



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**GRAZIELLA LEITE BRONDANI**

**ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA ANTI-DENGUE UTILIZANDO SISTEMAS DE SEPARAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS**

**RECIFE**

**2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**GRAZIELLA LEITE BRONDANI**

**ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA ANTI-DENGUE UTILIZANDO SISTEMAS DE SEPARAÇÃO E TÉCNICAS ANALÍTICAS**

TCC apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

**Orientador(a):** Ana Cristina Lima Leite

**RECIFE**

**2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Brondani, Graziella Leite.

Estudo da purificação e identificação de imunoglobulina anti-dengue utilizando sistemas de separação e técnicas analíticas / Graziella Leite Brondani. - Recife, 2025.

42 p. : il., tab.

Orientador(a): Ana Cristina Lima Leite

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. IgG. 2. Purificação de proteínas. 3. Sistema de duas fases aquosas. 4. Dengue. 5. Cromatografia líquida. 6. Eletroforese. I. Leite, Ana Cristina Lima. (Orientação). II. Título.

660 CDD (22.ed.)

GRAZIELLA LEITE BRONDANI

**ESTUDO DA PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA ANTI-DENGUE UTILIZANDO TÉCNICAS ANALÍTICAS E SISTEMAS DE SEPARAÇÃO**

TCC apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em: 11/04/2025.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Jorge Vinicius Fernandes Lima Cavalcanti (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Viviane do Nascimento e Silva Alencar (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível graças ao apoio e à dedicação de muitas pessoas, e a cada uma delas expresso minha mais profunda gratidão.

Primeiramente, minha eterna admiração e agradecimento à minha orientadora — e mãe — Prof.<sup>a</sup> Ana Cristina. Sua orientação, paciência e incentivo foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Além de todo o conhecimento compartilhado, você me ofereceu apoio incondicional e a estrutura necessária para que este projeto se tornasse realidade.

Ao Prof. Jorge, minha gratidão pela paciência e suporte nas análises cromatográficas. Seu conhecimento e disponibilidade foram essenciais para que eu pudesse compreender e aplicar corretamente as técnicas envolvidas.

Agradeço também ao Prof. Pedro Rolim, coordenador do LTM, e à Prof.<sup>a</sup> Larissa Rolim por gentilmente abrirem as portas do laboratório para esta pesquisa e por todo o apoio ao longo do trabalho.

Um agradecimento especial à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo financiamento concedido por meio de bolsas de pesquisa ao longo da minha graduação. Sem esse apoio, não teria sido possível me dedicar à pesquisa científica e aprimorar meus conhecimentos na área.

Aos meus amigos de curso, em especial Gabriel P., Aline, Gabriel S. e Thiago A., obrigada por estarem ao meu lado em cada etapa dessa jornada. Pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis e por todas as risadas que tornaram essa caminhada mais leve.

Por fim, sou imensamente grata a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se concretizasse. Cada ajuda, cada palavra de apoio, cada gesto de incentivo fez a diferença.

Muito obrigada!

## RESUMO

A purificação de imunoglobulina G (IgG) específica para dengue é essencial para o desenvolvimento de diagnósticos precisos e produção de insumos biotecnológicos. Neste estudo, foi aplicado um Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa) utilizando polietilenoglicol (PEG) 3350 e sal fosfato (pH 7,0), seguido da adição de ácido caprílico e filtração, visando a remoção de proteínas contaminantes. A eficiência da purificação foi avaliada por ELISA, eletroforese em gel SDS-PAGE e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados demonstraram que a IgG permaneceu majoritariamente retida na fase intermediária (precipitado do PEG), enquanto a fase salina apresentou apenas traços mínimos da proteína. A quantificação por HPLC indicou que a concentração final da IgG na amostra purificada foi de 5,36 mg/mL. A formação do precipitado foi influenciada pelos tempos de agitação, repouso e centrifugação, destacando-se importância do ajuste dessas variáveis no processo. Como aprimoramento, sugere-se a remoção do PEG por diálise ou ultrafiltração para evitar interferências em análises posteriores. O método desenvolvido demonstrou-se eficiente e reprodutível, oferecendo uma alternativa viável para a obtenção de IgG purificada com alta seletividade e rendimento.

**Palavras-chave:** cromatografia líquida; dengue; IgG; purificação de proteínas; sistema de duas fases aquosas.

## ABSTRACT

The purification of dengue-specific immunoglobulin G (IgG) is essential for developing accurate diagnostics and biotechnological applications. In this study, an Aqueous Two-Phase System (ATPS) using polyethylene glycol (PEG) 3350 and phosphate salt (pH 7.0) was applied, followed by caprylic acid addition and filtration to remove contaminant proteins. The purification efficiency was assessed by ELISA, SDS-PAGE electrophoresis, and high-performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that IgG remained mostly in the intermediate phase (PEG precipitate), while the saline phase contained only minimal traces of the protein. HPLC quantification indicated that the final IgG concentration in the purified sample was 5.36 mg/mL. The formation of the precipitate was influenced by agitation, resting time, and centrifugation, highlighting the importance of optimizing these variables. For further improvements, PEG removal through dialysis or ultrafiltration is suggested to prevent interferences in subsequent analyses. The developed method proved to be efficient and reproducible, offering a viable alternative for obtaining highly selective and high-yield purified IgG.

**Keywords:** aqueous two-phase system; dengue; IgG; liquid chromatography; protein purification.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 INTRODUÇÃO À DENGUE E À RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	15
2.1.1 <i>História e epidemiologia da dengue</i> .....	15
2.1.2 <i>Genoma, estrutura do vírus e resposta imune</i> .....	16
2.2 PLASMA E HEMOCOMPONENTES .....	17
2.2.1 <i>Relevância da obtenção e purificação de imunoglobulinas específicas</i> .....	17
2.2.2 <i>Métodos de purificação de imunoglobulinas específicas</i> .....	18
2.3 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA) .....	18
2.3.1 <i>Utilização de polímeros e sais na separação de biomoléculas</i> .....	19
2.3.2 <i>Fatores que influenciam a eficiência de purificação</i> .....	20
2.4 MÉTODOS COMPLEMENTARES DE PURIFICAÇÃO: ADIÇÃO DE ÁCIDO CAPRÍLICO E MICROFILTRAÇÃO .....	21
2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS .....	22
2.5.1 <i>ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)</i> .....	22
2.5.2 <i>Eletroforese em Gel SDS-PAGE</i> .....	22
2.5.3 <i>HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)</i> .....	23
2.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E DE BIOSSEGURANÇA .....	24
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
4.1 OBTENÇÃO DO PLASMA .....	26
4.2 PRÉ-TRATAMENTO DO PLASMA .....	26



4.3 VALIDAÇÃO DO PLASMA CONTENDO IgG .....	26
4.4 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA) .....	27
4.5 ANÁLISE DE IgG NAS FASES DO SDFA POR ELISA .....	28
4.6 ANÁLISE POR ELETROFORESE .....	28
4.7 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS POR HPLC.....	28
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
5.1 EFICIÊNCIA DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA) .....	29
5.2 IMPACTO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO CAPRÍLICO.....	30
5.3 REPRODUTIBILIDADE DO SISTEMA .....	31
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA .....	32
<i>5.4.1 Curva Analítica de IgG.....</i>	<i>32</i>
<i>5.4.2 Análise das Amostras de IgG obtidas do plasma pelo SDFA .....</i>	<i>33</i>
5.5 PROPOSTAS PARA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS .....	39
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das arboviroses mais prevalentes no mundo, sendo responsável por cerca de 390 milhões de casos anuais, dos quais 96 milhões apresentam sintomas clínicos graves (Gubler, 2012; Who, 2023). As arboviroses, doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes, destacam-se pela rápida disseminação em áreas urbanas e pelo aumento da sua incidência em função das mudanças climáticas e da globalização. Entre elas, a dengue se destaca pela gravidade e pela ausência de tratamentos antivirais específicos (Gubler, 2012; Who, 2023).

Avanços recentes no campo das vacinas representam um progresso significativo, embora ainda apresentem limitações. A vacina Dengvaxia®, indicada exclusivamente para indivíduos previamente infectados, possui eficácia de aproximadamente 65% contra a doença sintomática e 79% contra casos graves, mas seu uso é restrito devido ao risco de formas graves em pessoas sem infecção anterior (SBIM, 2023). Já a vacina Qdenga, aprovada no Brasil em 2023, é indicada para indivíduos a partir de 4 anos, independentemente de infecções prévias, com eficácia de cerca de 80% contra a dengue sintomática. Contudo, sua proteção não é absoluta e pode variar entre os sorotipos do vírus (Takeda, 2024). Além disso, a vacina de dose única desenvolvida pelo Instituto Butantan demonstrou eficácia de 67,3% contra infecções e 89% contra casos graves, representando um importante avanço, mas ainda aguardando registro junto à Anvisa (AGÊNCIA BRASIL, 2024).

Uma das principais ferramentas para o diagnóstico e monitoramento da dengue é a detecção de imunoglobulinas específicas, como IgG e IgM, que são produzidas pelo sistema imunológico em resposta à infecção. Nesse contexto, métodos eficientes para a obtenção, purificação e quantificação dessas imunoglobulinas a partir do plasma humano são fundamentais para melhorar a precisão diagnóstica e contribuir para avanços científicos no entendimento da resposta imunológica à doença (Kuno, 1997; Kaplan *et al.*, 2019).

Dentre os métodos clássicos de obtenção de proteínas plasmáticas, destaca-se o método de Cohn (1946), que utiliza precipitação fracionada com etanol em baixas temperaturas para separar proteínas como imunoglobulinas e albuminas (Cohn *et al.*, 1946). Embora revolucionário na época de sua criação, este método apresenta limitações, como alta complexidade, custos elevados, necessidade de grandes volumes de plasma e risco de perda de pureza das imunoglobulinas devido à presença de resíduos de etanol (Grzybowski *et al.*, 2016). Alternativas modernas, como cromatografia de afinidade e precipitação com sulfato de

amônio, oferecem ganhos em seletividade e custo, mas ainda enfrentam barreiras relacionadas à escalabilidade e à sustentabilidade (Kaplan *et al.*, 2019).

Uma abordagem promissora para superar essas limitações é o sistema de duas fases aquosas (SDFA). Este método, que utiliza polímeros como o PEG (polietilenoglicol) e sais, permite uma separação eficiente de biomoléculas com base em diferenças de solubilidade e partição entre duas fases líquidas. Essa técnica apresenta vantagens significativas, como menor uso de solventes orgânicos, maior seletividade e menor impacto ambiental (Fresquet, 2017). Combinada com o uso do ácido caprílico e da filtração, o SDFA pode oferecer um método mais eficiente e econômico para a purificação de imunoglobulinas, preenchendo lacunas deixadas por técnicas tradicionais (Harris *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 2020).

A relevância deste estudo está em contribuir para a melhoria de ferramentas diagnósticas, particularmente em regiões endêmicas, onde o impacto da dengue é mais severo. A purificação eficiente de imunoglobulinas específicas anti-dengue pode fornecer insumos para testes sorológicos mais precisos, além de apoiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Kaplan *et al.*, 2019). A aplicação de técnicas analíticas avançadas, como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), oferece uma oportunidade para validar métodos que conciliem precisão e viabilidade econômica (Nakamura *et al.*, 2014; Hosseini *et al.*, 2021).

