....	21
2.7.1 Fase clinica aguda Dengue, Zika e Chikungunya	23
2.7.2 Fase Clinica Aguda Guillain-Barré	23
2.8 TRATAMENTO	24
2.9 IMUNOGLOBULINA	25
2.10 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA).....	28
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 OBTENÇÃO DO PLASMA.....	33
4.2 TRIAGEM DE BOLSAS DE PLASMA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA DENGUE ZIKA E CHIKUNGUNYA.	33
4.2.1 Teste Elisa através do Kit Pambio™ para Dengue	33
4.2.2 Teste Elisa através do Kit Vircell para Zika	34
4.2.3 Teste Elisa através do Kit Vircell para Chikungunya	35
4.3 OBTENÇÃO DE IgG ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO UTILIZANDO O SISTEMA DE DUAS FASES	35
4.4 ELETROFORESE SDS-PAGE	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 TESTE PARA ARBOVIROSE TIPO DENGUE	38
5.1.2 Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) para Dengue	38
5.1.3 Eletroforese Sds-Page Dengue	41
5.1.4 Quantificação por Bradford	43

5.2 TESTE PARA ARBOVIROSE TIPO ZIKA.....	43
5.2.1 Sistema de Duas Fases Aquosas	43
5.2.2 Eletroforese -SDS	45
5.3 TESTE PARA ARBOVIROSE TIPO CHIKUNGUNYA	48
5.3.1 Sistema de Duas Fases.....	48
5.3.2 Eletroforese-SDS	49
5.3.3 Quantificação pelo o método de Bradford.....	50
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

Os Arbovírus são vírus transmitidos por insetos artrópodes *Arthropod borne virus* e são assim denominados devido à vinculação dos artrópodes e ao fato de seu ciclo reprodutivo se desenvolver em insetos. A designação dos arbovírus está relacionada à sua replicação ocorrer em insetos. Neste sentido, para ser classificados como condutor de arbovírus, um artrópode deve ter a habilidade de infectar vertebrados e invertebrados; iniciar uma viremia em hospedeiros vertebrados e invertebrados, e dar início a uma infecção produtiva (CASSEB *et al.*, 2013). Os arbovírus que causam doenças em humanos e animais de sangue quente são classificados em cinco famílias de vírus: Butanviridae, Tgayridae, Flaviridae, Reoviridae e Rhabdovidae (LOPEZ; NAZAWA; LINHARES, 2014).

Atualmente, as arboviroses têm proporcionado impactos econômicos e sociais significativos no Brasil. O aumento desenfreado das incidências no país torna necessário o desenvolvimento de novas estratégias e metodologias de combate e controle dessas patologias; além de resguardar o máximo de indivíduos contra possíveis contaminações (DIAS, 2020).

No Brasil, as características climáticas e sua extensão territorial, vegetação e condições críticas da infraestrutura das residências enfrentada pela maioria da população brasileira são os principais contribuintes para o desenvolvimento de alto índice na incidência epidemias de arbovirose, como: a Dengue, Zika e Chikungunya e seu alto índice de diagnósticos positivos nos revelam as fragilidades sociais e políticas do país e reafirmam a necessidade para criação estratégica efetivas de combate sobre tais infecções (PROPHINO, 2022).

Com referência a utilização de medicamentos constituídos por hemoderivados, as imunoglobulinas seguem como maior consumo no planeta, tornando-se, hoje, o produto que direciona a indústria de hemoderivados (DIMAS, 2021). Atualmente no Brasil, o índice de utilização das imunoglobulinas vem aumentando devido o aumento dos casos de Síndrome de Guillain-Barré associado às infecções geradas pelo Chikungunya Vírus (TYLER *et al.*, 2016). Hoje, o principal tratamento fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é o uso de imunoglobulinas, que se mostra eficaz para casos mais graves da doença (GELFAND, 2012; GILARDIN; BAYRY; KAVERI, 2015).

Localizada no estado do Pernambuco, a empresa brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás) é a principal responsável por distribuir imunoglobulinas ao Sistema Único de Saúde (SUS), através da transferência de tecnologia (TT) (HEMOBRAS, 2022). Atualmente, o método utilizado pela empresa é o método de Cohn (1946) em seu formato original, utiliza uma mistura de etanol com diferentes concentrações de pH. Entretanto, o

fracionamento do plasma com etanol frio e o baixo teor de pH (BURNOUFT, 2016).

Por outro lado, o estudo do sistema de duas fases aquosas (SDFA) aparece como uma alternativa de metodologia que permite um ambiente aquoso (85-99% de água), o que possibilita a obtenção de biomoléculas e partículas celulares em condições não desnaturantes. O SDFA é uma técnica que pode com uma única etapa clarificar, extrair e concentrar a amostra (CASCONI, 1991; IQBAL *et al.*, 2016).

Desta forma, o objetivo do trabalho visa propor uma nova tecnologia para obtenção de imunoglobulina específica para doenças causadas pelos vírus da dengue, Zika e Chikungunya e, por meio de bolsas de plasma excedentes, tendo como metodologia para extração dessas imunoglobulinas, o SDFA. A otimização desta técnica para obtenção de proteínas plasmáticas representará a inserção de nova tecnologia na área de fracionamento de hemoderivados. Permitirá a obtenção de uma imunoglobulina com altos títulos de sorotipos para a dengue.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA ARBOVIROSE

As Arboviroses são patologias causadas pelos arbovírus. Atualmente, existe 545 espécies de arbovírus presentes no planeta, com ênfase para 150 espécies que proporcionam doenças em animais de sangue quente e seres humanos (ARBOVIROSE, 2017). Retratando em transmissão, as fêmeas do gênero *Aedes* são as principais responsáveis pela propagação das principais arbovirose de importância para a saúde pública no mundo. Apesar da classificação ser utilizada para nomear diversos vírus, atualmente a expressão é mais utilizada para abordar as doenças transmitidas pelo *Aedes Aegypti* como: Zika, Chikungunya e Dengue (CAMPOS *et al.*, 2018).

O *Aedys Aegypti* é um artrópode de corpo escuro na sua fase adulta e listras brancas espalhadas pelo dorso do seu corpo. As fêmeas dessa espécie, comparadas com os machos, possuem um tamanho relativamente maior que proporciona uma facilidade de realizar a identificação do gênero dessas espécies. A alimentação dos machos é apenas por néctar açucarado e apenas as fêmeas são hematófagas (se alimentam de sangue). Neste ponto, por ser uma fonte proteica, o sangue faz-se extremamente necessário para o desenvolvimento dos ovos (SANTANA; GUILHERME; FORTUNA, 2021).

Além do *Aedys Aegypti*, o mosquito *A. albopictus* está presente em toda região tropical e subtropical, onde se torna responsável por uma pequena parcela de índices de infecção de arboviroses nessa região. No Brasil, os primeiros relatos de *A. albopictus* encontrado foi no ano de 1986, no estado do Rio de Janeiro, em um lote de larvas coletadas de pneus abandonados no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na cidade de Seropédica (ROCHA *et al.*, 2023).

Em 2003, os dados de informação nacional do Brasil sobre *Ae. albopictus* foram atualizados e sete estados tiveram a detecção da espécie, sendo eles: Acre, Amapá, Tocantins e Roraima (Norte do Brasil) e Ceará, Piauí e Sergipe (Nordeste do Brasil) – ainda não haviam registrado oficialmente a existência desta espécie nesses estados. Após 12 anos, estes estados observaram que o mosquito continua sendo encontrado nessas regiões. Porém, foi possível notar o desaparecimento nos estados do Acre, Sergipe e Amapá. Entretanto, no final de 2014 e em 2019, os estados voltaram a relatar a presença do vetor (ROCHA *et al.*, 2023).

2.2 TIPOS DE ARBOVIROSE

2.2.1 Arbovirose Tipo Dengue

A Dengue, classificada como uma doença viral, pode apresentar uma evolução benigna ou grave. O seu arbovírus é pertencente à família flaviridae e possui quatro variações conhecidas: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. É a arbovirose considerada de maior índice de mortalidade no mundo (SANTANA; LIMA; FORTUNA, 2021).

Entre as doenças consideradas re-emergentes, a Dengue é a que se constitui em problemas mais graves de saúde pública. Indivíduos quando acometidos com o vírus da Dengue adquirem imunidade duradoura específica para a qual tipo viral o mesmo foi infectado, mas não para os outros três tipos classificados. Pessoas que residem em áreas consideradas endêmicas para Dengue podem apresentar vários níveis de infecções devido à infecção pelos diferentes sorotipos da patologia. (SANTANA; LIMA; FORTUNA, 2021).

2.1.2 Arbovirose Tipo Zika

Relatado na década de 50 do século XX, o Zika vírus foi detectado em seres humanos e, até o início do ano de 2007, a patologia era considerada como uma causadora de infecções esporádicas em humanos na Ásia e na África. Porém, em meados de 2007 surgiram os primeiros sinais de infecções pelo vírus fora do continente africano e asiático; mas precisamente nos Estados Federados da Micronésia (SAKGUE *et al.*, 2016).

O Zika é uma patologia caracterizada como doença febril aguda, autolimitada e de curta duração (entre 3 e 7 dias). Assim como o vírus da Dengue, o Zika é um arbovírus do gênero flavivírus. O zika é mundialmente conhecido por proporcionar alterações e más-formações fetais durante a gravidez, sendo relatada a primeira ocorrência no Brasil no término da copa do mundo de 2014 (SANTANA; LIMA; FORTUNA, 2021).

2.1.3 Arbovirose Chikungunya

O vírus Chikungunya é pertencente a arbovirose togaravidae, pertencente ao gênero alphavirus. Como a Zika, acredita-se que a Chikungunya foi introduzida no Brasil na época da copa do mundo, devido sua primeira ocorrência acontecer no Brasil entre julho e agosto de 2014. A Chikungunya é conhecida mundialmente por ser uma das principais responsáveis pelo

aumento da síndrome de Guillain-Barré. Ela é classificada em três fases decorrentes da evolução dos sintomas: aguda, subaguda e crônica (SANTANA; LIMA; FORTUNA, 2021).

2.3 ARBOVIROSES NO BRASIL

Quando retratado ao nível global de diagnósticos positivados para as arboviroses, o Brasil se define como um dos maiores países com índice de detecção positiva para as arboviroses do gênero flavivírus (Zika e Dengue) e alphavirus (Chikungunya). Acredita-se que durante o ano de 1845, no Rio de Janeiro, teve-se a primeira epidemia de Dengue relatada em território brasileiro e entre os anos de 1851 a 1923, o país por completo começou a ter vivências as arboviroses (CAMPOS *et al.*, 2018). Um dos métodos de tratamento na época de 1845, era o isolamento das casas para indivíduos que apresentassem infecção por arbovirose.

Durante o ano de 1923, ações tomadas pelos governos da época realizaram uma grande campanha para eliminar o vetor do *Aedes Aegypti* no país. Entretanto, no ano de 1981, no estado de Roraima, teve-se uma nova emergência de casos de Dengue, onde foi possível, pela primeira vez, realizar a identificação laboratorial dos sorotipos circulantes na região. Devido a este avanço foi possível a identificação dos sorotipos do vírus da Dengue (Dengue vírus 1, 2, 3 e 4) (MORZOCHI, 1994).

Decorrente a vivência diária da população brasileira com as infecções ocasionadas pelas arboviroses, no final da década de 1980, adjunto com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), tornou-se obrigatório no país a realização de acompanhamento adequado para o paciente que tenha apresentado algum sintoma relacionado a patologia gerada por artrópodes do gênero flavivírus (SILVA; ANGERAMI, 2008).

Entre os anos de 2015 a 2017, o Brasil sofreu drástica epidemia de arbovirose, tendo como concentração de emergência a Dengue (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Tendo a visão dos avanços dessas infecções, a semana epidemiológica tornou-se um assunto fixo a ser debatido em conselhos municipais, estaduais e nacionais de saúde onde se tem o estudo de métodos que proporcione melhorias para a saúde pública do país. Graças a esses debates, em 2017 o Brasil tem uma queda considerável no número de casos diagnósticos no país (SINAN, 2019).

A semana epidemiológica (evento realizado todos os anos no país desde 1975) as grandes campanhas, conscientização populacional e o aprofundamento de estudos voltados para as doenças causadas por arbovirose, contribuíram para melhorar o quadro epidemiológico do país e a diminuição de notificações de óbitos acarretadas pelas infecções (SINAN, 2019;

MINISTERIO DA SAÚDE, 2016).

2.4 ARBOVIROSES NO ESTADO DE PERNAMBUCO

A região Nordeste apresenta-se como uma das regiões brasileiras com o maior índice de contaminação por arboviroses no país. Acredita-se que tamanha proporção de novos casos infecciosos da região Nordeste, torna-o como uma das principais responsáveis pelo aumento de 84,8% dos casos diagnósticos de arboviroses no ano de 2022 no país; possuindo sua concentração na patologia do tipo Chikungunya (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022)

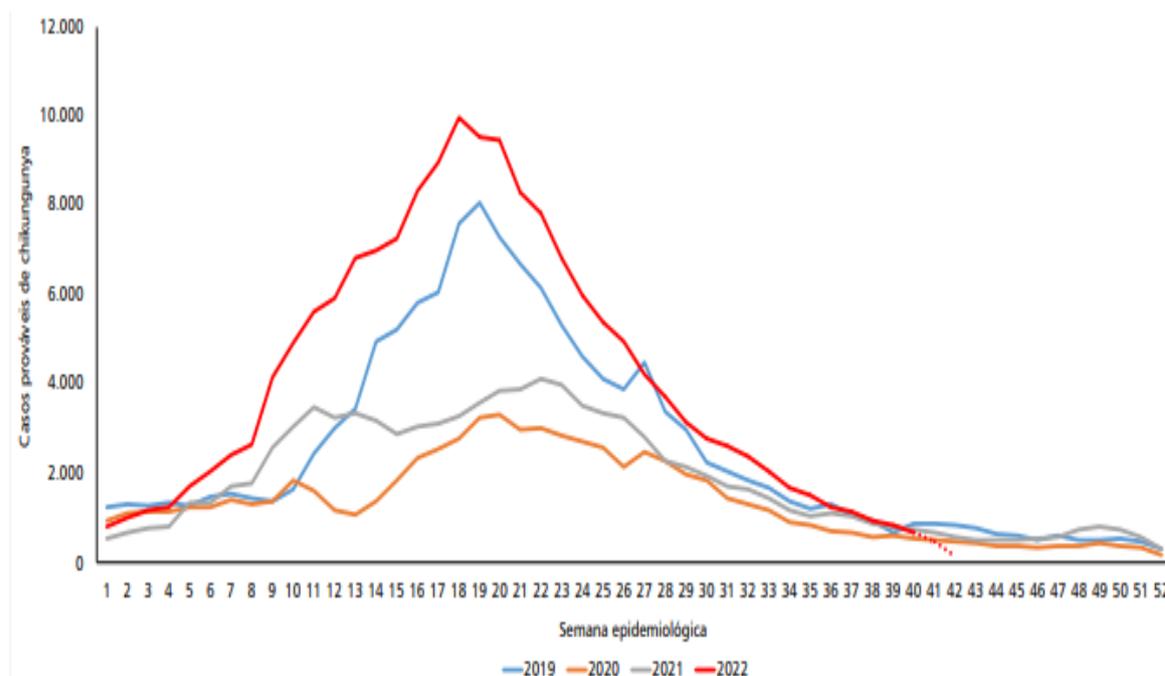
As arboviroses e Arbovírus estão presentes em praticamente qualquer ecossistema que seja propício para o desenvolvimento de artrópodes. Embora as florestas densas sejam o ecossistema mais propício, os resquícios de mata atlântica preservados nas grandes capitais do Nordeste, promovem sua procriação em grande escala. Possuindo a terceira maior faixa de mata atlântica do país, o estado de Pernambuco é considerado um dos estados provedores de casos de arboviroses do país (quadro 1). O caso mais alarmante do estado, é a arbovirose do tipo Chykungunya que a cada ano se torna mais crescente (figura 01) e assusta a sociedade pernambucana. O primeiro caso epidêmico de arbovirose no Brasil foi relatado no estado de Pernambuco no ano de 1685, onde se teve um surto de febre-amarela no estado. Historiadores acreditam que essa infecção veio atrás das importações e exportações do comércio marítimo na época com a região do golfo do México (SILVA; ANGERAMI, 2008).

Quadro 1 - Comparação dos casos de Arbovirose no estado de Pernambuco

Arbovirose	Notificações 2022	Notificações 2021	Comparativia
Dengue	16.620	11.932	39,3%
Zika	666	1.122	-40%
Chikungunya	9.986	5.636	77,20%
Total	27.272	18.690	45,9%

Fonte: SES (2022)

Corroborando com os dados fornecidos pela 40^a semana epidemiológica no estado de Pernambuco, é possível observar um aumento expressivo de casos de arboviroses desde os primeiros sete meses do ano de 2021. Segundo os dados fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, o contágio desta infecção cresceu 469% comparado ao ano de 2020 (SES, 2021).

Figura 1 - Curva epidemiológica Chikungunya: 2019-2022

Fonte: SINAN ONLINE (2022).

Segundo o ministério da saúde, no ano de 2022, o estado de Pernambuco registrou 18,2 (dezoito virgula dois) mil casos de dengue, como uma incidência de 188,3 casos diagnosticados por habitantes no estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Tendo em vista que o estado do Pernambuco é a região com maior detecção de casos de contaminação pelos arbovírus, assim, ações que proporciona o cuidado para evitar possíveis infecções foram criadas no estado. A Universidade de Pernambuco (UPE) é uma das principais organizadoras que promovem ações em Unidades Básicas de Saúde na cidade do Recife e por todo o estado pernambucano, promovendo informativo presenciais ou digital que ajudam a promover a não contaminação ao *Aedes Aegypti* (REUPE, 2018).

