



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALINE FERREIRA PINTO

**AVALIAÇÃO DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA CAPACIDADE DE
DO ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO TÂNICO DE PRECIPITAR PROTEÍNAS A PARTIR
DO PLASMA HUMANO**

RECIFE,

2017

ALINE FERREIRA PINTO

**AVALIAÇÃO DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA CAPACIDADE
DE DO ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO TÂNICO DE PRECIPITAR PROTEÍNAS A
PARTIR DO PLASMA HUMANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite.

Co-orientadora: Dr^a. Jéssica Miranda do Nascimento

RECIFE,

2017.

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

P659a Pinto, Aline Ferreira.
Avaliação de fatores que podem influenciar na capacidade do ácido gálico e ácido tânico de precipitar proteínas a partir do plasma humano / Aline Ferreira Pinto. – Recife: o autor, 2017.
126 f.; il; 30 cm.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas.
Inclui referências, figuras, tabelas e gráficos.

1. Plasma. 2. Proteínas do sangue. 3. Precipitação fracionada. 4. Taninos hidrolisáveis. I. Leite, Ana Cristina Lima. (orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 102)

ALINE FERREIRA PINTO

**AVALIAÇÃO DE FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR NA CAPACIDADE
DE DO ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO TÂNICO DE PRECIPITAR PROTEÍNAS A
PARTIR DO PLASMA HUMANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

APROVADA EM 17 / 11 / 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Ana Cristina Lima Leite (Presidente e Examinadora Interna)
(Dep. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. Diogo Ardailon Simões (Examinador Externo)
(Dep. de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dr. Severino Alves Júnior (Examinador Externo)
(Dep. de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco)

*Dedico este trabalho ao meu esposo, José Eduardo, pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.
À minha família, pelo carinho e apoio.
E a todos que tornaram esta jornada possível.*

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes dois anos de mestrado pude contar com o apoio, disposição e grande força de numerosas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este chegasse ao fim.

Agradeço a Deus por me iluminar nessa caminhada.

À minha orientadora, Ana Cristina, pela oportunidade de me integrar à sua equipe. Minha gratidão pela orientação, pela paciência nesta etapa da minha vida, por acreditar em mim e permitir o meu crescimento pessoal, profissional e acadêmico.

À minha co-orientadora, Jéssica, pelo apoio, orientação, conselhos e disponibilidade sempre manifestada.

Ao meu esposo, José Eduardo, pela paciência, torcida, apoio, incentivo e ensinamentos nesta etapa da minha vida. Muito obrigada pela dedicação e amor imprescindíveis nesta fase.

Aos meus colegas de laboratório por todo o apoio, ajuda, amizade e boa disposição que me ofereceram para o bom desenrolar deste trabalho: Renata, Talita, Kalyne, Juliana e Bruno.

À Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), pelo fornecimento da matéria prima utilizada na pesquisa.

À Supervisora de Fracionamento do HEMOPE, Sheila Lucena, pela disponibilidade e apoio.

Ao Laboratório e Tecnologia dos Medicamentos (LTM), Prof. Dr. Pedro Rolim, Lourenço e Larissa, pelo auxílio e disponibilização para o uso de equipamento.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosméticos (NUDFAC), Prof. Dra. Leila, Prof. Dr. Danilo, Geovana e aos colaboradores, que disponibilizaram equipamentos e me auxiliaram quanto à utilização destes.

Ao Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), Prof. Dra. Elba pela e ao Bruno, pela disponibilização de equipamento, ensinamentos e discussões.

À Rubênia, do Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física, pela disponibilidade e discussões.

Ao Lucas (NCQMC), pelos ensinamentos.

Ao Frederico Gouveia, pelo auxílio no início deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação que sempre me trataram de forma acolhedora e fraterna.

Aos professores do programa de pós-graduação por seus valiosos ensinamentos.

Ao meu pai, madrasta e familiares pela torcida, apoio e orgulho que sempre demonstraram, mesmo eu estando distante.

À minha avó, Deolinda, pela importância que tem na minha vida e por sempre desejar o meu bem-estar. É um exemplo de força.

Aos meu sogro e sogra pelo apoio e torcida.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pela ajuda durante estes anos de Mestrado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida durante o período do mestrado.

A todos, um sincero obrigado.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de mais nada, querer”.

Amyr Klink

“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua capacidade de adquirir experiência”.

George Bernard Shaw

RESUMO

Taninos hidrolisáveis são compostos fenólicos que formam estruturas estáveis com proteínas, em determinadas condições estruturais e ambientais, através de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Diante desta característica dos taninos e frente ao aumento da demanda por hemoderivados, cujos processos de produção ocorrem em várias etapas e são de custo elevado, este trabalho visa avaliar a capacidade dos taninos hidrolisáveis de precipitar proteínas. Neste estudo, foram avaliados diferentes fatores que podem influenciar na capacidade do ácido gálico (AG) e do ácido tânico (AT) de precipitar proteínas plasmáticas humanas. Até então, a literatura relata este tipo de precipitação somente com proteínas isoladas. As condições utilizadas para a análise da capacidade de precipitação dos taninos foram realizadas em função do solvente (água e solução etanólica 30%), da ordem de ajuste do pH (antes e após a adição da solução de tanino no plasma), do pH do meio (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 10), da razão tanino/plasma (1 g, 1,5 g e 2 g/100ml) e do tempo de homogeneização (15 e 30 min). Para cada experimento foram realizadas duas precipitações sucessivas. Os precipitados obtidos (P1 e P2) e o último sobrenadante (S2) foram utilizados para a avaliação das condições de precipitação. A análise dos produtos obtidos foi feita através das técnicas de eletroforese PAGE nativo, de quantificação proteica pelo método de Bradford, do potencial zeta e de espalhamento dinâmico de luz. As diferentes condições realizadas neste estudo permitiram estabelecer os melhores parâmetros para a precipitação de proteínas plasmáticas utilizando taninos. Para o AG, a solução etanólica demonstrou maior eficiência como solvente, com 63,8% das proteínas no P1. Porém, este tanino demonstrou baixa solubilidade e menor interação com as proteínas, sendo a razão AG/plasma 1,5 insuficiente para precipitar todas as proteínas em duas etapas de precipitação. Assim, os experimentos com o AG foram descontinuados. Nos ensaios com o AT, a água mostrou ser o solvente mais adequado, com 74,8% das proteínas no P1. O ajuste de pH depois da adição da solução de AT propiciou a estabilidade do pH e maior formação de precipitado proteico. Nas variações de pH, as precipitações foram influenciadas pelos pHs próximos aos pontos isoelétricos da albumina e da IgG, respectivamente no pH 4,5, com P1=88,86% P2=11,14% e, no pH 7,0, com P1=

47,27% e P2= 50,48% das proteínas. Contudo, houve formação de precipitados em todas as condições de pHs testados. As imagens de eletroforese mostraram a predominância de três bandas – gamaglobulina, alfa-1 e albumina – nos dois precipitados, independente dos pHs utilizados. Com o aumento da razão AT/plasma, houve um aumento progressivo de precipitado proteico na primeira etapa de precipitação. Em relação ao tempo de homogeneização, 15 minutos mostrou ser suficiente para precipitar todas as proteínas do meio, com 72,3% destas no P1. Diante dos resultados obtidos, concluímos que os taninos hidrolisáveis são efetivos como precipitantes de proteínas plasmáticas humanas. Adicionalmente, foi verificado que o ácido tânico é mais eficiente na precipitação quando comparado ao ácido gálico.

Palavras-chave: Plasma. Proteínas do sangue. Precipitação Fracionada. Taninos Hidrolisáveis.

ABSTRACT

Hydrolysable tannins are phenolic compounds that form stable structures with proteins, under certain structural and environmental conditions, through hydrophobic interactions and hydrogen bonds. In view of this characteristic of tannins and the increasing demand for blood products, whose production processes occur in several stages and are of high cost, this work aims to evaluate the hydrolyzable tannins capacity to precipitate proteins. In this study, were evaluated different factors that may influence the capacity of gallic acid (GA) and tannic acid (TA) to precipitate human plasma proteins. Until now, the literature reports this type of precipitation only with isolated proteins. The conditions used for the analysis of the tannin precipitation capacity were performed as a function of the solvent (water and ethanolic solution 30%) of the order of pH adjustment (before and after the addition of the tannin solution in the plasma), environment ph (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 10), of the tannin/plasma ratio (1 g, 1,5 g e 2 g/100ml) and homogenization time (15 and 30 min). For each experiment, two successive precipitations were performed. The precipitation obtained (P1 and P2) and the last supernatant (S2) were used for the evaluation of precipitation conditions. The analysis of the obtained products was done through the techniques of native PAGE electrophoresis, and protein quantification by the Bradford method, zeta potential and dynamic light scattering. The protein quantification allowed the evaluation of the influence of all the variations applied, according to the yield of precipitate in each precipitation step. The zeta potential and dynamic light scattering, provided information on the variation of fillers and tannins complexation with proteins as a function of pH. The electrophoresis images provided information on precipitated proteins according to their charges and sizes. The different conditions performed in this study allowed to establish the best parameters for precipitation of plasma proteins using tannins. For GA, the ethanolic solution demonstrated greater efficiency as solvent, with 63.8% of proteins in P1. However, this tannin demonstrated low solubility, less interaction with proteins, being the AG/plasma ratio of 1,5 insufficient to precipitate all the proteins in two steps of precipitation. Thus, experiments with GA were discontinued. In the TA tests, water was the most suitable solvent, with 74.8% of the proteins in P1. The pH adjustment after addition of the TA solution provided pH stability

and increased formation of protein precipitate. In pH variations, the precipitations were influenced by the isoelectric points of albumin and IgG, respectively at pH 4.5, with P1=88.86% and P2=11.14% and, at pH 7.0, with P1=47.27% and P2=50.48% of the proteins. However, there was precipitate formation at all pHs conditions tested. The electrophoresis images showed the predominance of three bands - gamma globulin, alpha-1 and albumin - in the two precipitates, independent of the pHs used. With the increase AT / plasma ratio increase, occurred a progressive increase of protein precipitate in the first stage of precipitation. Regarding the homogenization time, 15 minutes showed to be sufficient to precipitate all the proteins from the medium, with 72.3% of these in P1. According to the results obtained, we conclude that the hydrolyzable tannins are effective as precipitants of human plasma proteins. In addition, tannic acid has been found to be more efficient at precipitation when compared to gallic acid.

Keywords: Plasma. Blood Proteins. Fractional Precipitation. Hydrolyzable Tannins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aumento da demanda mundial de plasma para suprir a produção de albumina, Fator VIII e Imunoglobulina G polivalente intravenosa (IVIG), entre 1974 e 2014, em milhões de litros.....	26
Figura 2 - Esquema para precipitação de proteínas plasmáticas desenvolvido por Edwin Cohn (1946).....	29
Figura 3 - Composição do sangue total, do plasma e das proteínas sanguíneas.	32
Figura 4 - Ciclo do sangue, desde a seleção de candidatos à doação até o fracionamento pela indústria de hemoderivados.....	33
Figura 5 - Organização estrutural da Albumina.....	37
Figura 6 - A estrutura da Imunoglobulina.	39
Figura 7 - Estruturas de taninos condensados ((a) procianidina, (b) proantocianidina e (c) catequina.....	45
Figura 8 - Estruturas de taninos hidrolisáveis de galotaninos [(a) ácido gálico, (b) acertanina, (c) Pentagaloil glucose], e elagitaninos: [(d) ácido elágico].	46
Figura 9 - Estrutura molecular do ácido gálico.	47
Figura 10 - Estrutura molecular do ácido tânico.....	48
Figura 11 - Os mecanismos de interação entre taninos e proteínas.	53
Figura 12 - Possíveis mecanismos (i e ii) envolvidos na inibição da agregação de taninos (T) e proteínas (P) por carboidratos (C).....	55
Figura 13 – Etapas da técnica de eletroforese PAGE nativo: (a) polimerização do gel, (b) colocação do gel no suporte, (c) suporte com gel dentro da cuba e (d) cuba montada com o gel e ligada à fonte de energia.....	58

Figura 14 - Padrão de eletroforese PAGE nativo de proteínas plasmáticas: (a) padrão de bandas de proteínas plasmáticas, (b) amostra de plasma de um indivíduo sadio e (c) Conversão das bandas de eletroforese em um eletroferograma.	60
Figura 15 - Representação esquemática da distribuição de cargas e formação da dupla camada elétrica que circunda uma partícula em meio aquoso. O potencial zeta é formado no plano de cisalhamento.	64
Figura 16 - Variações utilizadas nos experimentos: (1) solubilizantes para os taninos, (2) ordens de ajuste de pH, (3) concentrações dos taninos, (4) tempos de homogeneização e (5) ajustes de pH.....	70
Figura 17 - Fluxograma geral do processo de produção de pastas brutas de proteínas plasmáticas.	71
Figura 18 – Imagens dos taninos (pó) utilizados para precipitação de proteínas plasmáticas (em cima) e de suas respectivas pastas brutas obtidas (a baixo). À esquerda está o ácido tânico e à direita, o ácido gálico.	77
Figura 19 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo: (a) plasma, (b) precipitação utilizando solução aquosa de AT e (c) precipitação utilizando solução aquosa de AG.	78
Figura 20 – Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes solubilizantes para o AT: (a) Água, (b) Solução etanol em água 30% e (c) Solução etanólica 30%, sem adição de tanino.....	83
Figura 21 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes solubilizantes para o AG: (a) Água, (b) Solução etanol em água 30% e (c) Solução etanólica 30%, sem adição de tanino.....	85
Figura 22 - Estabilidade dos pHs com a realização dos ajustes de pH antes da adição dos taninos, nos sobrenadantes I e II. Os pHs foram ajustados para 6,9 e 4,9, respectivamente.	88

Figura 23 - Estabilidade dos pHs com a realização dos ajustes de pH depois da adição dos taninos, nos sobrenadantes I e II. Os pHs foram ajustados para 6,9 e 4,9, respectivamente.	88
Figura 24 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes ordens de ajuste de pH, (a) antes e (b) depois da adição da solução aquosa de AT.....	89
Figura 25 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes concentrações de AT: (a) 1,0 %, (b) 1,5% e (c) 2,0%.	91
Figura 26- Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes tempos de homogeneização: (a) 15 min, (b) 30 min.	92
Figura 27 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes pHs: (a) 3,0, (b) 4,0, (c) 4,5, (d) 5,0, (e) 5,5, (f) 6,0, (g) 6,5, (h) 7,0, (i) 7,5, (j) 10,0.	95
Figura 28 - Representação de alterações da estrutura conformacional proteica em função do pH do meio em que se encontra, utilizando como exemplo a BSA.	98
Figura 29 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações de IgG, realizadas utilizando diferentes pHs: (a) 4,0, (b) 4,5, (c) 5,0, (d) 5,5, (e) 6,0, (f) 6,5, (g) 7,0, (h) 7,5.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de proteínas totais e das principais frações de proteínas presentes no plasma de um indivíduo normal.....	61
Tabela 2 - Composição dos géis para eletroforese PAGE nativo.....	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva padrão de BSA (0,01 - 0,1 mg/ml), dada a equação da reta $y = 8,4456x + 0,0344$, com $R^2 = 0,9976$	80
Gráfico 2- Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, utilizando diferentes agentes solubilizantes para o AT: água, solução etanólica 30% e solução etanólica 30% sem adição de tanino.	83
Gráfico 3 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, utilizando diferentes agentes solubilizantes para o AG: água, solução etanólica 30% e solução etanólica 30% sem adição de tanino.	85
Gráfico 4 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, utilizando diferentes ordens de ajuste de pH para o AT: antes e depois da adição do tanino.....	90
Gráfico 5 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, das precipitações realizadas utilizando diferentes razões de AT/P: 0,01, 0,015 e 0,02.	91
Gráfico 6- Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, das precipitações realizadas utilizando diferentes tempos de homogeneização: 15 min e 30 min.....	93
Gráfico 7 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, das precipitações realizadas utilizando diferentes pHs: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 10.	95
Gráfico 8 - Distribuição (%) da quantidade de IgG precipitada nos P1, P2 e S2, para avaliação das precipitações realizadas utilizando diferentes pHs: 4,0; 4,5; 5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5.	99

Gráfico 9 – Demonstra a relação entre o raio hidrodinâmico dos complexos de IgG (medido pela intensidade de espalhamento de luz) e as diferentes condições de pH.	101
Gráfico 10 - Variações do potencial zeta da IgG, do ácido tânico e da mistura de IgG e ácido tânico, em diferentes pHs.	101
Gráfico 11 – Distribuição do tamanho de partícula do complexo IgG/AT em função do pH.....	102

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Ácido gálico
AG/P	Ácido gálico/proteína
AIDS/SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Anti-Rho (D)	Anticorpo (IgG) específico que atua contra o fator Rhesus tipo D;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Persulfato de Amônio
AT	Ácido tânico
AT/P	Ácido tânico/proteína
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BSA	Albumina sérica bovina
C _{H1}	Domínio constante 1 da porção Fc
C _{H2}	Domínio constante 2 da porção Fc
C _{H3}	Domínio constante da cadeia pesada da porção Fab
C _L	Domínio constante da cadeia leve
COOH	Grupo carboxílico
CPMP	Comitê de Medicamentos para Uso Humano
EDL	Espalhamento Dinâmico de Luz
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
F _{ab}	Fragmento variável
F _c	Fragmento constante
FDA	Agência Reguladora de Alimentos e Medicamentos
FII	Fator II da coagulação

FIX	Fator IX da coagulação
FVII	Fator VII da coagulação
FVIII	Fator VIII da coagulação
FvW	Fator de von Willenbrand
FX	Fator X da coagulação
GBS	Síndrome de Guillain Barré
HCl	Ácido clorídrico
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSA	Albumina sérica humana
IgG	Imunoglobulina G
IMIG	Imunoglobulina intramuscular
IVIG	Imunoglobulina intravenosa
kDa	Kilo daltons
NaOH	Hidróxido de sódio;
OH	Hidroxila
P1	Precipitado II
P2	Precipitado II
PAGE nativo	Eletroforese em gel de poliacrilamida sem dodecil-sulfato de sódio
PAHO/OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PC	Plasma comum
PFC	Plasma fresco congelado
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PIC	Plasma isento de crioprecipitado

pKa	Constante de dissociação de um ácido
PPSB	Complexo Protrombínico
PRS	Proteínas Remanescentes no plasma
PTP	Proteínas totais no plasma
PVP	Polivinilpirrolidona
q.s.p.	quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RPM	Rotações por minuto
S2	Sobrenadante II
SCIG	Imunoglobulina subcutânea
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
T/P	Tanino/proteína
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	Tetrametilenodiamina
UI	Unidades internacionais
V _H	Domínio variável da cadeia pesada
VHC	Vírus da hepatite C
V _L	Domínio variável da cadeia leve
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

D	Difusão translacional
k	Constante de Boltzmann
n	Viscosidade
T	Temperatura
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
2.1 HEMODERIVADOS	28
2.1.1 Os Hemoderivados num contexto mundial.....	28
2.1.2 O Processo de Fabricação dos Hemoderivados	32
2.2 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	36
2.2.1 Albumina	36
2.2.2 Imunoglobulina G (IgG).....	38
2.2.3 Fator VIII da Coagulação (FVIII).....	40
2.2.4 Fator IX da Coagulação (FIX).....	41
2.2.5 Fator de von Willebrand (FvW).....	42
2.2.6 Complexo Protrombínico (PPSB).....	43
2.3 TANINOS	44
2.3.1 Ácido Gálico (AG).....	46
2.3.2 Ácido Tânico (AT).....	48
2.4 UTILIZAÇÃO DE TANINOS PARA PRECIPITAR PROTEÍNAS.....	49
2.5 INTERAÇÃO TANINO-PROTEÍNA	51
2.6 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO T/P	55
2.6.1 Precipitação de proteínas.....	55

2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	56
2.6.3 Quantificação de proteínas	60
2.6.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ)	61
3 OBJETIVOS	66
3.1 GERAL	66
3.2 ESPECÍFICOS	66
4 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 OBTENÇÃO DO PLASMA	67
4.2 MATERIAIS	67
4.3 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS PARA AS PRECIPITAÇÕES.....	68
4.4 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS UTILIZANDO ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO TÂNICO	69
4.5 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS FRACIONADAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE (PAGE) NATIVO	72
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	73
4.6.1 Preparo da curva de calibração de BSA	73
4.6.2 Quantificação das amostras dos sobrenadantes I e II	74
4.6.3 Cálculo das concentrações proteicas	74
4.7 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS PASTAS BRUTAS	76

5.2 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	77
5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	79
5.3.1 Curva de calibração	79
5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS SOLUBILIZANTES PARA O AT E AG NAS PRECIPITAÇÕES	81
5.4.1 Solubilização dos taninos	81
5.4.2 Influência dos solubilizantes dos AT e AG nas precipitações	82
5.5 INFLUÊNCIA DA ORDEM DE AJUSTE DE PH, ANTES OU APÓS O ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DE AT	87
5.6 INFLUÊNCIA DA RAZÃO ÁCIDO TÂNICO/PROTEÍNA NAS PRECIPITAÇÕES	90
5.7 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE HOMOGENEIZAÇÃO NAS PRECIPITAÇÕES ...	92
5.8 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES PHS NAS PRECIPITAÇÕES DE PROTEÍNAS	94
5.8.1 Avaliação do perfil de precipitação de proteínas plasmáticas pelo AT em diferentes pHs	94
5.8.2 Avaliação do perfil de precipitação de IgG pelo AT em diferentes pHs	98
5.9 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO AT/IGG POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL) E POTENCIAL ZETA (Z).....	100
6 CONCLUSÃO	104
7 PERSPECTIVAS.....	106
REFERÊNCIAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

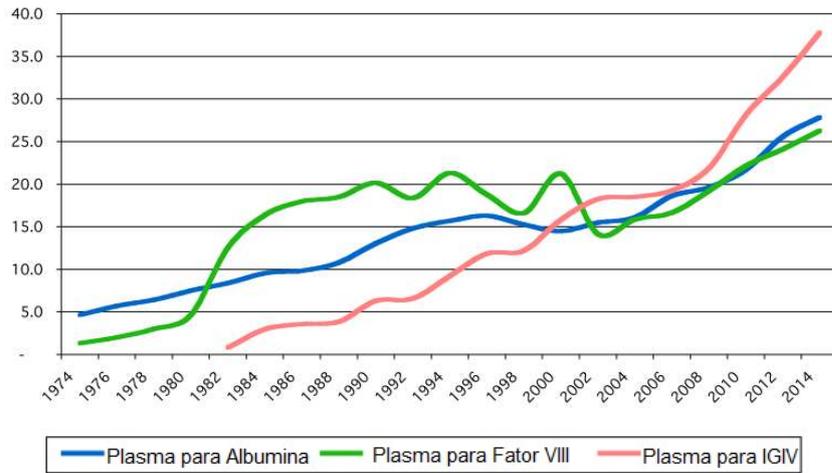
O processo de fracionamento do plasma foi desenvolvido por Edwin Cohn na década de 40 e teve seu avanço com a produção industrial de albumina humana (ROBERT, 2011). O método de Cohn (1946), o mais utilizado na sua forma original ou com algumas alterações (BURNOUF, 2016), utiliza uma mistura de etanol a frio em diferentes concentrações, controle de pH e temperatura para obter frações distintas de proteínas plasmáticas. Porém, altas concentrações de etanol podem alterar a conformação da proteína e formar agregados insolúveis, processo chamado de desnaturação. Isso altera a funcionalidade da maioria dos fatores de coagulação e inibidores de protease (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013).