Desta forma, o presente trabalho consistiu na utilização do SDFA para a purificação de Imunoglobulina anti-dengue diretamente do plasma humano contendo altos títulos dessa Imunoglobulina. As técnicas de eletroforese, ELISA e cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram utilizadas para a verificação da eficiência do processo em termos qualitativo e quantitativo.

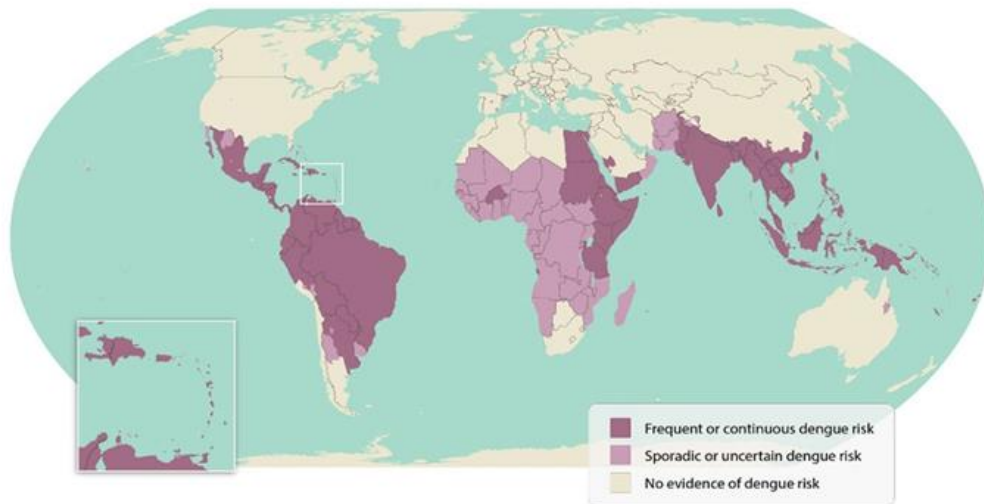
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 INTRODUÇÃO À DENGUE E À RESPOSTA IMUNOLÓGICA

#### 2.1.1 História e epidemiologia da dengue

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus da dengue (DENV), descrita pela primeira vez em epidemias simultâneas na Ásia, África e América do Norte no século XVIII. Com a globalização e o aumento da urbanização no século XX, a doença se tornou uma das principais preocupações de saúde pública mundial (Gubler, 2012). Hoje, a dengue é endêmica em mais de 100 países, a Figura 1 evidencia as áreas onde a dengue é prevalente no mundo.

**Figura 1** - Mapa-múndi destacando áreas de risco de dengue.



**Fonte:** CDC, 2024.

No Brasil, a dengue foi registrada pela primeira vez em 1846, mas os surtos começaram a ganhar destaque a partir da década de 1980, coincidindo com a reintrodução do mosquito *Aedes aegypti*, após campanhas mal-sucedidas de erradicação. Desde então, o país tem enfrentado epidemias cíclicas, com aumento progressivo no número de casos e na gravidade das manifestações clínicas. Em 2024, o Brasil notificou mais de 6,5 milhões de casos prováveis, o maior registro desde o início das notificações, além de 5.872 óbitos confirmados. O aumento expressivo foi atribuído à circulação simultânea de diferentes sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), associados a formas graves da doença (Brasil, 2024).

O estado de Pernambuco, devido à sua localização geográfica, alta densidade populacional e características climáticas, como chuvas intensas e altas temperaturas, apresenta taxas alarmantes de dengue. Até agosto de 2024, foram notificados 29.247 casos prováveis,

representando um aumento de 395,7% em relação ao mesmo período de 2023. Esse cenário é agravado por problemas estruturais, como déficit de saneamento básico e acesso limitado a serviços de saúde, além de dificuldades relacionadas à conscientização da população sobre medidas preventivas, como a eliminação de criadouros do *Aedes aegypti* (SES-PE, 2024).

### **2.1.2 Genoma, estrutura do vírus e resposta imune**

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero Flavivírus. O genoma viral é composto por RNA de fita simples, com aproximadamente 11 quilobases (kb), e codifica três proteínas estruturais (capsídeo, envelope e pré-membrana) e sete proteínas não estruturais (NS1 a NS5). Essas proteínas desempenham funções essenciais na replicação viral e na interação com o sistema imunológico do hospedeiro (Kaplan *et al.*, 2019; Anvisa, 2024;).

A proteína não estrutural 1 (NS1) é uma das principais moléculas envolvidas na patogênese e no diagnóstico da dengue. Durante a infecção, a NS1 é secretada em altas concentrações no plasma, especialmente na fase aguda, e está associada a uma intensa resposta inflamatória no hospedeiro. Além de sua função na replicação do RNA viral, a NS1 desempenha um papel imunomodulador, ajudando o vírus a escapar do sistema imunológico ao inibir a sinalização antiviral (Pereira *et al.*, 2022). Ela também é um marcador diagnóstico confiável, sendo detectada precocemente, o que permite o diagnóstico nos estágios iniciais da doença (Ramos *et al.*, 2020).

A estrutura do envelope viral também é de grande importância, pois contém epítomos que interagem diretamente com anticorpos neutralizantes. No entanto, essa interação está relacionada ao fenômeno de amplificação dependente de anticorpos (ADE), em que anticorpos não neutralizantes podem facilitar a entrada do vírus em células imunes, aumentando sua replicação e agravando a doença (Halstead, 2015).

A resposta imune ao DENV envolve principalmente a produção de imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG). Durante infecções primárias, a IgM é detectada precocemente, atingindo seu pico em cerca de duas semanas, enquanto a IgG é produzida posteriormente, garantindo memória imunológica de longa duração. Nas infecções secundárias, a IgG é gerada rapidamente em altos títulos, refletindo a reativação da memória imunológica (Kuno, 1997).

A interação entre a NS1 e a IgG é particularmente significativa. A IgG desempenha um papel importante na neutralização viral, mas também pode estar associada ao ADE em infecções secundárias, dependendo de sua especificidade e função. Essa relação destaca a importância de diagnósticos precisos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), que permite

a detecção da NS1 e a diferenciação entre infecções primárias e secundárias. Esses métodos são fundamentais para o controle epidemiológico e para estratégias de vigilância em regiões endêmicas, auxiliando na identificação de populações expostas e no monitoramento da progressão da doença (Ramos *et al.*, 2020).

## 2.2 PLASMA E HEMOCOMPONENTES

O plasma é a porção líquida do sangue, compreendendo cerca de 55% do volume total, e é composto por água (aproximadamente 90%), proteínas, sais minerais, lipídeos, hormônios e metabólitos. As principais proteínas plasmáticas incluem albumina, globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e fatores de coagulação, como fibrinogênio e protrombina, todas com funções essenciais no transporte de moléculas, manutenção da pressão oncótica e respostas imunológicas (Thorpe; Coutinho, 2018).

Os hemocomponentes, por sua vez, referem-se às frações separadas do sangue após a centrifugação ou outros processos técnicos, sendo classificados como concentrados de hemácias, plaquetas, plasma e crioprecipitado. O plasma é particularmente relevante para a purificação de imunoglobulinas, pois contém anticorpos responsáveis pela resposta imunológica adaptativa, como a IgG, IgA e IgM (Goldstein *et al.*, 2021). A alta concentração de albumina, que representa cerca de 60% das proteínas plasmáticas, e a presença de lipoproteínas e fibrinogênio tornam o processo de purificação desafiador, devido à necessidade de remover esses contaminantes para isolar as imunoglobulinas de interesse.

### 2.2.1 Relevância da obtenção e purificação de imunoglobulinas específicas

O plasma desempenha um papel essencial como fonte para a purificação de imunoglobulinas, dado que ele contém uma alta concentração de proteínas, incluindo albumina, fibrinogênio e imunoglobulinas como a IgG. Essas proteínas têm um papel central em aplicações terapêuticas e diagnósticas, tornando o plasma um recurso valioso para a biotecnologia. A IgG, em particular, é amplamente utilizada em imunoterapias e no desenvolvimento de vacinas, sendo uma molécula-chave para pesquisas biomédicas (Kalyana *et al.*, 2021; Stimac *et al.*, 2022).

No contexto da dengue, a purificação de imunoglobulinas específicas apresenta desafios significativos, principalmente devido à complexidade do processo. Este envolve a coleta de amostras de soro, ou a produção de anticorpos recombinantes, ambas etapas dispendiosas e difíceis de escalar. Além disso, a purificação dessas imunoglobulinas deve garantir uma alta especificidade, de modo a evitar reações cruzadas com outros flavivírus e com proteínas do hospedeiro, assegurando a qualidade e a confiabilidade de diagnósticos e

tratamentos. A precisão na purificação é fundamental para evitar interferências que possam comprometer a eficácia terapêutica e diagnóstica (Sariol *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020).

Além disso, a purificação desempenha um papel crucial no desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes, uma vez que ela pode ser utilizada para a produção de vacinas que induzam uma resposta imunológica sem provocar fenômenos adversos graves, como a amplificação dependente de anticorpos (ADE). Esse fenômeno ocorre quando anticorpos de uma infecção primária aumentam a gravidade de uma infecção subsequente, complicando os processos de imunização. Portanto, métodos aprimorados de purificação são essenciais para garantir que as vacinas induzam uma resposta imune segura e eficaz (Sariol *et al.*, 2018; Beh *et al.*, 2022).

### **2.2.2 Métodos de purificação de imunoglobulinas específicas**

Para a purificação das imunoglobulinas, diversos métodos são utilizados, cada um com suas vantagens e limitações. O método de Cohn, por exemplo, envolve o fracionamento com etanol a baixas temperaturas para precipitar proteínas plasmáticas, incluindo as imunoglobulinas. Embora eficaz, esse método apresenta desvantagens como o alto custo, a complexidade do processo e o impacto ambiental, devido ao uso de grandes volumes de solventes (Cohn *et al.*, 1946). Outro método bastante utilizado é a cromatografia de afinidade, que captura imunoglobulinas utilizando ligantes específicos como proteínas A ou G. Embora altamente seletiva, essa técnica tem um custo elevado e dificuldades de escalonamento para produção industrial em grandes volumes (Grzybowski *et al.*, 2016).

Entre as abordagens utilizadas, o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) tem se destacado como uma alternativa promissora devido à sua simplicidade, baixo custo e biocompatibilidade. Essa técnica utiliza polímeros, como o polietilenoglicol (PEG), em combinação com sais, como fosfato, para criar fases aquosas distintas que facilitam a separação e concentração de proteínas-alvo. O SDFA se mostra particularmente eficaz na purificação de IgG extraída do plasma, pois a combinação de parâmetros físico-químicos ajustáveis permite maximizar a seletividade do processo. A evolução dessas técnicas alternativas, como o SDFA, oferece uma grande promessa para superar essas limitações e tornar a purificação de imunoglobulinas mais acessível e eficiente (García-Rivera *et al.*, 2016; Chin *et al.*; Karmakar *et al.*, 2022).