2.7 FASE CLINICA

Quando retratamos a Arbovirose de nível clínico, a Anamnese (processo de perguntas detalhadas dos sintomas) deve ser feita logo que todos os pacientes acometidos por Dengue apresenta quadro febril durante os 7 primeiros dias de infecção. Tais informações servirão para o desenvolvimento de um tratamento terapêutico eficaz (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

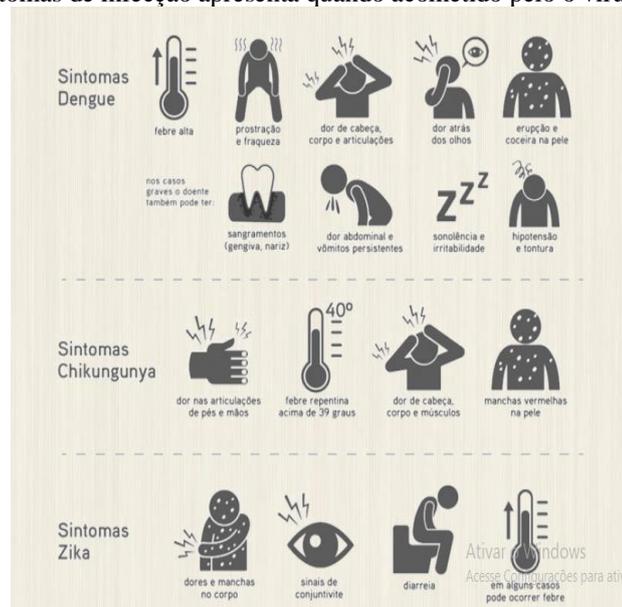
As principais formas clínicas da Arbovirose do tipo Dengue são classificadas em três

tipos: Dengue Clássica (DC), Dengue com Complicações (DCC) e a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD). Tendo observados padrões de sintomas de arboviroses, a Organização Mundial da Saúde procurou estabelecer critérios que facilita o diagnóstico preciso e rápido para a detecção da infecção pelos arbovírus em casos clínicos graves. Os quatro critérios são:

- Febre ou histórico de febre constante durante 7 dias, ou mais;
- trombocitopenia (Contagem plaquetária $\leq 100.000/\text{mm}^3$);
- hemorragias evidentes por sinais: Equimoses ou púrpuras, sangramento de mucosas do tratamento gastrointestinal e outros;
- extravasamento do plasma devido o aumento da permeabilidade capilar;
- presença de derrame pleural, oscite e hipoproteinemia (DIAS *et al.*, 2016).

Devido às manifestações clínicas por arboviroses serem variadas no ser humano, são analisados os sintomas de arboviroses do tipo Zika e Chikungunya a presença de doença febril (DF), que podem ocorrer variações do quadro patogênico e clínico com artralgia (AR) e erupções cutâneas (EC); síndrome hemorrágica (SH) e síndrome neurológica (SN) servem como pontos de detecção para proporcionar o tratamento terapêutico de forma eficaz (VASCONCELOS, 2015).

Figura 2 - Sintomas de infecção apresenta quando acometido pelo o vírus da arbovirose.



Fonte: Sanata, Lima, Fortuna (2021).

2.7.1 Fase clinica aguda Dengue, Zika e Chikungunya

Quando retratam os casos clínicos agudos, Houser e Amato (2015) afirmaram que os pacientes que apresentam casos de síndromes neurológicas (SN) são considerados como os pacientes de maior preocupação para o tratamento terapêutico. Indivíduos com SN podem apresentar quadros patológicos como: alterações comportamentais, paresia (diminuição ou perda de força) e dificuldade de coordenação, além de características sintomáticas de mielite, meningite e/ou encefaleia. O estudo com o apoio da Imaginologia vem se mostrando um forte aliado nos últimos anos para poder observar de forma mais clara, as alterações fisiológicas que podem ser causadas pelas arboviroses (CAMELO *et al.*, 2019).

2.7.2 Fase Clínica Aguda Guillain-Barré

Considerada uma doença polirradiculoneuropatia autoimune, aguda e potencialmente grave, a síndrome de Guillain-Barré é uma das principais preocupações para a equipe multidisciplinar que trata o devido paciente acometido pela patologia. A mesma manifesta-se como paralisia arreflexa ascendente com ou sem alterações sensitivas iniciada nos membros inferiores com fraqueza e dores nas articulações sensitivas, que pode evoluir em horas ou dias (Maniero *et al.*, 2016).

O padrão do comprometimento articular crônico ocorre mediante queixas constantes (60-80%) e acompanha aparições de oligo ou poliartralgia de formas variáveis, predominantes em punhos, mãos, tornozelos e joelhos; sempre associados a rigidez matinal e edema articulares. Alguns pacientes que apresentam melhoras consideráveis, mas que pode sofrer com retorno das dores em até 72% dos casos, com intervalo que oscila em uma semana há anos, tendo sintomas variáveis e comprometendo as articulações do corpo (MARQUES *et al.*, 2017).

Mesmo com o avanço de pesquisas na área e a principal característica de caso clínico de arboviroses ser a febre, a febre da Dengue e Chikungunya pouco são os fatos literários que se associam com cronificação e pior prognóstico. Porém, estudos publicados demonstram que alguns fatores estão mais associados à evolução por formar crônica com sexo feminino, idade acima de 40 anos, envelhecimento articular na fase aguda (edema e rigidez articulares na fase aguda, diagnóstico de doenças articulares prévia e presença de comorbidades, como diabetes mellitus (DM) (MARQUES *et al.*, 2017).

2.8 TRATAMENTO

Expansão Residencial, invasão de locais intocados, aquecimento global e intensificação da pecuária proporciona o aumento de contágio das doenças infecciosas emergentes (EIDS), como os vírus transmitidos pelos artrópodes Dengue, Zika e Chikungunya (GIBB *et al.*, 2020). Tendo em vista o aceleramento do surgimento de novas doenças infecciosas emergentes (EIDS) e por possuir quase que igual o padrão sintomático, os testes de diagnósticos tornara-se mais importante para medicina clínica que, assim, proporciona um prognóstico médico adequado e orienta o paciente com o método terapêutico mais eficaz (MESSINA *et al.*, 2019; GRAHAM; SULIVAN, 2018).

A rápida detecção dos patógenos, é realizada por testes moleculares ou pela detecção de antígenos virais. Outro método bastante utilizado para a detecção dos patógenos, são os testes sorológicos. Esses são capazes de realizar a detecção de imunoglobulinas produzidas pelo sistema imune adaptativo do paciente em resposta a uma infecção no soro, plasma, saliva ou urina (JUWANDRA; OGG; MALAVIGE, 2018).

A detecção de anticorpos específicos do vírus é de suma importância nas infecções por arbovírus devido a viremia, em alguns casos, possui uma curta duração, tornando o teste sorológico a principal e única solução adequada em pessoas que moram em áreas remotas, onde as amostras levam dias para serem analisadas após o contágio e o início dos sintomas. (FISCHER *et al.*, 2021).

Possuindo métodos de detecção e características virais dos arbovírus, até o momento não se encontra um método que seja específico para o tratamento de arboviroses em todo o mundo. Quando confirmado o caso de infecção no paciente, as recomendações iniciais são: repouso, ingestão de água e a não automedicação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Caso o indivíduo não demonstre melhoras no decorrer da infecção e seja acarretado por alguma alteração fisiológica, neste contexto, as práticas integrativas e complementares em saúde (PICS) são reconhecidas e aplicadas como o principal método de prevenção dos agravos patológicos dos arbovírus e são ofertadas pelo Sistema Único de Saúde(SUS) como garantia da integralidade e do cuidado (ALVES, 2020).

Em meados de 2006, foi instituído pelo Ministério da Saúde (MS) a criação da Política Nacional de Práticas Integradas e Complementares (PNPIC) que proporcionou novas práticas terapêuticas para o cuidado da saúde. A criação da PNPIC proporcionou incorporar experiências já em desenvolvimento no âmbito da medicina tradicional e apresenta entre seus objetivos a presença de agravos implementando a fitoterapia e a homeopatia (BRASIL, 2006;

ALVES, 2020).

Tendo em vista o avanço de estudos com a criação da Política Nacional de Práticas Integradas e Complementares (PNPIC), em 2018 foram incorporadas práticas de PICS que proporcionaram uma terapia estabilizadora dos sintomas patológicos ocasionados pelas arboviroses. Atualmente, mais de 29 métodos são fornecidos como tratamento que demonstraram uma paralização no grave dos quadros clínicos dos pacientes (BRASIL, 2018).

Até o momento, todas as PICS ofertadas pelo SUS não apresentam uma comprovação específica que forneça um retrocesso ou desaparecimento do quadro patológico do paciente que estão submetidos a tais terapia em seus cotidianos. Entretanto, o Ministério da Saúde explica que as provas científicas apontam para a qualidade do tratamento integrado entre medicina convencional e práticas integrativas e complementares (BRASIL, 2020).

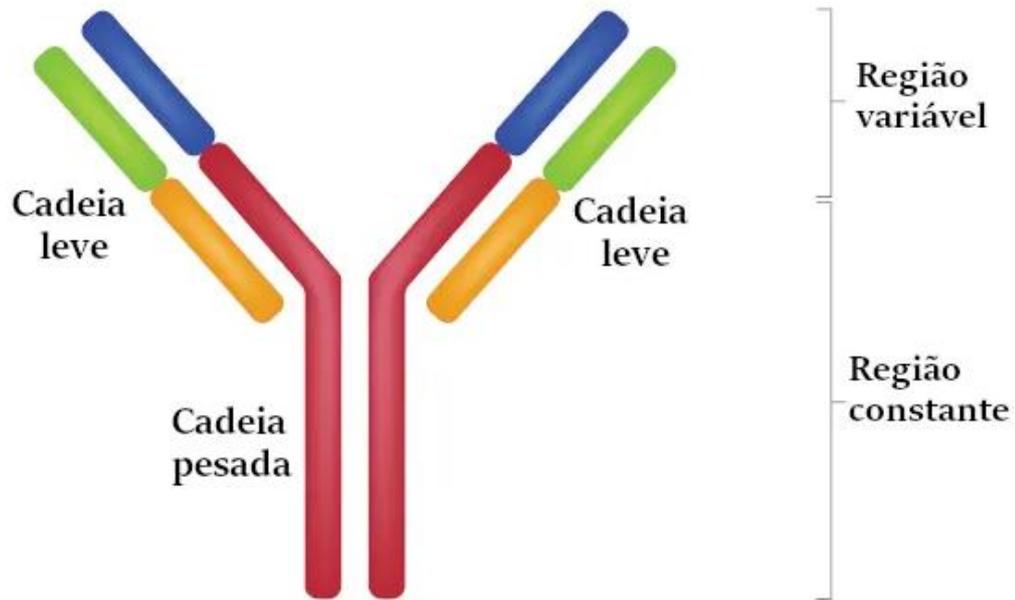
Outro tratamento considerado promissor para quadros inflamatórios como a Síndrome de Guillan-Barré é a utilização de IgG intravenosa. O uso da IgG é recomendado para os pacientes devido ter mostrado-se resultados promissores como: diminuição do tempo de recuperação da capacidade motora, uma recuperação parcial ou total da força muscular e diminuição dos casos de óbitos (CLINICO; PROTOCOLO, 2009).

2.9 IMUNOGLOBULINA

Possuindo um complexo gênico dividido em porções, as Imunoglobulinas são divididas em cinco classes diferentes, tendo requisito de diferencial sequência dos seus aminoácidos frequentes das cadeias pesadas. Os cinco grupos das Igs são: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (BARADI; CAROBREZ; PINTO, 2010).

A IgG (figura 3) é considerada como o principal componente responsável pela fração de anticorpos séricos humanos, IgG representa cerca de 75% das proteínas do tipo imunoglobulina e cerca de 10-20% do total das proteínas circulantes encontradas no plasma humano (KDIMATI; MULLINS; LINNEBACHER, 2021). No final da década de 50, o termo “imunoglobulinas” foi criado no meio literário da saúde para conceituar proteínas com a propriedade de anticorpos (LIVRAMENTO, 1979). Porém, desde o ano de 1952, o paciente Ogden Bruton foi o primeiro humano diagnosticado com IDP (Imunodeficiência primária) e tratado com IgG que proporcionou uma melhora no seu grau patológico de insuficiência de anticorpos. Desde então, a proteína G vem sendo usada como método terapêutico (CARVALHO *et al.*, 2010).

Figura 3 - Estrutura da Imunoglobulina



Fonte: Levison (2016).

Tornando-se conhecida por suas propriedades terapêuticas, a imunoglobulina humana tem sido recomendada para tratamentos de pacientes que sofrem das Imunodeficiências primárias, que somam mais de 150 doenças classificadas. Estima-se que 50% dos portadores de IDP (Imunodeficiência primária) são necessitados de tratamento por Imunoglobulinas G (IgG). Acredita-se que os primeiros produtos de IgG foram prescritos para prevenir ou tratar infecções com alto índice de morbimortalidade, tais como: poliomielite, sarampo, caxumba e hepatite, que deixaram de ser indicado devido à prevenção dessas doenças através do uso da vacina e suas campanhas vacinais (CARVALHO *et al.*, 2010).

A IgG proporciona um papel primordial nas funções de biotecnologia analítica, farmacêutica e imunoterápica. A produção volumétrica de anticorpos no seguimento “upstream” aumentou notavelmente nas últimas três décadas, mas as economias de escala atribuídas por essa melhoria foram prejudicadas pelo consumo do processamento downstream (CHOW, 2016).

As Imunoglobulinas intravenosas polivalentes G (IVIGs) são coletadas de 1.000 a 10.000 doadores de sangue saudáveis. A proteína IgG, atualmente, tornou-se aplicada para transplante de medula óssea e órgãos, para tratar polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, asma grave, HIV pediátrico, dermatomiosite, púrpura trombocitopênica idiopática, bem como esclerose múltipla (GOUVEIA, 2013).

Possuindo um agrupamento de cerca de 10 mg/mL, a imunoglobulina G está entre as proteínas de maior quantidade no soro humano. A proteína atua com sua relevância molecular efetora no retorno imune humoral adaptativa adquirida, mas, também realiza um papel essencial na ligação do retorno imune adaptativa e inata. A proteína de IgG possui um peso molecular de cerca de 150 kDa e equivale em dois fragmentos funcionais, o fragmento Fab (para fragmento de ligação ao antígeno) e o fragmento Fc (para fragmento cristalizável) (KRISTIC, 2022).

Sendo composta por quatro subtipos, a proteína IgG é dividida em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 os quais são diferenciados pelo agrupamento de ligações dissulfeto intermoleculares e pelo tamanho da região de junção das porções Fab com a porção Fc (Kanmert, 2011). Um aspecto importante da proteína é a estabilidade que possui quando estabilizada em pH de 5,0 a 9,0 (ABATUROV *et al.*, 1969; COHN *et al.*, 1946). A diminuição da estabilidade pode levar à desnaturação (soluções hidrofóbicas ou temperatura elevada), condições que aumentam as chances de desdobramento e formação de agregados. Para não ocorrer o acoplamento de agregados na formulação de uma IgG, faz-se uso das enzimas pepsina e papaína, que realizam a ruptura da imunoglobulina e separação dos fragmentos Fab dos fragmentos Fc, assim deixando os fragmentos Fab livres para realizar o ligamento com os antígenos (LIU; MAY, 2012; RADOSEVICH; BURNOUF, 2010).

Segundo Soares (2002), as IgGs são empregadas para patologias de deficiências imunológicas primárias ou genéticas e para deficiências secundárias e adquiridas (doenças infecciosas ou câncer) sendo utilizado numa possível substituição quanto na reposição de proteínas. Além disso, com os avanços do estudo da proteína, a mesma está sendo utilizada cada vez mais em tratamento neurológicos, infecciosos, hematológicos, entre outros (NOVARETTI; DIRNARDO, 2011).

Possuindo caracterizaras diferentes, as subclasses da IgG são constituídas por:

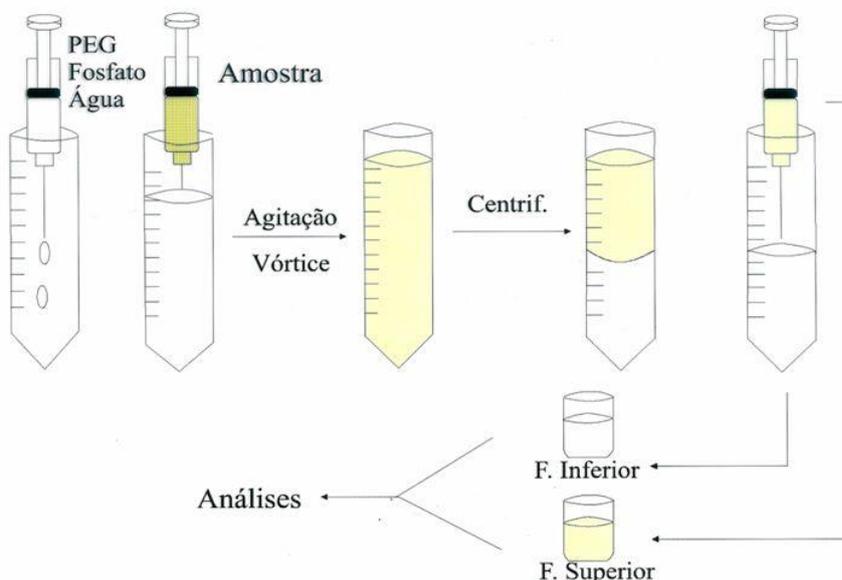
- IgG1: correspondendo a 65% total das IgGs, a Ig1 é a mais abundante no soro humano. Ela é a principal responsável por possuir resposta timo-dependente dominante contra os antígenos proteicos. A IgG1 liga-se aos receptores Fc das células fagocitárias (IMUNOGLOBULINA, 2021; BARADI; CAROBREZ; PINTO, 2010; MAYER, 2009)
- IgG2: É a principal responsável por provê a resposta imune prevalente conta os antígenos de carboidratos/polissacarídeos. Estudos afirmam que esta subclasse da proteína constitui de 20 a 25% da proteína IgG totais no soro humano. Níveis “adultos” desta proteína só são atingidos depois dos 7 anos do indivíduo. Está

subclasse está ligada diretamente a infecções respiratórias gerada na infância devido a bactérias com características cápsulas polissacarídicas como *Haemophilus influenzae* tipo B (IMUNOGLOBULINA, 2021; BARADI; CAROBREZ; PINTO, 2010; MAYER, 2009).