Com a evolução das metodologias de fracionamento, outras proteínas foram sendo fracionadas e produzidas em escala industrial. Dentre os produtos derivados do plasma estão a albumina, imunoglobulinas poliespecíficas e hiperimunes, vários fatores de coagulação, anticoagulantes e inibidores de protease (BURNOUF, 2016).

O aumento da demanda mundial de plasma para a produção de hemoderivados demonstra o crescente consumo de proteínas plasmáticas (figura 1). Entre 1984 e 2014, a demanda mundial de albumina aumentou de 267,1 para 780,1 toneladas; a de imunoglobulinas subcutânea e intravenosa, de 15,7 para 43,6 toneladas e de fator VIII, de 1,308 para 3,842 milhões de unidades internacionais (ROBERT, 2015). Esse aumento se deve às crescentes necessidades terapêuticas que utilizam proteínas plasmáticas como forma de tratamento (FARRUGIA, 2014). Fatores como o aumento e melhoria do diagnóstico e identificação dos pacientes, maior disponibilidade dos produtos, diferentes apresentações, conscientização dos médicos quanto aos seus usos e o uso *off label*¹ criam perspectivas para um maior crescimento da demanda.

¹ Prescrição de um medicamento aprovado pela agência reguladora (ANVISA no Brasil), mas para uma indicação não aprovada e não constante na bula do produto (BRASIL. ANVISA, 2005).

Figura 1 - Aumento da demanda mundial de plasma para suprir a produção de albumina, Fator VIII e Imunoglobulina G polivalente intravenosa (IVIG), entre 1974 e 2014, em milhões de litros.



Fonte: Robert, 2014.

Os processos atuais de produção dos hemoderivados envolvem várias etapas e utilizam tecnologias de custos elevados (BURNOUF, 2016). Esses fatores e o aumento da demanda de proteínas plasmáticas cria a necessidade de rever as metodologias já utilizadas e buscar uma nova alternativa para o fracionamento de proteínas, seja com novas metodologias ou utilizando métodos complementares aos atuais, com o objetivo de melhorar seus rendimentos, sua produtividade e sua eficiência.

Os taninos são compostos fenólicos solúveis em água e muito conhecidos pela capacidade de complexar e precipitar proteínas (BATE-SMITH; SWAIN, 1962). São conhecidos devido ao seu uso no curtimento de couro, produção de vinho, cerveja (CANNAS, 2015), e também por apresentarem inúmeras atividades biológicas (AKINYEMI et al., 2015; CHUNG et al., 1998; DORES, 2007; KIM et al., 2010a). Além das características bioquímicas e físicas das proteínas e taninos (estrutura química, carga proteica, ponto isoelétrico), a concentração de ambos os compostos e o pH do meio influenciam na precipitação (ADAMCZYK et al., 2012).

A partir da literatura, constatamos que os taninos foram até então utilizados para precipitação de proteínas isoladas, em especial a albumina sérica bovina (BSA) (HAGERMAN; BUTLER, 1978; OSAWA; WALSH, 1993; HOFFMANN; MUETZEL; BECKER, 2002; ADAMCZYK et al., 2012; XIAO; KAI, 2012). Esse fato despertou

nosso interesse em avaliar a capacidade de precipitação proteica dos taninos hidrolisáveis, utilizando como matéria prima o plasma humano, que contém um pool de proteínas plasmáticas. Dentre os taninos hidrolisáveis, os ácidos gálico e tânico foram definidos para a realização deste estudo, uma vez que são recorrentes na literatura sobre precipitação proteica, bem como pelo baixo custo (HAGERMAN; BUTLER, 1980; DAWRA; MAKKAR; SINGH, 1988; VERZA, 2006; ADAMCZYK et al., 2011, 2012).

Desta forma, pretendemos avaliar a influência de solubilizantes e concentrações dos taninos, o pH de melhor desempenho de precipitação e a eficiência dos taninos como agentes precipitantes de proteínas plasmáticas. Além dessas informações, poderemos também analisar fatores que influenciem na formação do complexo tanino-proteína.

Neste contexto, a propriedade de precipitação proteica dos taninos pode representar sua inserção como tecnologia alternativa de precipitação de proteínas plasmáticas. Ademais, vislumbra-se a possibilidade de redução de etapas no processo de produção de hemoderivados. As ações antimicrobiana (AKIYAMA et al., 2001; CHUNG et al., 1998; KIM et al., 2010) e antifúngica (DORES, 2007) dos taninos também podem propiciar uma maior segurança às formulações.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HEMODERIVADOS

2.1.1 Os Hemoderivados num contexto mundial

O sangue está ligado à concepção e à sustentabilidade da vida, despertando o interesse dos homens há muito tempo (CAIRUTAS, 2001). As práticas de sua utilização eram baseadas na intuição e senso comum (FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE, 2017). Com o passar do tempo surgiu o seu uso com finalidade terapêutica.

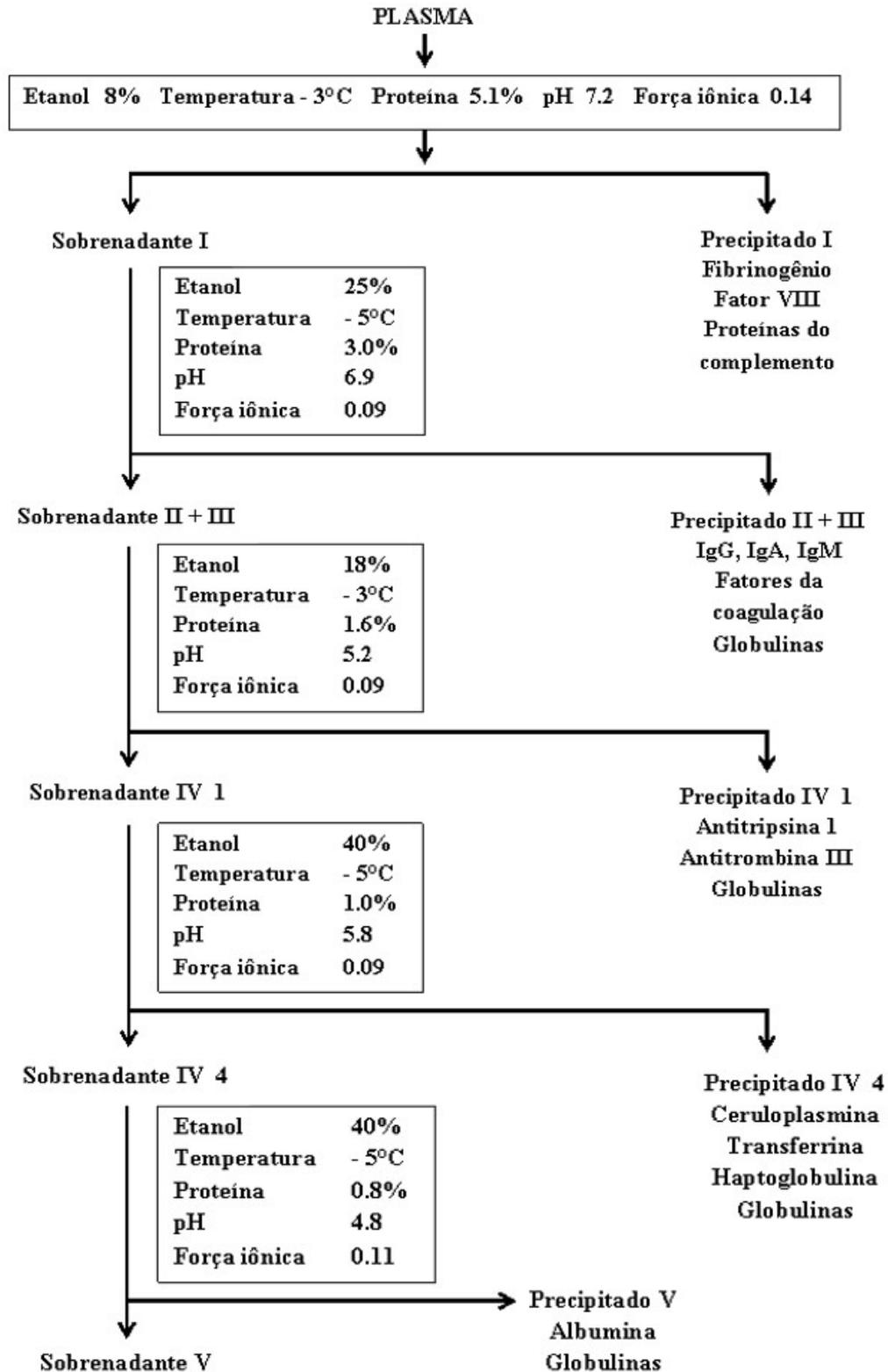
De acordo com Martins (2014), a hemoterapia vem sendo utilizada há muitos anos em vários procedimentos médicos e tratamentos de doenças, utilizando o sangue, seus componentes e seus derivados. Os hemocomponentes e hemoderivados são obtidos do sangue humano após doação. A ANVISA em sua Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) N°46/2000, define que:

Hemocomponentes: é a parte de uma unidade de sangue total, separada da mesma por processos físicos (BRASIL, 2000).

Hemoderivados: São produtos farmacêuticos obtidos a partir do plasma humano, submetidos a processos de industrialização e normatização que lhes conferem qualidade, estabilidade, atividade e especificidade (BRASIL, 2000).

As necessidades médicas diante da segunda guerra mundial, conhecimentos bioquímicos das proteínas e a técnica de fracionamento desenvolvida por Edwin Cohn na década de 40, foram fatores propulsores para o surgimento dos derivados plasmáticos. A técnica consiste na utilização de etanol a frio como agente precipitante em diferentes concentrações, variações de pH e força iônica, explorando assim a alta solubilidade e baixo ponto isoelétrico das proteínas plasmáticas para separá-las em frações (figura 2) (COHN et al., 1946).

Figura 2 - Esquema para precipitação de proteínas plasmáticas desenvolvido por Edwin Cohn (1946).



A principal fração proteica obtida pelo método de Cohn, a fração V, era composta basicamente por albumina, muito útil no tratamento de hemorragias como expansor volêmico (AMORIM FILHO, 2013). Logo sua produção cresceu para atender às necessidades da guerra, em substituição ao plasma utilizado em transfusões sanguíneas, facilitando a logística grandiosa e complexa para os campos de guerra (OLIVEIRA, 2016). Esta tecnologia foi difundida pelo mundo, que então começou a produzir albumina em escala industrial na década de 50 (MRB, 2017a).

A descoberta das imunoglobulinas anti-Rho (D) aconteceu depois de 1960, assim como os fatores VIII e IX da coagulação (ROBERT, 2011), melhorando o tratamento e a vida das pessoas com imunodeficiências e hemofilias, respectivamente (AMORIM FILHO, 2013). Na década de 70, Kistler e Nitschmann fizeram modificações na metodologia de Cohn, melhorando o processo de fracionamento. Essas mudanças permitiram obter melhores rendimentos na produção de algumas proteínas. Dentre as mudanças, a purificação de proteínas específicas por processos de cromatografia aumentou os rendimentos, em especial dos fatores de coagulação e das imunoglobulinas (MRB, 2017a).

Na década de 80, com o surgimento do vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS/SIDA), surgem nos EUA os primeiros casos de contaminação de pacientes hemofílicos e transfundidos (AMORIM FILHO, 2013). A confirmação da transmissão desse vírus e do vírus da hepatite C (VHC) demonstrou o potencial de transmissão viral dos derivados do plasma (OLIVEIRA, 2016). Essas descobertas causaram grande impacto e transformação na indústria de fracionamento, visto que a produção de hemoderivados requer um rigoroso controle de qualidade (AMORIM FILHO, 2013; OLIVEIRA, 2016).

Devido à possibilidade dos hemoderivados transmitirem doenças infectocontagiosas e poder agravar o estado clínico do paciente (EMA, 1996; JUNIOR, V. et al., 2011), as vigilâncias sanitárias e governos criaram normas e regulamentações mais estritas para as indústrias de hemoderivados, aumentando as exigências relacionadas às boas práticas de fabricação (BPF) (AMORIM FILHO, 2013). Essas medidas obrigaram os estabelecimentos de coleta de sangue a fazerem uma maior triagem sorológica e implantarem um sistema de rastreamento do material coletado em cada doação. Já as indústrias tiveram que implantar metodologias de

inativação viral, como o aquecimento dos concentrados de fatores de coagulação e tratamento por solvente-detergente (OLIVEIRA, 2016).

Ainda nos anos 80, a Imunoglobulina G intravenosa (IVIG) foi introduzida no mercado americano (ROBERT, 2011), pois antes desse período eram utilizadas gamaglobulinas intramusculares (AMORIM FILHO, 2013). Em 1990, a IVIG se tornou o hemoderivado de escolha para produção (ROBERT, 2011). Esse interesse na produção também se deve ao surgimento dos fatores VIII e IX recombinantes, que baixaram os valores dos fatores de coagulação, gerando menor interesse da indústria por eles (AMORIM FILHO, 2013). Atualmente o preço médio imunoglobulina chega a 133 dólares americanos por grama (FOUCHE et al., 2016).

Em 2008, existiam 65 plantas de fracionamento de plasma no mundo, sendo 65% de empresas comerciais. Os outros 35% eram formados por pequenas indústrias, e muitas vezes não tinham autorização de comercialização do produto fora de seu país e até fracionavam um único produto. Muitas dessas indústrias se fundiram, no intuito de se tornarem rentáveis e mais competitivas (CURLING; GOSS; BERTOLINI, 2013).

Dentre os países fracionadores, os Estados Unidos e a Alemanha permitem a coleta de plasma por aférese (plasmaférese^{II}) para a produção de hemoderivados. Suas legislações sanitárias permitem até duas coletas por semana, se limitando a cem (100) coletas por ano, e que o doador seja remunerado. Com isso os Estados Unidos é considerado o maior produtor de plasma do mundo, com capacidade de suprir sua demanda interna e comercializar o excedente produzido (CGEE, 2006).

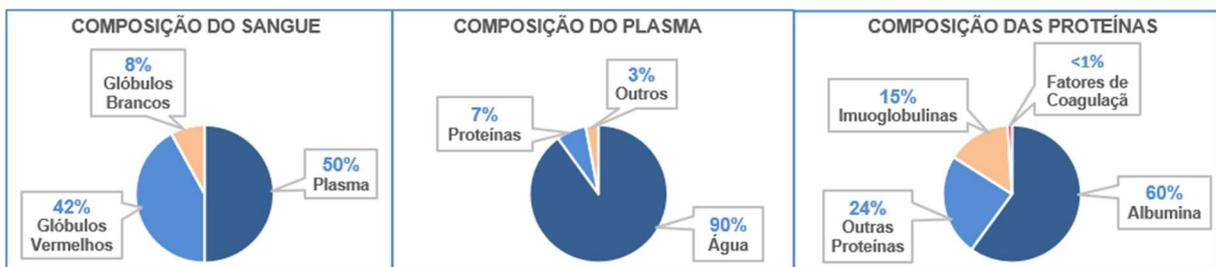
^{II} Plasmaférese: envolve a retirada do sangue venoso, separação das células sanguíneas do plasma e reinfusão de células com o plasma do doador ou outra solução de substituição. As células sanguíneas podem ser separadas por centrifugação ou membrana de filtração (JAYNE, 2008).

2.1.2 O Processo de Fabricação dos Hemoderivados

2.1.2.1 Matéria Prima

O sangue é considerado um material vivo, pois possui uma composição complexa, onde a maioria dos seus componentes possuem atividade bioquímica, podendo reagir entre si e com fatores externos, como temperatura, pH, força iônica, superfície do material, contaminação microbiana, entre outros (BRASIL, 2013). O maior componente sanguíneo é o plasma (50%), uma solução de pH 7,4, composto principalmente por água (90%) e diversas proteínas (~7%). Dentre os componentes dissolvidos têm-se também hormônios, gases respiratórios, nutrientes e eletrólitos (figura 3). Diante da composição do sangue total, o fracionamento permite aumentar o aproveitamento dos componentes sanguíneos, pois cada um pode ser armazenado de acordo com seu perfil e permite atender diferentes indicações clínicas (MESCHER, 2013; OLIVEIRA, 2016).

Figura 3 - Composição do sangue total, do plasma e das proteínas sanguíneas.

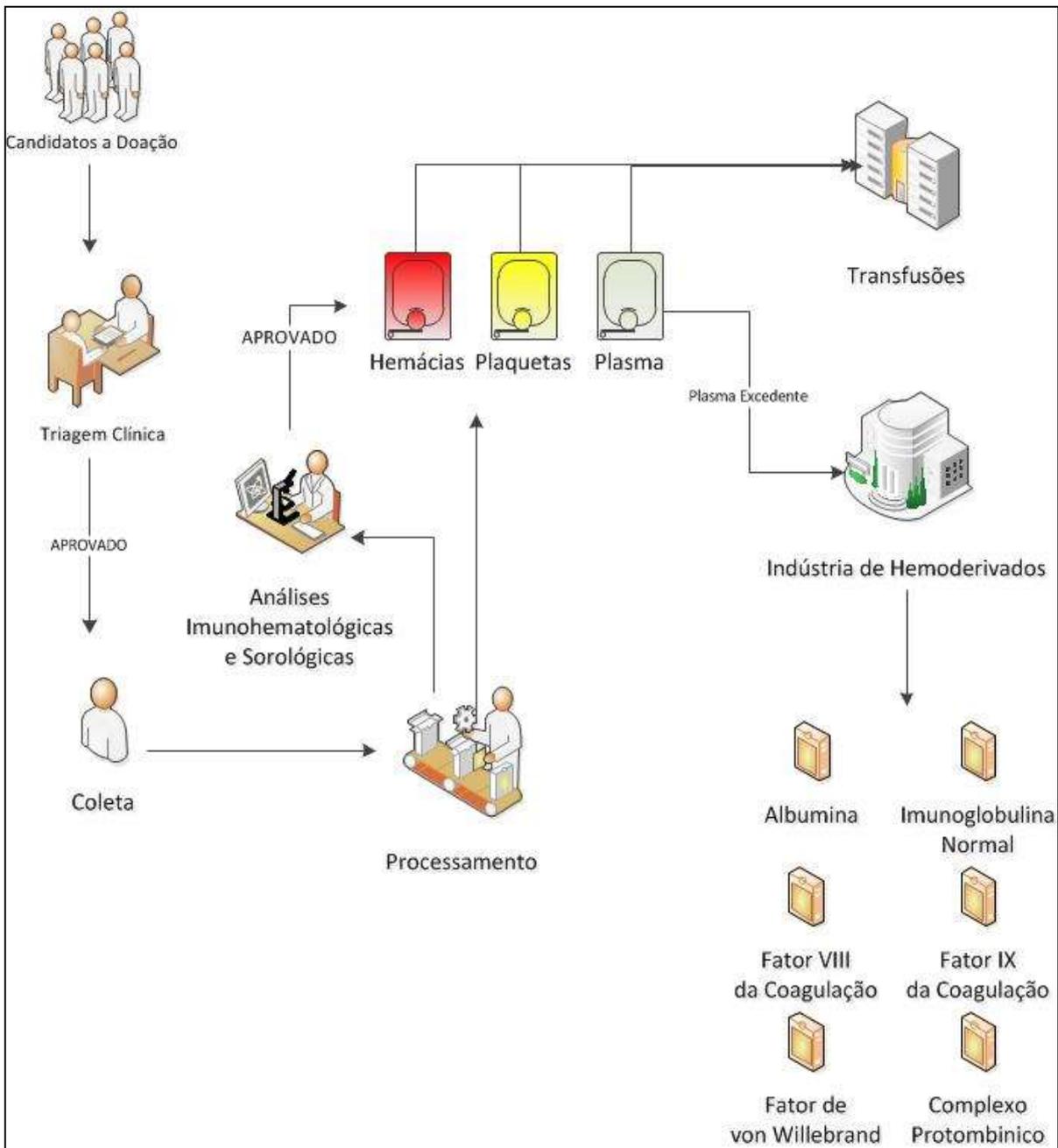


Fonte: Adaptado de Cairutas (2001) e Martins (2014).