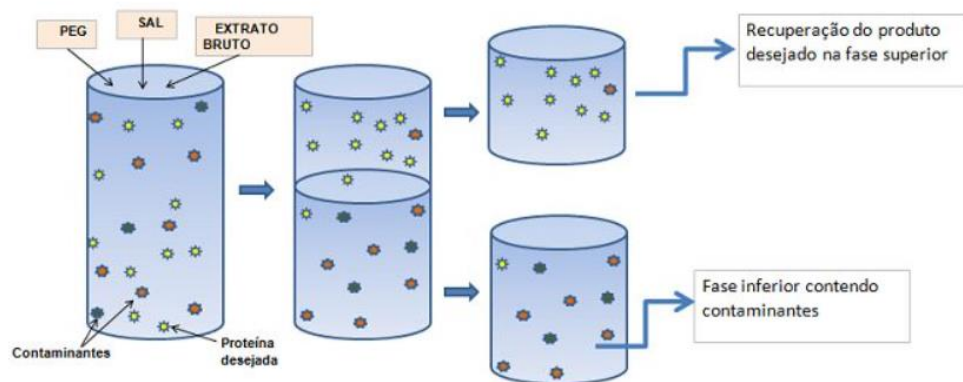
### **2.3 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)**

Os Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) representam uma técnica promissora para a purificação de biomoléculas, incluindo imunoglobulinas, baseada na formação de duas

fases imiscíveis em um meio aquoso. Nesse sistema, as biomoléculas são separadas em função de suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, polaridade e características hidrofóbicas ou hidrofílicas (García-Rivera et al., 2016; Mao et al.; Kruse *et al.*, 2019).

De acordo com Rodrigues (2013), os S DFA são formados sob condições termodinâmicas específicas (temperatura, pressão e concentração), a partir da mistura de soluções aquosas contendo dois polímeros, um polímero e um eletrólito, ou dois tipos de sais quimicamente incompatíveis. Nos sistemas compostos por polímero e sal (figura 2), a fase superior é geralmente rica em polímero, enquanto a fase inferior é rica em sal. Essas fases são separadas por uma interface, onde as propriedades termodinâmicas intensivas transitam para os valores de equilíbrio da outra fase (Carvalho *et al.*, 2007).

**Figura 2** - Extração de biomateriais usando S DFA.



Fonte: Santos, 2016.

### 2.3.1 Utilização de polímeros e sais na separação de biomoléculas

No S DFA, polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG), combinados com sais como fosfato, promovem a formação de duas fases aquosas: uma rica em polímero e outra predominantemente salina. Essa separação ocorre devido à agregação dos íons do sal, que libera moléculas de água das camadas de solvatação, aumentando a entropia do sistema e reduzindo a energia de Gibbs, o que torna a separação de fases termodinamicamente favorável (Machado, 1999; García-Rivera *et al.*, 2016).

A escolha do PEG baseia-se em sua massa molecular, que influencia propriedades como viscosidade, densidade e comportamento hidrofóbico. PEGs de baixa massa molecular, como o PEG 3350, são preferidos em sistemas de alta seletividade, pois apresentam menor viscosidade e exclusão estérica reduzida. Isso favorece o particionamento de biomoléculas, como a imunoglobulina G (IgG), para a fase rica em polímero, garantindo alta eficiência de



purificação e preservação de sua estrutura funcional (Albertsson, 1986; Naghadali *et al.*, 2021; Chin *et al.*, 2022).

Os sais, especialmente o fosfato, desempenham um papel crítico na modulação do sistema, oferecendo biocompatibilidade, efeito tamponante em pH fisiológico e capacidade de *salting-out*, que reduz a solubilidade das proteínas na fase salina e direciona-as para a fase rica em polímero (Hjertén, 1991; Iqbal, 2016). Essa interação resulta em sistemas que apresentam elevada seletividade, diferenças favoráveis de densidade e viscosidade entre as fases, além de compatibilidade com equipamentos industriais (Da Silva, 2011).

A combinação de PEG 3350 e fosfato destaca-se por sua simplicidade operacional, baixo custo e escalabilidade, sendo amplamente utilizada em aplicações industriais. Esse sistema proporciona uma separação rápida e eficiente de biomoléculas específicas, como a IgG, mantendo sua funcionalidade para aplicações diagnósticas e terapêuticas. Estudos indicam que o S DFA pode alcançar alta pureza e rendimento, oferecendo uma alternativa sustentável a métodos tradicionais, como cromatografia de afinidade (Husted *et al.*, 1985; Salabat, 2001; García-Rivera *et al.*, 2016; Naghdali *et al.*, 2021).

### **2.3.2 Fatores que influenciam a eficiência de purificação**

A eficiência do S DFA depende de parâmetros físico-químicos, como pH, concentração de polímero e sal, temperatura e tempo de processamento.

O pH afeta a carga superficial das proteínas e sua solubilidade. Próximo ao ponto isoelétrico da IgG, que é de 6.9, a solubilidade é reduzida, favorecendo a separação na fase rica em polímero. Desvios significativos podem comprometer a seletividade, permitindo a co-purificação de contaminantes (Karmakar *et al.*, 2022).

A concentração de PEG e sal também é crítica. Enquanto o PEG modula a densidade e a hidrofobicidade da fase rica em polímero, o sal ajusta a força iônica, estabilizando proteínas e minimizando interações inespecíficas. Concentrações inadequadas podem reduzir a recuperação ou aumentar impurezas no processo (García-Rivera *et al.*, 2016).

A temperatura influencia a estabilidade das proteínas e a dinâmica das fases. Temperaturas elevadas podem causar desnaturação, enquanto temperaturas muito baixas reduzem a mobilidade molecular, prejudicando a separação (Ahmad *et al.*, 2023). O tempo de processamento deve ser suficiente para completar a separação, evitando perdas por degradação ou aumento de contaminantes.

## 2.4 MÉTODOS COMPLEMENTARES DE PURIFICAÇÃO: ADIÇÃO DE ÁCIDO CAPRÍLICO E MICROFILTRAÇÃO

Na década de 1960, foi demonstrado que as globulinas  $\alpha$  e  $\beta$ , mas não as globulinas  $\gamma$ , formavam complexos insolúveis com ácidos graxos de cadeia curta (C6-C12). Essa descoberta foi crucial para o desenvolvimento de um processo de purificação para IgG, no qual as proteínas não imunoglobulinas são precipitadas com ácido caprílico (ácido octanóico, um ácido graxo C8 saturado). A pureza e o rendimento da solução enriquecida com IgG dependem da quantidade de ácido caprílico adicionado, do pH, da molaridade do tampão e do fator de diluição (Bertolini *et al.*, 2012).

A adição de ácido caprílico (C8) e a microfiltração continuam sendo métodos complementares amplamente utilizados na purificação de imunoglobulinas, especialmente quando combinados com o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA). Essa abordagem tem se mostrado eficaz na obtenção de IgG de alta pureza e rendimento (Vargas *et al.*, 2015). O ácido caprílico, age como um agente precipitante altamente seletivo para proteínas indesejadas, como albumina e lipoproteínas. Sua eficiência está em sua capacidade de interagir com as superfícies hidrofóbicas das proteínas, promovendo sua precipitação. Esse mecanismo é específico, permitindo a remoção de contaminantes sem afetar a integridade da IgG, que é menos suscetível à precipitação devido às suas propriedades físico-químicas (Brodsky *et al.*, 2012; Stimac *et al.*, 2022).

Durante o processo de purificação, o ácido caprílico é adicionado sob condições controladas de pH e temperatura, formando agregados proteicos insolúveis que são removidos por filtração. Essa etapa é particularmente importante para a remoção de albumina, que é uma das principais proteínas contaminantes em preparações de soro, sendo especialmente sensível às condições impostas pelo ácido caprílico (Romanowski *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2017).

A combinação do ácido caprílico com o SDFA potencializa ainda mais a eficiência do processo de purificação. O SDFA, que utiliza fases ricas em polímeros, como o PEG (polietilenoglicol), e sais, como o fosfato, realiza uma separação inicial baseada em propriedades como solubilidade e afinidade das moléculas. Quando o ácido caprílico é adicionado nesse contexto, ele atua seletivamente para precipitar proteínas residuais indesejadas, ampliando a pureza do produto final. Essa sinergia resulta em um processo de purificação robusto, com maior seletividade e menor custo operacional, em comparação a métodos como cromatografia de afinidade (García-Rivera *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2019).

O uso combinado de SDFA e ácido caprílico é especialmente relevante em aplicações terapêuticas e diagnósticas, onde a pureza das imunoglobulinas é um requisito crítico. Estudos

recentes têm demonstrado o potencial dessa estratégia para a produção em larga escala de IgG com altos padrões de pureza e rendimento, tornando-se uma alternativa promissora a métodos convencionais mais caros e complexos (Erdmann *et al.*, 2020; Stimac *et al.*, 2022).

## 2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

### 2.5.1 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

O ELISA identifica imunoglobulinas específicas por meio de interações bioquímicas baseadas na afinidade entre antígenos e anticorpos, mediadas por processos enzimáticos. Essas interações ocorrem devido à especificidade estrutural entre os epítomos presentes no antígeno e o sítio de ligação dos anticorpos. O método utiliza placas revestidas com antígenos ou anticorpos, que capturam o analito presente na amostra, como imunoglobulinas, através dessas interações de alta afinidade (Gan, 2013).

Quando um anticorpo conjugado a uma enzima é adicionado, ele se liga ao complexo antígeno-anticorpo formado. A enzima catalisa a conversão de um substrato em um produto colorido ou fluorescente, permitindo a detecção e quantificação do analito. Essa capacidade de amplificação de sinal torna o ELISA extremamente sensível, capaz de detectar concentrações muito baixas de imunoglobulinas, mesmo em amostras diluídas (Kao *et al.*, 2018; Díaz *et al.*, 2022). No caso de diagnósticos relacionados à dengue, por exemplo, o ELISA detecta anticorpos IgG ou IgM específicos do vírus. Aqui, os antígenos virais fixados na superfície do ensaio interagem com os anticorpos da amostra. A presença de imunoglobulinas específicas para o vírus indica uma resposta imunológica à infecção (Kao *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2021).

No contexto da validação de imunoglobulinas purificadas, como IgG, o ELISA garante a especificidade e funcionalidade das proteínas após processos como o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA). Ele permite identificar a concentração de IgG e avaliar sua reatividade com antígenos-alvo, assegurando a qualidade do produto final para aplicações diagnósticas e terapêuticas (Chen *et al.*, 2020; Díaz *et al.*, 2022).

### 2.5.2 Eletroforese em Gel SDS-PAGE

A eletroforese em gel SDS-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, com dodecil sulfato de sódio) é uma técnica fundamental para a análise da pureza e integridade das imunoglobulinas. O princípio dessa técnica baseia-se na separação de proteínas por seu peso molecular. Quando as amostras de proteínas são aplicadas a um gel de poliacrilamida em um campo elétrico, as proteínas migram com base no tamanho e na carga. A utilização do SDS,

um detergente aniônico, desnatura as proteínas, conferindo uma carga negativa uniforme, o que permite que as proteínas migrem proporcionalmente ao seu peso molecular (Larsen *et al.*, 2017).

A SDS-PAGE é amplamente utilizada para verificar a pureza das imunoglobulinas purificadas. A separação das proteínas permite a visualização de bandas que correspondem às proteínas presentes na amostra, possibilitando a identificação de contaminantes e a avaliação da integridade das imunoglobulinas. No caso das IgG, espera-se observar uma única banda de alta intensidade correspondente ao peso molecular esperado (aproximadamente 150 kDa para a molécula intacta), o que indica que a proteína está bem preservada e não foi degradada durante o processo de purificação (Ragusa *et al.*, 2019).

A utilização da SDS-PAGE é crucial para assegurar que a purificação da IgG, obtida por diferentes métodos como SFA ou cromatografia de afinidade, não resultou em degradação ou contaminação por outras proteínas do plasma ou da produção recombinante (Santos *et al.*, 2021).