- IgG3: esta subclasse da proteína G, contribui com 5 a 10% das proteínas totais da sua classe e a única que possui maior afinidade com a IgG de subclasse do tipo Ig1. Ela possui apenas 7 dias de meia-vida biológica. O nível de resposta dessa subclasse torna-se perceptível com seu aumento de produção no soro humano na infância e seu nível “adulto” tem início a partir de 1 ano (IMUNOGLOBULINA, 2021; BARADI; CAROBREZ; PINTO, 2010; MAYER, 2009)
- IgG4: sendo a subclasse de menor produção das IgGs, a Ig4 é responsável por apenas 5% do total da proteína G no soro humano. O nível “adulto” de produção dessa subclasse é fornecido quando o indivíduo alcance seu 10/12 anos. Está IgG não atua sobre antígenos polissacarídicos. Seus níveis são elevados quando detectados doenças alérgicas e com a ocorrência do bloqueio da IgE. Com ocorrência de níveis baixos de Ig4, uma deficiência muitas vezes é mascarada pelos níveis normais da IgG total (IMUNOGLOBULINA, 2021; BARADI; CAROBREZ; PINTO, 2010; MAYER, 2009)

2.10 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

O Sistema de duas fases aquosas (Figura 4) é uma metodologia que realiza o fracionamento líquido-líquido que possibilita a construção de um sistema de extração para moléculas alvo (IQBAL, 2016). Zaslavsky (2016) descreve o sistema de duas fases aquosas (SDFA) como um sistema composto por duas fases líquidas que formam um equilíbrio, tendo o principal solvente a água. O sistema de duas fases aquosas é formado quase sempre por uma combinação de polímero/polímero, polímero/sal e sal/sal. Tendo uma combinação de polímero/sal, o SDFA é o que melhor apresenta resultados para extração em grande escala, sendo considerado pela indústria mais vantajoso devido maior seletividade e uma viscosidade considerada pequena, além do custeio do sistema ser extremamente barato e entregar uma separação de fase rápida e com características contínuas (BORDÓN, 2017).

Figura 4 - Sistema de Duas Fases Aquosas

Fonte: Kilikian (2020).

Nos últimos anos, diversos métodos de precipitação e sistema de extração bifásica aquosa tem sido observado como futuras alternativas tecnológicas devido ser um método de extração de produtos biológicos mais barato. Segundo Chow (2016), a utilização do sistema de duas fases aquosas, é uma alternativa que possui caracterizaras de exclusão sobre as limitações realizadas no processo downstream (fase de separação e filtração da proteína alvo) tracionais das proteínas. Acredita-se que os primeiros processos envolvendo o sistema de duas fases e separação de anti-corpos foi realizado no ano de 1992 (BARBARA; GERD; GERHARD; CHOW, 2016).

Descrito na literatura por Neikerick (1896), o (SDFA) foi descoberto quando o mesmo percebeu que ao misturar gelatina, ágar e água, em concentrações diferentes formava um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em ágar. Nos anos 50, Per-Aka Albertsson percebeu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água formava o SDFA. O sistema PEG/sal/água tornou-se, desde então, o mais utilizado para purificação envolvendo inúmeras biomoléculas (PORTO, 2004).

O sistema apresenta-se como um método interessante quando pensado para a extração de produtos biológicas, diferenciando-se dos métodos tradicionais de separação, que muitas vezes, utilizam condições extremas, como altas temperaturas e pressão, grande consumo de produtos químicos e alta demanda de consumo de energia (ARSENJO; ANDREWS, 2011).

Esse sistema torna-se uma alternativa interessante devido suas condições serem capazes de fornecer condições não desnaturantes, possuir alta biocompatibilidade, fácil escalamento, além do baixo teor de energia gerando menos impacto ao meio ambiente. Outro forte ponto do SDFA, é a questão de possibilitar um isolamento em uma única etapa, permitindo a purificação da molécula alvo e realizando a remoção de contaminantes (DANIELSSON; ALBERTSSON, 2013; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

O SDFA explora a incompatibilidade entre as soluções aquosas. Entretanto, o sucesso do método depende da capacidade de manipular os parâmetros do sistema (composição das fases) de forma que seja possível obter a coeficientes de partidas apropriadas. Tendo o coeficiente de partida a razão de concentração de uma espécie química ou de soluto entre dois meios em equilíbrio, tem-se como objetivo a capacidade de conseguir uma concentração da biomolécula em uma das fases, de modo a conseguir uma seletividade maior na separação das proteínas alvo (ARSENJO; ANDREWS, 2011; NADAR; POWER; RATHOD, 2017).

Tendo em vista que o mecanismo exato de partição ainda não é completamente compreendido, sabe-se que o particionamento do produto biológico entre duas fases possui uma dependência das propriedades de superfície das proteínas a serem extraídas da composição do próprio sistema de duas fases. A composição do sistema inclui: o peso molecular e a concentração de polímero formador da base, o tipo e concentração do sal formador da fase oposta, a relação de volume entre as fases, pH e temperatura (ASENJO; ANDREWS, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2019).

Sabendo disso, a proteína alvo e os contaminantes irão interagir com as moléculas circundantes dentro de cada fase do sistema por meio de ligações físicas-químicas como: ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, iônicas e hidrofóbicas, entre outras. Os efeitos líquidos dessas interações será diferente em cada uma de suas fases, particionando a proteína preferencialmente para uma das fases (ARSENJO; ANDREWS, 2012; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017; RUIZ-RUIZ *et al.*, 2012).

Os atributos de partição podem ser explorados individualmente ou em conjunto para alcançar a separação eficiente de proteínas específicas, pode se alterar peso moléculas do polímero, pH, temperatura, tipo de sal, força iônica da fase sal, realizando o adicional de um sal, como o NaCl ou ainda adicionar aos polímeros grupos hidrofóbicos ou grupos químicos que promovem uma afinidade específica com a proteína alvo, aumentando a seletividade e sua purificação (ARSENJO; ANDREWS, 2012; DANIELSSON; ALBERTSSON, 2013).

Com relação à extração e purificação, o método bifásico pode ser uma alternativa para separação e purificação das proteínas. Azimaie (2010) aborda na literatura a comparativa de

melhor separação utilizando o sistema de duas fases aquosas com polímero/sal/água do que a utilização de um sistema formado pela mistura de duas soluções poliméricas aquosas. O destaque do polímero/sal vem por fornecerem menor viscosidade, um tempo de separação pequeno; além da seletividade de moléculas com base na solubilidade. Tais pontos, realizam um aspecto desejado para ser aplicado em escala industrial. Mesmo com alguns estudos sobre um novo polímero solúvel em água, o polivinilpirrolidona (PVP), o polietilenoglicol continua sendo mais utilizado devido suas vantagens, como: baixo custo, vantagens, como fácil manipulação, não possuir caracterizaras inflamável e não ser tóxico (BORDÓN, 2017; ANIBIA, 2020).

O uso do sistema de duas fases aquosas para extração de proteínas plasmáticas foi demonstrado por Vargas *et al.* (2014), que utilizou o SFDA para o particionamento da IgG derivado do plasma equineo. Ensaio realizados posteriormente comprovaram a alta pureza dessa imunoglobulina, como também a sua composição.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar uma tecnologia para obtenção de imunoglobulina específica para doenças infecciosas causadas pelas arboviroses (Dengue, Zika e Chikungunya), utilizando o sistema de duas fases aquosas (PEG/SAL).

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar uma pesquisa de anticorpos específicos para Dengue, Zika e Chikungunya em bolsas de plasma excedentes e cedidas pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE);
- Extrair imunoglobulinas do plasma triado utilizando sistema de duas fases aquosas por meio da interação polímero (Polietilenoglicol) e Sal (Fosfato de sódio);
- Caracterizar o perfil eletroforético das Imunoglobulinas extraídas por SDFA utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO PLASMA

O plasma utilizado durante a pesquisa foi concedido pela Fundação HEMOPE, o qual foi obtido a partir do processo de separação do sangue total, de acordo com a resolução RDC nº 10. As bolsas de plasma são de doadores voluntário. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da instituição HEMOPE (CAAE:55993122.8.3001.5195) e Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (CAAE: 55993122.8.0000.5208)

4.2 TRIAGEM DE BOLSAS DE PLASMA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA DENGUE ZIKA E CHIKUNGUNYA.

4.2.1 Teste Elisa através do Kit Pambio™ para Dengue

O processo do teste Elisa para identificação das bolsas de plasma foi o primeiro passo para identificação e validação das bolsas como portadoras da Arbovirose do tipo Dengue. Teve-se a testagens de três bolsas com tipos sanguíneos: A+, B+ e O+. Para realização dessa testagem, foi utilizado o Kit Pambio® Dengue Duo, IgG Capture Elisa. O protocolo do Kit explica que se deve remover o número necessário de micropoços referente a quantidade de amostras que serão utilizadas, além 5 poços extras para serem distribuídos em 1 poço controle negativo, 1 poço controle positivo e 3 para os calibradores. Usando tubos de ensaio adequados ou uma placa de microtitulação, diluir o Controle Positivo (P), Controle Negativo (N), Calibrador (CAL) e amostras de pacientes. Em cada poço foi adicionado 100 µL de amostra diluente e 10 µL de soro das amostras e reagentes em seus respectivos poços. Em seguida, cobriu-se a placa e foi incubado por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a primeira incubação, foi necessário a lavagem dos poços seis vezes com tampão de lavagem diluído. A cada lavagem, foram descartados os líquidos ainda presentes nos poços. Após esse processo, fez-se necessário pipetar 100 µl de IgG anti-humano conjugado para cada poço e cubra a placa durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a segunda incubação, lavou seis vezes os poços, repetindo o processo da primeira lavagem. Em seguida, foi pipetado 100 µL de cromogênio TMB (solução de substrato utilizada para fixar a amostra) e incubado 10 minutos à temperatura ambiente ($20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) cronometrado desde a primeira adição. Após esse período, foi pipetado 100 µL de solução de parada para todos os poços na mesma sequência e tempo como a adição de TMB. Dentro de 30 minutos,

leia a absorbância de cada poço em um comprimento de onda de 450 nm com um filtro de referência de 600-650 nm. Foi definido bolsas infectadas aquelas que apresentaram uma positividade que fosse ≥ 1.1 positivo; 0.9-1.1 duvidoso e negativo ≤ 0.9 .

4.2.2 Teste Elisa através do Kit Vircell para Zika

O processo do teste Elisa para identificação das bolsas de plasma para a Arbovirose do tipo Zika foi o segundo passo para identificação e validação das bolsas como portadoras da infecção. Teve-se a testagens de 45 bolsas de plasma possuindo três tipos sanguíneos: A+, B+ e O+. Para realização dessa testagem, foi utilizado o Vircell® Zika, IgG Capture Elisa. O protocolo do kit explica que se deve remover o número necessário de micropoços referente a quantidade de amostras que serão utilizadas, além 4 poços extras para serem distribuídos em 1 poço controle negativo, 1 poço controle positivo e 2 para os calibradores. Usando tubos de ensaio adequados ou uma placa de microtitulação, foi diluído o Controle Positivo (P), Controle Negativo (N), Calibrador (CAL) e amostras. Em cada poço foi adicionado 100 μ L de amostra diluente e 5 μ L de soro das amostras e reagentes em seus respectivos poços, agitado a placa num agitador de placas (2 minutos) de modo que se obteve uma mistura homogenia dos reagentes. Foi feita a diluição prévia da amostra num tubo à parte. Foi pipetado 105 μ l de cada amostra diluída nos poços (colocado 100 μ l de diluente mais 5 μ l do plasma em um tubo e após isso, repassado para o poço). A placa foi coberta e levada para incubação durante 30 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após a primeira incubação, foi necessário a lavagem dos poços cinco vezes com 0,3 ml tampão de lavagem diluído. A cada lavagem, descartaram-se os líquidos ainda presentes nos poços. Pipetou-se 100 μ l de IgG anti-humano conjugado para cada poço e cobriu a placa novamente durante 30 minutos a $37^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$. Após a segunda incubação, foi feita a lavagem novamente cinco vezes os poços, repetindo o processo da primeira lavagem. Pipetou-se 100 μ L de solução de substrato e levado para incubar 20 minutos à temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) no escuro cronometrado desde a primeira adição. Por fim, pipetou-se 50 μ L de solução de parada para todos os poços na mesma sequência. Dentro de 1 hora, foi feita a leitura da absorbância de cada poço em um comprimento de onda de 450. Foi definido bolsas de plasma infectadas aquelas que apresentaram uma positividade que fosse ≥ 1.1 positivo; 0.9-1.1 duvidoso e negativo ≤ 0.9 .

4.2.3 Teste Elisa através do Kit Vircell para Chikungunya

O processo do teste Elisa para identificação das bolsas de plasma para a Arbovirose do tipo Chikungunya foi o último passo para identificação e validação das bolsas como portadoras da infecção. Teve-se a testagens de 45 bolsas de plasma possuindo três tipos sanguíneos: A+, B+ e O+. Para realização dessa testagem, foi utilizado o kit Vircell® Chikungunya, IgG Capture Elisa. O protocolo do kit explica que se deve remover o número necessário de micropoços referente a quantidade de amostras que serão utilizadas, além de 4 poços extras para serem distribuídos em 1 poço controle negativo, 1 poço controle positivo e 2 para os calibradores. Usando tubos de ensaio adequados ou uma placa de microtitulação, diluir o Controle Positivo (P), Controle Negativo (N), Calibrador (CAL) e amostras de pacientes. Em cada poço foi adicionado 100 µL de amostra diluente e 5 µL de soro das amostras e reagentes em seus respectivos poços. Foi agitado a placa num agitador de placas (2 minutos) de modo que se obteve uma mistura homogenia dos reagentes. Após a agitação, teve-se uma perfeita homogeneização e foi pipetado 105µl de cada amostra diluída nos poços. (colocado 100 µl de diluente mais 5µl do plasma em um tubo e, após isso, repassado para o poço) Cobriu-se a placa e levada para incubar 45 minutos a 37 °C ± 1 °C. Após a primeira incubação, foi necessário a lavagem dos poços cinco vezes com 0,3 ml tampão de lavagem diluído. A cada lavagem foi descartado os líquidos ainda presentes nos poços. Em seguida, pipetou 100 µl de IgG conjugado para cada poço e cobriu a placa novamente durante 45 minutos a 37 °C+ 1 °C.

Após a segunda incubação, foi lavada novamente cinco vezes os poços, repetindo o processo da primeira lavagem. Pipetado 100 µL de solução de substrato e levado para incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C) no escuro cronometrado desde a primeira adição, pipetado 50 µL de solução de parada para todos os poços na mesma sequência. Dentro de 1 hora foi feita a leitura da absorbância de cada poço em um comprimento de onda de 450/620 nm. Foi definido bolsas do plasma infectado aquelas que apresentaram uma positivação que fosse ≥ 1.1 positivo; 0.9-1.1 duvidoso e negativo ≤ 0.9 .

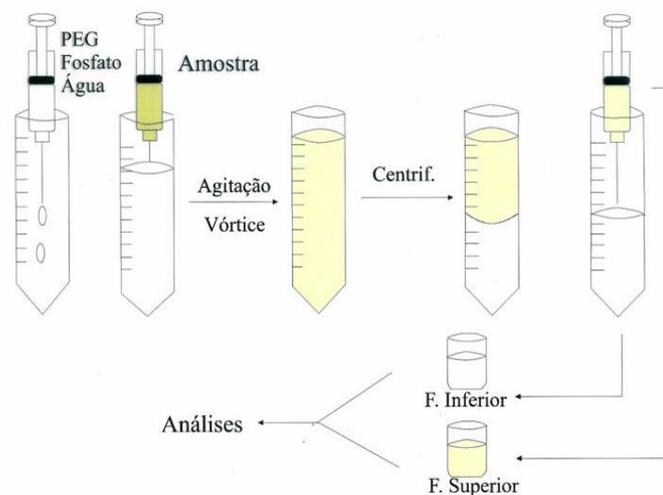
4.3 OBTENÇÃO DE IgG ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO UTILIZANDO O SISTEMA DE DUAS FASES

A metodologia do SDFA seguiu as orientações descritas por Arsenjio (2011) que utiliza o polietilenoglicol, uma alta concentração de sal como o fosfato, e o adicional de mais um sal,

como NaCl, que ajuda a alterar o peso molecular dos íons através da manipulação do coeficiente de participação, como proposta para o sistema de obtenção de proteínas. Para a extração das IgGs do plasma foi preparado uma mistura contendo uma solução de PEG 3.350/mol (concentração de 15.5% m/m), uma solução de fosfato (concentração 15% m/m em pH 7,0), solução de NaCl (concentração de 12% m/m) e o plasma pré tratado (plasma centrifugado à 3500 RPM por 30 minutos, em uma temperatura de 4 °C), onde foi coletado o sobrenadante como amostra.