No Brasil, a doação de sangue é regulamentada pela Lei nº 10.205/2001 (BRASIL, 2001a) e por regulamentos técnicos editados pelo Ministério da Saúde. A legislação brasileira diz que toda doação de sangue deve ser altruísta, voluntária e não gratificada (BRASIL, 2001b). Esta permite que apenas o plasma excedente de doações voluntárias dos hemocentros brasileiros possa ser destinado à elaboração de hemoderivados (BRASIL, 2001a), sendo vedada a comercialização de plasma e seus derivados (BRASIL, 1988; ANVISA, 2014).

Vários processos e etapas são percorridos para que uma bolsa de plasma seja destinada à indústria produtora de hemoderivados, começando com a seleção de doadores até a sua disponibilização para a indústria (figura 4) (MARTINS, 2014).

Figura 4 - Ciclo do sangue, desde a seleção de candidatos à doação até o fracionamento pela indústria de hemoderivados.



Fonte: Martins (2014).

O sangue total coletado durante o processo de doação (~450 ml) é recolhido em bolsa estéril e descartável. Passa por processo físico para a separação dos hemocomponentes, como concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas plasma fresco congelado (PFC), plasma fresco congelado em 24 horas (PFC24), plasma isento de crioprecipitado^{III} (PIC) e crioprecipitado (ANVISA, 2014).

O PFC é o plasma congelado em no máximo oito horas após a coleta, a uma temperatura inferior a -20°C, para manter estáveis todas as suas proteínas (ANVISA, 2000). Este tipo de plasma pode ser utilizado na terapêutica transfusional para reposição deficitária de fatores de coagulação. As bolsas de plasma excedentes nos centros de hemoterapia são direcionadas à indústria de hemoderivados (BRASIL, 2013). Esse plasma excedente do uso terapêutico é também chamado de plasma recuperado (AMORIM FILHO, 2013).

O plasma também pode ser obtido por aférese, que utiliza uma máquina separadora de células, permitindo a coleta seletiva de componentes sanguíneos. Por devolver outros componentes à corrente sanguínea do doador, esse tipo de procedimento permite a coleta de aproximadamente 800 ml de plasma/doação e um maior número de doações por ano. A Europa permite até 20 doações/ano e os Estados Unidos, até 100 doações/ano (AMORIM FILHO, 2013). Do volume total de plasma mundial utilizado para fracionamento, cerca de 35% é obtido por centrifugação do sangue total (plasma recuperado) e 65% é obtido por plasmaférese (BURNOUF, 2007).

Todo o sangue coletado é triado e passa por testes laboratoriais específicos para sua finalidade. O sangue total, seus componentes e derivados plasmáticos passam por rigoroso controle de qualidade até serem liberados para utilização no seu destino final, seja nos serviços de hemoterapia ou na indústria farmacêutica (ANVISA, 2014).

^{III}Crioprecipitado: fração formada por glicoproteínas insolúveis a frio, obtida a partir do plasma fresco congelado, composta principalmente fator VIII, fator de Von Willebrand, fator XIII e fibrinogênio (ANVISA, 2014).

2.1.2.2 Produção de Hemoderivados

Os hemoderivados são produtos farmacêuticos classificados como medicamentos biológicos, pois são originários do plasma humano, que é composto por células e fluidos (SCHÄRER, 2010). São oriundos do fracionamento industrial do plasma por processos físico-químicos em várias etapas, que lhes conferem qualidade e atividade (ANVISA, 2000, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

A formulação de um lote de um derivado plasmático é bem complexa e dispendiosa se comparada à produção de um medicamento sintético, pois abrange desde a coleta do sangue até a fabricação do produto final. Os custos com plasma giram em torno de 57% do valor gasto no processo fabril (BAKER, 2014).

O primeiro método de produção de hemoderivados foi desenvolvido pelo americano Edwin Cohn, para a produção de albumina humana. Sua metodologia era desenvolvida com a adição de diferentes concentrações de etanol ao plasma para diminuir a constante dielétrica do meio, variações de pH de acordo com os pI das proteínas, força iônica para diminuir a solubilidade proteica e baixas temperaturas para evitar a desnaturação das proteínas (COHN et al., 1946).

A produção de hemoderivados geralmente segue como base a metodologia desenvolvida por Cohn, conforme demonstrado na figura 2. Esta metodologia vem evoluindo, principalmente nos quesitos de tratamentos para inativação viral e purificação, com a implementação de novas etapas (BURNOUF, 2014).

O fracionamento plasmático é utilizado para separar produtos de uma mistura e envolve uma sequência de processos, dentre eles: separação das proteínas plasmáticas (precipitação e/ou cromatografia), purificação (cromatografia de afinidade ou troca iônica) e inativação ou remoção viral (tratamento solvente-detergente, calor, ou ácido octanóico em uma ou mais etapas ou múltiplas etapas de filtração) (WHO, 2007).

Como produtos mais comumente comercializados temos: albumina, imunoglobulinas, fatores de coagulação (Fator VII, Fator VIII, Fator IX, Fator de von

Willenbrand) e complexo protrombínico (Fatores II, VII, IX e X da Coagulação) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Estes produtos fazem parte da RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais) elaborada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015).

2.2 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As proteínas possuem inúmeras atividades funcionais, como armazenamento, transporte, comunicação celular, adesão celular, resposta imune, expressão gênica, entre outras (KANMERT, 2011). Alterações no meio em que elas se encontram, como pH, temperatura, agitação e alteração de força iônica podem provocar modificações estruturais, como desnaturação proteica parcial ou total (PONCIN-EPAILLARD et al., 2012).

Cada fração plasmática possui características diferentes de solubilidade, o que permite fracioná-las. Durante o processo de fracionamento podem ser obtidas cerca de 20 proteínas diferentes, utilizadas para o tratamento de deficiências proteicas congênitas ou adquiridas (BURNOUF, 2016). Dentre estas, podemos citar algumas proteínas que se destacam na fabricação de hemoderivados, juntamente com os respectivos rendimentos esperados a partir de um litro de PFC: albumina (25 a 28 g), imunoglobulina G (3 a 5 g), fator VIII (150 a 200 UI), Fator IX (250 a 300UI), antitrombina III (250 UI), alfa-1-antitripsina (0,20 g), além de produtos de globulina hiperimunes (ROBERT, 2011). Abaixo descreveremos as proteínas plasmáticas mais comumente fracionadas e comercializadas.

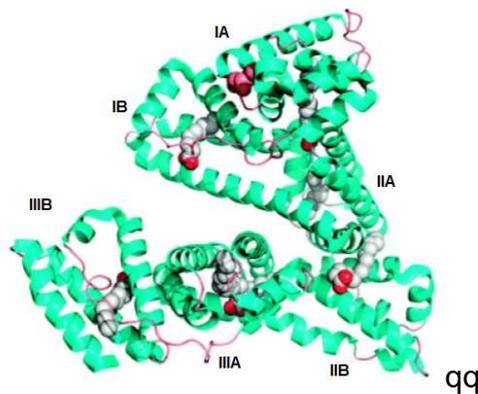
2.2.1 Albumina

A albumina humana foi a primeira proteína plasmática a ser produzida em escala industrial utilizando o método de Cohn (MORE; BULMER, 2013). A evolução

das técnicas de produção de albumina permitiu a obtenção de um produto com maior pureza e também, o aproveitamento de outras proteínas durante o processo de fracionamento (MARTINS, 2014).

Sua estrutura é formada por uma cadeia polipeptídica de 585 aa, com peso de 66 kDa e possui uma forma elipsoide (figura 5), que lhe confere uma estrutura flexível (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013). Esse tipo de estrutura a permite se ligar a vários tipos de substâncias. Sua cadeia apresenta um grande número de grupos tiol, presentes nas cadeias laterais das cisteínas. Os grupos tiol permitem a formação de pontes dissulfídicas, o que confere grande estabilidade à molécula (MORE; BULMER, 2013).

Figura 5 - Organização estrutural da Albumina



Molécula formada por três domínios (I, II e III) que são divididos em dois subdomínios (A e B).
 Fonte: Bertolini; Goss; Curling (2013).

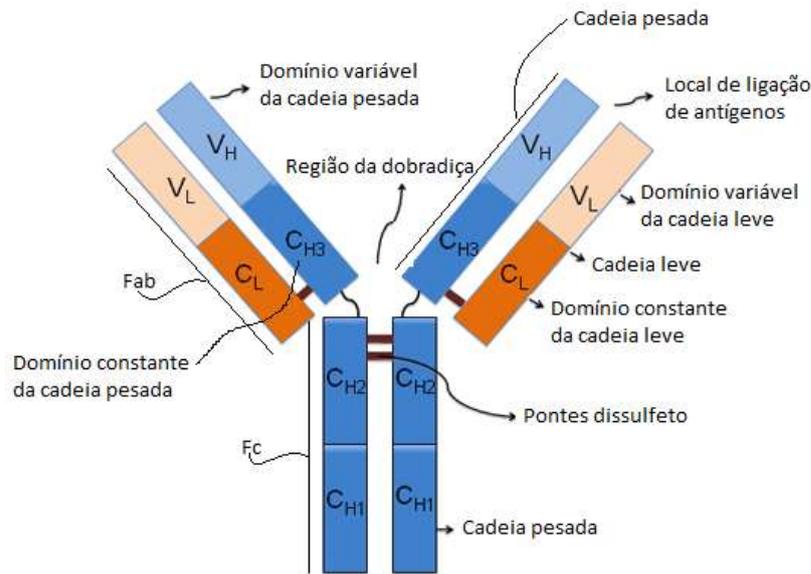
Esta proteína plasmática é sintetizada pelo fígado e distribuída tanto nos compartimentos intravascular (plasma) como extravascular (VINCENT et al., 2014), representando cerca de 60% das proteínas plasmáticas (VINCENT, 2009). A sua alta solubilidade em água se deve ao fato de possuir carga negativa (pI 4,9) (MORE; BULMER, 2013). É também considerada uma proteína multifuncional. Ela participa de inúmeros processos fisiológicos e fisiopatológicos, dentre eles, a regulação da pressão osmótica coloidal, ligação e transporte de substâncias endógenas e exógenas, propriedades antioxidantes, modulação de óxido nítrico, equilíbrio ácido-base (VINCENT et al., 2014), efeitos antiplaquetários e anti-inflamatórios (VINCENT, 2009).

As preparações de albumina são encontradas sob a forma de solução aquosa estéril, com pureza mínima de 95% e coloração de amarelada a esverdeada (MORE; BULMER, 2013). É indicada para os tratamentos de choque hemorrágico e não hemorrágico, síndrome nefrótica ou ascite, hipovolemia e hipotensão pós-cirúrgica (MORE; BULMER, 2013), edema resistente a diurético, pacientes hipoproteinêmicos, hipoalbuminemia, queimaduras (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002), síndrome hepatorenal e cirrose (OLIVEIRA, 2016).

2.2.2 Imunoglobulina G (IgG)

As imunoglobulinas são glicoproteínas derivadas dos linfócitos B, com peso molecular de 150 kDa, responsáveis pela imunidade humoral e são classificadas em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (KANMERT, 2011). A IgG (figura 6) corresponde a cerca de 75% das imunoglobulinas do plasma, sendo considerada uma das principais moléculas da imunidade humoral (AFONSO; JOÃO, 2016). É composta por quatro subtipos, sendo elas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (AHMED et al., 2014), os quais se diferenciam pela quantidade de ligações dissulfeto intermoleculares e pelo tamanho da região de junção das porções Fab com a porção Fc (região da dobradiça) (KANMERT, 2011).

Figura 6 - A estrutura da Imunoglobulina.



A estrutura da Imunoglobulina é formada por doze domínios, divididos em duas cadeias leves (rosa/laranja) e duas cadeias pesadas (azul escuro e claro). Possui dois fragmentos Fab idênticos, sendo cada um composto por dois domínios constantes (C_{H3} e C_L) e dois domínios variáveis (V_H e V_L). O fragmento Fc é dividido em duas porções idênticas, onde cada uma é composta por dois domínios (C_{H1} e C_{H2}). As porções são unidas por pontes dissulfeto.

Fonte: Adaptado de <http://brasil.bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/891.html?locale=el&>. Acessado em 05/02/17.

Uma característica importante da IgG é a sua estabilidade, e na faixa de pH de pH 5,0 a 9,0 é termicamente estável. A formação de agregados pode ocorrer quando há aquecimento em meio ácido (pH 2,0 a 4,0) (ABATUROV et al., 1969). Apresenta carga igual a zero em seu pl, igual a 6,9 (COHN et al., 1946). A diminuição da estabilidade pode levar à desnaturação (soluções hidrofóbicas ou temperatura elevada), condições estas que aumentam as chances de desdobramento e formação de agregados (LIU; MAY, 2012). Para evitar a presença de agregados em uma formulação de IgG, utiliza-se as enzimas pepsina e papaína, que fazem a quebra da imunoglobulina e separação dos fragmentos Fab dos fragmentos Fc, deixando os fragmentos Fab livres para se ligarem a antígenos (RADOSEVICH; BURNOUF, 2010).

Para uso clínico, as imunoglobulinas podem ser classificadas em imunoglobulinas específicas e poliespecíficas (ANVISA, 2004). As imunoglobulinas específicas ou hiperimunes são preparações com altos níveis de anticorpos específicos para determinadas doenças, como Rubéola, Sarampo, Coqueluche,

Varicela, Hepatite A (ANVISA, 2004; SOARES, 2002), Hepatite B, Tétano, Anti-D (anti-RhoD), Citomegalovírus (CMV), Raiva (MARKETING RESEARCH BUREAU (MRB), 2017b) Caxumba, Difteria (ANVISA, 2004).

O componente principal das imunoglobulinas poliespecíficas é IgG, mas possuem em sua composição também IgA e IgM (ANVISA, 2004). As IgGs são utilizadas para deficiências imunológicas primárias ou genéticas, e para deficiências secundárias ou adquiridas (câncer, doenças infecciosas graves), podendo ser usadas tanto na substituição quanto na reposição de proteínas (ANVISA, 2004; SOARES, 2002). Estão sendo cada vez mais utilizadas no tratamento de condições neurológicas, infecciosas, hematológicas, entre outras (NOVARETTI; DINARDO, 2011).

2.2.3 Fator VIII da Coagulação (FVIII)

É uma glicoproteína que tem como peso molecular 300kDa, com uma cadeia polipeptídica de 2351 aa, bastante lábil, sendo que sua concentração *in vitro* sofre uma redução em 50% em 12 horas a 4°C. Após produção e secreção pelos hepatócitos, o FVIII se liga ao Fator de von Willebrand, formando um complexo não covalente, o que permite a sua circulação (CHTOUROU, 2013).

A falta, redução ou mutação do fator VIII da coagulação são as causas da Hemofilia A. Esse distúrbio genético e hereditário ocorre devido a uma mutação do gene codificante deste fator (CHTOUROU, 2013), que afeta a coagulação sanguínea, dando origem a hemorragias de difícil controle (MARTINS, 2014). No Brasil, a Hemofilia A atinge 45,65% dos pacientes com algum tipo de deficiência de fator da coagulação. Desse montante, 98,26% são homens (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS., 2015), com prevalência de 1 a cada 10.000 (BRASIL, 2014).

Antes da produção dos medicamentos derivados do plasma, o tratamento para Hemofilia A era feito com transfusão sanguínea e depois com crioprecipitado rico em FVIII (CHTOUROU, 2013). Hoje o tratamento é feito com medicamentos, sob demanda ou de forma profilática, com infusão de FVIII plasmático ou recombinante, numa dosagem variando de 25 UI/kg a 50 UI/kg, de uma a três vezes por semana (BRASIL, 2014).

2.2.4 Fator IX da Coagulação (FIX)

O FIX é uma proteína plasmática glicosilada, formada por um polipeptídeo de 431 aa, com peso molecular de 56 kDa e atua na cascata de coagulação. Está presente em baixa concentração no plasma, 3 a 5 mg/L, mas não se degrada rapidamente, permanecendo estável por até duas semanas a 4°C (GRANCHA et al., 2013).

Essa proteína é sintetizada no fígado e liberada na forma inativa, podendo ser ativada pelas vias intrínseca (após interação com o fator XIa) e pela via extrínseca (após interação do fator tecidual com o fator VII) , desempenhando importante papel na cascata de coagulação (MARTINS, 2014). A ativação do FIX é dependente da vitamina K e da ligação ao cálcio (GRANCHA et al., 2013). A ausência ou deficiência desse fator causa uma doença hereditária autossômica recessiva, chamada Hemofilia B (OLIVEIRA, 2016).

A Hemofilia B já foi tratada com complexo protrombínico (FII, FVII, FIX e FX), Proteína C e S, mas os outros fatores além do FIX não contribuem para o tratamento, podendo até causar trombose. Com o avanço das técnicas de fracionamento e purificação, hoje se utiliza o concentrado de FIX plasmático ou recombinante (GRANCHA et al., 2013).

A incidência de hemofílicos B chega a 8,93% dos pacientes com algum tipo de deficiência de fator de coagulação, sendo que 97,18% desse montante é composto por homens (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À

SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS., 2015), com prevalência de 1 a cada 40.000 (BRASIL, 2014). Essa alta incidência em homens, nas Hemofilias A e B, ocorre porque as deficiências de fatores de coagulação se dá devido ao defeito do cromossomo X. Já as mulheres, por possuírem dois cromossomos X, são consideradas portadoras do gene, mas com rara manifestação da doença (MANSO et al., 2007).

2.2.5 Fator de von Willebrand (FvW)

O FvW é uma glicoproteína multimérica, com peso molecular de 360 kDa, composta por 2813 aa (CHTOUROU; POULLE, 2013). Sua síntese é feita por células endoteliais e megacariócitos, presentes no plasma e nas plaquetas. A sua deficiência, qualitativa ou quantitativa, é provocada por mutação do gene que codifica o FvW (BRASIL, 2008). Geralmente está presente no plasma na concentração de 7-10 µg/ml (CHTOUROU; POULLE, 2013).

Este fator da coagulação pode ser encontrado no subendotélio dos vasos sanguíneos, nas células endoteliais, nas plaquetas e no plasma. Sua função é mediar a agregação plaquetária no subendotélio dos vasos sanguíneos lesados, formando trombos e contribui indiretamente para o processo de coagulação através da ligação e estabilização do FVIII (BRASIL, 2008; CHTOUROU, 2013). O FvW está envolvido na homeostase primária (LAWRIE et al., 2013).

A doença de von Willebrand é classificada em três tipos de acordo com a intensidade de deficiência do FvW, sendo estes o tipo 1 (deficiência parcial quantitativa), tipo 2 (deficiência qualitativa) e tipo 3 (deficiência total quantitativa) (CHTOUROU; POULLE, 2013; MARTINS, 2014). Dentre as coagulopatias hereditárias, é reconhecida como a mais comum, atingindo cerca de 1,3% da população mundial (CHTOUROU; POULLE, 2013). No Brasil atinge 31,06% dos portadores de coagulopatias, 2015), com prevalência de 1 portador a cada 10.000 pessoas (CHTOUROU; POULLE, 2013).

O tratamento é feito em caso de manifestações hemorrágicas e antes da realização de procedimentos invasivos, fazendo a correção do baixo nível de FVIII e da anormalidade da adesão e agregação plaquetária. Para isso utiliza-se a desmopressina, concentrados de FVIII/FvW e drogas auxiliares (BRASIL, 2008).

2.2.6 Complexo Protrombínico (PPSB)

O concentrado de complexo protrombínico é uma mistura de fatores de coagulação do complexo protrombínico inativados. É formado por fatores sintetizados no fígado, dependentes da vitamina K: Fator II (protrombina), Fator VII (proconvertina), Fator X (fator de Stuart) e Fator IX (fator anti-hemofílico B) (ROMISCH; POCK, 2013).