### **2.5.3 HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*)**

A cromatografia líquida é uma técnica analítica indispensável para a separação, identificação e quantificação de componentes em misturas complexas. Seu princípio baseia-se na interação diferencial entre as moléculas da amostra (fase móvel) e o material da coluna cromatográfica (fase estacionária), permitindo que compostos sejam separados com base em suas propriedades físico-químicas, como polaridade, tamanho e afinidade (Grimalt *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

No contexto das imunoglobulinas, como a IgG, o HPLC se destaca como uma ferramenta essencial para avaliar pureza, quantificar concentrações e analisar modificações pós-traducionais, como glicosilações, que podem impactar diretamente a funcionalidade terapêutica. Sua capacidade de fornecer análises detalhadas e precisas dessas características o torna indispensável na validação de processos de purificação e no controle de qualidade de produtos biotecnológicos (Grimalt *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Apesar dessas vantagens, a precisão das análises realizadas por HPLC pode ser influenciada por fatores como impurezas residuais, estabilidade das amostras e condições do sistema cromatográfico. Resíduos de sais ou solventes, quando não eliminados adequadamente nas etapas de purificação, podem interferir na separação cromatográfica, gerando picos sobrepostos ou distorcidos que comprometem a identificação e quantificação das imunoglobulinas (Miller *et al.*, 2020). Para assegurar a precisão analítica, é fundamental

controlar rigorosamente a composição da fase móvel, incluindo proporções de solventes e pH, além de monitorar continuamente o estado da coluna cromatográfica, que pode se desgastar ou acumular resíduos ao longo do tempo (Grimalt *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2022). Essas medidas não apenas garantem a confiabilidade dos dados obtidos, mas também contribuem para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos mais seguros e eficazes.

## 2.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E DE BIOSSEGURANÇA

A ética na manipulação de plasma humano começa com o respeito aos direitos dos doadores. A coleta deve ser voluntária, baseada no consentimento livre e informado, e aprovada por comitês de ética em pesquisa, conforme a Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os doadores devem ser informados sobre os objetivos da pesquisa, os riscos envolvidos e as medidas de proteção à confidencialidade de suas informações pessoais. Além disso, é imprescindível que as práticas estejam alinhadas com diretrizes internacionais, como a Declaração de Helsinki, e regulamentações específicas de agências como a ANVISA e a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Brasil, 2013; Who, 2020).

Do ponto de vista da biossegurança, trabalhar com materiais biológicos requer a implementação de protocolos rigorosos para reduzir o risco de exposição a agentes infecciosos. A adoção de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), como luvas, jalecos e máscaras, é obrigatória (CDC, 2021). Ainda neste interim, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou a RDC N° 34, DE 11 DE JUNHO DE 2014, que estabelece os requisitos de boas práticas para serviços de hemoterapia que desenvolvam atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue. O artigo 89 estabelece que a cada doação devem ser realizados obrigatoriamente testes laboratoriais de triagem de alta sensibilidade, para detecção de marcadores para as seguintes doenças: sífilis, Doença de Chagas, Hepatite B e C, HIV 1 e 2 e HTLV i e II. Caso pelo menos um dos resultados da repetição em duplicata seja reagente/positivo ou inconclusivo, as bolsas deverão ser bloqueadas e descartadas (Brasil, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral desenvolver e validar um protocolo para a obtenção, purificação e quantificação de imunoglobulina específica anti-dengue a partir do plasma humano, utilizando o sistema de duas fases aquosas e técnicas analíticas. Espera-se que o protocolo permita a obtenção de imunoglobulinas específicas com alta pureza e rendimento, adequadas para aplicações diagnósticas e científicas. A hipótese central é que a utilização dessas metodologias resultará em um processo eficiente e escalável.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as bolsas de plasma contendo altos títulos de IgG anti-dengue utilizando ELISA.
- Estabelecer as condições ideais para a purificação de imunoglobulinas por SDFa;
- Identificar e caracterizar as imunoglobulinas purificadas utilizando ELISA e SDS-PAGE;
- Avaliar a eficiência do uso do ácido caprílico e da microfiltração como etapas complementares de purificação utilizando SDS-PAGE;
- Realizar a identificação e quantificação por HPLC utilizando a IgG da Hemobrás como referência;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DO PLASMA

O material de partida utilizado nos experimentos é o plasma congelado (plasma comum), obtido por doação de voluntários da região metropolitana de Recife-PE, e cedido pela Fundação HEMOPE. As bolsas de plasma (figura 3) seguiram os protocolos de doação exigidos pela RDC n° 34, de 11 de junho de 2014 (BRASIL. ANVISA, 2014). Todo o processo de fornecimento de plasma foi aprovado nas Comissões de Ética da UFPE (CAAE: 55993122.8.0000.5208) e do HEMOPE (CAAE:55993122.8.3001.5195).

**Figura 3-** Bolsas de plasma de diferentes tipos sanguíneos.



Fonte: A Autora, 2023.

### 4.2 PRÉ-TRATAMENTO DO PLASMA

As bolsas de plasma foram descongeladas a aproximadamente 4°C. O plasma já líquido foi vertido em um recipiente apropriado e centrifugado a 3500 RPM por 30 min a 4°C. O precipitado (crioprecipitado) foi descartado, e o sobrenadante foi separado para a realização dos experimentos.

### 4.3 VALIDAÇÃO DO PLASMA CONTENDO IgG

As bolsas de plasma contendo títulos de IgG para Dengue foram validadas através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). As bolsas que apresentaram títulos de anticorpos de Dengue foram submetidas ao Sistema de duas fases Aquosas (SDFa).

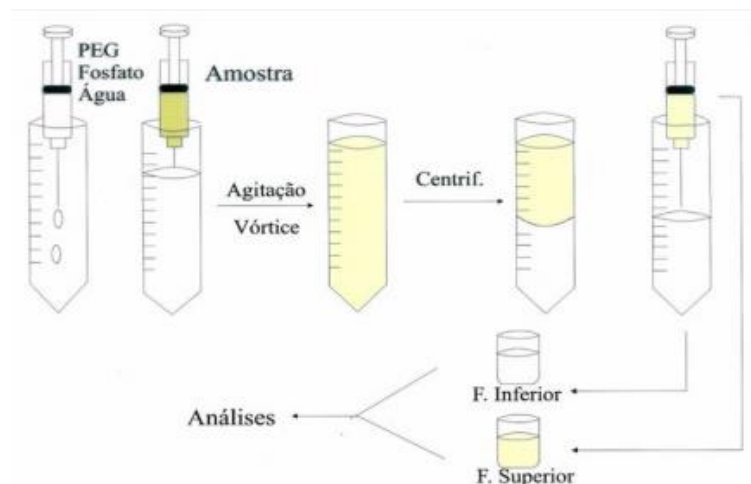
O ensaio de ELISA para Dengue IgG foi realizado conforme instruções do Kit Panbio Dengue IgG *Indirect* ELISA® (Austrália). Conforme recomendado, os controles positivo e negativo, o calibrador e as amostras de plasma foram diluídos na proporção de 1:9 em diluente de amostra. Em microplacas contendo 96 poços, revestidas com anti-imunoglobulinas para Dengue, foram adicionados 20 µL de cada diluição. As microplacas foram incubadas durante 30 min a 37 °C, e lavadas posteriormente com solução salina tamponada (fosfato/tween 20/conservante Proclin 0,1%). Após as lavagens, foram

adicionados 100  $\mu$ L de anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase em cada poço, e as placas foram incubadas por mais 30 min a 37 °C. Após novas lavagens com solução salina de fosfato, foram adicionados 100  $\mu$ L de substrato de tetrametilben-zidina/peróxido de hidrogênio (cromógeno TMB), e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 min. A reação foi interrompida com 100  $\mu$ L de ácido fosfórico 1 M (Solução de parada). Através do leitor de microplacas *Accuris SmartReader UV-Vis* - modelo MR9600, as absorvâncias dos poços foram medidas utilizando um comprimento de onda de 450 nm. Seguindo o cálculo do “*cut-off*” fornecido pelo kit e pelos valores de obtidos com a absorvância de cada amostra, os resultados foram considerados positivos, negativos ou duvidosos.

#### 4.4 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

O sistema de duas fases aquosas (Figura 4) seguiu a metodologia descrita por Arsenjo (2011), proposto para sistemas de obtenção de proteínas. Foi utilizado PEG de concentrações 3350, 4000 e 8000 (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. Os sistemas foram homogeneizados por 30 minutos em um agitador magnético, deixados em repouso por 15 minutos e posteriormente, centrifugados em baixa velocidade (3.500 rpm, 15 minutos) para a separação das fases. Todos os experimentos de partição foram realizados a temperatura ambiente. Amostras das fases superior e inferior foram separadas em micro tubos contendo uma solução de ácido caprílico (concentração 5%) e filtradas (microfiltro 0,22  $\mu$ m, Mil-lipore).

**Figura 4-** Procedimento do sistema de duas fases aquosas utilizado.



Fonte: Kilikian, 2020.



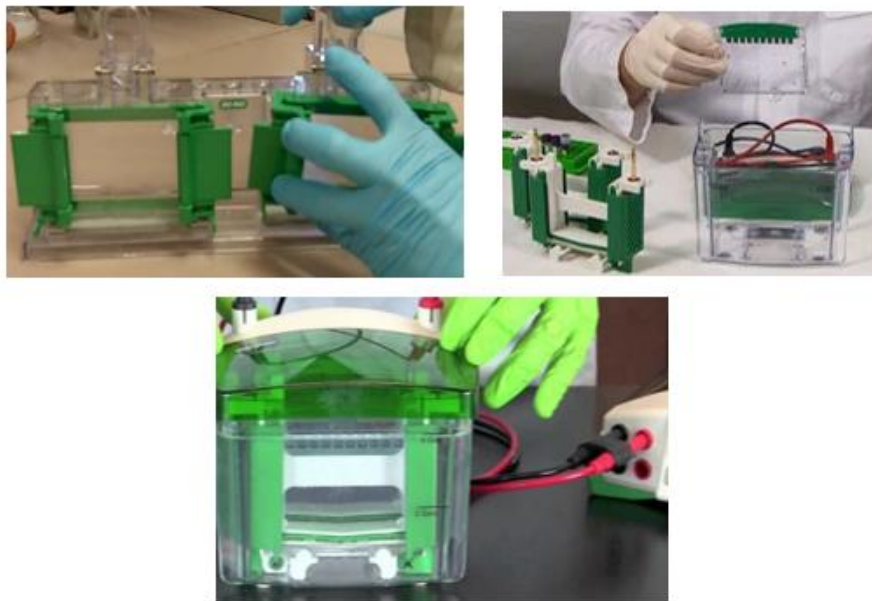
#### 4.5 ANÁLISE DE IgG NAS FASES DO SDFA POR ELISA

Novos ensaios ELISA foram realizados após o processo de separação do SDFA para identificar a IgG nas diferentes fases. A IgG foi analisada nas fases superior (PEG) e inferior (sal) para confirmar a presença e a distribuição da proteína nas fases resultantes da separação.

#### 4.6 ANÁLISE POR ELETROFORESE

As duas fases obtidas nos SDFA (PEG e Sal) foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. O gel de poliacrilamida foi preparado nas concentrações de 6% (gel de empilhamento) e 12% (gel de corrida) e após a corrida eletroforética (figura 5) foram corados em solução de Comassie Blue. A análise foi realizada através do densitômetro Bio-DS-5000 plus Microtek utilizando um software LPixImage (Loccus Biotecnologia®). A cuba e reagentes foram da BIORAD. Os resultados obtidos foram comparados com a IgG purificada, comercializada e cedida pela Hemobrás.