Estes percentuais foram escolhidos devido diversos testes realizados com diversas concentrações de Peg e diferentes níveis de concentração de fosfato até obter uma extração de IgG de qualidade. Além disso, seguindo as informações cedidas por Vargas (2014), em seu estudo, o autor fala que aplicando ácido caprílico e filtrando as amostras, proporciona retirada de outras proteínas do sistema. Deixando, assim, a IgG isolada e concentrada apenas na fase superior do sistema. O SDFa foi homogeneizado durante 15 minutos sob um agitador magnético em um tubo volumétrico, tendo um volume de 3,5 ml de amostra deixado em descanso por 24 horas de sedimentação em temperatura ambiente (± 24 °C). As fases formadas (superior-PEG e inferior-SAL) foram separadas, medido seus respectivos volumes e guardados em microtubos contendo uma solução de ácido caprílico (concentração 4%), sendo posteriormente filtradas por microfiltro de 0,22 μ m milipore e analisada pelo método de Elisa e de eletroforese

Figura 5 - Sistema de Duas Fases aquosas Dengue



Fonte: Kilikian (2020).

4.4 ELETROFORESE SDS-PAGE

As duas fases (PEG e Sal) obtidas do SDFa foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida foi preparado nas concentrações de 6% (gel de empilhamento) e 12% (gel de corrida) de acordo com adaptações em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Cada amostra do SDFa foi preparada misturando-a uma solução de tampão de amostra contendo azul de bromofenol (125 mM Tris-HCl) na proporção 1:2. Alíquotas dessa mistura (10 µl) foram condicionadas em pequenos poços do gel de empilhamento submetidos inicialmente a uma corrente de 80 Volts por 10 minutos. A massa molecular foi determinada usando um marcador de peso molecular de proteínas como padrão da marca BIORAD. Após a corrida eletroforética a 120 Volts, durante aproximados 120 minutos, o gel de estudo contendo as bandas foi corado em solução de Comassie Blue. A cuba e reagentes foram da BIORAD.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para realizar a identificação das bolsas de plasma e seus tipos de infecções ocasionadas pelo Arbovírus foi realizado previamente um teste Elisa para Dengue, Zika e Chikungunya, onde foi possível observar se as 45 bolsas de plasma analisadas possuíam anticorpos IgG para qual das arboviroses. O primeiro teste feito foi para a arbovirose do tipo dengue através do teste rápido do kit Elisa Panbio como pode ser observado na Tabela 1.

5.1 TESTE PARA ARBOVIROSE TIPO DENGUE

Dentre as 45 amostras analisadas, 33 bolsas foram positivadas para Dengue e 12 bolsas negativadas. Essas bolsas foram utilizadas para identificação da presença de IgG. Dentre as bolsas positivadas para a Dengue, foram selecionadas de forma aleatória 4 bolsas positivadas com tipagem sanguínea distribuída em A+, B+ e O+ apenas para essa arbovirose.

Tabela 1 - Testes das bolsas de Plasma Elisa

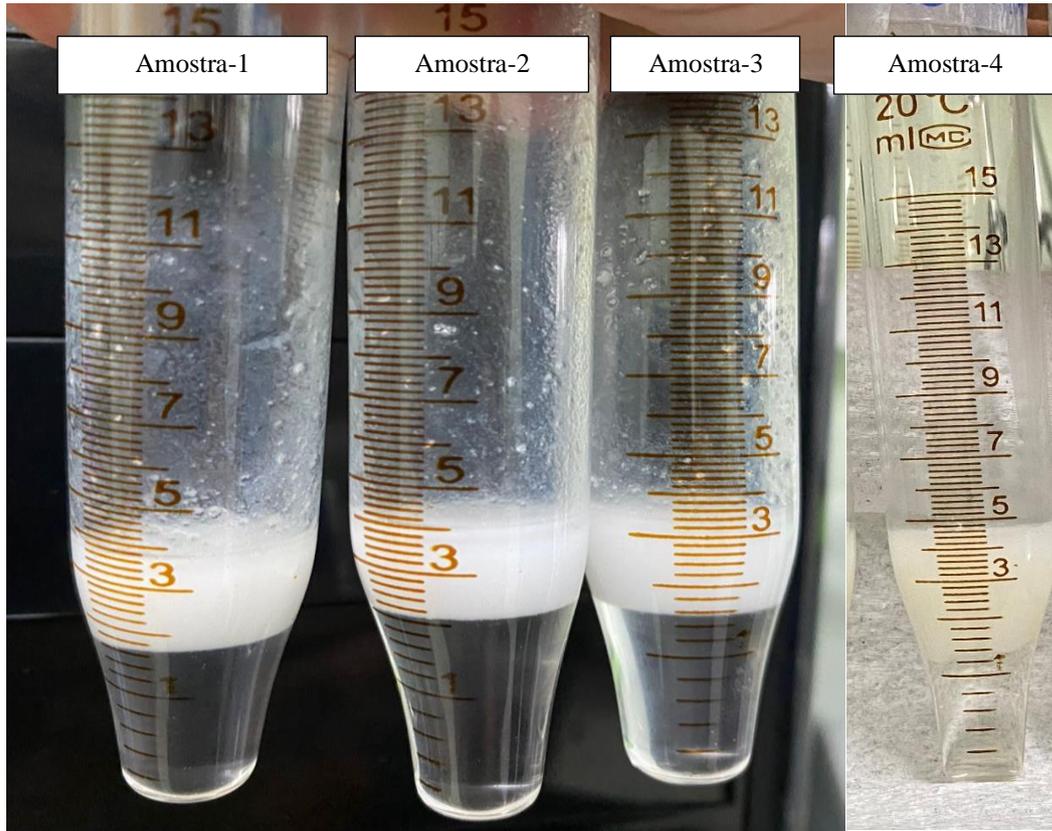
BOLSA DE PLASMA	RESULTADO
Amostra 1	Positivo
Amostra 2	Positivo
Amostra 3	Positivo
Amostra 4	Positivo

Fonte: Autori própria (2023)

5.1.2 Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) para Dengue

Quando identificado as bolsas específicas apenas para a Arbovirose do tipo Dengue, realizou-se o SDFA (Figura 6).

Figura 6 - Sistema de Duas Fases Aquosas das amostras de Dengue



Fonte: Autoria própria (2023)

As bolsas 1, 2, 3, 4 foram positivadas especificamente com concentrações de IgG apenas para a Dengue. As bolsas 1, 2 e 3 (colocada dessa forma numérica para melhor compreensão) foram as bolsas escolhidas de forma aleatória para realizar a aplicação do SDFA no processo de extração da IgG em sua fase teste, como mostra a figura 6. Na amostra 1 foi feita o teste com o plasma apenas filtrado; na amostra 2, foi testado o plasma com a adição de ácido caprílico e não foi filtrado; e, na amostra 3, foi realizado o teste com a filtragem e adição de ácido caprílico. Já a amostra de número 4, foi a amostra escolhida para se realizar o SDFA de forma direta, já tendo as informações coletadas.

Após a formação do SDFA das três amostras, teve-se uma nova leitura pelo método Elisa para validar a separação da IgG apenas na fase superior do sistema (PEG), como pode ser observado através da tabela 3. No estudo de Vargas (2014), o autor já abordava a extração de imunoglobulina pelo o método SDFA onde confirma a ideia da viabilidade do sistema para extração de IgG. A nova leitura das amostras pelo método de Elisa é feita após as amostras terem sido submetidas ao método de filtragem. Após o SDFA, a fase PEG foi utilizada para realizar uma filtragem com a adição de ácido caprílico para remoção de proteínas indesejáveis como albumina, promovendo apenas a recuperação da IgG e novamente positivando apenas a

fase PEG. A figura 6 demonstra a eficiência da amostra da IgG em ficar apenas na fase PEG sendo positivada e a fase sal, sendo negativada. Com isso, confirmando a eficácia do sistema em deixar apenas a proteína G na fase PEG.

Fica evidente que a fase superior (fase PEG) possui um volume maior quando comparado com a fase inferior (fase sal) nas amostras estudadas (bolsa 1 B+, bolsa 2 O+, bolsa 3 A+ e bolsa 4 A+). Após a formação do sistema de duas fases das três amostras, teve-se uma nova leitura pelo Elisa para validar a separação da Imunoglobulina G da fase PEG. Essa nova leitura é feita após a filtragem das duas fases por filtros de 0,22 µm e com isso, faz-se uma observação para ter-se uma comprovação definitiva que a IgG fica apenas na fase PEG.

Tabela 2- Elisa das amostras 6, 9 e 14.

AMOSTRAS	RESULTADO
1 (Fase PEG)	POSITIVO
1 (Fase Sal)	NEGATIVO
1 (Fase PEG após filtração*)	POSITIVO
1 (Fase Sal após filtração*)	NEGATIVO
2 (Fase PEG)	POSITIVO
2 (Fase Sal)	POSITIVO
2 (Fase PEG após filtração)	POSITIVO
2 (Fase Sal após filtração)	NEGATIVO
3 (Fase PEG)	POSITIVO
3 (Fase Sal)	NEGATIVO
3 (Fase PEG após filtração)	POSITIVO
3 (Fase Sal após filtração)	NEGATIVO

*Filtração com ácido caprílico

Fonte: Autoria própria (2023)

Após a testagem das amostras 1, 2 e 3 terem obtidos resultados promissores, a amostra de número 4 também foi submetida ao processo final de filtragem com adição de ácido caprílico. Vargas (2014) abordou em seu estudo que a importância da aplicação do ácido era importante devido o mesmo proporcionar uma quebra de proteínas mais pesadas e fornecendo um sistema puro apenas com concentração de IgG que ficou confirmada pelo método do teste Elisa. Após isso, a amostra de número 4 foi escolhida para ter-se a aplicação do método com a amostra filtrada e filtrada com o ácido caprílico que comprovou mais uma vez a eficácia da extração da Ig pelo método de SFA.

Tabela 3 - Elisa das amostras 4.

AMOSTRAS	RESULTADO
4 (Fase PEG)	POSITIVO
4 (Fase Sal)	NEGATIVO
4 (Fase PEG após filtração*)	POSITIVO
4 (Fase Sal após filtração*)	NEGATIVO

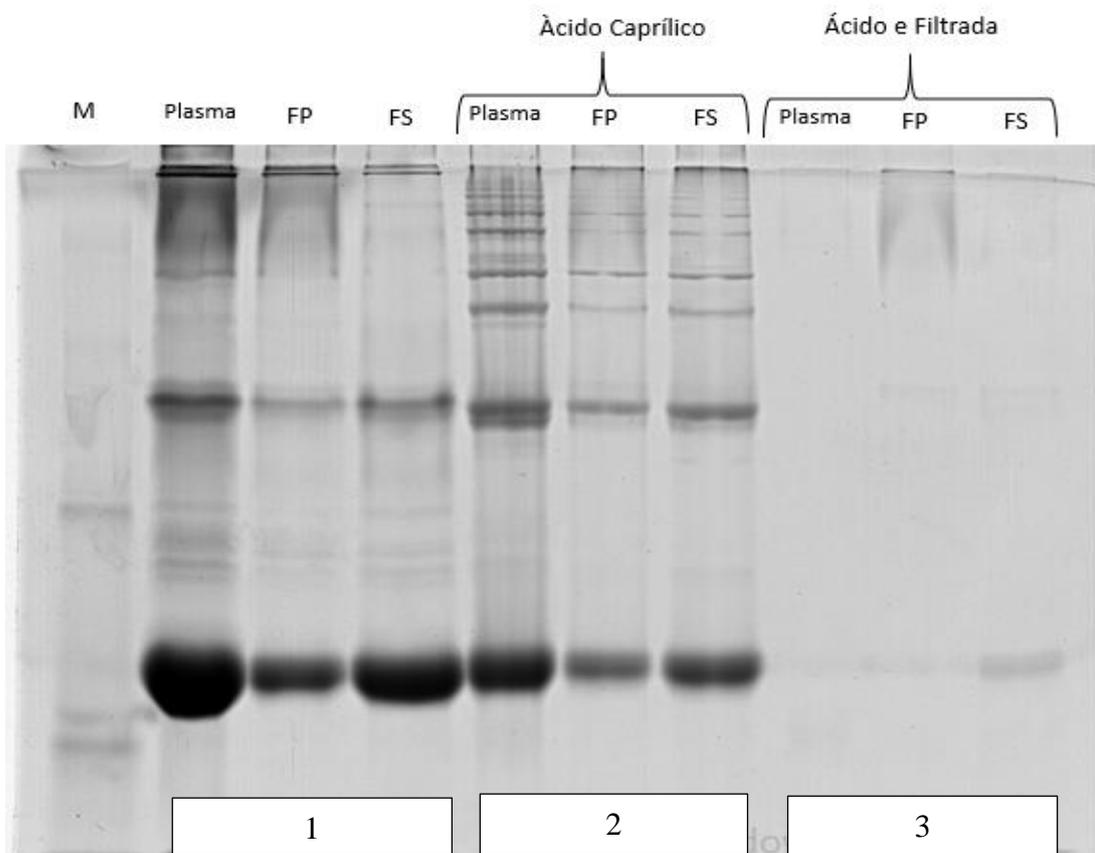
*Filtração com ácido caprílico

Fonte: Autoria própria (2023)

5.1.3 Eletroforese Sds-Page Dengue

Como demonstrado na figura 7, é possível observar que as amostras foram submetidas a 3 processos, nos quais foram distribuídas em: poços contendo apenas a fase PEG/ Sal; poços contendo a fase PEG/SAL filtrados; e a fase PEG/SAL filtradas com ácido caprílico.

Figura 7 - Eletroforese das Amostras 1/2/3



Fonte: Autoria própria (2023)

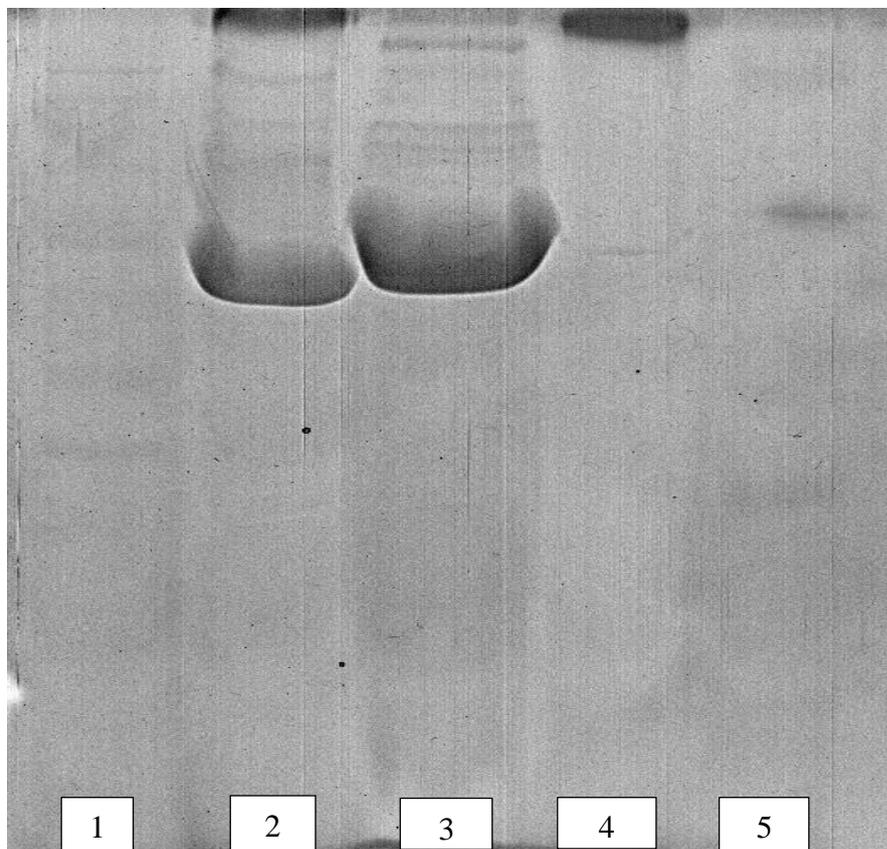
1- Marcador; 2 – Plasma – Bolsa 6, 3 - PEG Filtrado- bolsa 6, 4 - Sal Filtrado- bolsa 6, 5 - Plasma com ácido- bolsa 9, 6 - PEG com ácido- bolsa 9, 7 - Sal com ácido- bolsa 9, 8 - Plasma- bolsa 14, 9 - PEG filtrada com ácido- bolsa 14, 10 - Sal filtrada com ácido- bolsa 14.

Na figura 7, pode-se visualizar, a eficácia da separação do sistema apenas com ácido caprílico e com ácido/filtrada. Nos primeiros poços foi testado apenas as fases sem ácido e filtrado poço 3 e 4. Nos poços de número 6 e 7 já se nota uma diferença na separação da proteína IgG mais presente na fase PEG. Porém, uma concentração quase que igual na fase sal. Por fim,

tem-se a visualização de melhor forma das fases 8 e 9 com ácido e filtrado e com isso, tendo uma melhor separação de isolamento a proteína G apenas na fase PEG após a aplicação do ácido caprílico e sua filtragem. Como demonstrando a imagem acima, pode-se perceber que o método quando adotado o adicional de ácido/filtrado tem-se uma separação de melhoria e praticamente isolada a Imunoglobulina G apenas encontrada na fase PEG e na fase sal, apenas uma concentração pequena da proteína Albumina.