É utilizado como profilaxia em pré-operatório, tratamento de hemorragia em pacientes com deficiência destes fatores, complementação do tratamento de pacientes que fazem uso de antagonistas da vitamina K (Ex: varfarina), e quando há deficiência de um fator dependente de vitamina K e não há disponibilidade desse fator específico purificado (FRANCHINI; LIPPI, 2010; ROMISCH; POCK, 2013). É utilizado principalmente quando se precisa uma ação rápida para uma coagulopatia (SORENSEN et al., 2011).

Os riscos de utilização do PPSB estão associados a eventos trombogênicos, devido ao excesso de protrombina, mas isso pode ser controlado com o monitoramento da coagulação do paciente (SORENSEN et al., 2011). Os PPSB atuais provocam menos risco de trombose, pois possuem em sua formulação alguns inibidores da coagulação para equilibrar os fatores de coagulação, tais como heparina, antitrombina, Proteína C, Proteína S e Proteína Z (FRANCHINI; LIPPI, 2010; ROMISCH; POCK, 2013).

2.3 TANINOS

Em 1962, os taninos foram caracterizados como compostos fenólicos poliméricos, solúveis em água, com capacidade de formar complexos insolúveis com gelatinas e alcaloides e capacidade de se ligar e precipitar proteínas (BATE-SMITH; SWAIN, 1962). São utilizados há muitos séculos no curtimento do couro, na produção de vinho, cerveja, entre outros. Normalmente, percebemos a presença de taninos ao ingerir frutas e vinhos, pois em contato com as proteínas salivares provocam sensação característica de adstringência (CANNAS, 2015).

Taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular derivados do metabolismo secundário de plantas, comumente oriundos do metabolismo de carboidratos por diferentes reações bioquímicas (SANTOS; MELLO, 2003). Sua estrutura deve ser composta de pelo menos um fenol, mas pode conter açúcares e ácidos orgânicos (CARVALHO, 2007), com peso molecular variando de 500 a 3000 Da.

Estes compostos são encontrados sob forma livre e mais comumente, sob a forma de ésteres ou heterosídeos, o que lhes confere solubilidade em água e em solventes orgânicos polares (SIMÕES et al., 2001). Mesmo com a presença de hidroxilas (OH) em sua estrutura, os taninos não reagem como álcoois orgânicos e sim como ácidos orgânicos fracos, sendo mais fracos do que os ácidos carboxílicos (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI), 2017a). A presença de fenóis na estrutura dos taninos lhes confere elevada reatividade química, caracterizando-os como excelentes doadores de hidrogênio, o que permite a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares com os grupos carboxílicos das proteínas (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

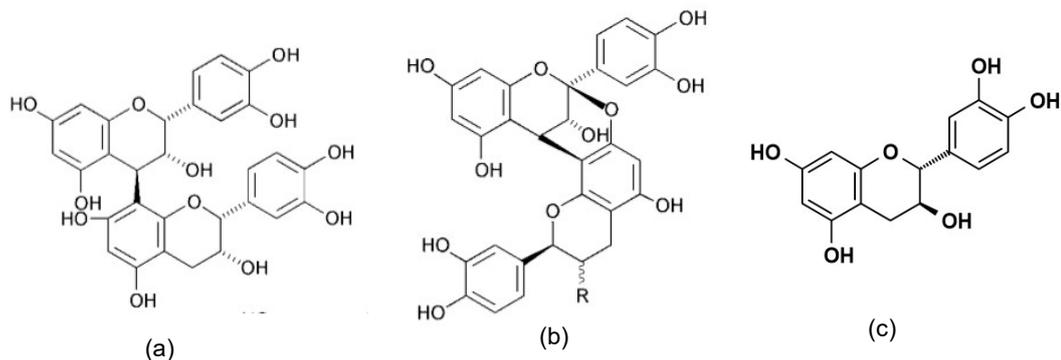
Por estarem presentes em várias partes das plantas (caule, folha, raiz e fruto), despertam grande interesse econômico e ecológico, aumentando o interesse de se estudar suas interações com proteínas (CANNAS, 2015). As maiores concentrações de taninos podem ser encontradas em plantas de folhas largas, em regiões com clima quente (SHEWANGZAW, 2016), fraca qualidade do solo e escassez de água

(BUNGLAVAN; DUTTA, 2013). As concentrações também podem variar de acordo com a idade da planta, parte coletada, período e local da coleta (DORES, 2007).

São muito conhecidos pela ação adstringente, antidiarreica e hemostática (VERZA, 2006). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam efeito antioxidante, antimicrobiano (AKIYAMA et al., 2001; CHUNG et al., 1998; KIM et al., 2010; SANTOS; MELLO, 2003), antifúngico (DORES, 2007), antimutagênico (AKINYEMI et al., 2015), antiviral (KILKUSKIE et al., 1992), moluscicida (SANTOS; MELLO, 2003), entre outros. São eficazes em processos de queimaduras e cicatrização de feridas (VERZA, 2006). Também são considerados nefroprotetores, pois diminuem a toxicidade renal de drogas antitumorais utilizadas na quimioterapia (AKINYEMI et al., 2015).

Com base na estrutura química e propriedades, os taninos podem ser divididos em taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados (figura 7) são constituídos por oligômeros ou polímeros de flavonóides, derivados das proantocianidinas, onde os monômeros são unidos por ligações carbono-carbono. São estruturas complexas, podendo ou não serem solúveis em água (SHEWANGZAW, 2016), e não sofrem hidrólise em ácido ou base (HAGERMAN, 1992).

Figura 7 - Estruturas de taninos condensados (a) procianidina, (b) proantocianidina e (c) catequina

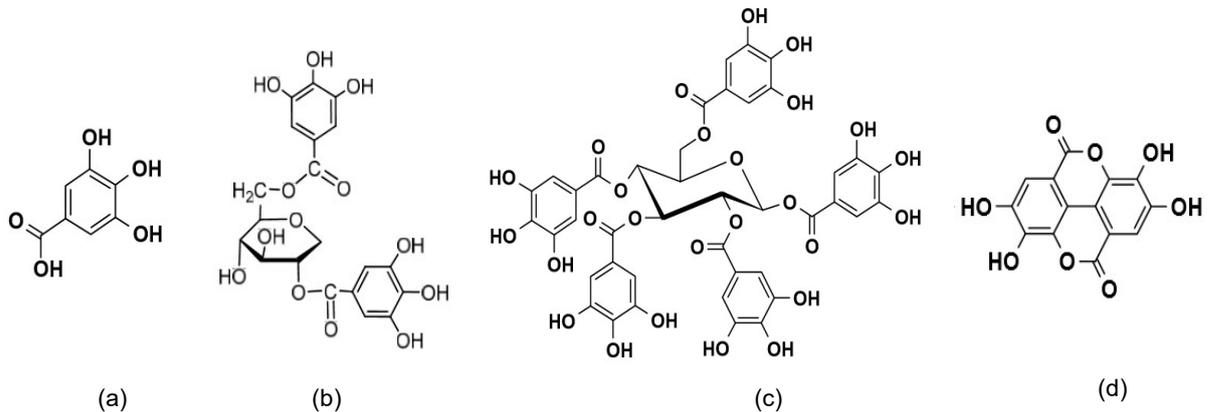


Fonte: Khanbabaee e Ree (2001), Hagerman (2002a).

Os taninos hidrolisáveis ($C_6 - C_1$)_n (figura 8), podem produzir poliálcoois e ácidos fenólicos através de hidrólise por ácidos, bases ou enzimas. Como resultado

da hidrólise de um ácido fenólico, temos o ácido gálico (galotanino) e seus derivados ou ácido elágico (elagitanino) (HAGERMAN, 1992). São formados por grupos hidroxila esterificados com os grupos fenólicos ou são esterificados para outros resíduos de ácido gálico, formando cadeias de resíduos de ácido gálico longos (SHEWANGZAW, 2016).

Figura 8 - Estruturas de taninos hidrolisáveis de galotaninos [(a) ácido gálico, (b) acertanina, (c) Pentagaloiil glucose], e elagitaninos: [(d) ácido elágico].



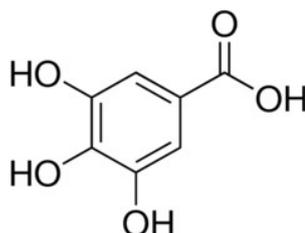
Fonte: Hagerman (2002a), Okuda e Ito (2011).

Os galotaninos são taninos hidrolisáveis compostos por uma unidade de ácido gálico ou mais unidades esterificadas nas hidroxilas de um poliol, tendo como exemplos o ácido gálico (com uma unidade de ácido gálico) e o ácido tânico (de oito a dez unidades de ácido gálico) (VERZA, 2006). Os taninos gálicos são extraídos principalmente de espécies de carvalho, quebracho e acácia (SANTOS; MELLO, 2003).

2.3.1 Ácido Gálico (AG)

O ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico), de fórmula $C_6H_2(OH)_3COOH$, é composto por um anel benzênico como núcleo, ligado a um grupo carboxílico e três grupos OH nas posições 3, 4 e 5 (DEGUCHI, 2014), conforme a figura 9.

Figura 9 - Estrutura molecular do ácido gálico.



Fonte: Disponível em <http://www.coompo.com/compounds/Gallic+acid+C7836.html>. Acessado em 27 mar 2016.

O AG é um galotanino originário de polifenol (XIAO; KAI, 2012), de cor branca ligeiramente transparente a amarelado, com peso molecular de 170,11954 g/mol. É solúvel em água (1g/87 ml), álcool (1g/6 ml), glicerol (1g/10 ml), acetona (1g/5 ml), e praticamente insolúvel em benzeno e clorofórmio (NCBI, 2017a). Sua solubilidade é aumentada à medida que se aumenta a temperatura e o tempo de solubilização (DANESHFAR; GHAZIASKAR; HOMAYOUN, 2008). A produção do AG, em escala industrial, utiliza a glicoproteína tanase para a degradação do ácido tânico (FERNANDES; SALGADO, 2015).

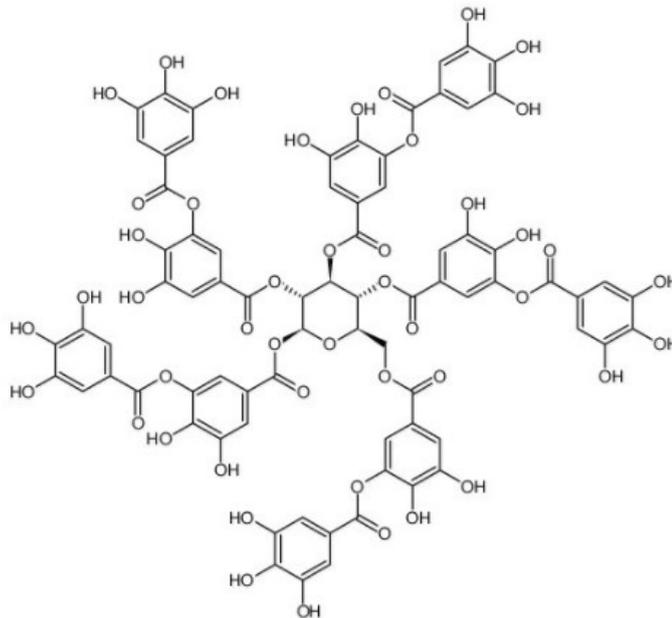
O ácido gálico, por fazer parte do grupo fenólico, é um bom doador de hidrogênio, o que favorece a formação de ligações de hidrogênio com o grupo carboxil, grupo funcional da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). A interação AG-proteínas é estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (MADHAN et al., 2003).

A atividade antioxidante é a mais conhecida do AG, mas outras atividades farmacológicas também são descritas na literatura. Dentre estas estão as ações antibacteriana (XIAO; KAI, 2012), antifúngica (NGUYEN et al., 2013), anticancerígena (WANG et al., 2014; RAJAN; MURALEEDHARAN, 2017), anti-inflamatória (NOUBIGH et al., 2012), hepatoprotetora (NABAVI et al., 2013), diurética (KATEEL; RAI; KUMAR J., 2014), antiparkinsoniana (MOHAMMAD-BEIGI et al., 2015), antiviral (KILKUSKIE et al., 1992), cardioprotetora e anti-helmíntica (NAYEEM et al., 2016).

2.3.2 Ácido Tânico (AT)

O ácido tânico é um tanino hidrolisável, de fórmula $C_{76}H_{52}O_{46}$ que corresponde a glicose decagalolil, formado por um núcleo poliol (glicose) esterificado com ácidos fenólicos, podendo variar de oito a dez resíduos de ácido (grupo galolil) por molécula de glicose (HAGERMAN, 1992; KOUPANTSIS; PAVLIDOU; PARASKEVOPOULOU, 2016; MOHAMED FAKER EL-DIN et al., 2015; SIENIAWSKA; BAJ, 2017), , conforme a figura 10.

Figura 10 - Estrutura molecular do ácido tânico.



Fonte: Disponível em <http://www.coompo.com/compounds/Tannic+acid+C8029.html>. Acessado em 05/04/2017.

O AT é um galotanino de cor marrom, com peso molecular de 1701,206 g/mol. Possui alta solubilidade, sendo solúvel em água (1g/0,35 ml), glicerol (1g/1 ml), álcool e acetona (NCBI, 2017b). Este ácido tem sido muito utilizado em trabalhos como agente precipitante de proteínas (BSA, HSA, proteínas salivares e digestivas) (BUCHSBAUM; SWAIN, 1985; DAWRA; MAKKAR; SINGH, 1988; HOFFMANN; MUETZEL; BECKER, 2002; MARKS; ADAMCZYK et al., 2011, 2012; OMAR; MORGENTHALER, 2016).

Várias atividades do ácido tânico já foram estudadas e comprovadas. Dentre elas está a atividade antioxidante, que é proporcionada pelas hidroxilas presentes na molécula. Sua ação antioxidante é maior do que a do ácido gálico, pois esse tipo de ação depende da quantidade e posições das hidroxilas (AKINYEMI et al., 2015). A atividade antimicrobiana se deve à presença do grupo galoil (grupo 3,4,5-tri-hidroxibenzoílo) na molécula de tânico, que priva os micro-organismos da absorção de ferro (KIM et al., 2010).

O AT apresenta ação antiviral, por inibição da hemaglutinação ou da infecciosidade (KONISHI; HOTTA, 1980). Também atua como agente tópico em queimaduras para precipitação das proteínas desnaturadas pelo calor (CHUNG; REED, 2012), antidiabético, anticancerígeno (KIM et al., 2013). Apresenta efeitos antigênicos, cujas intensidades podem variar de acordo com o antígeno específico, dependendo também da localização do antígeno dentro da célula (BERRYMAN et al., 1992).

Konish e Hotta (1980) restauraram reversivelmente a atividade do vírus chikungunya após descomplexar proteínas e taninos, com variação do pH do complexo. Com isso, considera-se que a ligação entre a proteína e moléculas de ácido tânico seja tão fraca que dificilmente modificaria a composição da proteína.

2.4 UTILIZAÇÃO DE TANINOS PARA PRECIPITAR PROTEÍNAS

Na literatura observam-se relatos da utilização de taninos para precipitar proteínas, principalmente na interação de taninos com proteínas digestivas e salivares e, em estudos de estabilidade de vinhos.

KUTZ et al., (1980) utilizaram pós de partes individuais de algodoeiro para precipitar proteínas séricas. Suspeitaram que a precipitação tivesse ocorrido devido à presença de tanino polifenólico na composição do precipitante vegetal. Por motivo de comparação, outra precipitação foi realizada com o pó de algodão tratado com polivinilpirrolidona (PVP) para a retirada de taninos, e após o tratamento não houve

precipitação de beta-lipoproteína e gamaglobulina. Com isso, relacionaram a precipitação com a presença de taninos no pó de algodão.

Hagerman et al. (1992) avaliaram os efeitos de dietas artificiais contendo taninos bem diferentes (galotaninos e taninos condensados), em grandes ruminantes (veados, ovelhas), e compararam os resultados com os obtidos com forragens naturais. Observaram que os taninos hidrolisáveis eram facilmente digeridos por sofrerem hidrólise e os taninos condensados diminuía a digestibilidade das proteínas, devido às diferentes estruturas químicas.

Alguns estudos citam a utilização de taninos para a precipitação de proteínas, mas os estudos de complexação, precipitação e interação entre taninos e proteínas acabam sendo desenvolvidos com proteínas isoladas, sendo a maioria com a BSA (HAGERMAN; BUTLER, 1978; MAKKAR; DAWRA; OSAWA; WALSH, 1993; SINGH, 1988; HOFFMANN; MUETZEL; BECKER, 2002; ADAMCZYK et al., 2012; XIAO; KAI, 2012)

Serafini e colaboradores (1997) avaliaram o efeito do álcool sobre a interação tanino/proteína (T/P), utilizando taninos do vinho para precipitar BSA, e puderam concluir que o álcool produziu uma redução linear na interação tanino-proteína, aumentando simultaneamente a capacidade antioxidante do vinho.

Hoffman e colaboradores (2002) propuseram um método de determinação proteica utilizando o método dot-blot modificado, aplicado no ensaio de precipitação tanino-BSA. A modificação proposta foi a substituição do método radioativo de determinação proteica por um ensaio dot-blot com corante fluoróforo, substituindo o método radioativo por uma medida fluorimétrica. Assim, os ensaios permitiam verificar as manchas de proteínas in situ, usando uma câmera de vídeo e análise de imagem do computador. Vários conjuntos de filtros foram testados e, em seus testes, conseguiram obter filtros que produzissem resultados iguais ao do método de comparação, mas com redução de 70% no tempo de trabalho que o método original exigia.

Carvalho e colaboradores (2004) estudaram a interação de taninos de diferentes fontes (casca de uva, semente de uva e vinho) com BSA, utilizando método

de fluxo contínuo por detecção nefelométrica. Mesmo com excesso de proteína, a quantidade de agregados insolúveis permaneceu constante para a interação com casca de uva e vinho. Já com taninos da semente de uva, houve uma diminuição da quantidade de agregados insolúveis. Mostraram com isso que a técnica nefelométrica de fluxo foi um método versátil, podendo ser utilizado para amostras complexas, portanto confiável para estudar a interação entre taninos e proteínas.

Kurlbaum e Hogger (2011) avaliaram as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de sete taninos presentes no extrato da casca de pinheiro marítimo. Eles analisaram a extensão da ligação dos taninos com proteínas plasmáticas após a ingestão oral do extrato, determinando a interação proteica com cada tanino e mostraram que a fração do tanino ligada à proteínas é protegida contra a degradação.

2.5 INTERAÇÃO TANINO-PROTEÍNA

As interações e o processo de precipitação tanino/proteína (T/P) são dependentes das estruturas químicas e concentrações de ambos (CANNAS, 2015), temperatura, pH, adição de sais e a composição de alguns solventes. A temperatura e o pH afetam o grau de ligação, mas não a afinidade de interação entre a proteína e o tanino (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013).

Algumas características proteicas são importantes e favorecem a interação, como a riqueza em prolina das proteínas (conferem estruturas mais flexíveis), estruturas mais abertas, grande tamanho molecular e seu ponto isoelétrico (MCMANUS et al., 1981; CARVALHO; MATEUS; DE FREITAS, 2004). Em contrapartida, os taninos também possuem características que influenciam na interação, como a alta mobilidade conformacional, o grande peso e tamanho molecular (CANNAS, 2015), a quantidade e disposição dos grupos galoi (VERZA, 2006), a metilação, a hidroxilação, a glicosilação, a hidrogenação (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013) e a solubilidade em água (HAGERMAN; RICE; RITCHARD, 1998).

O peso molecular do tanino influencia muito na interação. As proteínas possuem espaços interfibrilares que serão ou não intercalados pelos taninos, dependendo do peso molecular. Caso o peso molecular seja elevado, a molécula do tanino não conseguirá se intercalar entre os espaços interfibrilares de uma proteína. Se o peso for baixo a molécula se intercala, mas pode não conseguir formar a quantidade de ligações necessárias para assegurar a estabilidade do complexo (DORES, 2007).

Alguns mecanismos de precipitação de proteínas por taninos têm sido propostos atualmente e divergem opiniões de alguns autores. A primeira proposição é composta por dois estágios, onde há inicialmente a complexação entre o tanino e a proteína e posterior precipitação do complexo (KAWAMOTO; NAKATSUBO; MURAKAMI, 1996). Essa proposta considera somente a associação entre o tanino e a proteína, desconsiderando a interação entre diferentes moléculas de proteínas.