**Figura 5-** Equipamento para preparo do gel de eletroforese e corrida eletroforética.



Fonte: A Autora (2023).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS POR HPLC

A análise das amostras de proteínas foi realizada utilizando um Sistema HPLC Shimadzu VP com detector UV/Vis a 214 nm e coluna C18. A fase móvel foi composta por água e acetonitrila (50/50) com 0,2% de ácido fosfórico com taxa de fluxo de 1 mL/min. A calibração foi realizada com padrões de imunoglobulinas obtidas da Hemobrás, comparando os tempos de retenção e as áreas dos picos das amostras para a quantificação das proteínas presentes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFICIÊNCIA DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) composto por polietilenoglicol (PEG), predominantemente na fase superior, e fosfato de sódio, concentrado na fase inferior, foi avaliado para a extração e purificação de imunoglobulina G (IgG) a partir de plasma humano. Para otimizar a comparação, foram preparados sistemas bifásicos com diferentes concentrações de PEG. Os resultados são apresentados na Tabela 1 e posteriormente, realizado uma corrida com as amostras na eletroforese, como mostrado na Figura 6.

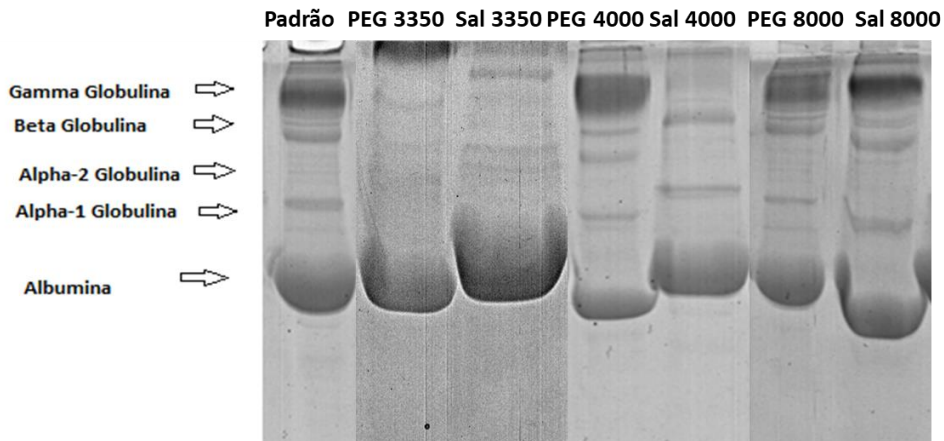
**Tabela 1** – Resultados e condições experimentais de purificação de IgG imune a dengue.

Amostra	PEG	Volume da fase superior (mL)	Volume da fase inferior (mL)
1	3350	3,6	1,4
2	4000	3,4	1,6
3	8000	3,1	1,9

Fonte: A autora (2024).

Nota: Tabela elaborada pela autora com base nos resultados obtidos na pesquisa.

**Figura 6-** Eletroforese em gel de poliacrilamida dos sistemas de duas fases aquosas com PEG 3350, 4000 e 8000, solução de fosfato de sódio no pH 7.



Fonte: A autora (2024).

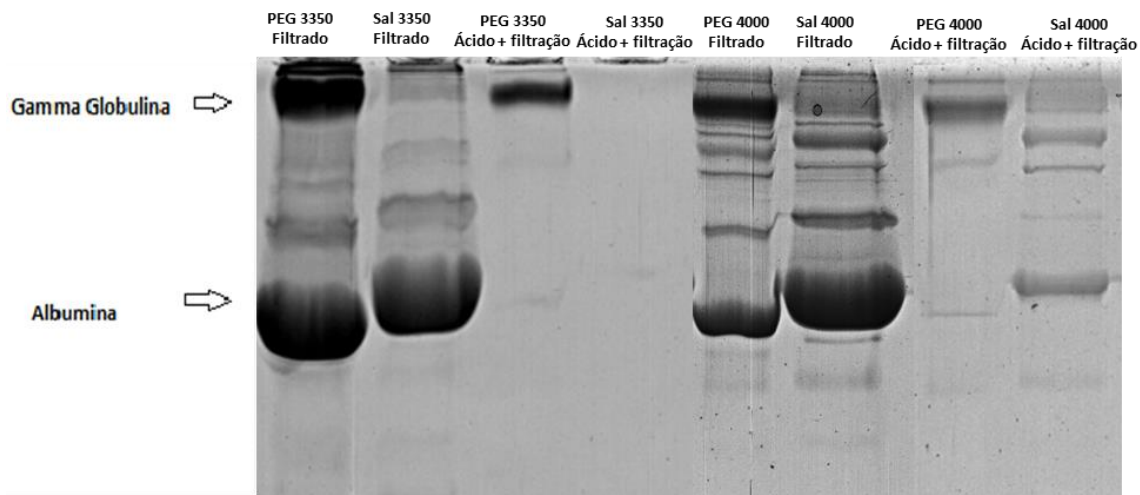
No estudo de eletroforese realizado em gel de poliacrilamida (Figura 6), dentre as amostras que apresentaram banda de imunoglobulina, a amostra 1 e 2, preparadas com PEG 3350 e 4000, respectivamente, mostraram os melhores resultados. É possível verificar que nas fases Sal de ambas amostras, a banda de Gamma Globulina encontra-se praticamente ausente, mostrando que a IgG ficou retida na fase PEG, como esperado. Já com o PEG 8000, é

possível ver a banda de IgG em ambas as fases. É possível ver também uma diminuição considerável das demais proteínas na fase PEG com concentrações 3350 e 4000 em comparação com a 8000. Por isso, as amostras preparadas com PEG 3350 e 4000 foram escolhidas para serem tratadas com ácido caprílico e submetidas à filtração.

## 5.2 IMPACTO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO CAPRÍLICO

A adição de ácido caprílico foi avaliada como um método complementar para a remoção de contaminantes, como albumina e lipoproteínas, e para melhorar a seletividade da purificação da IgG. Foram realizados experimentos comparando amostras filtradas com e sem a adição do ácido caprílico para PEG de concentrações 3350 e 4000.

**Figura 7-** Eletroforese em gel de poliacrilamida dos sistemas de duas fases aquosas com PEG 3350 e 4000 filtrados com e sem a adição de ácido caprílico.



Fonte: A autora (2024).

Os resultados da eletroforese SDS-PAGE (Figura 7) indicaram que, nas amostras sem a adição de ácido caprílico, tanto com PEG 3350 quanto com PEG 4000, a maior parte da IgG foi retida na fase PEG. No entanto, observou-se a presença de albumina e alfa-globulinas. Além disso, uma leve banda de IgG foi detectada na fase salina, sendo mais pronunciada no sistema com PEG 4000.

Em contrapartida, nas amostras na qual ambas as fases foram filtradas com a prévia adição de ácido caprílico, observou-se que as outras proteínas na fase PEG foram praticamente eliminadas. Na fase salina, o sistema com PEG 3350 apresentou pouca ou nenhuma proteína residual, sugerindo uma retenção mais eficiente da IgG na fase PEG em comparação com o PEG 4000. Esses resultados confirmam que a IgG permaneceu predominantemente na fase PEG e em um estado mais purificado, evidenciando a eficácia do

PEG 3350 com a adição do ácido caprílico e filtração na separação e purificação da imunoglobulina.

Para validar a eficácia do sistema e garantir que a proteína precipitada foi de fato a IgG específica, foi realizado o ensaio de Elisa em duplicata nas amostras feitas com PEG 3350 com a adição do ácido caprílico e filtradas. Esse método permitiu a detecção específica da imunoglobulina em ambas as fases PEG e a negatização das fases salinas, conforme Tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados Elisa das amostras.

<b>Amostras</b>	<b>Absorbância</b>	<b>Resultado</b>
Controle Negativo	0.127	-
Controle Positivo	0.629	-
Calibrador 1	0.273	-
Calibrador 2	0.303	0.2880
<b>PEG 1</b>	<b>0.681</b>	<b>23.6458</b>
Sal 1	0.092	3.1994
<b>PEG 2</b>	<b>0.419</b>	<b>18.0208</b>
Sal 2	0.121	4.2013

Fonte: A autora (2024).

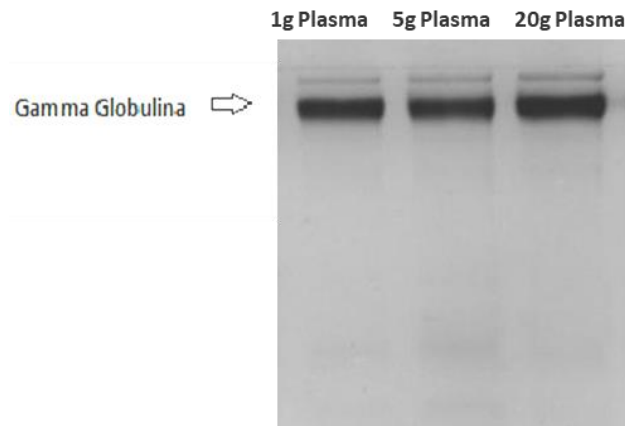
Nota: Os resultados a seguir foram obtidos pelo método Panbio™ Dengue IgG ELISA. Os valores obtidos por métodos diferentes não podem ser usados de forma intercambiável. A magnitude do resultado medido, acima do valor de *cut-off*, não é indicativa da quantidade total de antígeno presente.

### 5.3 REPRODUTIBILIDADE DO SISTEMA

Após a realização dos testes preliminares com os polímeros PEG 3350 e PEG 4000, além da adição do ácido caprílico, foi avaliada a reprodutibilidade do sistema que apresentou os melhores resultados (PEG 3350). Para isso, a extração de imunoglobulinas foi conduzida em maior escala, aumentando progressivamente a quantidade de plasma processado de 1 g para 5 g e posteriormente para 20 g.

A eficiência da extração foi analisada por meio de eletroforese (Figura 8) permitindo a verificação da integridade e pureza das imunoglobulinas isoladas. Essa abordagem permitiu validar a aplicabilidade do sistema para volumes maiores, garantindo sua viabilidade para futuras aplicações em diagnóstico e terapêutica.

**Figura 8-** Eletroforese em gel de poliacrilamida dos sistemas de duas fases aquosas com PEG 3350 preparados para 1, 5 e 20g de plasma.