Além disso, realizou-se uma eletroforese com a aplicação de SDS da amostra de número 4, com características específicas para a arbovirose do tipo Dengue, que pode-se perceber uma melhor visualização da separação do sistema com a IgG (figura 8).

Figura 8- Eletro da amostra 4 para Dengue



1- Poço- Marcador, 2- Poço- Fase PEG Filtrada, 3- Poço- Fase Sal Filtrada, 4- Poço- Fase PEG filtrada e com ácido, 5- Poço- Fase Sal filtrada e com ácido

*F-Amostra filtrada

*F.A-Amostra filtrada com ácido

Fonte: Aatoria própria (2023)

Com isso, pode-se compreender que o método de Sistema de duas Fases (SDFA), aplicando a separação com ácido/filtrado, é uma sugestão viável para realizar a separação da proteína IgG.

5.1.4 Quantificação por Bradford

O resultado do método de Bradford serviu para realizar de forma quantitativa uma observação da quantidade de proteínas IgG presente na amostra. Onde após o processo da amostra aplicada ao SDFa, foi encontrada na fase superior do sistema, um total de 287 mg/ml de IgG isolada e concentrada apenas na fase peg. Quando submetida a fase inferior do sistema ao método de quantificação pelo Bradford, pode-se perceber uma concentração de 91 mg/ml de outras proteínas que ficaram localizadas na fase superior do sistema, como o caso da Albumina.

5.2 TESTE PARA ARBOVIROSE TIPO ZIKA

Dentre as 45 amostras analisadas, 34 bolsas foram positivadas para Zika e 11 bolsas negativadas. Essas bolsas foram utilizadas para identificação da presença de IgG. Dentre as bolsas positivadas para a Zika, foram selecionadas de forma aleatória 3 bolsas positivadas com tipagem sanguínea distribuída em A+, B+ e O+ apenas para essa arbovirose. As bolsas escolhidas foram 5, 6 e 7.

Tabela 4 - Bolsa de Plasma para Zika

BOLSA DE PLASMA	RESULTADO
Amostra 5	Positivo
Amostra 6	Positivo
Amostra 7	Positivo

Fonte: Autoria própria (2023)

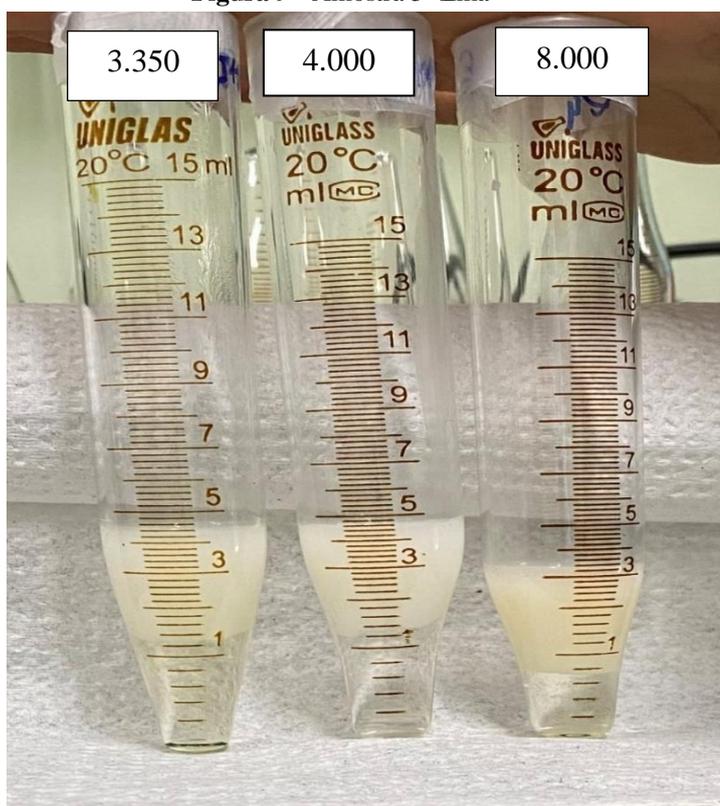
A utilização do Vircell pode proporcionar uma melhor identificação e observação dos resultados específicos para as bolsas que possuíam IgG voltado para Zika. As bolsas que possuem IgG podem indicar que a pessoa, no momento da doação, está na fase crônica e/ou convalescente ou já teve contato com a doença em algum momento da vida (PONTE, 2022).

5.2.1 Sistema de Duas Fases Aquosas

Quando identificado as amostras positivas para a arbovirose do tipo Zika, foi escolhida apenas uma amostra de forma aleatória que foi a de número 5. Diferente da metodologia aplicada no processo de extração de IgG para o método do tipo Dengue, o processo da extração da Ig no tipo Zika foi utilizado apenas em uma amostra para realizar a aplicação do SDFa, tendo em

vista que a amostra do tipo Dengue serviu para dar norteamento nos próximos passos de forma direta e não ser mais preciso submeter a amostras a teste para visualizar, por exemplo, se a filtração com ácido caprílico ou não teria um resultado para diminuir a concentração de outras amostras no sistema.

Figura 9 - Amostra 5- Zika



Fonte: Autoria própria (2023)

Tabela 5 - Teste Elisa da amostra 5

AMOSTRAS	RESULTADO
5 (Fase PEG 3.350)	POSITIVO
5 (Fase Sal)	NEGATIVO
5 (Fase Peg3.350 Filtrada.Ácido)	POSITIVO
5 (Fase Sal Filtrada. Ácido.	NEGATIVO
6 (Fase PEG 4.000)	POSITIVO
6 (Fase sal)	NEGATIVO
6 (Fase Peg 4.00 filtrada.Ácido)	POSITIVO
6 (Fase Sal. Filtrada.Ácido)	NEGATIVO
7 (Fase Peg 8.00)	POSITIVO
7 (Fase Sal)	POSITIVO
7 (Fase Peg8.000 filtrada com ácido)	POSITIVO
7 (Fase sal 8.000 filtrada com ácido)	Negativo

*Filtração com ácido caprílico

Fonte: Autoria própria (2023)

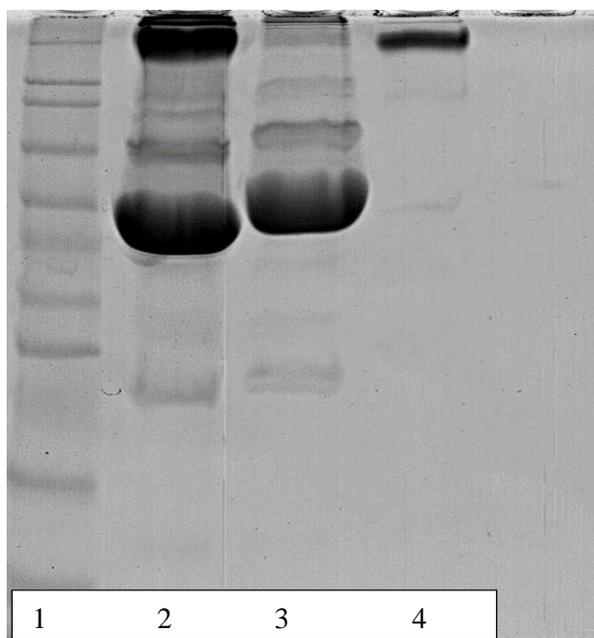
Dentre as três bolsas escolhidas para realizar da aplicação do SDFA, foi escolhida a

amostra de 5 para aplicação do método SDFa. Entretanto, o método foi aplicado em diferentes concentrações de PEG, sendo eles PEG 3350, PEG 4000 e PEG 8000.

5.2.2 Eletroforese -SDS

Como demonstrado na figura 10, 11 e 12, é possível observar que as amostras foram submetidas a 3 processos com tipos de Polímeros diferentes, nos quais foram distribuídas em: poços contendo apenas a fase PEG/ Sal; poços contendo a fase PEG/SAL filtrados; e fase PEG/SAL filtradas com ácido caprílico.

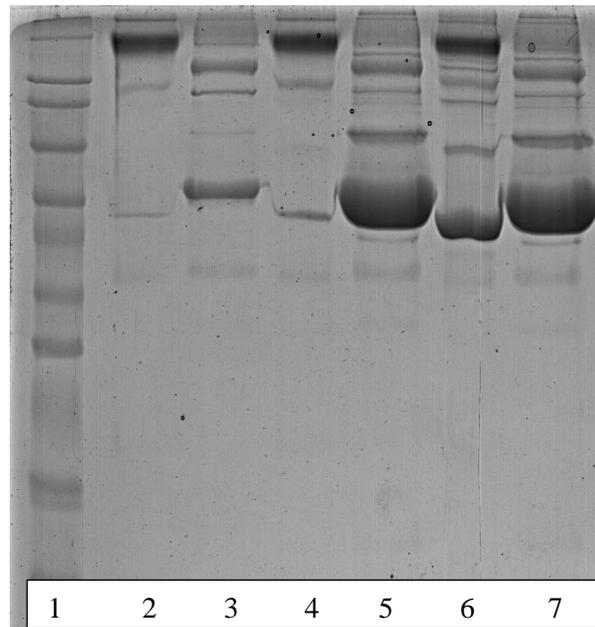
Figura 10 – Amostra 9 utilizando PEG 3.350



1 Marcador, 2 Peg F, 3 Sal F, 4 Peg F.A, Sal F.A

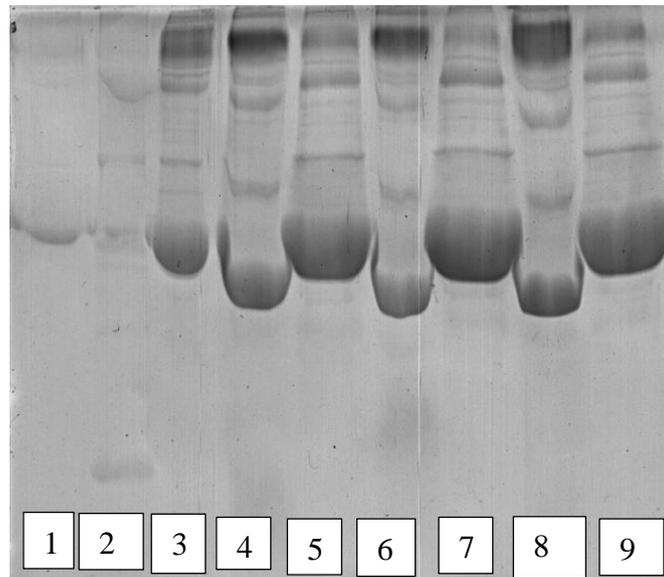
Fonte: Aatoria própria (2023)

Figura 11 – Amostra 10 utilizando PEG 4.000



*1 Marcador, 2 Peg F.A, 3 sal.F, 4 Peg com A, 5 Sal com A, 6 Peg.F, 7 Sal F
 Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 12 – Amostra 11 utilizando PEG 8.000



1 Marcador, 2 Peg F.A, 3 sal.F.A 4 Peg com A, 5 Sal com A, 6 Peg.F, 7 Sal F, 8 peg, 9 sal
 *F.A- Fase filtrada com ácido
 *F-Fase filtrada
 Fonte: Autor própria (2023).

Tendo em vista a análise das eletroforeses, pode-se perceber que os três tipos de Peg (3.350, 4.000 e 8.000) possuem a capacidade de extrair a Ig através do método de SDFa. No estudo de Torres (2013), a autora afirma que pode-se observar que decorrente do aumento da massa molar do PEG, tem-se uma formação mais rápida do sistema. Considerando a região bifásica aumenta com o aumento da massa molar do PEG, provavelmente devido à alta

hidrofobicidade do PEG e sua reduzida solubilidade em água, o que leva à exclusão do polímero da mistura e, conseqüentemente, à formação das duas fases de uma forma mais rápida. Isso se comprova quando testado do método de Peg 8.000 que conseguiu formar um sistema em 8 horas. Já as amostras com Peg 3.350 e 4.000, só foram formados após 12 horas.

Como já conhecido no meio industrial, e por ter um custo benefício baixo, o Peg 8.000 fornece uma rápida extração de IgG. Torres (2013) afirma que a utilização do Peg 8.000 consegue proporcionar um sistema de forma mais rápida e barata. Entretanto, a alta concentração desse polímero proporciona uma formação de sistema mais rápida, gerando assim, em alguns casos, a não concentração da amostra em uma única fase.

Além disso, quando analisada a eletroforese de Peg 8000, nota-se uma alta concentração de IgG também na fase sal, gerando uma perda da proteína significativa que, quando feita em sistema de concentrações de Peg menores, fica retida totalmente apenas na fase Peg. Através da análise do método de eletroforese, pode-se compreender que um Peg de maior molaridade proporciona um sistema em maior quantidade e de forma rápida. Entretanto, tem-se uma perda significativa de proteína para a fase sal.

No estudo de Vargas (2014), o pesquisador retrata que a utilização do Peg 4.000 proporciona um sistema que possui a capacidade de extrair de IgG tão quanto outros Peg's de molaridades maiores. Além disso, o mesmo afirma que o sistema quando intercalado com o ácido caprílico promove uma extração de imunoglobulina pura e livre de contaminação em fases *in vitro*. Isso pode ser observado através das eletro de 4.000 que forneceu uma extração de Ig em maior quantidade na fase superior (Peg) do sistema deixando a fase sal (inferior) praticamente nula com a presença de Ig tanto na fase apenas extraída e filtrada como na fase filtrada e adicionada com ácido caprílico concluído a capacidade de extração pura da IgG.

5.2.3 Quantificação pelo o método de Bradford

O resultado do métodos de Bradford serviu para realizar uma observação quantitativa da quantidade de proteínas IgG presente na amostra de número 5, a qual foi utilizado o PEG 3.350 e considerada nossa amostra real devido ter demonstrado uma melhor extração de IgG, onde, após o processo da amostra aplicada ao SDFa, foi encontrada um total de 678,39 mg/ml de IgG na fase superior do sistema. Já na fase inferior do sistema, foi encontrado um total de 182,00mg/ml de proteínas mais pesadas como o caso da Albumina.

5.3 TESTE PARA ARBOVIROSE TIPO CHIKUNGUNYA

Dentre as 45 amostras analisadas, 11 bolsas foram positivadas para Chikungunya e 31 bolsas negativadas. Essas bolsas foram utilizadas para identificação da presença de IgG. Dentre as bolsas positivadas para a Chikungunya, foram selecionadas de forma aleatória 3 bolsas positivadas apenas para essa arbovirose. As bolsas escolhidas foram 8, 9 e 10.

Tabela 6 - Bolsa de Plasma para Chikungunya

AMOSTRA	RESULTADO
AMOSTRA 8	POSITIVO
AMOSTRA 9	POSITIVO
AMOSTRA 10	POSITIVO

Fonte: Autoria própria (2023)

5.3.1 Sistema de Duas Fases

Quando identificado as amostras positivas para a arbovirose do tipo Chikungunya, foi escolhida apenas uma amostra de forma aleatória, denominada como amostra de número 8. Diferente da metodologia aplicada no processo de extração de IgG para a arbovirose do tipo Dengue, que passou por uma análise se deveria ser adicionada ácido caprílico e se filtrar a amostra e Zika que foi analisada quais tipos de PEG forneceria uma melhor extração de IgG, o processo da extração da IgG no tipo Chikungunya foi utilizado apenas em uma amostra para realizar a aplicação do SDFa considerando que os testes que as outras arboviroses foram submetidos serviu para nortear uma aplicação direta quando relacionada arbovirose do tipo Chikungunya. Nesse sentido, a amostra de Chikungunya foi aplicada o método do sistema utilizando o PEG 3.350 fazendo a adição de ácido caprílico e filtrando ambas as fases do sistema.

Figura 13 - SDA para amostra Chikungunya

Fonte: Autor própria (2023).

Tabela 7 - Teste de Elisa da amostra 8

AMOSTRAS	RESULTADO
Fase Peg F	POSITIVO
Fase sal F	NEGATIVO
Fase Sal F.A	POSITIVO
Fase Peg F.A	NEGATIVO

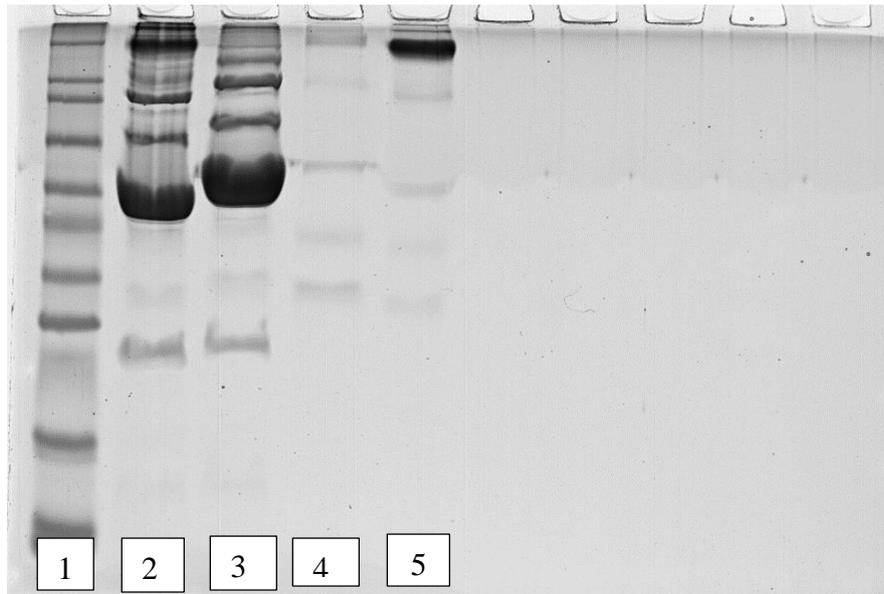
Fonte: Aatoria própria (2023)

Tendo conhecimentos após os testes realizados nas arboviroses do tipo Dengue e Zika, a arbovirose do tipo Chikungunya também teve suas fases peg's (superior) positivas e as sais (inferior) negativadas. Com tais informações, fornecidas pelo o método de Elisa, a amostra foi submetida ao método de eletroforese onde foi possível visualizar as amostras de IgG presente apenas na fases Peg do sistema.