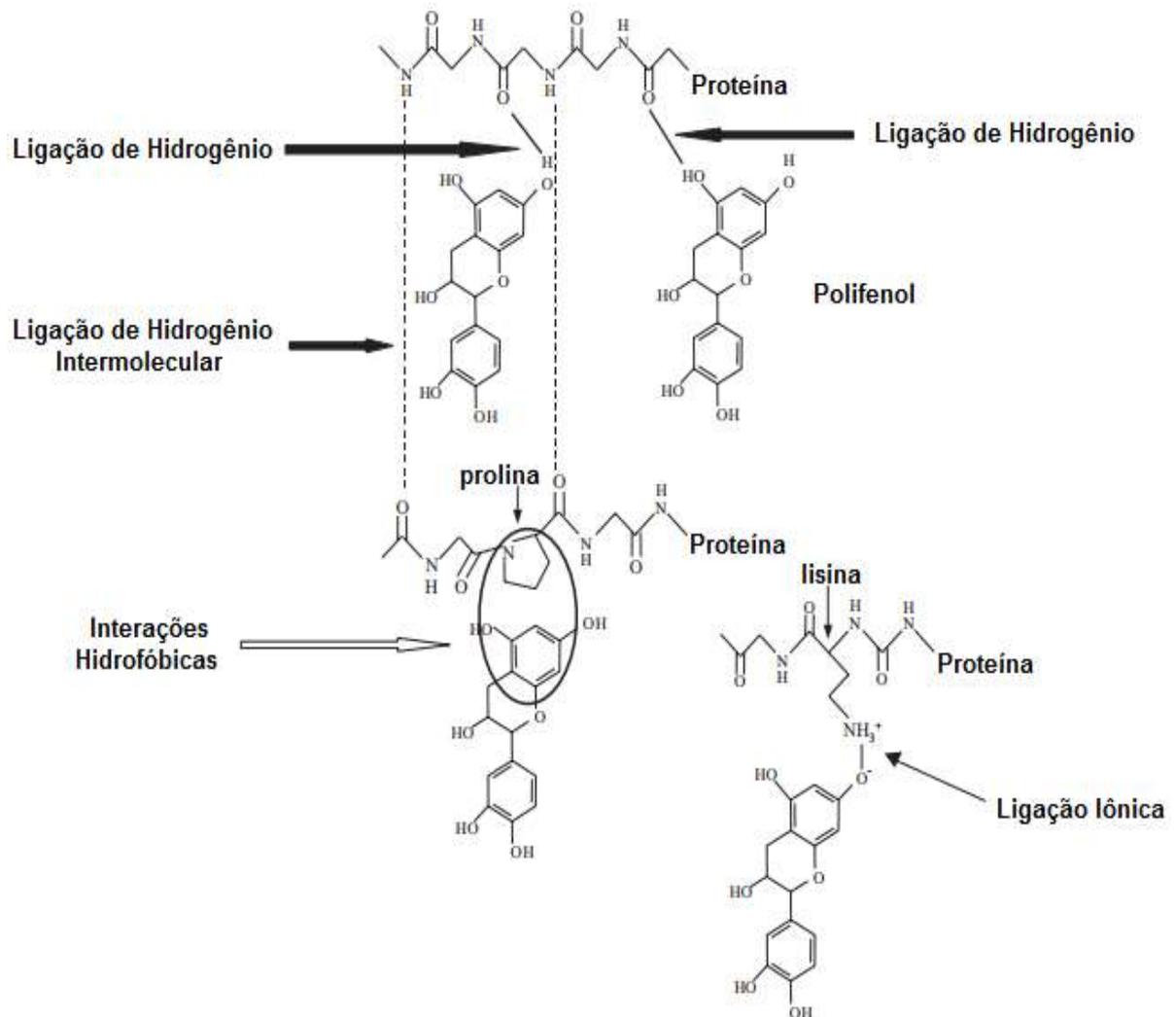
A segunda proposição considera que a precipitação ocorra por interações de superfície. A interação decorreria da natureza multidentada dos taninos, permitindo que um único tanino pudesse interagir mediante diferentes grupos fenólicos, de modo simultâneo, com uma série de resíduos de uma mesma proteína (VERZA, 2006; LE BOURVELLEC; RENARD, 2012). Isso justificaria a afinidade entre os taninos com elevado tamanho molecular e as proteínas (CHARLTON et al., 2002; VERZA, 2006).

A terceira proposição considera que a precipitação ocorra em três estágios. Inicialmente várias moléculas de taninos se ligam a uma mesma proteína. Isso ocorre até que haja saturação dos sítios de ligação de uma proteína e ocorra a associação de duas moléculas proteicas, favorecendo a formação de complexos e a precipitação (CHARLTON et al., 2002; VERZA, 2006).

Os complexos reversíveis T/P são formados por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações iônicas. As ligações de hidrogênio são reversíveis e pH dependentes, e ocorrem entre as hidroxilas do grupo fenólico e o oxigênio do grupo carboxílico da proteína. As interações de "empilhamento" hidrofóbicas são reversíveis e pH dependentes, e ocorrem entre sítios hidrofóbicos dos resíduos de aminoácidos e anéis aromáticos da porção fenólica. Estas interações são também complementadas por ligações iônicas, que ocorrem entre a porção catiônica da

proteína e os grupos hidroxila negativamente carregados do tanino (figura 11) (HOFMANN et al., 2006; LE BOURVELLEC; RENARD, 2012; BUNGLAVAN; DUTTA, 2013).

Figura 11 - Os mecanismos de interação entre taninos e proteínas.



Fonte: BOURVELLEC; RENARD, 2012.

De acordo com Hagerman e colaboradores (1998) e Verza (2006), a polaridade do tanino pode ser utilizada para prever a natureza de sua ligação com a proteína. Quanto maior a quantidade de grupos galoil, maior será a polaridade, determinando que a complexação de tanino e proteína é predominantemente formada por ligações de hidrogênio. Já para taninos não polares, a complexação se dá predominante por

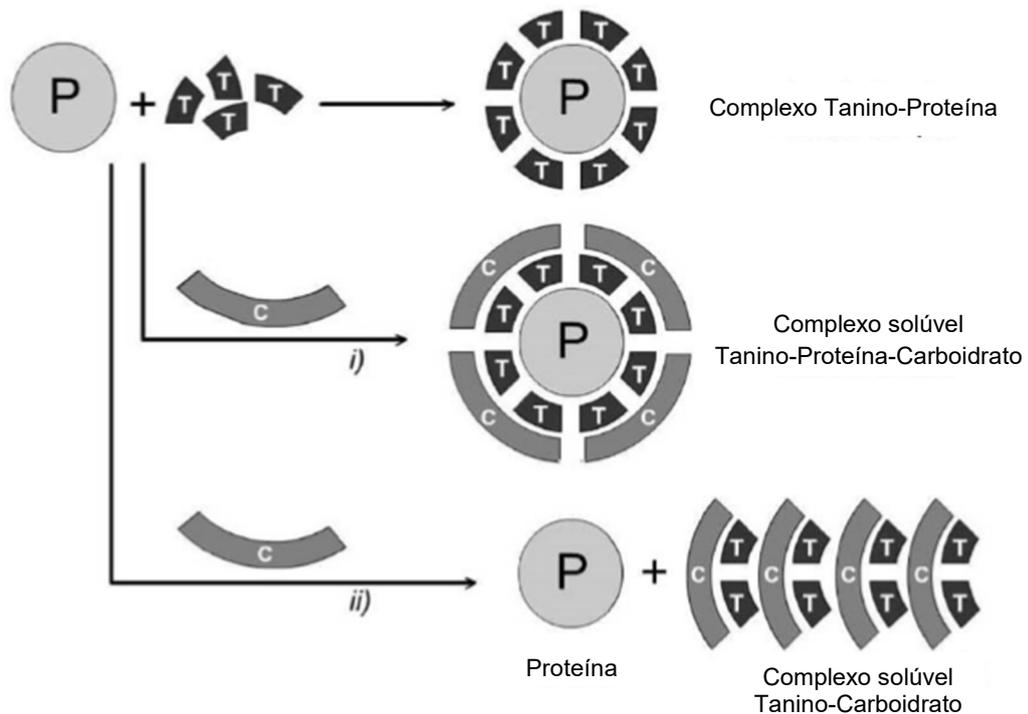
interações hidrofóbicas. Em um estudo realizado por Simon et al., (2003), eles observaram que os taninos se ligam somente a um lado do peptídeo, sendo este a porção hidrofílica. Nesse local, ocorrem ligações de hidrogênio entre os grupamentos OH dos taninos e os grupamentos carboxila de alguns resíduos de prolina, formando ligações de hidrogênio.

A intensidade de ligação dos complexos é influenciada pela natureza hidrofílica ou hidrofóbica das proteínas e pela hidrofobicidade dos taninos. A hidrofobicidade dos anéis aromáticos e a hidrofiliabilidade dos grupos hidroxilas dos taninos fazem com que estes se tornem ligantes multidentados, fazendo múltiplas ligações não covalentes com as proteínas (BRUDZYNSKI; MALDONADO-ALVAREZ, 2015). Quanto maior a hidrofobicidade, mais forte será a ligação entre o complexo (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013). A formação de complexos pela interação T/P reduz a solubilidade dos mesmos (no caso de proteína solúvel), levando à agregação e precipitação (HAGERMAN, 1992; CARVALHO, 2007; ADAMCZYK et al., 2012).

Os complexos formados entre taninos e proteínas aniônicas ou no ponto isoelétrico são reversíveis, dependentes do pH, quantidade e peso molecular dos reagentes (MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN et al., 1959). A dissociação dos complexos T/P pode ser feita por tratamentos com variação do pH, uso de detergentes, polímeros ou cafeína, para que haja a diminuição da concentração de taninos (HAGERMAN, 1992). A cafeína proporciona uma recuperação de mais de 90% de proteínas. Seu uso para a remoção de taninos em misturas dá origem a proteínas isoladas e ao complexo cafeína-tanino, dependendo da razão molar de cafeína para tanino (MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN et al., 1959).

Para a dissociação do complexo, também podem ser usados polissacarídeos neutros e aniônicos (pectina, goma arábica, xantana, gelatina), pois estes podem romper a ligação entre o tanino e competir com a agregação proteica. Eles também podem desenvolver uma estrutura que seja capaz de encapsular e se complexar com o tanino, conforme demonstrado na figura 12 (FREITAS; CARVALHO; MATEUS, 2003). Polímeros como polivinilpirrolidona (PVP) podem ser utilizados na dissociação, através de competição com a proteína (VERZA, 2006).

Figura 12 - Possíveis mecanismos (i e ii) envolvidos na inibição da agregação de taninos (T) e proteínas (P) por carboidratos (C).



Fonte: CARVALHO; FREITAS; MATEUS, 2010

2.6 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO T/P

2.6.1 Precipitação de proteínas

Por ser uma técnica simples, a precipitação vem sendo uma operação bastante utilizada em indústrias e laboratórios para separar as proteínas, baseada na solubilidade das mesmas (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005; COELHO, 2012). A precipitação seletiva de proteínas pode ser utilizada para recuperar uma proteína específica, um grupo de proteínas e até a totalidade das proteínas de uma solução proteica que se deseja (LOVRIEN; MATULIS, 1997).

Alguns fatores podem influenciar na precipitação, como as características físicas e bioquímicas das proteínas e dos agentes precipitantes. Dentre esses fatores, podemos citar a estrutura química, concentração da proteína e do precipitante, o ponto isoelétrico (pI), a carga, a estrutura e o tamanho da proteína, e outros fatores como o pH do meio (KRAUS; DAHLGREN; ZASOSKI, 2003; ADAMCZYK et al., 2012), a força iônica (FREITAS; CARVALHO; MATEUS, 2003), temperatura (KAWAMOTO; NAKATSUBO, 1997) e solventes (BUENO; SILVA; QUEIROZ, 2011).

O pH afeta a disposição de cargas em uma proteína, pois o excesso de cargas, tanto positivas (pH ácido) quanto negativas (pH básico), podem aumentar a sua solubilidade. As proteínas podem ser precipitadas utilizando seu ponto isoelétrico, que consiste no pH em que a molécula proteica não tem nenhuma carga líquida. A ausência de cargas diminui a repulsão entre moléculas e a interação com o solvente, favorecendo a interação proteína-proteína e precipitação. A existência ou não de carga determina a interação da proteína com o meio aquoso (PESSOA JÚNIOR; KILIKIAN, 2005).

Íons inorgânicos, como polifenóis e taninos vegetais, utilizados em condições de ácida a neutra, precipitam bem as proteínas. Quando os poliânions se ligam à proteína, a deixam com uma conformação mais compactada e pouco hidratada. A contração molecular das proteínas leva à precipitação (LOVRIEN; MATULIS, 1997).

2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese em gel é muito utilizada para análise de amostras biológicas e os principais tipos utilizam agarose ou poliacrilamida na composição do gel (WESTERMEIER et al., 2005). A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é utilizada para separar e analisar amostras de proteínas e moléculas de ácido nucleico, e pode ser feita sob condições desnaturantes ou redutoras (SDS-PAGE) e de forma nativa (PAGE NATIVO) (HEGYI et al., 2013).

A eletroforese SDS-PAGE permite separar as proteínas, de forma qualitativa, de acordo com seus pesos moleculares. Essa técnica utiliza como agente desnaturante o detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), que rompe as interações não-covalentes e como agente redutor o mercaptoetanol, que reduz as ligações dissulfeto e rompe as ligações cruzadas das proteínas (HEGYI et al., 2013).

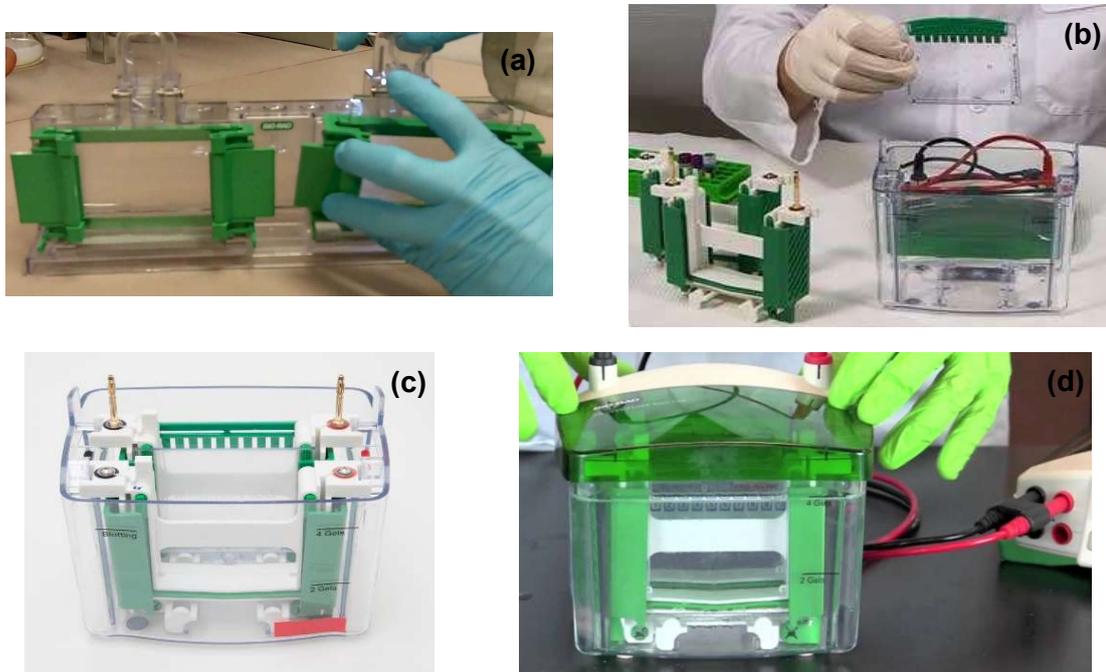
A eletroforese PAGE NATIVO permite caracterizar e separar as proteínas de acordo com sua carga líquida e seu peso molecular. Ela pode fornecer também, informações qualitativas sobre a estrutura nativa da molécula, caracterizando, identificando e isolando uma substância ou uma mistura de substâncias (WESTERMEIER et al., 2005).

O gel utilizado para a separação das proteínas é formado pela copolimerização da acrilamida na presença da bisacrilamida (N, N-metilenobisacrilamida), formadora de ligações cruzadas. A polimerização se inicia com a adição do oxidante persulfato de amônio (APS), para evitar que o oxigênio neutralize os radicais livres formados e com a adição do catalisador de radicais livres tetrametilenodiamina (TEMED) (WILSON; WALKER, 2009). Como resultado, há a formação de um gel poroso, que permite a migração das proteínas diante de um potencial elétrico (HEGYI et al., 2013).

A porosidade do gel ou grau de reticulação é determinada pela concentração de acrilamida e bisacrilamida, onde uma maior concentração desses componentes diminui a mobilidade eletroforética das proteínas (WESTERMEIER et al., 2005). O gel é polimerizado entre duas placas de vidro (figura 13a) e pode ser dividido em dois tipos de géis: o gel de resolução ou separação com poros pequenos, e o gel de empilhamento com poros grandes (WILSON; WALKER, 2009).

A técnica é realizada com o gel preparado preso em um suporte (figura 13b), colocado dentro de uma cuba vertical com tampão (13c). As amostras são colocadas no gel de empilhamento, o qual contém pequenos poços formados com o auxílio de um pente, e então a cuba é fechada com uma tampa que possui eletrodos. A ela é ligada uma fonte de tensão, que faz a migração das proteínas (figura 13d) (WILSON; WALKER, 2009).

Figura 13 – Etapas da técnica de eletroforese PAGE nativo: (a) polimerização do gel, (b) colocação do gel no suporte, (c) suporte com gel dentro da cuba e (d) cuba montada com o gel e ligada à fonte de energia.



Fonte: Disponível em: http://www.bio-rad.com/pt-br/product/mini-protean-tetra-cell?pcp_loc=catprod. Acessado em 18 out 2017.

A migração proteica depende da relação entre as características físicas do sistema de eletroforese e das proteínas. As proteínas possuem grupos funcionais ionizáveis e, em determinado pH, elas adquirem carga positiva ou negativa (WILSON; WALKER, 2009). Sob a influência de um campo elétrico aplicado a um meio condutor (tampão), uma corrente elétrica flui e faz com que as proteínas sejam deslocadas na direção do eletrodo de carga oposta. Por possuírem cargas elétricas e massas diferentes, as moléculas migram em diferentes velocidades e se separam em frações distintas (WESTERMEIER et al., 2005). As de menor massa migram mais rapidamente que as de maior massa. Alguns fatores podem interferir na migração das proteínas, como: força do campo elétrico, pH e concentração do tampão, temperatura do sistema, tamanho do poro do gel, tamanho, carga e forma da proteína (BIO-RAD, 2012).

A corrente elétrica e a potência empregadas em uma corrida eletroforética são selecionadas de acordo com a espessura do gel, mas pode variar durante a corrida,

devido à condutividade do tampão e do gel. O tampão de corrida tem em sua composição a glicina e o gel tem íons Cl^- . A glicina tem ponto isoelétrico (pI) 6,5 e como o gel de empilhamento é preparado com tampão a pH 6,8, não há quase nenhuma carga líquida, deixando a glicina com baixa mobilidade e baixa capacidade de transporte. Isso deixa a velocidade de migração relativamente elevada. Devido ao fato do gel de empilhamento ter poros grandes, a mobilidade não depende do tamanho da molécula, e sim da carga líquida (HEGYI et al., 2013).

A passagem das moléculas para o gel de resolução encontra uma maior resistência, devido à diminuição dos poros e a diferença de pH entre o tampão do gel de separação (pH=8,8) e o pH da glicina. Isso faz com que elas migrem de forma mais lenta e algumas zonas fiquem mais concentradas. Essa mudança de gel não afeta o baixo peso molecular da glicina, com isso as moléculas passam e se tornam mais carregadas. A mobilidade, agora, já depende da carga e tamanho da molécula (WESTERMEIER et al., 2005; HEGYI et al., 2013). O azul de bromofenol, um corante de rastreamento presente no tampão de amostra, permite acompanhar a distância percorrida pelas proteínas no gel até o final da corrida, evitando que moléculas sejam arrastadas do gel para o tampão de corrida (HEGYI et al., 2013).

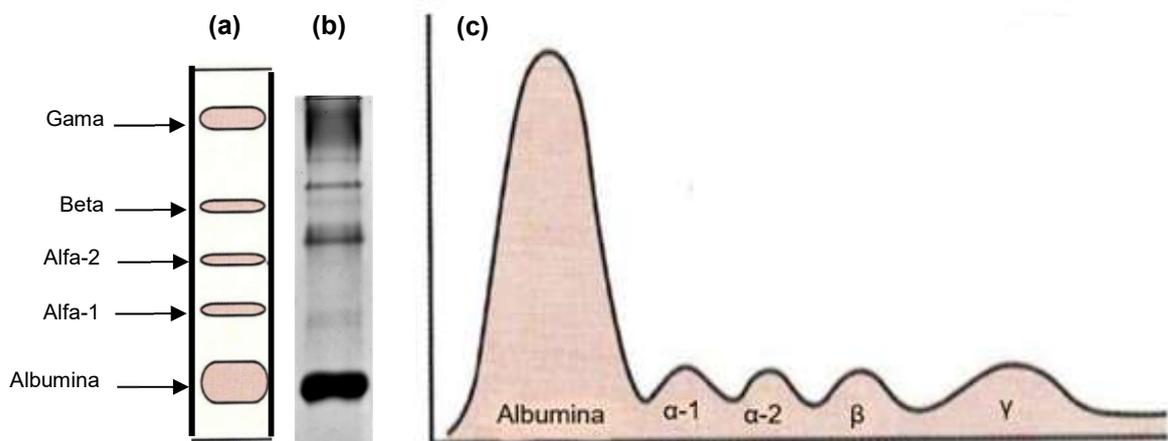
As proteínas que foram isoladas no gel não podem ser visualizadas a olho nu, mas podem ser visíveis após o gel ser corado com corantes específicos (normalmente Azul de Coomassie Brilhante R-250 ou nitrato de Prata) e ser descorada com solução descorante ácida (WILSON; WALKER, 2009).