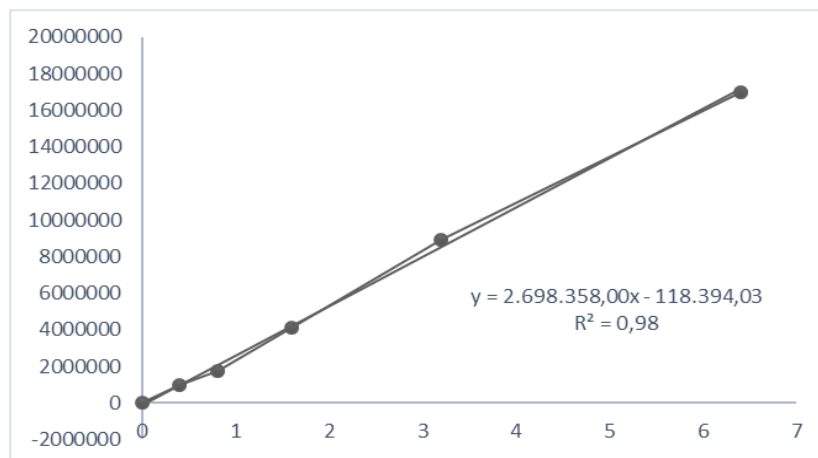
Fonte: A autora (2024)

## 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA

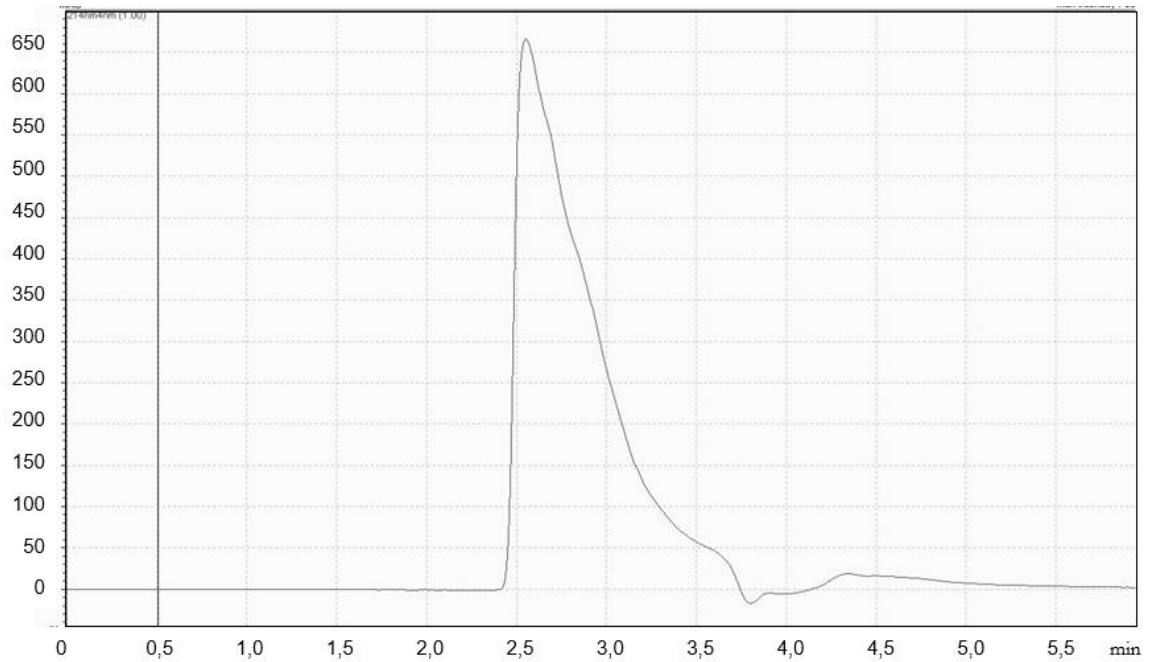
### 5.4.1 Curva Analítica de IgG

Para a quantificação da IgG nas amostras, foi construída uma curva analítica (Figura 9) utilizando soluções de concentrações conhecidas de uma IgG fornecida pela Hemobrás: Branco (0 mg/mL), 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,6 mg/mL, 3,2 mg/mL e 6,4 mg/mL. Os cromatogramas obtidos apresentaram um tempo de retenção médio de 2,55 min para a IgG, demonstrado na Figura 10.

**Figura 9-** Curva analítica dos padrões de IgG com concentrações de 0 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,6 mg/mL, 3,2 mg/mL e 6,4 mg/mL.



Fonte: A autora (2025)

**Figura 10-** Cromatograma do Padrão IgG.

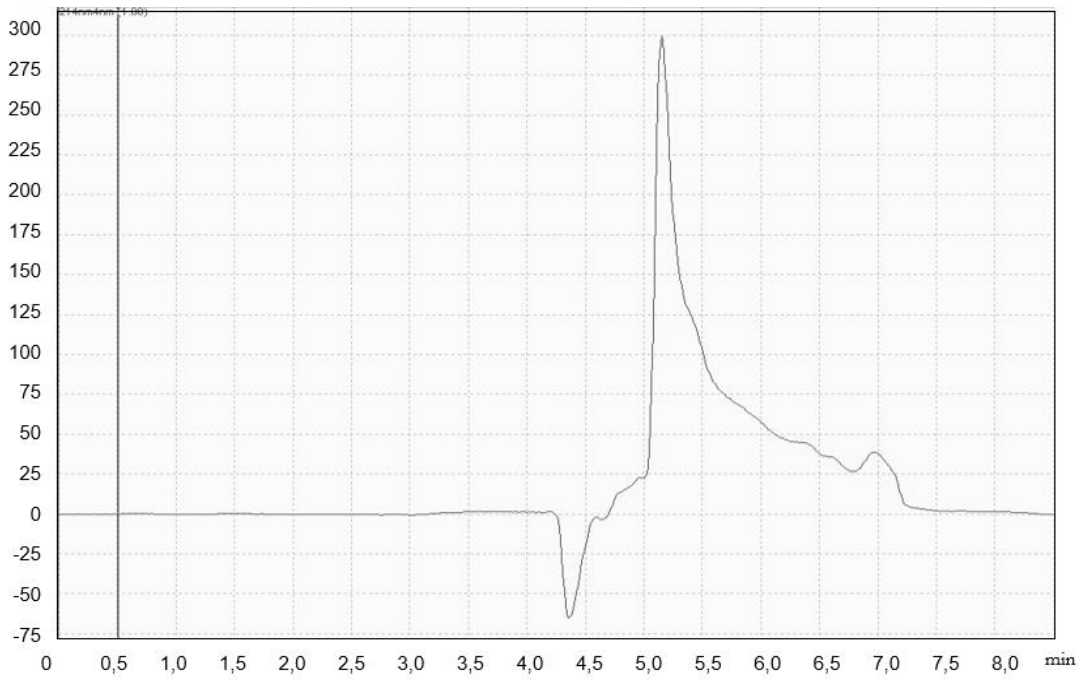
Fonte: A autora (2025)

A área sob os picos foi utilizada para construção da curva analítica, permitindo a correlação entre área e concentração de IgG. Essa curva será utilizada para o cálculo da concentração da IgG nas amostras obtidas do plasma pelo S DFA.

#### 5.4.2 Análise das Amostras de IgG obtidas do plasma pelo S DFA

O branco utilizado continha todos os componentes do S DFA, exceto a amostra de IgG obtida do plasma. O cromatograma (Figura 11) correspondente mostrou picos indicando a presença da fase PEG com tempo de retenção iniciando em aproximadamente 4 minutos.

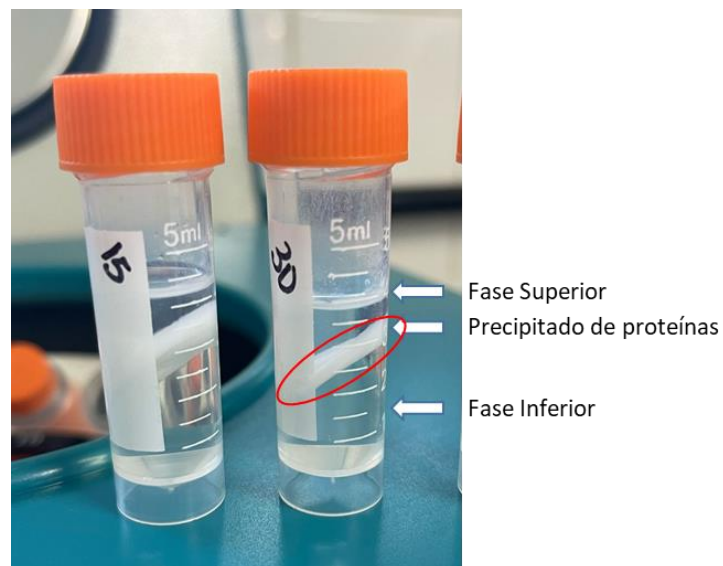
**Figura 11-** Cromatograma da Fase PEG do S DFA sem a presença da IgG obtida do plasma.



Fonte: A autora (2025)

Após a centrifugação, a amostra de IgG obtidas do plasma pelo SDFA foi separada em três fases: Fase salina (inferior), Fase PEG (superior), precipitado de proteínas - massa branca homogênea (fase intermediária) como apresentado na Figura 12.

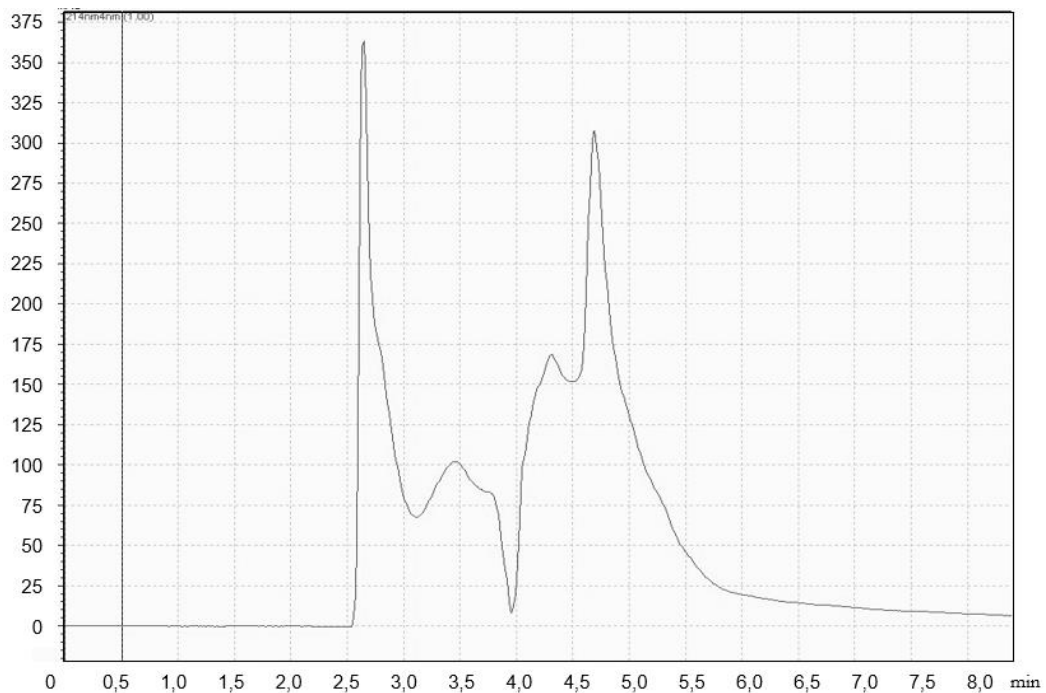
**Figura 12-** SDFA das amostras de plasma pós centrifugação evidenciando formação de precipitado de proteínas da fase PEG.



Fonte: A autora (2025)

A fase intermediária, foi isolada e diluída em 100 µL de água destilada, seguida da adição de ácido caprílico (5%) e filtração (filtro Millipore 0,22 µm). No cromatograma da Figura 13 pode ser verificado um pico expressivo de IgG com tempo de retenção em torno de 2,55 min, indicando alta concentração de IgG nessa fase intermediária. O Cromatograma também mostra a fase PEG após o pico de IgG no tempo de retenção iniciando em aproximadamente 4 minutos, como constado no cromatograma do branco da Figura 11.