5.3.2 Eletroforese-SDS

Como demonstrado na imagem 13, pode-se perceber a presença da imunoglobulina apenas na fase peg enquanto na fase sal não se encontrou nem uma amostra da Ig. Além disso, é possível visualizar pela eletroforese que a IgG ficou completamente isolada, afirmando assim a eficácia do SDFA também para a extração da proteína na arbovirose do tipo Chikungunya.

Figura 14 - Eletroforese Chikungunya



1-Marcador, 2- Fase Peg filtrada, 3- Fase Sal filtrada, 4 Fase peg filtrada com ácido caprílico, 5-Fase peg filtrada com ácido caprílico.

Fonte: Autorial própria (2023)

5.3.3 Quantificação pelo o método de Bradford

O resultado do método de Bradford serviu para realizar, forma quantitativa, uma observação da quantidade de proteínas IgG presente na amostra. Nesse sentido, após o processo da amostra aplicada ao SDFA, foi encontrada 767,77 mg/ml extraída de IgG para Chikungunya. Já a fase inferior do sistema, teve-se um total de 293,07 mg/ml de amostras que ficaram encontradas em sua fase, como a Albumina.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pelo estudo, podemos compreender que o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa) é eficiente para a realização da extração de (IgG) para as arboviroses como Dengue, Zika e Chikungunya, as quais foram testadas e trabalhadas nesse estudo e se obteve a comprovação da presença da IgG apenas na fase PEG (fase superior do sistema) por método de verificação como o processo de Elisa, eletroforese e quantificação pelo método de Bradford. Com isso, o SDFa é um método viável para utilização de extração da IgG.

REFERÊNCIAS

- ABATUROV, L. V. *et al.* Conformational studies of immunoglobulin G and its subunits by the methods of hydrogen deuterium exchange and infrared spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v. 194, n. 2, 1969.
- ALVES, J. A. **Práticas integrativas e complementares em saúde na prevenção, controle e tratamento das arboviroses Dengue, Zika e Chikungunya: uma sistematização qualitativa, Brasil 2019**. 2020. 85 f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Saúde Coletiva) — Universidade de Brasília, Brasília, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/39724>. Acesso em: 16 jan. 2023.
- ARBOVIROSES**. Direção: Rafael Figueiredo. Produção: Christovão Paiva. Roteiro: Marcela Morato. Rio de Janeiro: Canal Saúde Fiocruz, 2017, 1 vídeo, MPEG-4, (26min38s), son., color. (Ligado em Saúde).
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A.**, v. 1218, n. 49, p. 8826– 8835, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/journal/journal-of-chromatography-a/vol/1218/issue/49>. Acesso em 16 jan. 2023.
- AZIMAIE, R. *et al.* Liquid-liquid phase equilibrium of MgSO₄ and PEG1500 aqueous two-phase system. **Physics and Chemistry of Liquids**, n. 48, p. 764–772, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00319100903046112>. Acesso em 16 jan. 2023.
- BARARDI, M. R. C.; CAROBREZ, G. S.; PINTO, R. A. **Imunologia**. Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2010. 179 p. Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Imunologia.pdf>. Acesso em 16 jan. 2023.
- SULK, B.; BIRKENMEIER, G.; KOPPERSCHLÄGER, G. Application of phase partitioning and thiophilic adsorption chromatography to the purification of monoclonal antibodies from cell culture fluid. **Journal of Immunological Methods**, v.149, n. 2, p. 165-171, 1992.
- BART, O. M. *et al.* **Atlas de Morfologia e Morfogênese dos Vírus da Dengue**. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, 2000.
- BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N; OLSON, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.
- BORDÓN. S. F. HOBI. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas de duas fases aquosas (SDEA) formados por polímero (PEG ou PVP) e sal inorgânico (CuSO₄ ou MnSO₄) : determinação experimental e modelagem termodinâmica**. Universidade Federal do Paraná: Curitiba. 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/46972> 2017. Acesso em 18 jan. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico N° 40 2022**. Brasília DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53->

2010. Acesso em 20 jan. 2023.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and Purification of thaumatin in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbiology Technology**, v.13, p. 629, 1991.

CASSEB, A. R. *et al.* Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CHOW, Y. H. *et al.* Characterization of partitioning behaviors of immunoglobulin G in polymer-salt aqueous two-phase systems. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 122, n. 5, p. 613-619, 2016.

SILVA, A. V. *et al.* Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, 2020.

DANIELSSON, R.; ALBERTSSON, P. Aqueous polymer two-phase systems and their use in fragmentation and separation of biological membranes for the purpose of mapping the membrane structure. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 512-525, 2013.

DIAS, A. B. L.; ALMEIDA, L. C. S.; HAES, M. T.; MOTA, M. L.; FILHO, R.S, J. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. Parte 1. Capítulo VI. **Revista USP**, 2010. Disponível em: file:///D:/Pessoal/Downloads/171-Texto%20do%20artigo-336-1-10-20120126%20(1).pdf 2016. Acesso em 21 jan. 2023.

DIAS, I. K. R. *et al.* Ações educativas de enfrentamento ao *Aedes Aegypti*: revisão integrativa. **Ciência Saúde coletiva**, 2020.

DIMAS, T. C. **Hemoderivados no Brasil**. 2021. Disponível em: file:///D:/Pessoal/Desktop/ufpe%2021/ufpe%202022/artigo%20para%20publica%C3%A7%C3%A3o/hemobraz%20[5].pdf. Acesso em 21 jan. 2023.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saúde pública**, v. 51, p. 30, 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 224-229, 2007.

FISCHER C, JO WK, HAAGE V, MOREIRA-SOTO A, DE OLIVEIRA FILHO EF, DREXLER J. F. Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. **Clin Microbiol Infect**, v.27, n. 9, p. 1221-1229, 2021.

GALATI, E. A. B.; LIMA-CAMARA, T. N.; NATAL, D.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. “Mudanças climáticas e saúde urbana”. **Revista USP**, n. 107, p. 79-90, 2015.

GELFAND, E. W. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. **N Engl J Med**, v. 22, 2012. Disponível em:

<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra1009433> 2012. Acessado em 21 fev. 2023.

GIBB, R. *et al.* Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 398-402, 2020.

GILARDIN, L.; BAYRY J.; KAVERI, S. V. Intravenous immunoglobulin as clinical immune-modulating therapy. **CMAJ**, v. 3, n. 187, p. 257-264, 2015.

GOMES, P. A. T. M.; PENA, L. J.; LEITE, A. C. L. Isatin derivatives and their antiviral properties against arboviruses: a review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 56-62, 2019.

GOUVEIA, F. L.; OLIVEIRA, R. M. B. DE, LUCENA, A. E. DE S., CORDEIRO, M. T., & LEITE, A. C. L. Production of intravenous human dengue immunoglobulin from Brazilian-blood donors. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.49, n. 4, p. 821-829, 2013.

GRAHAM, B. S.; SULLIVAN, N. J. Emerging viral diseases from a vaccinology perspective: preparing for the next pandemic. **Nat Immunol**, n. 19, p. 20–28, 2018.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.**, v. 33, p. 330-342, 2002.

HAMMERSCHMIDT, N.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 325-332, 2016.

HEMOBRÁS. Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia.
<https://www.hemobras.gov.br/Section.aspx?TopFolderPath=\Root\Contents\Website\Nos sas%20Atividades&SelectedSubFolderId=752>. Acesso em 15 jan. 2023.

HENRIQUES, D. A. **Caracterização molecular de arbovírus isolados da fauna diptera nematocera do Estado de Rondônia (Amazônia ocidental brasileira)**. 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

IMUNOGLOBULINAS. IgG1, 2, 3 e 4. Subclasses IgG. Biolider. Disponível em:
https://biolider.com.br/wp-content/uploads/2021/01/I_-IgG1-2-3-e-4-IMUNOGLOBULINAS.pdf 2021.04-02-2023. Acesso em 17 jan. 2023.

IQBAL, M. *et al.* Sistema aquoso bifásico (ATPS): uma visão geral e avanços em suas aplicações. **Biol Proced Online**, n. 18, 2016.

KANMERT, D. **Structure and Interactions of Human IgG-Fc**. Linköping, Suécia: Linköping University - Institut of Technology, 2011.

KARABATSOS, N. **International Catalogue of Arboviruses, including certain other viruses of vertebrates**. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. San Antonio, TX, USA: 1985. Atualização em 2001.

KDIMATI S.; MULLINS C. S.; LINNEBACHER M. **CANCER-CELL-DERIVED IGG**

AND ITS POTENTIAL ROLE IN TUMOR DEVELOPMENT. **Int J Mol Sci**, v. 27, n. 22, 2021.

KILIKIAN, B. V. *et al.* Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: KILIKIAN, B. V. *et al.* **Purificação de Produtos Biotecnológicos: Operações e processos com aplicação industrial**, 2020. p. 241-280.

LEUNG, J. Y. S. *et al.* Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in virology**, v. 2011, 2011.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. McGraw Hill Brasil, 2016.

LINDENBACH, B. D; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; Howley P. M.; **Fields Virology**. 4. ed. New York: Lippincott Williams &Wilkins, 2001. p. 810-851.

LIU, H.; MAY, K. Disulfide bond structures of IgG molecules. Structural variations, chemical modifications and possible impacts to satability and biological function. **Landes Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 17–23, 2012.

LIVRAMENTO, J. A. Imunoglobulinas do líquido cefalorraqueano normal. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v. 37, n. 3, 1979. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/twhH783YfDfvcH9FsPzZhYb/?lang=pt> 1997. Acesso em 2 fev. 2023.

LOPEZ, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, E. C. R. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Ver Pan-Amaz Saúde**, v. 5, n. 3, 2014. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007. Acesso em 22 jan. 2023.

LUNDSTROM, K. Alphavirus-based vaccines. **Viruses**, v. 16, n. 6, 2014.

MARQUES, C. D. L. *et al.* Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya: parte 1 - diagnóstico e situações especiais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, supl. 2, p. 421-437, 2017.

MAYER, G. **Immunoglobulins - Structure and Function**. Murray, et al, **Medical Microbiology**. Unesp, 2009. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/ed-3-anticorpos-e-imunoglobulinas.pdf> 2009. Acesso em 22 fev. 2023.

MESSINA, J. *et al.* A distribuição global atual e futura e a população em risco de dengue. **Nat Microbiol**, v. 4, p. 1508–1515, 2019.

MINEIRO. C. V. *et al.* Sergian. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 3, n. 1, 2016. Disponível em: <http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/amp/article/view/3409/2110>. Acesso em 1 fev. 2023.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, 2017.

NASCIMENTO, J. *et al.* Evaluation of the influence temperature on the protein-tannic acid complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2021. Disponível em: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.179. Acesso em 29 mar. 2023.

NICOLELIS, M. A. L. *et al.* How super-spreader cities, highways, hospital bed availability, and dengue fever influenced the COVID-19 epidemic in Brazil. **MedRxiv**, 2020.

NOVARETTI, M. C. Z.; DINARDO, C. L. Immunoglobulin. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 5, p. 377–382, 2011.

PLISA. V Cases of Chikungunya virus disease by country or territory, Health Information Platform for the Americas (PLISA). Disponível em: <https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/chikv-en/550-chikv-weekly-en.html>. Acesso em 22 jan. 2023.

PORTO, T. S. **Extração da pró-toxina épsilon e de uma protease a partir de 'Clostridium perfringens' em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato**. 2004. 93 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Acesso em 24 abr. 2023.

PROPHINO, S. J. Arboviroses e Mudanças Climáticas. **Revista: 'Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 1-2, 2022. Disponível em: https://portaldeperiodicos.animaeducacao.com.br/index.php/gestao_ambiental/article/view/12605/5999. 2022. Acesso em 21 jan. 2023.

RADOSEVICH, M.; BURNOUF, T. Intravenous immunoglobulin G: Trends in production methods, quality control and quality assurance. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 1, p. 12–28, 2010.

SILVA, B. *et al.* Ações de educação em saúde no combate às arboviroses. **Revista de Extensão da UPE**, v. 3, n. 1, 2018. Disponível em: <https://www.revistaextensao.upe.br/index.php/reupe/article/view/240/145>. Acesso em 21 jan. 2023.

ROCHA, *et al.* First official record of Aedes (Stegomyia) albopictus (Diptera: Culicidae) in the Acre State, Northern Brazil. 2023. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/TbnBntDktxH4SLNFBfhZZCQ/?lang=en>. Acesso em 22 jan. 2023.

ROMEIRO, M. F. **Estudo sobre infecções por Alphavirus e Flavivirus em amostras de banco de sangue**. 2019. 75 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

RUIZ-RUIZ, F. *et al.* Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1-13, 2012..

SANTANA, M. C. L.; LIMA, C. G.; FORTUNA, B. D. **Aedes Aegypti: Ciclo de vida e Arbovirose**. Teixeira de Freitas: Universidade Promotora da Saúde, 2021 Disponível em: https://ufsb.edu.br/proaf/images/SEPSE/documentos/cartilha_aedes_aegypti_ciclo_de_vida_e_arboviroses_vers%C3%A3o_final.pdf 2021. Acesso em 18 dez. 2022.

SES. Arboviroses: Crescem os casos de Chikungunya. **Portal Saúde PE**, 2021. Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/arboviroses-crescem-os-casos-de-chikungunya>. Acesso em 15 jan. 2023.

SILVA, L. J.; ANGERAMI, R. N. Arboviroses no Brasil contemporâneo. In: **Viroses emergentes no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, p. 37-56.

SINAN. **Legislação Aplicada ao Sinan**. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/sinan-legislacao>. 2019. Acesso em 22 jan. 2023.

SOARES, B. M. D. **Política de Hemoderivados no Brasil: Desafios e Perspectivas**. Brasília, Brasília: Universidade de Brasília, 2002.

TEIXEIRA, A. G. *et al.* Emerging biotechnology applications of aqueous two-phase systems. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 6, 2018.

TORRES, A. A. F. N. **Estudo da Partição de Imunoglobulina G em Sistemas Aquosos Bifásicos Utilizando Peg/Tampão Citrato**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

TORRES-ACOSTA, M. A. *et al.* Aqueous Two-Phase Systems at Large Scale: Challenges and Opportunities. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2019.

TYLER M. S. *et. al.* Zika Virus Infection Associated With Severe Thrombocytopenia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 9, 2016.

VAN LEUR S. W.; HEUNIS T.; MUNNUR D.; SANYAL S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, v. 12, n. 1, 2021.

VASCONCELOS, P. F. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 6, n. 2, 2015. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000200001 2015. Acesso em 17 jan. 2023.

WADA. C. Covid- Ergonomia e Síndrome de Guillain-Barré. **Ergonomia, Psicologia e saúde**, 2021. Disponível em: <https://cmqv.org/covid-ergonomia-e-sindrome-de-guillain-barre>. Acesso em 22 mar. 2023.

APÊNDICE

Capítulo de livro aceito e publicado na editora RFB voltado para os resultados sobre a Imunoglobulina G (IgG) voltada para Dengue. DOI: 10.46898/rfb.8fecf29d-4b81-41ff-adc3-7cec887a7345

EXTRAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA G APARTIR DE BOLSAS DE PLASMA POSITIVADAS PARA ARBOVIROSE DO TIPO DENGUE UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

EXTRACTION OF IMMUNOGLOBULIN G FROM DENGUE-TYPE ARBOVIROSIS POSITIVE PLASMA POCKETS USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (SDFA)

Josué Brito Gondim¹
Graziella Leite Brondani²
Maria de Jesus Morais³
Thiers Araújo Campos⁴
Thiago Pajeú Nascimento⁵
Ana Lúcia Figueiredo Porto⁶
Ana Cristina Lima Leite⁷

¹ <http://lattes.cnpq.br/4641789990346686>

² <http://lattes.cnpq.br/4921633578028705>

³ <http://lattes.cnpq.br/9160477270072718>

⁴ <http://lattes.cnpq.br/5704582393527240>

⁵ <http://lattes.cnpq.br/6243710241063546>

⁶ <http://lattes.cnpq.br/4989617783837981>

⁷ <http://lattes.cnpq.br/8115160528911145>

RESUMO

Objetivo: Avaliar a separação da imunoglobulina G através do sistema de duas fases aquosas (SDFA) utilizando bolsas de plasma positivadas para a arbovirose do tipo Dengue.

Metodologia: Foram utilizadas bolsas de plasma excedentes fornecidas pelo HEMOPE (Hemocentro de Pernambuco). As bolsas foram triadas para a arbovirose do tipo Dengue através do teste Elisa utilizando o Kit Panbio e para o teste rápido Kit Abbott. A extração da Imunoglobulina G foi realizada através do SDFA que foi composto por 12, 5% de solução de polietilenoglicol (PEG) 3350, 15% de solução de fosfato em pH 7,0 e NaCl a 12%. Após a formação do sistema e repouso de 24 horas foi realizada a separação da fase superior (PEG) e inferior (SAL), sendo utilizada para as devidas análises bioquímicas. Ambas as fases foram submetidas ao procedimento de Eletroforese de SDS-PAGE. (CAAE:55993122.8.3001.5195).