2.6.2.1 Leitura e interpretação do gel de eletroforese

Para a leitura do gel utiliza-se um equipamento que permite o escaneamento por densitometria. Geralmente o software de análise está ligado ao software de digitalização (WESTERMEIER et al., 2005). Na eletroforese de proteínas plasmáticas geralmente predominam cinco bandas, que correspondem à albumina, alfa-1-globulina, alfa-2-globulina, betaglobulina (que pode se dividir em beta-1-globulina e beta-2-globulina) e gamaglobulina. Eventualmente, pode ser observada a presença

da pré-albumina. As figuras 14a e b, apresentam em um gel de eletroforese as disposições das cinco bandas principais presentes no soro plasmático. Os pesos moleculares de marcadores proteicos são utilizados como referência para a quantificação de cada banda, formando um diagrama (figura 14c) (WESTERMEIER et al., 2005).

Figura 14 - Padrão de eletroforese PAGE nativo de proteínas plasmáticas: (a) padrão de bandas de proteínas plasmáticas, (b) amostra de plasma de um indivíduo sadio e (c) Conversão das bandas de eletroforese em um eletroferograma.



Fonte: <https://www.slideshare.net/mprasadnaidu/plasma-proteins-32909503>. Acessado em 08/06/2017

2.6.3 Quantificação de proteínas

O método de Bradford (1976) é rápido e sensível, mas os resultados das dosagens dependem muito do grau de pureza do corante (BRADFORD, 1976). Também é um método simples, barato e que sofre menos interferência de conteúdos não proteicos presentes em amostras biológicas e de reagentes. Ele utiliza o corante Azul de Coomassie Brilhante G-250, que se liga aos aminoácidos arginina, lisina, triptofano, histidina, tirosina e fenilalanina que compõem as proteínas (através de forças de van der Waals e interações eletrostáticas) (OWUSU-APENTEN, 2002), mas não se liga a aminoácidos livres (KRUGER, 2002). A maior resposta é obtida em ensaios que tenham resíduos de arginina, com leitura por espectroscopia a 595 nm (OLSON e MARKWELL, 2007).

A metodologia de Bradford é muito utilizada na quantificação de proteínas solúveis, e é superior aos métodos de Lowry e biureto, isso por sofrer menor interferência de fenólicos. Porém, para a utilização em amostras com metabólitos secundários de plantas, é preciso utilizar esta metodologia com modificações. Alguns reagentes minimizam as interações proteínas-taninos (PVP, TCA, 2-mercaptoetanol, EDTA) e podem ser utilizados quando associados a esse método (OWUSU-APENTEN, 2002). Como referência para a quantificação, utiliza-se um padrão proteico que permite traçar uma curva padrão e estimar a concentração de proteínas no meio.

Os valores considerados como referência das concentrações relativas de proteínas totais e das cinco principais frações proteicas presentes no plasma humano (indivíduo normal), são descritos na tabela 1. A albumina é a proteína mais abundante no plasma, correspondendo em média cerca de 60% da concentração total de proteínas (TUAZON, 2014). A faixa da gamaglobulina é composta pelas imunoglobulinas, predominantemente pela IgG (~14% das proteínas totas) (STANDRING; BORLEY, 2010).

Tabela 1 - Concentração de proteínas totais e das principais frações de proteínas presentes no plasma de um indivíduo normal.

	Concentração (%)	Concentração (g/dL)
Proteínas Totais	100 %	6,0 – 8,2
Albumina	55 – 69,5	3,3 – 5,7
α -1 Globulina	1,7 – 4,9	0,1 – 0,4
α -2 Globulina	5 - 11	0,3 – 0,9
β Globulina	11,7 – 14,6	0,7 – 1,2
γ Globulina	8,3 – 18,3	0,5 – 1,5

Fonte: Tuazon (2014).

2.6.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) e Potencial Zeta (ζ)

Muitos processos de separação e purificação de produtos biológicos podem ser controlados pelo tamanho e propriedades elétricas de superfície das partículas (proteínas). Um estudo relata o uso de EDL e ζ para avaliar o tamanho das partículas

e as cargas superficiais de moléculas em diferentes concentrações e pHs (THONGKAEW et al., 2014).

A medida do tamanho de partícula pode ser utilizada para determinar o grau de agregação das proteínas, que pode variar de acordo com o pH e força iônica. São técnicas muito utilizadas para estudar a formação de complexos tanino/proteína e para otimizar processos de precipitação, seguido por centrifugação ou filtração (BOWEN et al., 1998; LE BOURVELLEC; RENARD, 2012).

O espalhamento dinâmico de luz é uma técnica granulométrica que determina algumas propriedades de uma partícula em suspensão, baseadas no diâmetro esférico como tamanho das partículas, formação de agregados, monitoramento de ligação a ligantes e investigação do comportamento de soluções complexas. É muito utilizada para dimensionar proteínas, dispersões e colóides (SHAW, 2014).

As partículas se movimentam constantemente e de forma aleatória, e isso é chamado de movimento browniano, sendo que a velocidade do movimento varia de acordo com o tamanho da molécula (quanto menor, maior a velocidade), temperatura (quanto maior, maior a velocidade) e viscosidade do meio (quanto menor, maior a velocidade) (DOMINGUES et al., 2008; SHAW, 2014). A dispersão de luz é obtida com a emissão de um feixe de luz (laser) que colide com as partículas, se dispersando em diferentes intensidades de acordo com o movimento browniano (MALVERN, 2014). A análise das variações de intensidade de luz gera o coeficiente de difusão translacional (D), que define a velocidade de difusão e pode ser convertido no diâmetro hidrodinâmico (d_H) através da equação de Stokes-Einstein:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

, onde k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade (SHAW, 2014).

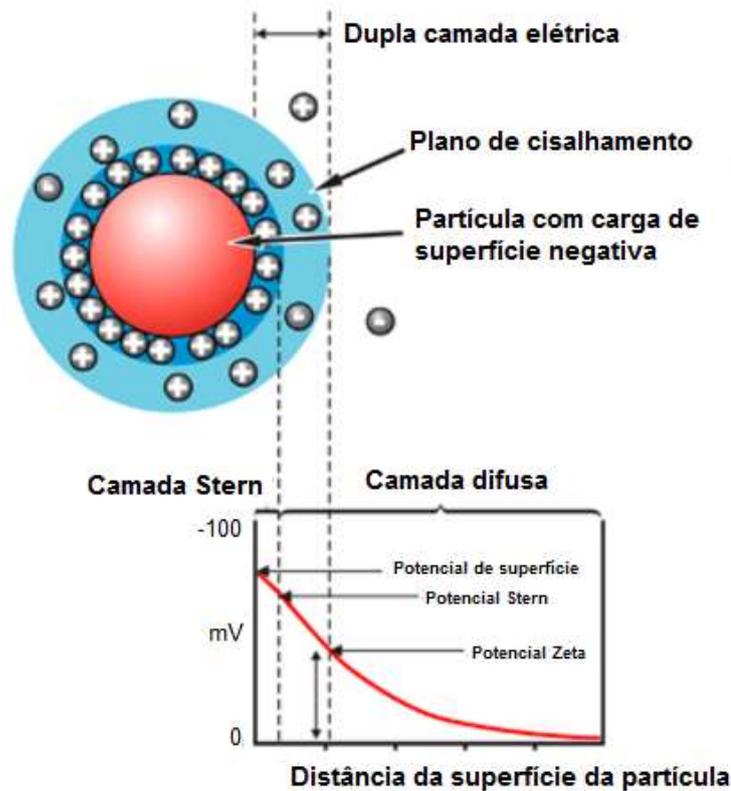
Além do tamanho de partícula, o cálculo do Potencial Zeta permite compreender a influência das cargas na agregação e dispersão de partículas em meio líquido. Pode ser usado como indicador de estabilidade do sistema coloidal, possibilitando diminuir o tempo e custo de uma formulação. Isso é possível porque os

grupos funcionais presentes na superfície das partículas podem se dissociar ou adsorver íons em meio aquoso, influenciando no potencial de superfície das partículas (DOMINGUES et al., 2008; SALGIN; SALGIN; BAHADIR, 2012).

A variação de pH leva a ionização de aminoácidos em meio aquoso, dando origem à carga superficial negativa das proteínas. Assim, as proteínas influenciam nas cargas do meio em que se encontram, sendo o plasma ou soluções. Devido à carga superficial negativa, alguns íons de carga oposta (cátions) se ligam à superfície das proteínas plasmáticas, através de atração eletrostática. Essa camada compacta de íons formada ao redor da proteína, e que chega a se mover com ela, é chamada Camada Stern (HUNTER, 1981).

As cargas negativas das proteínas continuam atraindo íons, mas estes são repelidos pelas cargas positivas da Camada de Stern. Com isso, uma camada de contra íons é formada, chamada de camada difusa (HUNTER, 1981). Os íons que estão fortemente ligados à molécula se movem com ela na presença de um campo elétrico. Essas duas camadas, sendo uma que se move e a outra não, são delimitadas pelo Plano de Cisalhamento (DOMINGUES et al., 2008). O movimento de cargas neste plano gera uma diferença de potencial elétrico, e o dimensionamento dessas interações eletrostáticas entre superfícies carregadas é conhecido como Potencial Zeta (HUNTER, 1981). Toda essa distribuição de cargas e formação de camadas podem ser visualizadas na figura 15.

Figura 15 - Representação esquemática da distribuição de cargas e formação da dupla camada elétrica que circunda uma partícula em meio aquoso. O potencial zeta é formado no plano de cisalhamento.



Fonte: Disponível em <https://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques#smgs>. Acessado em 20 maio 2017.

A carga superficial da partícula depende do pH da solução em que se encontra, podendo chegar a zero se o pH estiver no seu ponto isoelétrico (NANOCOMPOSIX, 2016). Outras características como tipo e concentração de sal no meio aquoso também interferem na carga elétrica das moléculas (SALGIN; SALGIN; BAHADIR, 2012). Estes e outros fatores podem influenciar a mobilidade das proteínas, como a viscosidade e a constante dielétrica do líquido de dispersão, e também o potencial eletrocinético, presente entre a partícula em movimento e o líquido (WONGSAGONSUP et al., 2005).

A intensidade do ζ indica o grau de repulsão entre as partículas de cargas semelhantes (HORIBA INSTRUMENTS, 2009), e tem grande influência na performance dos processos de separação de proteínas plasmáticas (BOWEN et al.,

1998). Na região do ponto isoelétrico da proteína, o ζ fica em torno de zero, o que significa que ocorreu a precipitação ou coagulação completa da substância (WONGSAGONSUP et al., 2005).

A técnica é realizada adicionando a amostra de uma solução, dispersão ou suspensão em uma cubeta que possui dois eletrodos. Quando um potencial elétrico é aplicado ao eletrodo, há uma mobilidade eletroforética em direção ao eletrodo que possui carga contrária à das partículas. O equipamento de leitura então emite um feixe de laser, fazendo com que as partículas se movam através dele. Com isso, a variação na intensidade da luz do meio ocorre numa frequência proporcional à velocidade da partícula. A medida dessas variações permite calcular o potencial zeta (NANOCOMPOSIX, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o perfil de precipitação das proteínas plasmáticas, a partir do plasma humano, utilizando ácido gálico e ácido tânico como agentes precipitantes, sob diferentes condições de precipitação.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes solventes (água e solução etanólica 30%) para o ácido gálico e ácido tânico durante as precipitações de proteínas a partir do plasma humano;
- Avaliar a influência da ordem de ajuste do pH do plasma, antes ou após a adição das soluções dos taninos;
- Avaliar a variação do tempo de homogeneização e concentrações de ácido gálico e ácido tânico;
- Estudar a influência do pH durante as precipitações;
- Verificar as proteínas precipitadas nas pastas brutas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- Quantificar as proteínas pelo método de Bradford;
- Avaliar a interação do tanino/proteína através do perfil de agregação das moléculas por EDL e suas cargas superficiais pelo ζ .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO PLASMA

Os experimentos deste trabalho foram realizados após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE e da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco - HEMOPE (Processo n° 1.727.579). O material de partida utilizado nos experimentos foi o plasma fresco congelado, obtido por doação de voluntários do estado de Pernambuco. As bolsas de plasmas foram cedidas pela Fundação HEMOPE e são consideradas excedentes, ou seja, aquelas bolsas que não são utilizadas nos serviços de hemoterapia de Hospitais e Clínicas. Visando garantir segurança, todo o plasma disponibilizado foi previamente triado no setor de sorologia do HEMOPE, sendo realizados testes sorológicos determinados em legislação sanitária específica. Todas as informações do doador foram mantidas em sigilo pelo Hemocentro, sendo fornecidas para a UFPE apenas as informações sobre os testes sorológicos realizados, seguindo todos os critérios de doação exigidos pela RDC n° 34, de 11 de Junho de 2014 (ANVISA, 2014).

4.2 MATERIAIS

Todos os insumos farmacêuticos utilizados nos processos experimentais possuíam grau de pureza que atendiam os requisitos farmacopeicos. Os ácidos gálico e tânico foram obtidos comercialmente. A IgG foi obtida por Gouveia (2013) em parceria com o HEMOPE e UFPE, estudo este que visou a produção de imunoglobulina humana intravenosa pelo método de Cohn-Oncley, e foi cedida ao Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia e Hemoderivados da UFPE.

4.3 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS PARA AS PRECIPITAÇÕES

Para realizar as precipitações, alguns parâmetros foram pré-determinados. Baseado em testes iniciais realizados e não descritos aqui, foram utilizados: 1,5 g de tanino em relação ao volume de plasma (1,5g/100ml), diluídos em 125 ml de água (225 ml de volume final e concentração de 0,67% de tanino) e 41,4 ml de solução etanólica 30% (141,4 ml o volume final, concentração de 1,06 % de tanino). Os ajustes de pH foram feitos após a adição das soluções dos taninos nos sobrenadantes I e II e o tempo de homogeneização foi de 30 minutos.

Em relação aos pHs de precipitação, na tentativa de precipitar algumas proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos, foram utilizadas duas proteínas como referência, albumina e a imunoglobulina G, que possuem respectivamente pontos isoelétricos iguais a 4,9 e 6,9. Tais proteínas foram selecionadas por estarem em maiores concentrações no plasma.

Todos os experimentos foram realizados com duas precipitações sucessivas, e para cada uma delas houve um ajuste de pH. Baseado na sequência de precipitação proteica do método de Cohn (1946), que obtém as imunoglobulinas na fração II + III e a albumina na fração V, foram realizados o ajuste de pH para 6,9 na primeira precipitação, visando a precipitação da IgG, e o ajuste de pH para 4,9 na segunda precipitação, visando a precipitação da albumina. Essa ordem é indicada para que não ocorram perdas de imunoglobulina durante o processo, dado sua menor concentração em relação à albumina. Estas condições de pH foram utilizadas para as variações de solventes, ordens de ajustes de pH, concentrações de taninos e tempos de homogeneização. Para os testes de variações de pH, para cada variação de pH realizada, o mesmo pH foi utilizado para as duas etapas de precipitação.

Adicionalmente, os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (~25°C). No entanto, optou-se por realizar a centrifugação das misturas a baixa temperatura (8°C), pois isso favorece a formação de sedimentos mais firmes no fundo dos tubos e evita o aquecimento das amostras (ZUMBO, 2013).

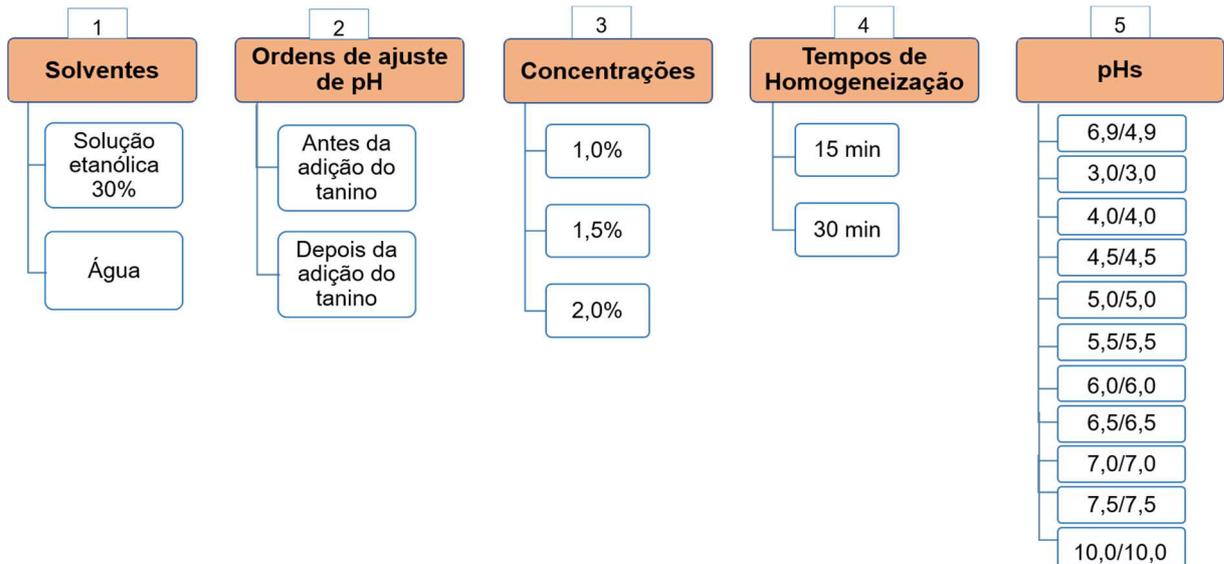
4.4 PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS UTILIZANDO ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO TÂNICO

As soluções (aquosa e etanólica 30%) de AG e AT, foram preparadas em balões volumétricos antes de iniciar as precipitações, considerando a proporção de 1,5 g de cada tanino para 125 ml de água ultrapura (solução de ácido gálico 0,07 M e de ácido tânico 0,007 M) e/ou 41,4 ml de solução etanólica 30% (solução de ácido gálico 2,13 M e de ácido tânico 0,213 M).

Bolsas de plasma (~200 ml) foram descongeladas a +4°C por 24 horas, em quantidade suficiente para realizar experimentos com 100 ml cada. O plasma foi clarificado por centrifugação à 3500 RPM, a 8°C por 20 minutos. O crioprecipitado formado foi separado vertendo o criosobrenadante em béquer e teve seu pH e temperatura medidos. Separou-se em diferentes béqueres 100 ml de criosobrenadante para realizar o experimento correspondente a cada condição proposta (de acordo com a figura 16), em temperatura ambiente (~25°C). Em seguida, a solução de tanino preparada (125 ml de solução aquosa ou 41,4 ml de solução etanólica de tanino) foi adicionada à 100 ml de criosobrenadante. Posteriormente, as misturas foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) 6M ou hidróxido de sódio (NaOH) 5M para ajuste do pH, tendo seus pHs ajustados para diferentes valores. O ajuste foi realizado antes ou após a adição das soluções de taninos. As misturas foram homogeneizadas em temperatura ambiente no agitador magnético, nos diferentes tempos propostos e em seguida, centrifugadas de acordo com os parâmetros anteriormente citados. O precipitado I e uma alíquota de 1,5 ml do sobrenadante I foram armazenados a -20°C para realização da quantificação proteica e da eletroforese. O sobrenadante I teve seu pH e temperatura medidos. Cada solução de tanino foi adicionada novamente no sobrenadante I, seguindo a proporção de 1,5 g de tanino para 100 ml de sobrenadante. As misturas foram novamente tratadas com ácido clorídrico (HCl) 6M ou hidróxido de sódio (NaOH) 5M para ajuste do pH, antes ou depois da adição das soluções dos taninos. Após a homogeneização em temperatura ambiente no agitador magnético, por diferentes tempos, o precipitado II foi separado por nova centrifugação e ambos, o precipitado II e o sobrenadante II,

foram armazenados a -20°C para testes posteriores. O fluxograma da metodologia é ilustrado na figura 17.