**Figura 13-** Cromatograma do precipitado de proteínas da amostra de IgG obtida do plasma.

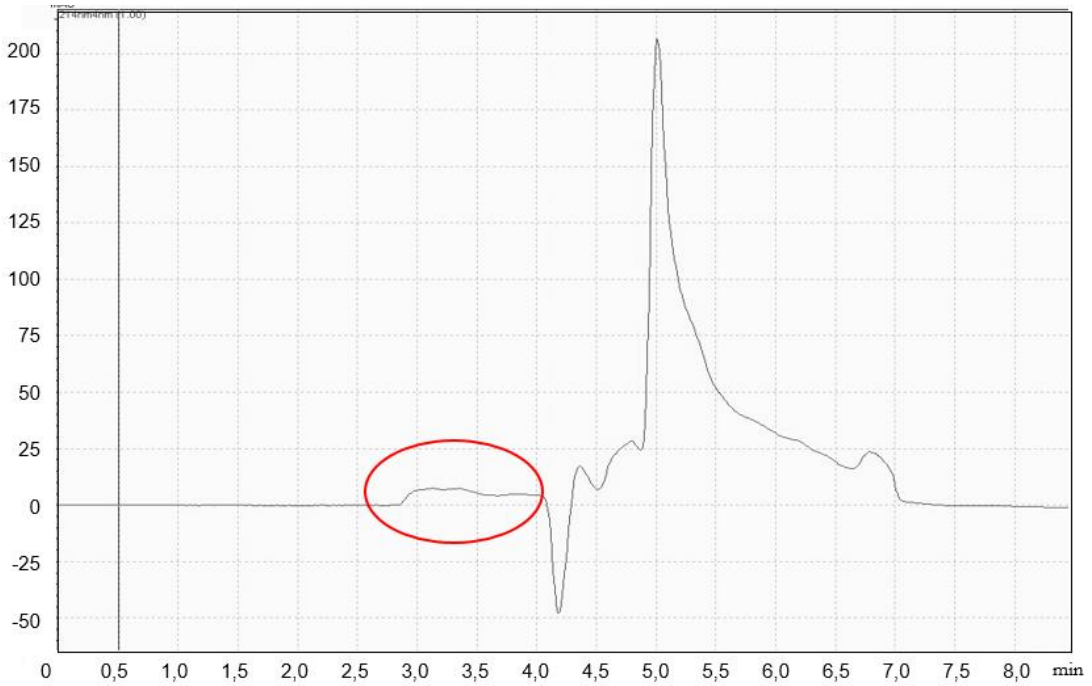


Fonte: A autora (2025)

Também foi analisado a fase superior (PEG) e a fase inferior (Sal). A análise da fase PEG da amostra de plasma submetida ao SDFA (Figura 14) revelou um pico reduzido na região correspondente à IgG, confirmando que a maior parte da IgG, de fato, precipitou na fase intermediária.

**Figura 14-** Cromatograma da fase Superior (PEG) do SDFA.

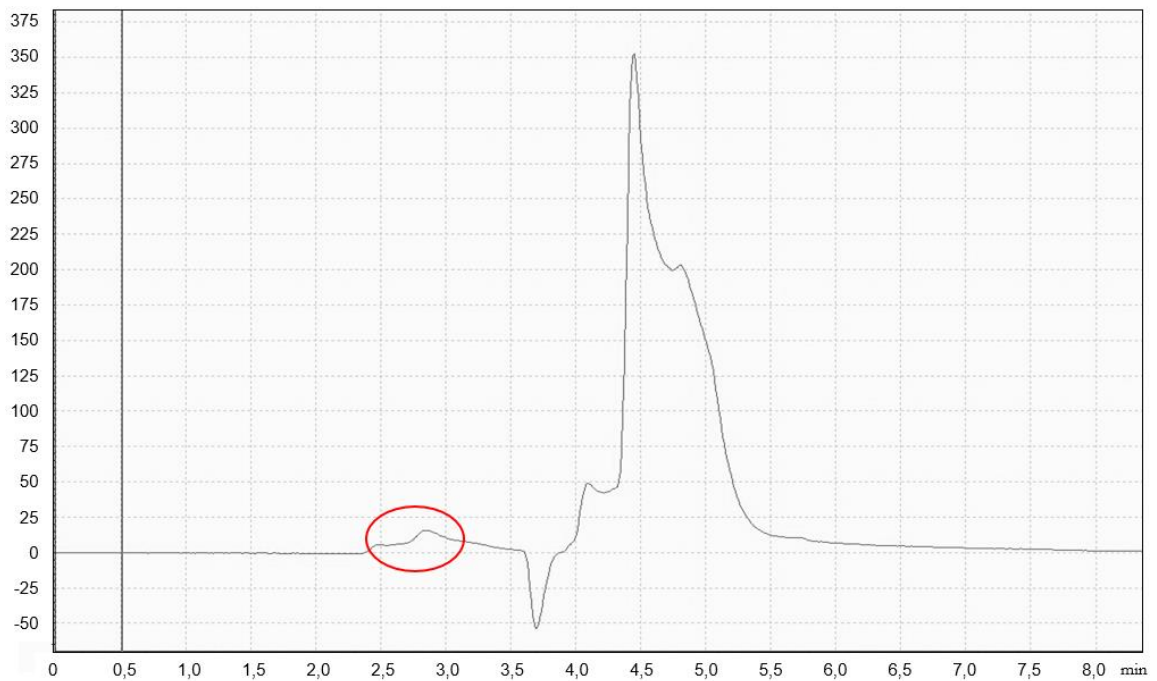




Fonte: A autora (2025)

Por fim, a fase salina foi analisada (Figura 15) e apresentou um pico mínimo de IgG, reforçando a retenção preferencial da IgG na fase PEG.

**Figura 15-** Cromatograma da fase Inferior (Sal) do S DFA.



Fonte: A autora (2025)

Utilizando a curva analítica obtida previamente (Figura 9), foram realizados os cálculos para determinação da concentração de IgG nas diferentes fases da amostra obtida pelo SDFa. O valor calculado para a fase intermediária, em que consta o precipitado de proteínas da fase PEG, foi 1,93 mg/mL. Para a fase PEG superior e fase Sal as áreas dos picos calculadas foram consideravelmente menores que as usadas para montar a curva padrão, portanto, ambas têm concentrações menores que 0,4 mg/mL.

A concentração de IgG do precipitado de proteína (fase intermediária) foi previamente diluída. Portanto, devido às diluições realizadas durante o processamento, foi necessário aplicar o fator de diluição total para determinar a concentração real da IgG na amostra original. Inicialmente, 400 µL do precipitado da fase PEG foram diluídos em 100 µL de água destilada, seguido por uma nova diluição onde 450 µL dessa mistura foram combinados com 50 µL de ácido caprílico e 500 µL de água, totalizando um fator de diluição de 2,78. Assim, a concentração corrigida da IgG na amostra original foi calculada como 5,36 mg/mL.

Em um estudo conduzido por Vargas *et al.* (2012), a purificação de IgG e albumina a partir de plasma humano foi realizada utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFa) polímero/fosfato. O rendimento final de IgG obtido foi de 7 g/L, com 70% de recuperação. O processo incluiu uma etapa inicial de precipitação de IgG com ácido caprílico e centrifugação, seguida por cromatografia de troca iônica (AEC), a qual foi empregada para melhorar a pureza e otimizar o rendimento final da IgG.

De maneira semelhante, embora o rendimento final de IgG obtido no estudo de Vargas *et al.* tenha sido superior (7 g/L) em comparação com o obtido neste trabalho, que foi de 5,36 g/L, ambos os métodos mostraram boa eficiência na recuperação de IgG a partir do plasma. A principal diferença entre os estudos está no uso da cromatografia de troca iônica (AEC) no estudo de Vargas *et al.*, o que contribuiu para um aumento na pureza da IgG. O menor rendimento de IgG observada no presente estudo pode estar relacionada à separação e ressuspensão do precipitado formado na fase superior, o que indica a necessidade de otimização desta etapa do processo. Mesmo assim, os resultados obtidos são favoráveis quando comparados a métodos tradicionais de fracionamento, como a fração Cohn (3–4 g/L, com 20–50% de recuperação) ou os procedimentos de cromatografia (4–4,5 g/L, com 30–65% de recuperação).

Os resultados indicam que, após a centrifugação, a IgG ficou predominantemente retida na fase intermediária do PEG, com pouca presença na fase superior do PEG e quase nenhuma na fase salina. Esse comportamento sugere que a metodologia utilizada foi eficaz na

separação da IgG, embora ajustes possam ser necessários para otimizar a recuperação e a pureza.

A precipitação da IgG na fase intermediária pode ser explicada por uma combinação de fatores termodinâmicos e interações moleculares. O pH do sistema é 7, e dado que o ponto isoelétrico da IgG é de 6,9, nesse intervalo de pH as IgG estão predominantemente em sua forma neutra, o que pode influenciar suas interações com as fases do sistema bifásico. A solubilidade da proteína é afetada pela interação com os componentes da fase superior e inferior, especialmente o PEG, um polímero hidrofóbico, induz a exclusão de solvente ao formar o sistema bifásico, o que reduz a solubilidade das proteínas e pode favorecer a agregação das moléculas de IgG (Vargas et al., 2012).

A presença de NaCl também pode influenciar o particionamento das proteínas. A adição de NaCl reduz a água livre disponível para solvatação, aumentando a hidrofobicidade das proteínas e favorecendo sua interação com o PEG na fase superior. O efeito de volume excluído causado pelo PEG e pela presença de NaCl resulta em uma concentração mais alta de proteínas na fase intermediária, o que explica a precipitação da IgG nessa fase. Esse comportamento está em linha com estudos anteriores, como o de Rito-Palomares *et al.* (1997), que demonstraram que a IgG tende a se particionar para a fase rica em PEG, formando um precipitado.

Além disso, o ácido caprílico interage com as superfícies hidrofóbicas das proteínas, promovendo sua precipitação. As globulinas  $\alpha$  e  $\beta$  formam complexos insolúveis com ácidos graxos de cadeia curta, mas a globulina  $\gamma$  não é afetada de forma similar. Essa característica foi importante para o processo de purificação, no qual proteínas como a IgA, IgM e albumina são precipitadas com ácido caprílico, enquanto a IgG é separada devido às suas propriedades hidrofóbicas. O ácido caprílico também pode ajudar na inativação de vírus com envelope lipídico, aumentando a segurança do processo de purificação (Bertolini *et al.*, 2012).

A centrifugação foi determinante na formação da fase intermediária. Em testes preliminares, onde o sistema foi deixado em repouso por até 24 horas, não foi observada a separação dessa fase pastosa, sugerindo que a força centrífuga foi fundamental para a coalescência e agregação das moléculas de IgG. Esse efeito da centrifugação está relacionado à redução do volume livre para solvatação, promovendo a agregação das proteínas e sua retenção na fase intermediária (Vargas et al., 2012).

## 5.5 PROPOSTAS PARA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

Uma possível melhoria no processo de separação e recuperação da IgG seria a otimização das condições de centrifugação. Testar diferentes velocidades e tempos de centrifugação pode ajudar a avaliar o impacto dessas variáveis na formação da fase intermediária e na recuperação da IgG. Essa análise permitiria compreender melhor o papel da força centrífuga no processo de precipitação da IgG, ajudando a ajustar as condições ideais de centrifugação para maximizar a eficiência da separação e da recuperação da proteína.

Além disso, a remoção do PEG das fases do processo poderia ser aprimorada com a exploração de métodos alternativos. A diálise, por exemplo, pode ser testada como uma técnica para separar o PEG da fase superior sem formar precipitados, o que permitiria uma recuperação mais limpa da IgG. Outra opção seria a utilização de precipitação com etanol ou acetona, que pode ser eficaz na remoção do PEG, mas deve ser cuidadosamente avaliada para garantir que a pureza da proteína não seja comprometida (Torres, 2013). A ultrafiltração, por meio de membranas específicas, também pode ser uma alternativa interessante, uma vez que poderia separar o PEG da IgG de forma mais eficiente, preservando a integridade da proteína. A combinação dessas técnicas pode ser explorada de forma complementar, buscando otimizar a recuperação da IgG sem comprometer sua funcionalidade (Bertolini *et al.*, 2012).