Resultados e discussão: Após a identificação das bolsas de plasma positivadas para dengue foi realizada a identificação de IgG e IgM presentes nessas bolsas. Estas foram utilizadas para a separação por SDFA e através da aplicação do sistema separados em fase filtrada sem a adição de ácido caprílico e com ácido caprílico, pode-se perceber através do método de eletroforese que quando utilizado 5% de ácido caprílico e filtrada, a proteína IgG apresentou-se pura e somente particionada na fase PEG. **Considerações Finais:** Verificou-se no estudo realizado, que a extração da IgG pelo o SDFA foi eficiente promovendo a recuperação da proteína, destacando assim como uma metodologia rápida, eficiente e de baixo custo, quando comparado a métodos tradicionais.

Palavras-chave: Imunoglobulina; Dengue; Hemoderivados; SDFA; IgG.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the separation of immunoglobulin G through the two aqueous phase system (SDFA) using plasma positive bags for Dengue virus. **Methodology:** Surplus plasma bags provided by HEMOPE (Hemocentro de Pernambuco) were used. The bags were screened for Dengue type arbovirose by Elisa test using the Panbio Kit and the rapid test Abbott Kit. Immunoglobulin G extraction was performed using SDFA which was composed of 12, 5% polyethylene glycol (PEG) 3350 solution, 15% phosphate solution at pH 7.0 and 12% NaCl. The system was formed and 24 hours later, the upper phase (PEG) and lower phase (SAL) were separated. Both phases were submitted to the SDS-PAGE electrophoresis procedure

(CAAE:55993122.8.3001.5195). **Results and discussion:** After the identification of plasma positive bags for dengue, the IgG and IgM were identified. The SDFA (PEG 3350 solution, 15% phosphate solution at pH 7.0 and 12% NaCl), 5% caprylic acid and filtration were the best conditions used. The SDS-PAGE electrophoresis showed, that the IgG protein was pure in the phase PEG. **Final Considerations:** It was verified in the study that the extraction of IgG by the SDFA was efficient, promoting the recovery of the protein, standing out as a fast, efficient and low cost methodology, when compared to traditional methods.

Keywords: Immunoglobulin; Blood products; Aqueous two-phase system

1 INTRODUÇÃO

A Dengue é uma arbovirose de ampla distribuição global, sendo encontrada mais facilmente em áreas tropicais onde as condições climáticas permitem ciclos de transmissão anuais causando impactos econômicos e sociais. (GIBB *et al.*, 2020). No Brasil, um país de grandes dimensões e com grandes desigualdades socioeconômicas a circulação do Flavivírus ocasiona altos índices de Dengue que tem sido grande desafio para a saúde pública (REIS *et al.*, 2019).

O vírus da Dengue é transmitido através da picada de mosquitos fêmeas infectadas, artrópodes do gênero *Aedes*, principalmente por espécies como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que são considerados os principais vetores em ambientes urbanos (GIBB *et al.*, 2020). Este gênero de mosquito encontra-se em larga distribuição no território brasileiro, devido ao país apresentar ambiente propício como a mata atlântica, sendo uma característica de local ideal para reproduzirem (REIS *et al.*, 2019).

Diante de um diagnóstico sem precisão e como não existe tratamento antiviral específico para nenhuma das arboviroses (SIGFRID *et al.*, 2017), atualmente, a imunoglobulina hiperimune tem sido usada efetivamente no tratamento de muitas infecções virais endêmicas ou epidêmicas como parte da imunização passiva (CHAVDA *et al.*, 2023).

A rápida busca por um tratamento contendo uma imunoglobulina específica para uma doença estimula a indústria de hemoderivados no desenvolvimento estratégias de fracionamento de plasma. O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é um método utilizado para fracionar, recuperar e purificar produtos biológicos, incluindo proteínas, que tem se tornado

satisfatoriamente atrativo para pesquisadores. Estudos demonstram a obtenção de hemoderivados através do fracionamento do plasma humano de pessoas convalescentes

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi demonstrar o processo de extração de imunoglobulina G a partir de bolsas de plasma positivadas para arbovirose do tipo dengue utilizando Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Arbovirose no Brasil

As arboviroses são infecções ocasionadas pelos arbovírus. A mesma possui uma característica muito ímpar para detecção de que o indivíduo esteja contaminado como: febre, dor de cabeça, náuseas e dores no corpo. (ARBOVIROSE, 2017) Atualmente, acredita-se que existe no planeta mais de 454 espécies de arbovírus já identificadas; tendo uma atenção para 150 espécies que possuem a capacidade de ocasionar doenças em seres vivos de sangue quente. Abordando o assunto de transmissão, as fêmeas do gênero *Aedes* são o ponto chave de transmissão da arbovirose em seres humanos (CAMPOS *et al.*, 2018).

A classificação dos Arbovírus não é somente ao seu vínculo com os artrópodes, mas devido ao seu ciclo replicativo ser realizado nos insetos. Deste modo, a classificação de um artrópode como portador de um arbovírus é realizada principalmente por possuir sua reprodução infecciosa em um artrópode. (MINEIRO, 2016). O termo originalizado do inglês, *arthropod-borne virus* (vírus transmitido por artrópode) começou a ser utilizado no meio literário da saúde no ano de 1956.

Entre os anos de 2015 a 2017, o Brasil foi quadro de uma das maiores epidemias de arboviroses da história, tendo sua concentração a Dengue. (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; MINISTERIO DA SAÚDE, 2017). Possuindo visão de avanços dessas infecções, métodos de prevenção como a semana epidemiológica tornou-se um assunto rotineiro a ser debatido em concelhos municipais, estaduais e nacionais de saúde onde procuram debater e analisar o aumento ou diminuição de casos de infecções por quaisquer arbovirose, em especial para Dengue, devido a mesma ser a que mais acomete os brasileiros (SINAN, 2019).

2.1 Imunoglobulina

As imunoglobulinas são conhecidas por possuir uma grande diversidade de genes que codificam a molécula IgG, onde permite a realização de ligação dos mais distintos antígenos (BARADI; CAROBREZ; PINTO, 2010). Relatada como a principal componente de responsabilidade de fracionar anticorpos de séries humanos, a imunoglobulina G (IgG) é caracterizada como a de maior abundância na presença de proteínas; possuindo assim, uma concentração de 75% das proteínas de sua família e cerca de 10 à 20% do total das proteínas circulantes encontradas no soro humano (KDIATI; MULLINS; LINNEBACHER, 2021).

Sendo conhecida por ter características de propriedades terapêuticas, a IgG tem sido recomendada para tratamentos de pacientes que são acometidos das Imunodeficiências primárias (IDP), que totalizam mais de 150 patologias classificadas. Estima-se que 50% dos pacientes que portam o IDP são necessitados de tratamento por IgG. Atualmente, tem-se uma convicção que os primeiros produtos de IgG foram prescritos para realizar uma prevenção ou tratar infecções com alto índice de morbimortalidade, tais como: Poliomielite, sarampo, caxumba e hepatite; onde deixaram de ser indicados devido a campanhas de prevenção dessas patologias através de vacinas e suas campanhas. (CARVALHO *et al.*, 2010).

2.3 Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Nos últimos anos, a abordagem de estudos que envolve a precipitação de proteínas por polietileno glicol (PEG) vem sendo aprofundado devido a relevância para purificar anticorpos de características monoclonais (KNEVELAMN *et al.*, 2010). Com características simples e de rápida realização, a precipitação do PEG é uma metodologia que vem sendo abordada em laboratórios pelo o fato de ser feito em temperatura ambiente e um processo realizado em grande escala. Além disso, a utilização de PEG e seu modo de operação vem sendo instalada de forma progressiva na indústria de biofarmacêutica pelo fato de o protocolo ser mais econômico e barateado para as indústrias (NIKOLAUS; STEFANIE; ALOIS, 2016).

O estudo de Pereira, (2020), descreve a realização do SDFA com uma grande importância no mercado Biotecnológico e sua caracterização por separação e seu processo. No ano de 1956 foi realizada a primeira citação ao uso do SDFA para ter-se a purificação de proteínas e partículas de células (KILIKIAN, 2020). O SDFA é composto por duas fases líquidas que formam um equilíbrio, tendo como solvente principal a água. Esse sistema é composto quase sempre por uma combinação de polímero/polímero, polímero/sal ou sal/sal. Sendo a combinação de polímero/sal, a mais comumente utilizada. O SDFA é o que melhor

apresenta resultados para extração em grande escala, sendo considerado pela indústria o mais propício, devido apresentar uma maior seletividade, uma viscosidade considerada pequena, além do custo do sistema ser extremamente barato e entregar uma separação de fase rápida e com características contínuas (BORDÓN, 2017). O sistema formado por PEG e um sal são intensamente empregados por fornecer uma separação de moléculas com base na solubilidade. (KILIKIAN, 2020).

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção de Plasma

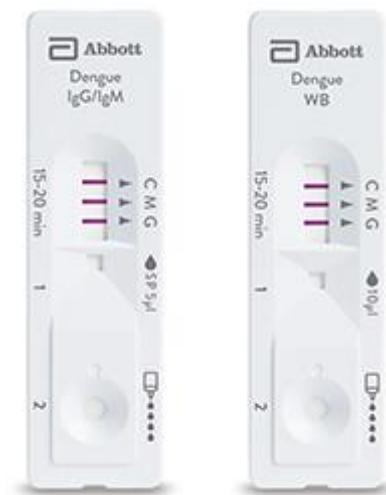
O plasma utilizado durante a pesquisa foi concedido pela Fundação HEMOPE (CAAE:55993122.8.3001.5195). Este foi obtido a partir do processo de separação do sangue total, de acordo com as indicações determinadas pela resolução RDC nº 10, de 23 de janeiro de 2004. Estes plasmas foram de doadores que foram acometidos por algum tipo de arbovirose e de forma voluntária fornecerem seu plasma para a pesquisa aprovada pelo comitê de ética (CAAE:55993122.8.3001.5195).

3.2 Triagem de bolsas de Plasma para detecção de anticorpos para Dengue

3.2.1 Teste rápido Kit Abbott

A detecção dos anticorpos IgG contra o vírus da dengue nas bolsas de plasma foi utilizando o teste rápido Bioline™ Dengue Duo (Abbott). O kit é um ensaio imunocromatográfico rápido *in vitro* composto por dois dispositivos de teste (Figura 1).

Figura 1: Teste Bioline™ Dengue IgG/IgM é um teste imunocromatográfico *in vitro* de fase sólida para a detecção qualitativa e diferencial de anticorpos IgG e IgM para sorotipo DEN-1, 2, 3 e 4 do vírus da dengue.



Fonte: <https://www.globalpointofcare.abbott/pt/product-details/bioline-dengue-igg-igm.html>

Para sugerir que o doador está com infecção inicial pelo vírus da Dengue o lado esquerdo do teste (NSA1 Ag) precisaria apresentar duas linhas vermelhas no controle (C) e no teste (T). Caso o doador estivesse com infecção primária, no lado direito do teste rápido apresentaria duas linhas vermelhas no controle (C) e no que apresenta imunoglobulinas M (IgM) representado pela letra “M”. No avanço da infecção como na secundária a bolsa de plasma positiva contendo imunoglobulinas G (IgG) apresentaria duas linhas vermelhas, no controle (C) e na letra G (IgG). Quando linhas aparecem no “C”, no “M” e no “G” é positivo pode-se sugerir que a infecção é primária tardia ou secundária inicial. A leitura foi feita após 15 minutos e analisadas como esclarecida pelo fabricante.

A utilização do Kit Abbott pode proporcionar uma melhor identificação e observação dos resultados específicos para as bolsas que possuíam IgM voltado para Dengue, (onde se deduz que o paciente já foi exposta e está na fase ativa da doença havendo a possibilidade do microrganismo estar circulando no paciente naquele momento), quais bolsas possuem IgG (pode indicar que a pessoa está na fase crônica e/ou convalescente ou já teve contato com a doença em algum momento da vida) e as bolsas que detectaram IgM/IgG representando que o indivíduo já tinha sido exposto a infecção algum tempo atrás e foi exposto novamente a contaminação (PONTE, 2022).

3.2.2 Teste Elisa através do Kit Pambio™

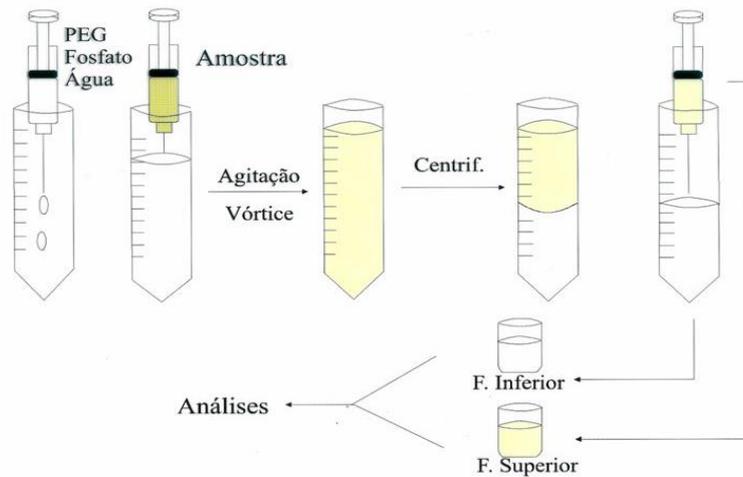
O processo do teste Elisa para identificação das bolsas de plasma foi o primeiro passo para identificação e validação das bolsas como portadoras da Arbovirose do tipo Dengue. Teve-se a testagens de três bolsas com tipos sanguíneos: A+, B+ e O+. Para realização dessa testagem, foi utilizado o Kit Pambio® Dengue Duo IgM, IgG e NS1 Capture Elisa. A escolha desse Kit Elisa foi selecionada por já ser um teste utilizado em outros laboratórios de referências no país. O teste para Dengue foi realizado seguindo as normas esclarecidas no manual do fabricante. Foi definido bolsas infectadas pela a patologia aquelas que apresentaram uma positividade que fosse ≥ 1.1 positivo; 0.9-1.1 duvidoso e negativo ≤ 0.9 .

3.2 Obtenção de IgG através da separação utilizando sistema de duas fases aquosas

A metodologia do SDFa seguiu as orientações descritas por ARSENJIO, (2011) que utiliza em seu estudo um polímero do tipo polietilenoglicol, uma alta concentração de sal como o fosfato, e o adicional de mais um sal como NaCl que ajuda a alterar o peso molecular dos íons através da manipulação do coeficiente de participação, como proposta para o sistema de obtenção de proteínas. Para a determinação do SDFa para a extração das IgGs do plasma foi preparado uma mistura contendo uma solução de PEG 3.350 (concentração de 15.5% m/m), uma solução de fosfato (concentração 15% m/m em pH 7,0), solução de NaCl (concentração de 12% m/m) e o plasma pré-tratado (plasma centrifugado à 3500 RPM por 30 min a 4°C), onde foi coletado o sobrenadante como amostra.

O SDFa foi homogeneizado durante 15 minutos sob um agitador magnético e posteriormente transferido para um tubo volumétrico deixado em descanso por 24 horas de sedimentação em temperatura ambiente ($\pm 24^\circ\text{C}$). As fases formadas (superior-PEG e inferior-SAL) foram separadas (Figura 2), medido seus respectivos volumes e guardados em microtubos contendo uma solução de ácido caprílico (concentração 4%), sendo posteriormente filtradas por microfiltro de 0,22 μm Millipore.

Figura 2 - Representação do Sistema de duas fases



Fonte: Kilikan, 2020

3.2 SDS-Page

As duas fases (PEG e Sal) obtidas do S DFA foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida foi preparado nas concentrações de 6% (gel de empilhamento) e 12% (gel de corrida) de acordo com adaptações em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Nascimento, J. M. *et al.*, 2021). Cada amostra do S DFA foi preparada misturando a uma solução de tampão de amostra contendo azul de bromofenol (125 mM Tris-HCl) na proporção 1:2. Alíquotas dessa mistura (10 μ l) foram condicionadas em pequenos poços do gel de empilhamento submetidos inicialmente a uma corrente de 80 Volts por 10 minutos. A massa molecular foi determinada usando um marcador de peso molecular de proteínas como padrão. Após a corrida eletroforética a 120 Volts durante aproximadamente 120 minutos, o gel de estudo contendo as bandas foi corado em solução de Comassie Blue e posteriormente analisados através do densitômetro Bio-DS-5000 plus Microtek utilizando um software LPixImage (Loccus Biotecnologia®). A cuba e reagentes foram da BIORAD.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de realizar a identificação das bolsas de plasma e seus tipos de infecções ocasionadas pelo Arbovírus foi realizado previamente um teste Elisa para Dengue, onde foi possível observar se as 15 bolsas de plasma analisadas possuíam anticorpos IgG para a arbovirose dengue, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Testes das bolsas de plasma.

BOLSAS DE PLASMA	RESULTADO PARA DETECÇÃO DE IgG para Dengue
1	Positivo
2	Positivo
3	Negativo
4	Positivo
5	Positivo
6	Positivo
7	Negativo
8	Positivo
9	Positivo
10	Positivo
11	Negativo
12	Positivo
13	Positivo
14	Positivo
15	Negativo

Positivo: Presença de IgG para dengue

Negativo: Ausência de IgG para dengue

Dentre as amostras analisadas de acordo com a tabela 1, 11 bolsas foram positivadas para Dengue e 4 bolsas negativadas. Essas bolsas então foram utilizadas para identificação por meio do teste identificar dessa vez a presença de IgM e/ou IgG.