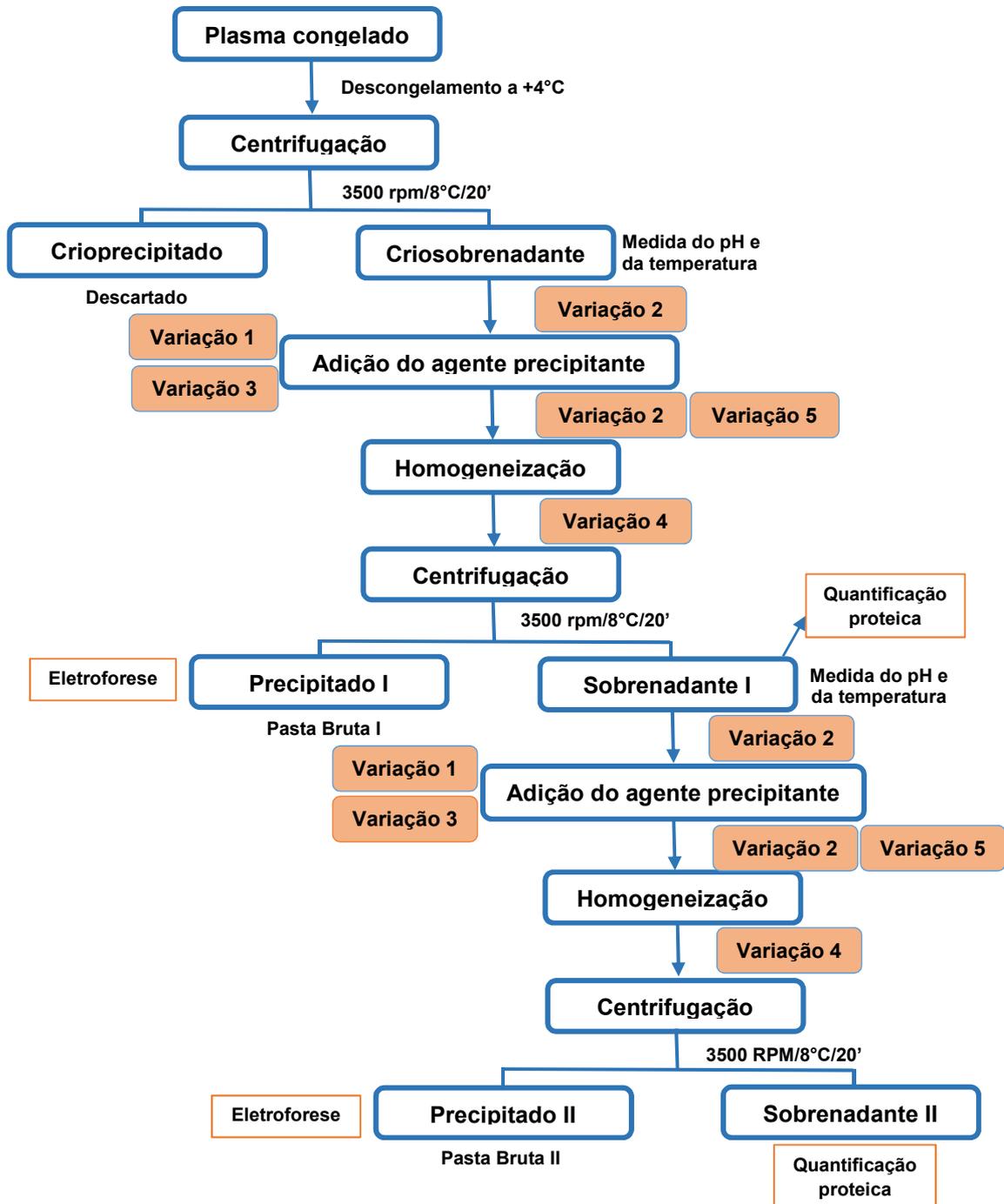
Figura 16 - Condições utilizadas nos experimentos: (1) solventes para os taninos, (2) ordens de ajuste de pH, (3) concentrações dos taninos, (4) tempos de homogeneização e (5) ajustes de pH.



Em cada experimento foi utilizada somente uma condição. Para as condições de 1 a 4, a mesma variação foi utilizada nas duas etapas de precipitação. Para a condição 5, de pH, foram utilizados os pHs como descritos acima, na primeira e segunda precipitações, respectivamente. Alguns parâmetros foram pré-determinados para iniciar as precipitações, como: 125 ml de água, ajuste de pH depois da adição do tanino, concentração de 1,5% de tanino em relação ao volume de plasma, tempo de homogeneização de 30 minutos e pHs de 6,9 e 4,9, considerando os pontos isoelétricos da IgG e da albumina.

Fonte: O autor.

Figura 17 - Fluxograma geral do processo de produção de pastas brutas de proteínas plasmáticas.



Fonte: O autor.

4.5 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS FRACIONADAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE (PAGE) NATIVO

As pastas brutas obtidas com os precipitados I e II, e sobrenadantes II, foram analisados por eletroforese PAGE nativo em gel de poliacrilamida. Utilizou-se o kit Mini-PROTEAN Tetra Cell, fonte elétrica e reagentes obtidos da BIORAD®. Os géis de poliacrilamida foram preparados nas concentrações de 4% (gel de empilhamento) e 10% (gel de separação), em tubos falcon, seguindo o protocolo do manual do equipamento, conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Composição dos géis para eletroforese PAGE nativo.

Soluções	Volume em µl para um gel	
	Gel de empilhamento	Gel de separação
	4%	10%
Água destilada	1240	2490
Acrilamida/Biscacrilamida	268	1980
Tampão Tris-HCl pH=8,8	-	1500
Tampão Tris-HCl pH=6,8	500	-
APS 10%	10	30
TEMED	2	4,2

Conjuntos de placas de vidro (lisa e espaçadora) foram montados no suporte do kit adquirido. Foram aplicados 3,5 ml do gel de separação, com pipeta, no conjunto de placas e cobertos com butanol 50% até sua total polimerização. Em seguida, o butanol foi removido, através de capilaridade, por papel filtro até total secagem. Posteriormente foi adicionado 1,0 ml de gel de empilhamento e em seguida, encaixado o pente para formação dos poços de aplicação (10 poços em cada gel). Os géis polimerizados, já sem o pente, foram transferidos para o suporte com eletrodos e encaixados dentro da cuba. Adicionou-se o tampão de corrida entre as placas até cobrir os poços. Todas as amostras foram preparadas utilizando 50 µg de pasta bruta úmida formadas com os complexos T/P, diluída em 950 µl de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram misturadas ao tampão de amostra na proporção 1:2. Em um dos poços formados no gel de empilhamento foi aplicado 10 µl de marcador

proteico como referencial padrão (BIORAD®) e no restante dos poços, foi aplicada uma alíquota de 10 µl de amostra. Finalizada a aplicação, a cuba foi tampada e conectada à fonte elétrica mantendo 80 V de corrente inicial por 10 minutos para o gel de empilhamento, seguido de 120 V até o final da corrida para o gel de separação, mantendo a amperagem livre. Após a corrida, os géis foram removidos das placas de vidro. Cada gel foi colocado em um recipiente com 25 ml de corante Coomassie de Azul Brilhante e agitados de forma lenta por 1 hora. A descoloração para a visualização das bandas proteicas foi realizada em duas etapas de 30 minutos com solução descorante contendo 45 ml de metanol, 4 ml de ácido acético e água q.s.p. 100 ml.

A captação das imagens das bandas proteicas foi realizada por meio do densitômetro Bio-DS-5000 plus Microtek e do software LPixImage (Loccus Biotecnologia®).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

4.6.1 Preparo da curva de calibração de BSA

Para o preparo da solução estoque de BSA em um balão volumétrico de 10 ml, foram dissolvidos 250 µL de BSA 40 mg/ml em água ultra-pura, obtendo uma concentração final de 1 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas adicionando alíquotas de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL da solução estoque, em triplicata, em tubos de ensaio e acrescentados água até o volume final de 100 µL. O branco foi preparado em outro tubo de ensaio com 100 µL de água. Aos tubos foram adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford e foram levemente agitados em vórtex. As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 595 nm, no espectrofotômetro Biospectro SP-220, utilizando uma única cubeta de plástico. O branco foi utilizado para zerar o equipamento e em seguida, foram feitas as leituras dos padrões e das amostras.

4.6.2 Quantificação das amostras dos sobrenadantes I e II

Foram preparadas diluições de duas amostras nas proporções de 1, 1:2, 1:4, 1:10 e 1:20, em triplicata, para efeito de padronização. Em cada tubo foram adicionados 100 μ L das amostras e 2,5 ml do reagente de Bradford. A solução corada foi agitada em vórtex e depois de 5 minutos suas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro, conforme descrito no item anterior.

As amostras do plasma de origem foram diluídas a 1% e as amostras dos sobrenadantes a 5%, com água ultrapura. Depois, 500 μ L de cada amostra diluída foram misturados com 125 μ L de ácido tricloroacético a 72%. Após 1 h de incubação a +2° C e centrifugação (14600 rpm, 15 min), os sobrenadantes foram descartados e os precipitados dissolvidos em 1000 μ L de NaOH 1 M. Em seguida, 100 μ L das soluções resultantes foram colocadas em tubos de ensaio e foram adicionados 2,5 mL de reagente de Bradford. A solução corada foi agitada em vórtex e depois de 5 minutos suas absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro.

4.6.3 Cálculo das concentrações proteicas

Os cálculos das quantidades de proteínas plasmáticas presente nos plasmas de origem e nos sobrenadantes I e II foram baseados na curva padrão de BSA e sua equação da reta. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição inicial de cada amostra (x 20 para amostras preparadas a 5% e x 100 para amostras preparadas a 1%) e também pelo fator de correção, que corresponde às diluições realizadas durante à execução da metodologia de quantificação (x 20). As concentrações de proteínas precipitadas foram dadas como perda percentual da quantidade inicial de proteínas plasmáticas presentes no plasma de origem do experimento. Então, 100% significa que a quantidade total das proteínas foi precipitada e um resultado de 0% significa que não houve precipitação. As

quantificações foram realizadas em triplicata, sendo calculada a média e desvio padrão de cada amostra.

4.7 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ E POTENCIAL ZETA

O diâmetro hidrodinâmico das partículas e o potencial zeta foram medidos no aparelho Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) com um laser He-Ne ($\lambda = 633$ nm), ângulo de espalhamento fixado em 173° , temperatura a 25°C e 2 minutos de estabilização da temperatura antes das medições. Todas as medidas foram executadas utilizando os mesmos parâmetros.

Foram analisadas inicialmente amostras diluídas em água ultrapura, de IgG (0,05g/10 ml), e para ambos os ácidos gálico e tânico (0,15g/10 ml), considerando a concentração das soluções de taninos de 1,5% em relação ao volume da solução de IgG. Posteriormente, foram analisadas as misturas das soluções de IgG + ácido gálico e IgG + ácido tânico, na proporção de 2000:30 μl de IgG/tanino. A força iônica das amostras foi mantida constante e o pH ajustado para 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 10,0, diretamente antes das medições. Os eppendorfs com as soluções foram homogeneizados e deixados em repouso durante 10 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata, e para cada amostra foram realizadas três medidas no modo automático do equipamento.

Para a técnica do potencial zeta foram utilizadas células zeta descartáveis DTS 1060 e para o espalhamento dinâmico de luz, cubeta de dimensionamento DTS 0012. As medidas foram analisadas utilizando o software do equipamento ZetaSizer 10.11.1, Malvern®. Os dados finais obtidos são referentes à média das triplicatas \pm desvio padrão da média e os gráficos foram plotados no programa Origin® 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de avaliar os perfis de precipitação das proteínas plasmáticas pelos taninos (ácido gálico e ácido tânico), foram realizados ensaios com variações de pH, ordem de ajuste de pH (antes ou após a adição da solução de tanino), tempo de homogeneização e concentração dos precipitantes. As variações foram realizadas em duas etapas para possibilitar, através do ajuste de pH, a precipitação da proteína desejada. Para cada experimento, as precipitações foram realizadas em pequena escala para determinar as condições ideais. A partir desses testes, foi possível obter o melhor parâmetro de cada variação. As comparações foram feitas utilizando-se eletroforese PAGE nativo, potencial zeta, tamanho de partículas e quantificação de proteínas.

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS PASTAS BRUTAS

As precipitações utilizando os AG e AT resultaram em pastas brutas distintas (figura 19), em relação às colorações, às texturas e nas quantidades de precipitados. As colorações das pastas estão relacionadas às características de coloração dos precipitantes. As cores dos precipitados do AT aumentaram de intensidade a partir do pH 7,0 e o AG a partir do pH 6,0, sugerindo uma possível oxidação dos taninos com o aumento do pH e oxigenação do meio. O ácido tânico (marrom) formou uma pasta bruta marron, mais cremosa e com maior formação de precipitado em relação ao ácido gálico. O ácido gálico (branco), gerou uma pasta esbranquiçada, de textura mais ressecada e menor rendimento de precipitados. As quantidades de precipitados podem ser relacionadas à estrutura dos taninos.

Figura 18 – Imagens dos taninos (pó) utilizados para precipitação de proteínas plasmáticas (em cima) e de suas respectivas pastas brutas obtidas (a baixo). À esquerda está o ácido tânico e à direita, o ácido gálico.



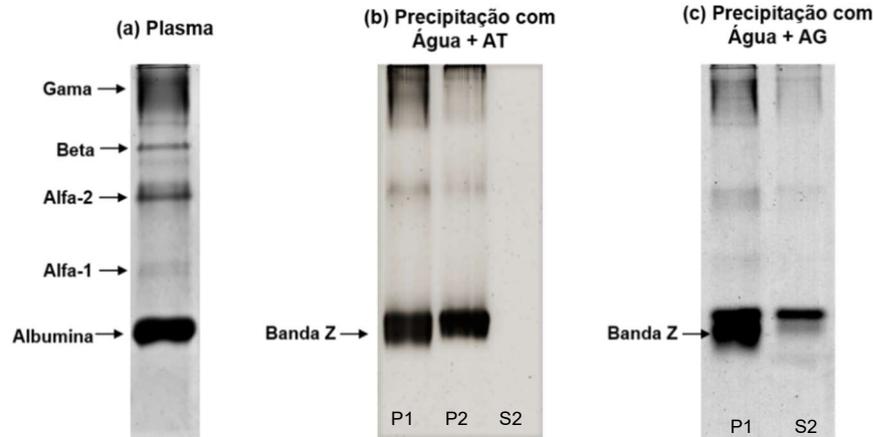
Fonte: O autor

5.2 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

De acordo com as eletroforeses das pastas brutas obtidas, observamos a predominância de três bandas: a gamaglobulina, a alfa2-globulina e a albumina. Mesmo realizando as precipitações em duas etapas sucessivas, utilizando como ajuste de pH os pontos isoelétricos da IgG e da albumina, respectivamente, ainda foi possível observar a presença de mais de uma banda proteica em cada etapa de precipitação.

As imagens de eletroforese também mostraram que o perfil eletroforético das proteínas muda após a formação de complexos solúveis em água, pela combinação das moléculas de taninos e proteínas plasmáticas. Na figura 19a, no padrão eletroforético de plasma humano (indivíduo saudável), as bandas da albumina, alfa-2-globulina, betaglobulina e gamaglobulina estão bem delimitadas, e há traços da alfa-1-globulina.

Figura 19 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo: (a) plasma 1%, (b) precipitação utilizando solução aquosa de AT e (c) precipitação utilizando solução aquosa de AG.



P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

Parâmetros utilizados nas precipitações: pH 6,9 na 1ª precipitação e 4,9 na 2ª precipitação; 1,5 g de tanino para 100 ml de plasma; tempo de homogeneização de 30 minutos; ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor

É possível visualizar nas eletroforeses (figuras 19b e c) a presença de uma banda adjacente às bandas das proteínas plasmáticas, chamada aqui de banda Z, principalmente unida à banda da albumina. Esta banda se moveu e ampliou outras bandas no gel, e isso ocorreu devido à presença de complexos maiores do que as proteínas isoladas. A presença dessa banda pode ser justificada pela carga negativa dos grupos hidroxílicos fenólicos nos complexos e pela mudança na mobilidade eletroforética de uma proteína após a complexação desta com o tanino, visto que a forma e a carga da proteína afetam a mobilidade eletroforética. A ausência de banda Z com algumas proteínas pode ser justificada pela instabilidade do complexo. No estudo de Kusuda e colaboradores (2006), a formação de uma nova banda também é visualizada e eles sugerem que isso ocorra devido a formação de complexo heterogêneos, resultantes da ligação de diferentes quantidades de moléculas de taninos, ligadas a uma molécula de proteína.

As figuras 19b e c também revelam que a mudança do perfil da mobilidade eletroforética do complexo ácido tânico/proteína (AT/P) é diferente da mobilidade do complexo ácido gálico/proteína (AG/P). Essa diferença de mobilidade pode ser

atribuída ao ácido carboxílico presente na molécula de AG (KUSUDA; HATANO; YOSHIDA, 2006).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Devido à interferência do tanino na quantificação de conteúdos proteicos, o método de escolha para a quantificação de proteínas foi o método de Bradford com adaptações para diminuir a interferência dos taninos, método este descrito por Adamczyk et al. (2012). As quantificações das proteínas foram realizadas precipitando os complexos tanino-proteína remanescentes nos sobrenadantes com TCA e posterior solubilização dos precipitados formados com hidróxido de sódio (NaOH), também utilizado para aumentar a sensibilidade do método frente a diferentes proteínas.

5.3.1 Curva de calibração

Para determinar as concentrações das amostras por espectrofotometria, foram obtidas as absorbâncias de amostras de diferentes concentrações, a partir de uma solução padrão de BSA cuja concentração era conhecida (1 mg/ml).

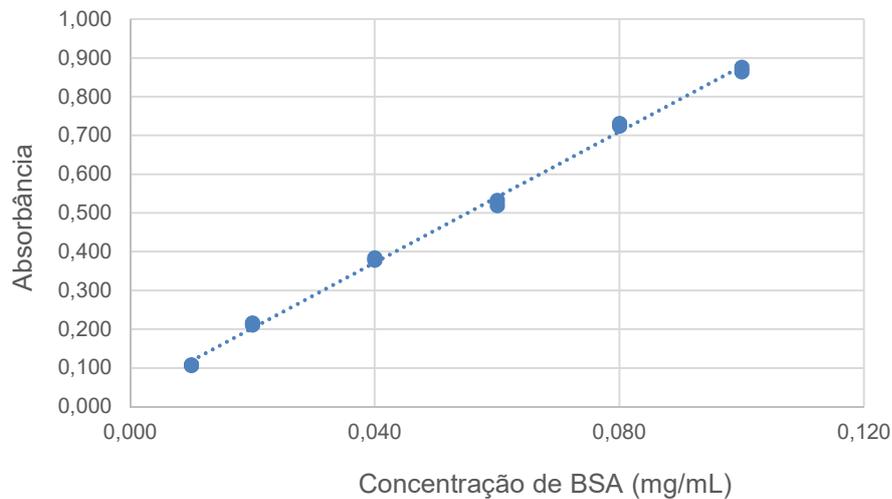
A curva de calibração do padrão apresentou linearidade dentro do intervalo de 90 a 110%, na faixa de concentração estabelecida, cobrindo uma faixa linear de trabalho suficiente para quantificação das proteínas. Os resultados obtidos a partir da linearidade demonstraram que a variável dependente (absorbância) é diretamente proporcional à variável independente (concentração do analito) dentro do intervalo estudado, e que a equação matemática obtida expressa adequadamente esta relação. A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação de 0,9976, situado dentro do critério mínimo aceitável, com variabilidade menor que 1%. Isto comprova que há adequação do método no que concerne à relação entre as

concentrações de BSA e as respostas espectrofotométricas, revelando boa qualidade da reta de calibração (gráfico 1). A equação da reta é dada por:

$$y = 8,4456x + 0,0344$$

, onde y corresponde à absorbância medida de cada amostra do padrão de calibração, e x corresponde à concentração dos mesmos.

Gráfico 1 - Curva padrão de BSA (0,01 - 0,1 mg/ml), dada a equação da reta $y = 8,4456x + 0,0344$, com $R^2 = 0,9976$.



Em relação à repetibilidade, o método apresenta coeficiente de variação inferior a 5 %, considerando os dados homogêneos, estabelecendo valores com 95% de confiança.

As concentrações proteicas foram calculadas através da equação da reta obtida com a curva padrão de BSA e multiplicadas pelo fator de diluição inicial (de acordo com o tipo de amostra) e pelo fator de correção ($FC=20$), devido a diluições ocorridas durante a execução da quantificação. Para os resultados apresentados em porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de proteínas plasmáticas precipitadas} = \frac{PTP - PRS}{PTP} \times 100$$

, onde *PTP* corresponde às proteínas totais do plasma e *PRS* corresponde às proteínas remanescentes nos sobrenadantes. Quantidades de proteínas precipitadas inferiores ao limite de quantificação foram descritas como 0%. As concentrações de proteínas totais variaram de 7,75 a 8,12 g em 100 ml de plasma.

5.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS SOLUBILIZANTES PARA O AT E AG NAS PRECIPITAÇÕES

5.4.1 Solubilização dos taninos

A adição dos ácidos em pó, diretamente no plasma, pode formar aglomerados que não se desfazem com a homogeneização. Para facilitar a mistura do plasma com os agentes precipitantes, foram preparadas soluções de AG e AT, utilizando como solventes água ultrapura e solução etanólica 30%. A inclusão da solução etanólica foi devido à dificuldade encontrada na solubilização do AG. O álcool é um co-solvente miscível em solventes polares e por esse motivo, é muito utilizado em precipitações proteicas (COHN et al., 1946).