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a viabilidade do Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) utilizando PEG 3350, sal fosfato e NaCl para a purificação de IgG hiperimune contra dengue. A adição de ácido caprílico e a filtração mostraram-se etapas fundamentais para a remoção de contaminantes e aprimoramento da seletividade do método. Os resultados obtidos confirmaram que a IgG permaneceu predominantemente na fase intermediária (precipitado da fase PEG), enquanto a fase salina apresentou apenas traços da proteína. A quantificação por HPLC revelou uma concentração final de 5,36 mg/mL, validando a capacidade do sistema em recuperar IgG de forma seletiva.

A formação da fase intermediária foi um aspecto central neste estudo, sendo influenciada por interações entre a IgG, os componentes do sistema bifásico e o ácido caprílico. A otimização das variáveis do processo, como tempo de agitação, repouso e centrifugação, foi essencial para a obtenção de um sistema reprodutível e eficiente.

Os resultados obtidos reforçam a eficiência e aplicabilidade do SDFA na purificação de IgG, sendo uma alternativa viável para a obtenção de proteínas de interesse biotecnológico. Sua relevância para a área de purificação de biomoléculas é significativa, pois o método oferece uma abordagem custo-efetiva, reprodutível e de fácil escalonamento, podendo ser otimizado para diferentes tipos de imunoglobulinas.

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA BRASIL. **Butantan pede registro da vacina contra dengue para Anvisa.** Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2024-12/butantan-pede-registro-da-vacina-contradengue-para-anvisa>. Acesso em: 30 dez. 2024.
- AHMAD, A.; FARID, M.; SHAH, S. A. **Effect of temperature on the partitioning of proteins in aqueous two-phase systems.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 65, p. 32-40, 2023.
- ALBERTSSON, P. Å. **Partition of cell particles and macromolecules.** 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 1986.
- 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.
- BERTOLINI, Joseph; GOSS, Neil; CURLING, John. **Production of plasma proteins for therapeutic use.** John Wiley & Sons, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 34**, de 11 de junho de 2014: Dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 11 jun. 2014. Seção 1, p. 46.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 52 de 2022.** Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br>. Acesso em: 3 dez. 2024.
- BRODSKY, Y. *et al.* **Caprylic acid precipitation method for impurity reduction: an alternative to conventional chromatography for monoclonal antibody purification.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 10, p. 2589-2598, 2012.
- CARVALHO, A. L.; OLIVEIRA, S. M.; TAVARES, A. P. M. **Phase diagrams for PEG + salt aqueous two-phase systems: Influence of temperature and molar mass of PEG.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 46, n. 18, p. 6352-6358, 2007.
- CARVALHO, A. L. *et al.* **The role of caprylic acid in the precipitation of unwanted proteins in biopharmaceutical purification processes.** *Journal of Biotechnology*, v. 156, p. 90-98, 2017.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Dengue: areas with risk.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/areas-with-risk/index.html>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL).** 6. ed. Atlanta: CDC, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl6/index.htm>. Acesso em: 20 dez. 2024.
- CHIN, Y. P. *et al.* **Aqueous Two-Phase Systems for Antibody Purification: New Advances in Biotechnology.** *Journal of Biochemical Engineering*, v. 2022, p. 1–10, 2022.

CHOI, M. *et al.* **Integration of aqueous two-phase system and caprylic acid for the purification of immunoglobulins.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 116, n. 4, p. 832-843, 2019.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L. **Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 68, p. 459–475, 1946.

DA SILVA, F. P. **Estudo termodinâmico e cinético de sistemas de duas fases aquosas aplicados à purificação de biomoléculas.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011

DÍAZ, L. *et al.* **Optimized ELISA techniques for detecting anti-dengue antibodies.** *Viral Immunology*, v. 35, n. 4, p. 213–221, 2022.

ERDMANN, M. *et al.* **Precipitation of unwanted proteins with caprylic acid: impact on purification efficiency.** *Journal of Protein Chemistry*, v. 38, p. 64-71, 2020.

FRESQUET, G. E. S.; OLIVEIRA, G. M. **Aplicações do sistema de duas fases aquosas na purificação de biomoléculas.** *Química Nova*, v. 40, n. 1, p. 81-89, 2017.

GARCÍA-RIVERA, F. *et al.* **Aqueous two-phase systems for bioprocessing: optimizing conditions for high-yield protein purification.** *Biotechnology Advances*, v. 34, p. 724-735, 2016.

GRILO, A. L.; MANTALARIS, A. **The increasingly human and profitable monoclonal antibody market.** *Trends in Biotechnology*, v. 37, n. 3, p. 337–345, 2019.

GRZYBOWSKI, R. A.; HESTER, J. D.; SMITH, M. C. **Advances in immunoglobulin purification techniques.** *Biotechnology Progress*, v. 32, n. 1, p. 1–10, 2016.

GRZYBOWSKI, B. A.; SHIELDS, C. W.; SZYMBOROWSKI, J. **Antibody purification: Challenges and advancements.** *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 673–687, 2016.

GUBLER, D. J. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.** *Trends in Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 100–103, 2012.

HALSTEAD, S. B. **Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology.** *Science*, v. 239, n. 4840, p. 476–481, 2015.

HARRIS, D. C.; HIGGINS, I. J.; PALMER, T. **Techniques in protein purification.** Oxford: Oxford University Press, 1997.

HJERTÉN, S. **Partitioning in aqueous two-phase systems.** *Journal of Chromatography A*, v. 142, n. 1, p. 83-100, 1991.

HOSSEINI, P.; ABADI, P. S.; HOSSEININIA, M. **A systematic review of ELISA-based diagnostics for infectious diseases.** *Journal of Immunological Methods*, v. 494, p. 113048, 2021.

HUSTED, S. et al. **Optimization of aqueous two-phase systems for protein purification.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, n. 5, p. 789-798, 1985.

KAPLAN, H.; LI, X.; BERLINER, N. **Advances in antibody purification: Implications for industrial and clinical settings.** *Nature Biotechnology*, v. 37, n. 9, p. 883–891, 2019.

KARMAKAR, S.; DUTTA, S.; CHATTERJEE, D. **Role of pH in partitioning behavior of proteins in aqueous two-phase systems.** *Separation Science and Technology*, v. 57, n. 7, p. 1183-1195, 2022

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*, p. 241-280, 2020.

KRUSE, T.; MARTIN, J.; THOMPSON, P. **Advances in PEG/salt aqueous two-phase systems for the separation of proteins.** *Separation and Purification Technology*, v. 210, p. 12-22, 2019.

KUNO, G. **Serological diagnosis of dengue virus infections by a standardized enzyme-linked immunosorbent assay: a multicenter study.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 56, n. 4, p. 489–496, 1997.

MACHADO, M. F. S. **Sistemas aquosos bifásicos aplicados à purificação de biomoléculas.** São Paulo: USP, 1999.

MAO, X.; LIU, Q.; ZHOU, H. **Purification of monoclonal antibodies using aqueous two-phase systems.** *Biotechnology Reports*, v. 23, p. e00378, 2019.

MARTÍNEZ, J. *et al.* **ELISA application in validating immunoglobulin purification processes.** *Journal of Applied Biotech*, v. 15, n. 4, p. 210-217, 2020.

MILLER, D. *et al.* **UPLC for the analysis of therapeutic proteins.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 109, n. 1, p. 92–101, 2020.

NAGHADALI, M. *et al.* **Aqueous two-phase systems in the biopharmaceutical industry: applications and optimization strategies.** *Separation Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 281-299, 2021.

NAGHDALI, M.; AHMED, S.; RAZAVI, H. **Application of aqueous two-phase systems for protein partitioning.** *Separation and Purification Reviews*, v. 50, n. 1, p. 78-98, 2021.

NAKAMURA, N.; YOSHIDA, T.; NAKAMURA, Y. **UPLC: A next-generation technology for high-resolution protein analysis.** *Analytical Chemistry*, v. 86, n. 7, p. 3510–3517, 2014.



RAMOS, C. *et al.* **Detection of dengue virus markers and host immune responses: a review of diagnostic methods.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58, n. 6, p. e01522-20, 2020.

RAMOS, M. T.; SILVA, R. A.; GONZÁLEZ, L. G. **Application of aqueous two-phase systems in immunoglobulin separation.** *Journal of Chromatography B*, v. 1138, p. 1–10, 2020.

Rito-Palomares M, Daled C, Lyddiatt A. **Aqueous two-phase fractionation of biological suspensions for protein recovery from bovine blood.** *Biotechnol Tech.*; 12:711–714, 1998.

RODRIGUES, G. D. *et al.* **Application of hydrophobic extractant in aqueous two-phase systems for selective extraction of cobalt, nickel and cadmium.** *Journal of Chromatography A*, v. 1279, p. 13-19, 2013.

RODRIGUES, M. *et al.* **Immunoassays for viral disease diagnostics: Focus on dengue virus.** *Journal of Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 99, n. 3, p. 253–260, 2021.

SALABAT, A. **Phase behavior and partitioning in PEG/salt aqueous two-phase systems.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 21, n. 3, p. 219-230, 2001.

SANTOS, F. *et al.* **Protein purification and integrity verification methods.** *Biotechnology Advances*, v. 49, p. 107–115, 2021.

SARIOL, C. A. *et al.* **Challenges in the development of dengue diagnostics.** *Journal of Virology*, v. 92, n. 6, p. e00453-18, 2018.

SBIM. **Vacinas disponíveis: Dengue.** Disponível em: <https://familia.sbim.org.br/vacinas/vacinas-disponiveis/vacinas-dengue>. Acesso em: 30 dez. 2024.

SES-PE. Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. **Dados epidemiológicos: arboviroses 2022.** Disponível em: <https://portal.saude.pe.gov.br>. Acesso em: 3 dez. 2024.

SILVA, A. F. N. T. **Extração e avaliação do comportamento da imunoglobulina G (IgG) em sistemas de duas fases aquosas.** 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SOUZA, Ranyere Lucena de. **Sistemas aquosos bifásicos formados por constituintes não convencionais: fundamentos termodinâmicos e aplicações biotecnológicas.** 2013. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.

ŠTIMAC, A. *et al.* **Development of Improved High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Residual Caprylic Acid in Formulations of Human Immunoglobulins.** *Molecules*, v. 27, n. 5, p. 1665, 2022.

TAKEDA. **Dengue vaccine Qdenga approved in Brazil.** Disponível em: <https://www.takeda.com>. Acesso em: 30 dez. 2024.

TORRES, Ana Alice de Fátima Nunes. **Estudo da partição de imunoglobulina G em sistemas aquosos bifásicos utilizando PEG/tampão citrato**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2013.

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 sanguinis* 108.2 (2015): 169-177.

VARGAS, Mariángela *et al.* **Purification of IgG and albumin from human plasma by aqueous two phase system fractionation**. *Biotechnology progress*, v. 28, n. 4, p. 1005-1011, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue and severe dengue**. Fact Sheets. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 3 dez. 2024.

ZHANG, X. *et al.* **Advances in immunological detection methods**. *Analytical Biochemistry*, v. 620, p. 45–54, 2021.