Tabela 2: Teste rápido para Dengue

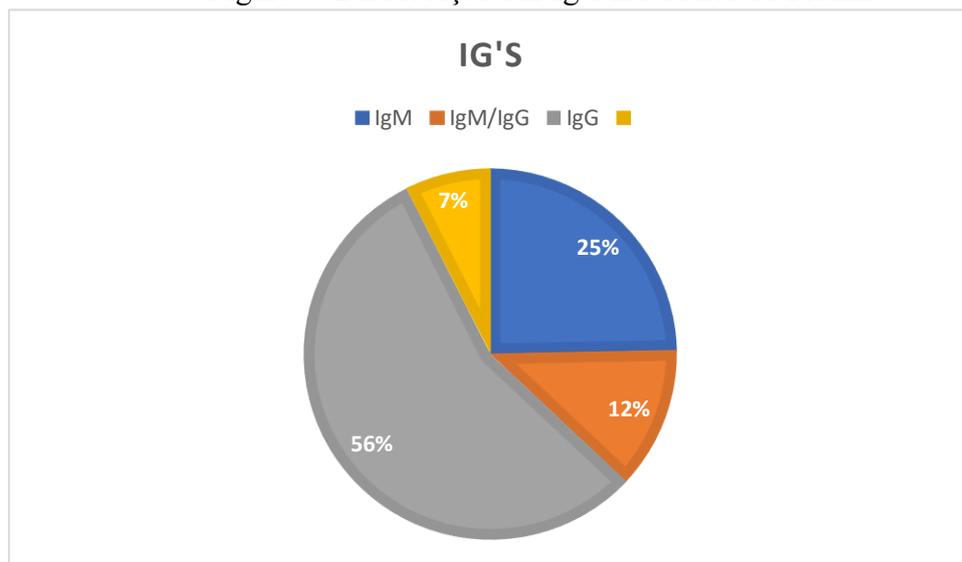
BOLSAS	IgM	IgG
1	Negativo	Positivo
2	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Positivo
5	Negativo	Positivo
6	Negativo	Positivo
7	Negativo	Negativo
8	Negativo	Positivo

9	Positivo	Positivo
10	Positivo	Negativo
11	Negativo	Negativo
12	Positivo	Positivo
13	Negativo	Positivo
14	Positivo	Positivo
15	Negativo	Negativo

Fonte: Autor, 2023

Após o processamento das bolsas tanto pelo formato do teste Elisa como pelo teste rápido do Kit Abbot, teve-se a identificação das proteínas presentes em cada bolsa de plasma sendo elas definidas em: 4 (quatro) bolsa para IgM, 25%; 2 (dois) bolsas para IgM/IgG, 12% e todas às outras 9 (nove), unicamente para IgG, 56%, como demonstrado na figura 3.

Figura 3: Distribuição das Ig's nas bolsas de Plasma



Fonte: Autor, 2023

A utilização do Kit Abbot pode proporcionar uma melhor identificação e observação dos resultados específicos para as bolsas que possuíam IgM voltado para Dengue, (onde se deduz que o paciente já foi exposta e está na fase ativa da doença havendo a possibilidade do vírus está circulando no paciente naquele momento), quais bolsas possuem IgG (pode indicar que a pessoa está na fase crônica e/ou convalescente ou já teve contato com a doença em algum momento da vida) e as bolsas que detectaram IgM/IgG representando que o indivíduo já tinha sido exposto a infecção algum tempo atrás e foi exposto novamente a contaminação (PONTE, 2022).

4.2 Sistema de Duas Fases Aquosas (SFDA)

Quando identificado as bolsas específicas apenas para a Arbovirose do tipo Dengue, teve-se a realização do SDFa (Figura 4).

Figura 4: Sistema de duas Fases



Fonte: Autor, 2023

A amostra escolhida de forma aleatória foram as bolsas de número 6; 9 e 14 que foram assim numeradas para ter-se um controle da quantidade de bolsas existentes e, separar de uma melhor forma as bolsas que foram positivadas especificamente para Dengue.

Após a formação do SDFa das três amostras, teve-se uma nova leitura no método Elisa para validar a separação da Imunoglobulina G em maior quantidade apenas na fase superior, como pode ser observado através da tabela 3. Essa nova leitura é feita após as amostras terem sido submetidas ao método de filtragem. Após o SDFa, a fase PEG foi utilizada para realizar uma filtragem com adesão de ácido caprílico para remoção de proteínas indesejáveis como albumina promovendo apenas a recuperação da IgG e novamente positivando apenas a fase PEG. A figura 4 demonstra a eficiência da amostra da IgG em ficar apenas na fase PEG sendo positivada e a fase sal, sendo negativada. Com isso, confirmando a eficácia do sistema em deixar apenas a proteína G na fase PEG.

Tabela 3: Elisa das amostras 6; 9 e 14.

AMOSTRAS	RESULTADO
6 (Fase PEG)	POSITIVO
6 (Fase Sal)	NEGATIVO
6 (Fase PEG após filtração*)	POSITIVO
6 (Fase Sal após filtração*)	NEGATIVO
9 (Fase PEG)	POSITIVO
9 (Fase Sal)	POSITIVO
9 (Fase PEG após filtração)	POSITIVO
9 (Fase Sal após filtração)	NEGATIVO
14 (Fase PEG)	POSITIVO
14 (Fase Sal)	NEGATIVO
14 (Fase PEG após filtração)	POSITIVO
14 (Fase Sal após filtração)	NEGATIVO

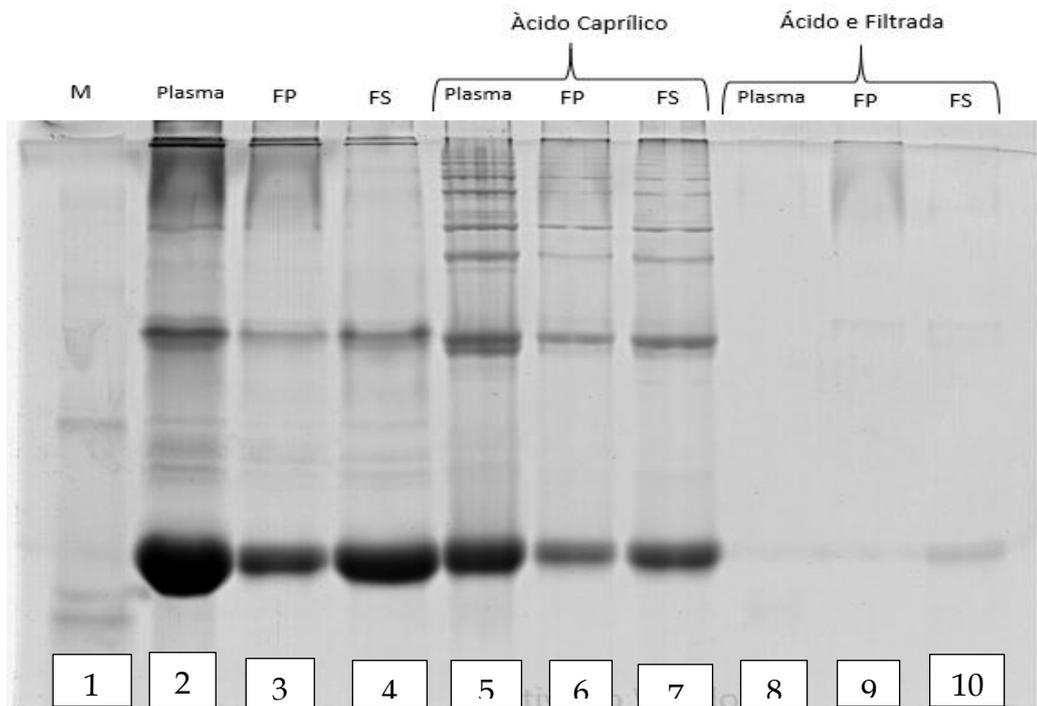
*Filtração com ácido caprílico

Fonte: Autor, 2023

4.3 Eletroforese SDS-PAGE

Como demonstrado na figura 5 é possível observar todas as etapas de purificação da IgG.

Figura 5: Eletroforese das amostras 6; 9 e 14.



Fonte: Autor, 2023

1- Marcador; 2 – Plasma – Bolsa 6, 3 - PEG Filtrado- bolsa 6, 4 - Sal Filtrado- bolsa 6, 5 -Plasma com ácido- bolsa 9, 6 - PEG com ácido- bolsa 9, 7 - Sal com ácido- bolsa 9, 8 - Plasma- bolsa 14, 9 - PEG filtrada com ácido- bolsa 14, 10 - Sal filtrada com ácido- bolsa 14.

Na figura 5, pode-se compreender e visualizar de melhor forma, a eficácia da separação do sistema apenas com ácido caprílico e com ácido/filtrada. Nos primeiros poços foi testado apenas as fases sem ácido e filtrado poço 3 e 4. Nos poços de número 6 e 7 já se nota uma diferença na separação da proteína IgG mais presente na fase PEG. Porém, uma concentração quase que igual na fase sal. Por fim, tem-se a visualização de melhor forma das fases 8 e 9 com ácido e filtrado e com isso, tendo uma melhor separação de isolamento a proteína G apenas na fase PEG após a aplicação do ácido caprílico e sua filtragem. Como demonstrando a imagem acima, pode-se perceber que o método quando adotado o adicional de ácido/filtrado tem-se uma separação de melhoria e praticamente isolada a Imunoglobulina G apenas encontrada na fase PEG e na fase sal, apenas uma concentração pequena da proteína Albumina.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível verificar a viabilidade de utilização do Sistema de Duas Fases na separação de proteínas do plasma, sendo um método que proporciona a eficácia de separação da Imunoglobulina. Desta forma, abre uma perspectiva de utilização pela indústria biotecnológica e de hemoderivados. Novos estudos devem ser realizados para aprimorar o método e aumentar a escala de produção do produto hemoderivado.

REFERÊNCIAS

ARBOVIROSES. Direção: Rafael Figueiredo. Produção: Christovão Paiva. Roteiro: Marcela Morato. Rio de Janeiro: Canal Saúde Fiocruz, 2017, 1 vídeo, MPEG-4, (26min38s), son., color. (Ligado em Saúde). Acessado em: 16-01-2022.

ASENJO, J. A.; ANDEWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 8826– 8835.2011. Acessado em: 16-01-2023

BARARDI, M, R, C; CAROBREZ, G, S; PINTO, R, A. *Imunologia*. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina. ISBN: 07.007-7. 2010 Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Imunologia.pdf>. Acessado: 16-01-2023

BORDÓN. S. F. HOBII. Equilíbrio líquido-líquido de sistemas de duas fases aquosas (SDFA) formados por polímero (PEG ou PVP) e sal inorgânico (CuSO₄ ou MnSO₄): determinação experimental e modelagem termodinâmica. *Acervo Digital da UFPR*. Curitiba. 2017. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1884/46972> 2017. Acessado: 18-01-2023

CAMPOS, Jonatan M. et al. Arboviroses de importância epidemiológica no Brasil. *Revista de Ciências da Saúde Básica e Aplicada*, [S.l.], v. 1, jun. 2018. ISSN 2595-8380. Disponível em: <http://186.248.187.182/ojs/index.php/rcsba/article/view/23>. Acessado em: 18-02-2023. Acessado em: 18-02-2023

CARVALHO, B. T. Costa, *et al.* I Consenso brasileiro sobre o uso de imunoglobulina humana em pacientes com imunodeficiências primárias. *Rev. bras. alerg. imunopatol.*—Vol, v. 33, n. 3, p. 105, 2010. Disponível em: http://www.imunopediatria.org.br/_download/artigos/consenso_igiv.pdf 2010. Acessado em: 20-01-2023

CHAVDA VP, *et al.* Convalescent plasma (hyperimmune immunoglobulin) for COVID-19 management: An update. *Process Biochem.* 2023 Apr;127:66-81. doi: 10.1016/j.procbio.2023.01.018. Epub 2023 Jan 31. PMID: 36741339; PMCID: PMC9886570. Acessado em: 13-02-2023

DONALISIO MR, Freitas ARR, Zuben APB Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev Saude Publica*. 2017. Acessado em: 13-02-2023

GIBB R, *et al.* Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. *Nature*. 2020 Aug;584(7821):398-402. doi: 10.1038/s41586-020-2562-8. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32759999. Acessado em: 04-03-2023

HEGYI, G, *et al.* I. Introduction to Practical Biochemistry. 2013. Disponível em: <https://ttk.elte.hu/dstore/document/871/book.pdf> Acessado em: 3-03-2023

KDIMATI S, M, CS, L, M. CANCER-CELL-DERIVED IGG AND ITS POTENTIAL ROLE IN TUMOR DEVELOPMENT. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 27;22(21):11597. doi: 10.3390/ijms222111597. PMID: 34769026; PMCID: PMC8583861. Acessado: 06-02-2023

KILIKIAN.V,B; P, A. Extração Líquido-líquido em Sistemas de duas fases aquosas.

Purificação de Produtos Biotecnológicos: Operações e processos com aplicação industrial. 2

Edi. 2020. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=PQLoDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA241&dq=sistema+de+duas+fases+aquosas&ots=CWHfeGczYH&sig=VvA94-FSw3uk16SPxbhOgngDGyw#v=onepage&q&f=false)

BR&lr=&id=PQLoDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA241&dq=sistema+de+duas+fases+aquosas
&ots=CWHfeGczYH&sig=VvA94-FSw3uk16SPxbhOgngDGyw#v=onepage&q&f=false

Acessado em: 28-03-2023

KNEVELMAN, Carol, *et al.* High-throughput screening techniques for rapid PEG-based precipitation of IgG4 mAb from clarified cell culture supernatant. *Biotechnology Progress* Volume 26, Issue 3, Pages 697 - 705 May 2010. Acessado: 05-02-2023

Volume 26, Issue 3, Pages 697 - 705 May 2010. Acessado: 05-02-2023

MADRID MG *et al.* Potential of Aqueous Two-Phase Systems constructed on flexible devices: Human serum albumin as proof of concept. 2010 July; 45(7) 1082-1087.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.026>. Acessado em: 12-03-23

MINEIRO.C, Viviane; et al, Sergian. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. *Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa*. V.3, N.1. Disponível em:

<http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/amp/article/view/3409/2110>. Acessado em: 01-02-23

MINISTERIO da Saúde, Vigilância S De. Boletim epidemiológico N° 39. 2017;48(Tabela 2):1-13. Disponível em:

http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/PDF/2017/novembro/28/2017_039.pdf. Acessado: 15-01-2023

MINISTERIO da Saúde, Vigilância S De. Boletim epidemiológico N° 40 2022. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no40#:~:text=mesmo%20per%C3%ADodo%20analisado,-,Quando%20comparado%20com%20o%20ano%20de%202021%2C%20ocorreu%20um%20aumentado,casos%2F100%20mil%20hab.)

conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no40#:~:text=mesmo%20per%C3%ADodo%20analisado.-

,Quando%20comparado%20com%20o%20ano%20de%202021%2C%20ocorreu%20um%20aumentado,casos%2F100%20mil%20hab.). Acessado: 15-01-2023

NASCIMENTO, Jéssica, *et al.* (2021). Evaluation of the influence temperature on the protein-tannic acid complex. *International Journal of Biological Macromolecules*. 182. 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.179. Acessado em: 29-03-2023

NAIR PM, *et al.* Recent advances in use of fresh frozen plasma, cryoprecipitate, immunoglobulins, and clotting factors for transfusion support in patients with hematologic

disease. *Semin Hematol.* 2020 Apr;57(2):73-82. doi: 10.1053/j.seminhematol.2020.07.006. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32892846; PMCID: PMC7384412. Acessado em: 11-03-2023

NIKOLAUS, H; STEFANIE, H; ALOIS, J. Continuous polyethylene glycol precipitation of recombinant antibodies: Sequential precipitation and resolubilization, *Process Biochemistry*, Volume 51, Issue 2, 2016, Pages 325-332, ISSN 1359-5113, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.032>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511315301446>). 2016. Acessado: 21-01-2023

PONTE, G. O que é IgG e IgM?. *Bio-Manguinhos*. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Fundação Oswaldo Cruz. 2022. Acessado em: 29-03-2023. <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1739-o-que-e-igg-e-igm#:~:text=Os%20anticorpos%20IgM%20e%20IgG,determinados%20anticorpos%20no%20nosso%20sangue>.

REIS IC, *et al.* Entomo-virological surveillance strategy for dengue, Zika and chikungunya arboviruses in field-caught *Aedes* mosquitoes in an endemic urban area of the Northeast of Brazil. *Acta Trop.* 2019 Sep;197:105061. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105061. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31194961. Acessado em: 10-03-2023

SIGFRID L, *et al.* Preparing clinicians for (re-)emerging arbovirus infectious diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Mar;24(3):229-239. doi: 10.1016/j.cmi.2017.05.029. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28648861. Acessado em: 11-03-2023

SINAN. Legislação Aplicada ao Sinan. Disponível em: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/sinan-legislacao>. 2019. Acessado em: 20-01-2023

VARGAS M, *et al.* Human plasma-derived immunoglobulin G fractionated by an aqueous two-phase system, caprylic acid precipitation, and membrane chromatography has a high purity level and is free of detectable in vitro thrombogenic activity. *Vox Sang.* 2015 Feb;108(2):169-77. doi: 10.1111/vox.12209. Epub 2014 Dec 3. PMID: 25469648. Acessado em: 20-03-2023

ZASLAVSKY, B. Y. *Aqueous two-phase partitioning*, 1st ed., New York: Marcel Dekker, 1995. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080%2F01932699508943691>. Acessado em: 13-03-2023