O volume de água utilizado para a solubilização dos taninos foi de (125 ml para 1,5 g de tanino), volume este considerado elevado quando comparado ao volume inicial de plasma (100ml), porém, necessário para solubilizar o AG. Como descrito na literatura, a solubilidade deste tanino é de 1g para 87ml de água (NCBI, 2017a). Conforme observado em nossos ensaios e também relatado por Noubigh et al. (2012), a solubilidade deste ácido se mostrou maior quando se aumentou a temperatura da dissolução, mas é desaconselhável para evitar a desnaturação proteica.

O AT por sua vez, é facilmente solubilizado em água, sendo que 1g se dissolve em 0,35 ml (NCBI, 2017b). Para solubilizar 1,5 g deste ácido, também foram utilizados os volumes de 125 ml de água e 41,4 ml de solução etanólica 30%, para permitir a comparação das quantidades de precipitados obtidos com os dois taninos.

A concentração de 30% da solução etanólica foi definida com o objetivo de se usar um menor volume de solução para solubilizar o AG (41,4 ml para dissolver 1,5g), quando comparado ao de água (125 ml para 1,5 g de tanino) e, também com foco na preservação da estrutura das proteínas. O mesmo volume foi utilizado para solubilizar o AT. Por serem utilizados 100 ml de plasma no início de cada precipitação, após a mistura da solução de tanino ao plasma, a concentração final de álcool etílico foi de 8,78%. De acordo com Kundu e colaboradores (2017) e Yoshikawa et al. (2012), concentrações moderadas de etanol (10% - 40%) vêm sendo utilizadas com eficiência em métodos de fracionamento de proteínas plasmáticas, pois concentrações mais elevadas podem desestabilizar e desnaturar proteínas.

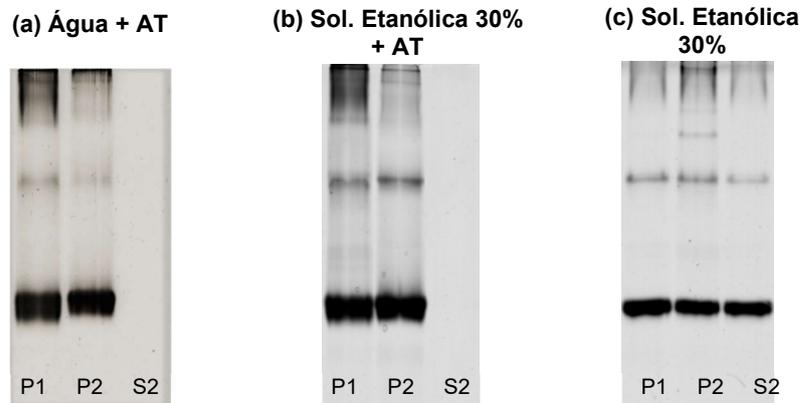
Quanto à temperatura, a solução aquosa não provocou nenhuma variação, e com a solução etanólica, a variação foi de apenas 1°C. Hagerman et al. (1992) afirmam que temperaturas entre 4 e 44°C não costumam afetar a interação T/P e Dawra (1988), relata que a maior interação T/P ocorre a ~25°C.

A pouca solubilidade do AG em água reflete a baixa capacidade de formação de ligações de hidrogênio, e isso ocorre devido ao tamanho da molécula e presença de poucas hidroxilas livres (BENDER, 2014). Por outro lado, o AT possui maior número de grupos hidroxila em sua molécula, acarretando no aumento das ligações de hidrogênio com os solventes, aumentando sua solubilidade.

5.4.2 Influência dos solubilizantes dos AT e AG nas precipitações

Avaliando a influência dos solubilizantes para o AT, os géis de eletroforese das proteínas precipitadas a partir do ácido dissolvido em água (figura 20a) e em solução etanólica 30% (figura 20b), demonstraram uma grande semelhança no perfil de precipitação. O gráfico 2 também demonstra semelhança em relação às quantidades de precipitados obtidos, tanto utilizando a água como solubilizante (P1=74,8% e P2=25,2%) quanto com solução etanólica (P1= 74,62% e P2= 25,38%). A figura 20c demonstra o perfil de precipitação com solução etanólica 30% sem adição de tanino.

Figura 20 – Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes solubilizantes para o AT: (a) Água, (b) Solução etanólica 30% e (c) Solução etanólica 30%, sem adição de tanino

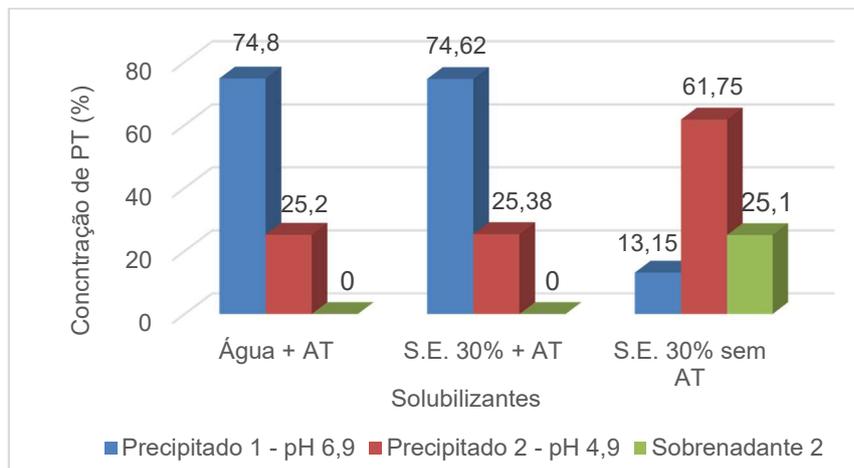


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

Parâmetros utilizados nas precipitações: pH 6,9 na 1ª precipitação e 4,9 na 2ª precipitação; 1,5 g de tanino para 100 ml de plasma; tempo de homogeneização de 30 minutos; ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor

Gráfico 2- Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, utilizando diferentes agentes solubilizantes para o AT: água, solução etanólica 30% e solução etanólica 30% sem adição de tanino.



PT – Proteínas Totais. S. E. – Solução Etanólica.

Na precipitação realizada com AT/água, o AT forma ligações de hidrogênio com água. Isso promove uma competição entre o AT e a água pelos carboxilatos das superfícies das proteínas. A presença de muitas hidroxilas na molécula do AT favorece a sua interação com as proteínas, levando a uma maior precipitação. Como relatado por Bender (2014), a água faz melhor solvatação de íons, deixando também

os fenóis do AT livres para interagirem com as proteínas através de interações hidrofóbicas, favorecendo assim a formação de complexos.

Na precipitação realizada com AT/solução etanólica, devido à baixa concentração de etanol utilizada, há menor interação deste com o AT, deixando hidroxilas do AT disponíveis para realizarem ligações de hidrogênio com as proteínas. A presença do etanol também favorece as interações hidrofóbicas entre os grupos fenólicos do tanino e as proteínas. O fato do AT ser um polifenol, sua maior superfície de interação faz com que este atue como um ligante multidentado com as proteínas, sobrepondo a capacidade de precipitação do etanol.

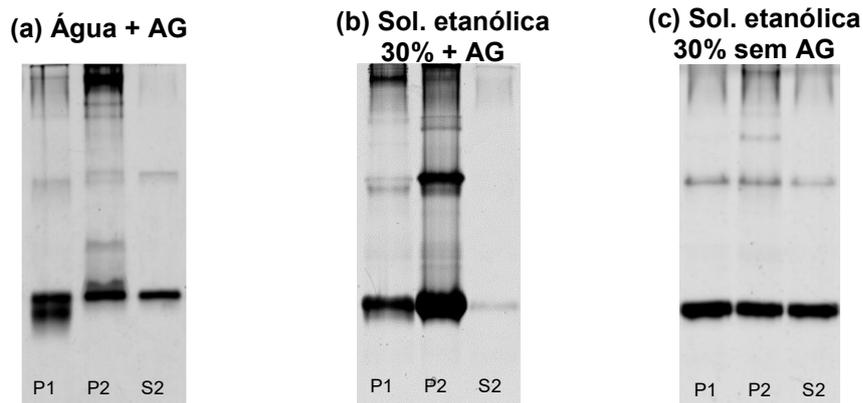
Na precipitação realizada somente com solução etanólica 30% foram obtidos 13,15% e 61,75% das proteínas precipitadas nos P1 e P2, respectivamente, restando ainda proteínas no S2 (gráfico 2). O perfil eletroforético obtido dessa precipitação (figura 20c) é notadamente diferente da precipitação realizada com AT em diferentes solventes (figuras 20a e b). Isto demonstra que o perfil de precipitação obtido utilizando o AT é próprio do tanino e não do seu solvente.

A menor precipitação utilizando apenas solução etanólica, provavelmente se deve ao fato da concentração final de etanol utilizado (8,78%) ter sido insuficiente para baixar a constante dielétrica do meio, com isso há menor exposição dos grupos hidrofóbicos proteicos e conseqüentemente menor precipitação (figura 20c). Isso demonstra que mesmo possuindo a capacidade de alterar a constante dielétrica do meio, a capacidade de precipitação do etanol depende da sua concentração e da molécula de tanino utilizada. Schilcher et al. (2013) realizaram precipitações com soluções etanólicas nas concentrações de 7 a 70%, e puderam confirmar que uma precipitação efetiva ocorre entre 28 e 35%. Eles também verificaram que ocorreu uma precipitação não específica de proteínas plasmáticas, com a presença de várias proteínas em um precipitado, predominantemente a IgG e a HSA.

Em relação ao AG, nas imagens de eletroforese (figura 21 a e b) e nas quantificações (gráfico 3), é possível visualizar que o perfil de precipitação do AG em água é diferente do perfil do AG em solução etanólica. Na precipitação utilizando água como solvente, os valores de proteínas precipitadas foram de 56,34% no P1 e 29,88% no P2, restando 13,7% no S2. O perfil eletroforético (figura 21a) demonstrou que a

banda da albumina apresentou maior intensidade no P1 e a banda da IgG apresentou maior intensidade no P2, maiores intensidades estas fora de seus pontos isoelétricos (pI), 4,9 e 6,9 respectivamente. Ademais, as duas precipitações não foram suficientes para precipitar todas as proteínas, restando proteínas no S2.

Figura 21 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes solubilizantes para o AG: (a) Água, (b) Solução etanol em água 30% e (c) Solução etanólica 30%, sem adição de tanino

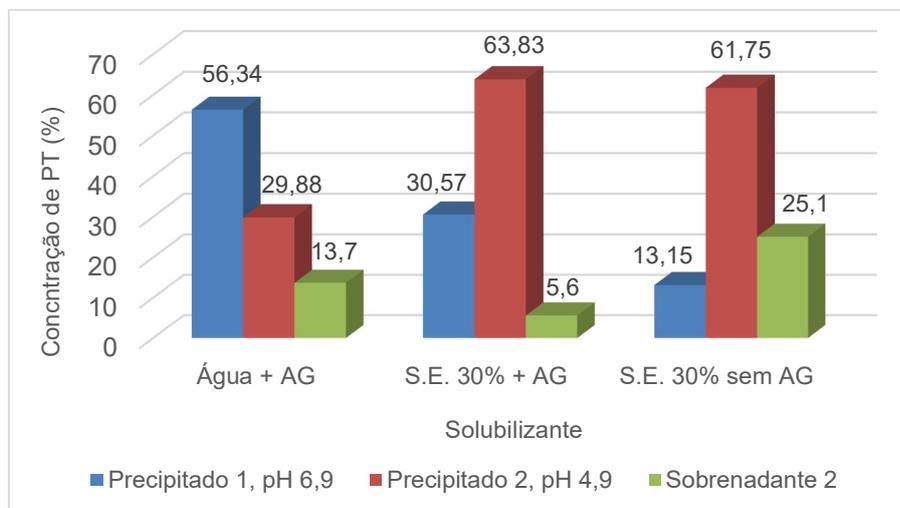


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

Parâmetros utilizados nas precipitações: pH 6,9 na 1ª precipitação e 4,9 na 2ª precipitação; 1,5 g de tanino para 100 ml de plasma; tempo de homogeneização de 30 minutos; ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor

Gráfico 3 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, utilizando diferentes agentes solubilizantes para o AG: água, solução etanólica 30% e solução etanólica 30% sem adição de tanino.



PT – Proteínas Totais. S. E. – Solução Etanólica.

Utilizando a solução etanólica como solvente para o AG, tivemos 30,57% das proteínas no P1 e 63,83% no P2, restando apenas 5,6% de proteínas não precipitadas no S2. A eletroforese (figura 21b) demonstra um melhor perfil das bandas, restando pouca proteína no sobrenadante 2. Comparando-se estes resultados com os da precipitação utilizando apenas solução etanólica 30% (sem a presença de taninos), podemos observar maior semelhança entre estes perfis de precipitação, no entanto, a precipitação realizada com AG/solução etanólica demonstra maior formação de P1 e P2 (figura 21c). Isso pode ser justificado devido à menor constante dielétrica do meio, favorecendo assim a interação AG/P.

Diferentemente do AT, o perfil de precipitação utilizando AG e solução etanólica demonstra sofrer maior influência dos solubilizantes. Como a estrutura do AG é formada apenas por um grupo galoil, o seu poder de interagir através de interações hidrofóbicas e através de ligações de hidrogênio com as proteínas é menor. Como as características da precipitação etanólica se sobressaem às do AG, ocorre maior precipitação do AG em solução etanólica do que em água.

As figuras 21a e b e os dados do gráfico 3 demonstram que proporção de tanino utilizado (1,5 g de AG para 100 ml de plasma), se mostra insuficiente para precipitar as proteínas em duas etapas. Essa desvantagem pode ser explicada pelo pequeno tamanho e menor flexibilidade da sua molécula. Nossos estudos demonstraram que mesmo não precipitando todas as proteínas em duas etapas e com menor formação de precipitado que o AT, o AG demonstrou capacidade de precipitação proteica. De acordo com Verza (2006), tal fato pode ocorrer porque o grupo carboxila se mostra mais efetivo na complexação proteica do que as hidroxilas. Kurlbaum e Hogger (2011) também descreveram a menor capacidade de ligação do AG à proteínas. Diferentemente do nosso estudo, Hagerman e colaboradores (1992) relataram que o ácido gálico, monogaloilglucoses, digaloilglucoses, trigaloilglucoses e tetragaloilglucoses não precipitam proteínas.

O AT, formado por dez grupos galoil, apresentou maior propensão em formar complexos com as proteínas do que o AG, formado por um grupo galoil. Segundo Frazier et al. (2003) e Mcmanus et al. (1981), fatores como a estrutura molecular, a mobilidade conformacional e peso molecular influenciam na interação T/P. Verza (2006) descreve que a molécula de tanino deve ser grande o suficiente para se

intercalar entre os espaços interfibrilares das proteínas, não devendo ser pequenas e nem muito grandes, aumentando assim sua capacidade de ligação.

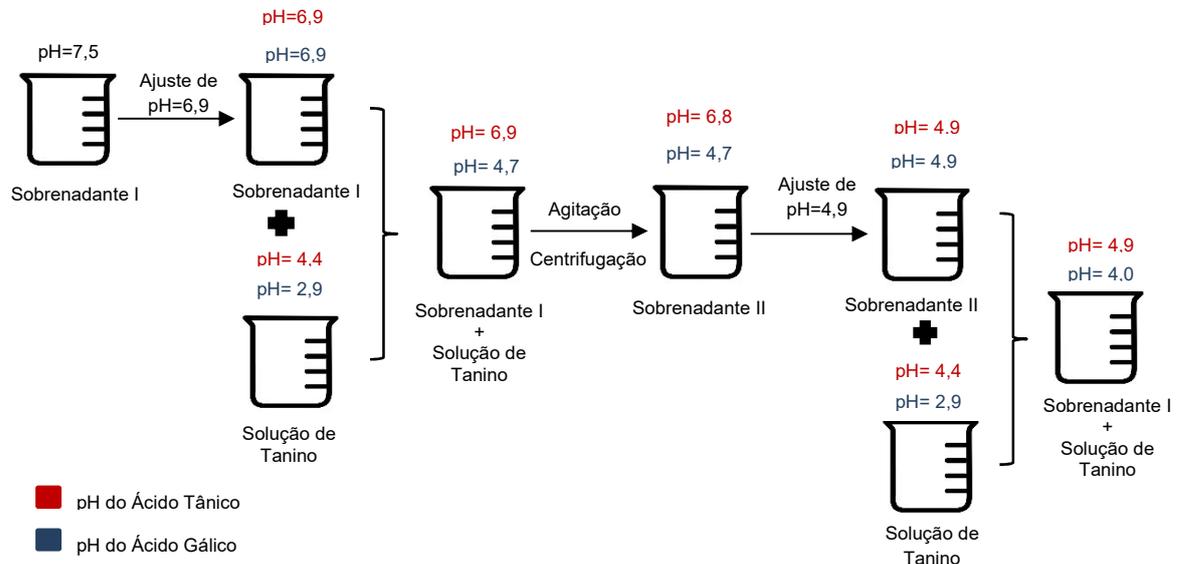
A formação dos precipitados proteicos, mesmo que em quantidades diferentes, sugere que os taninos se ligam às proteínas quando são dispersos em meios aquosos. Como a água apresenta boa capacidade de solvatação dos íons, manteve os complexos T/P estáveis em relação ao pH e temperatura, e não possui ação desnaturante, a água foi eleita o solvente mais adequado para os experimentos seguintes.

5.5 INFLUÊNCIA DA ORDEM DE AJUSTE DE PH, ANTES OU APÓS O ADIÇÃO DA SOLUÇÃO DE AT

Os valores de pH 6,9 e 4,9 foram escolhidos por representarem os pI da IgG e da albumina, respectivamente. Os pI favorecem a precipitação das proteínas, devido às suas cargas líquidas serem iguais a zero. Durante as precipitações foram testadas duas ordens de ajuste de pH, antes e depois da adição das soluções dos taninos nos sobrenadantes I e II.

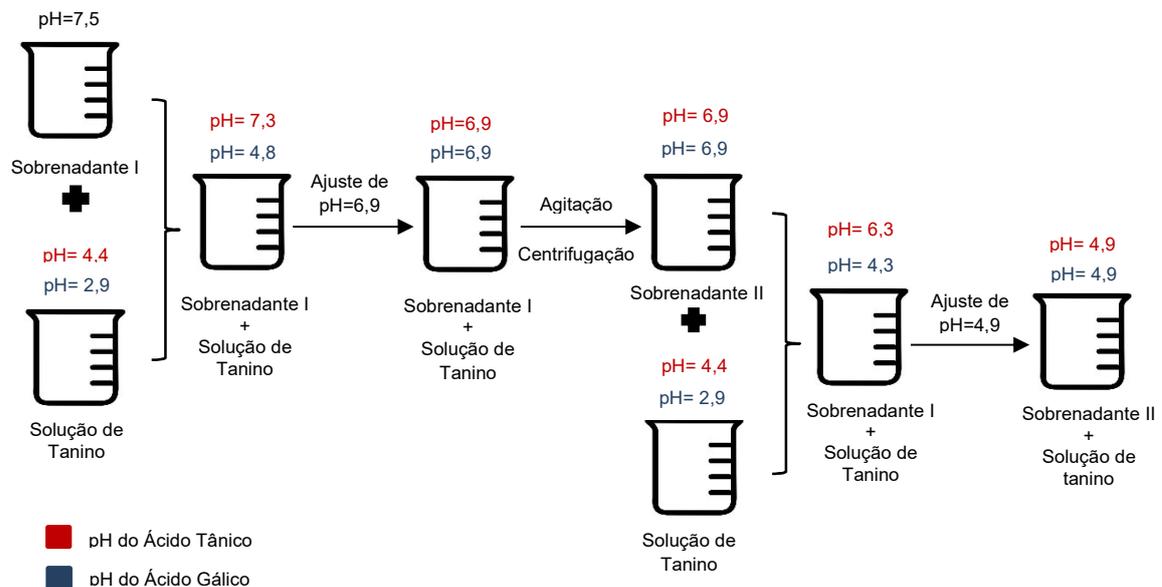
No ensaio com AT, em que o ajuste de pH foi realizado antes da adição da solução do tanino, foi verificado que a adição da solução (pH ~4,4) no sobrenadante I ajustado (pH 6,9) não promoveu variação de pH. Para o AG, sua solução (pH ~2,9) foi adicionada no sobrenadante I ajustado (pH 6,9), o pH baixou para 4,7. Essa variação é justificada pela presença do ácido carboxílico na molécula do AG. As variações de pH provocadas quando o ajuste de pH foi realizado antes da adição das soluções dos AG e AT, podem ser visualizadas na figura 22.

Figura 22 - Estabilidade dos pHs com a realização dos ajustes de pH antes da adição dos taninos, nos sobrenadantes I e II. Os pHs foram ajustados para 6,9 e 4,9, respectivamente.



Como visualizado na figura 23, quando o ajuste de pH é realizado depois da adição dos taninos nos sobrenadantes I, há modulação do pH conforme desejado, permitindo precipitar as proteínas de acordo com seus pI. Os pHs se mantiveram estáveis após a agitação.

Figura 23 - Estabilidade dos pHs com a realização dos ajustes de pH depois da adição dos taninos, nos sobrenadantes I e II. Os pHs foram ajustados para 6,9 e 4,9, respectivamente.

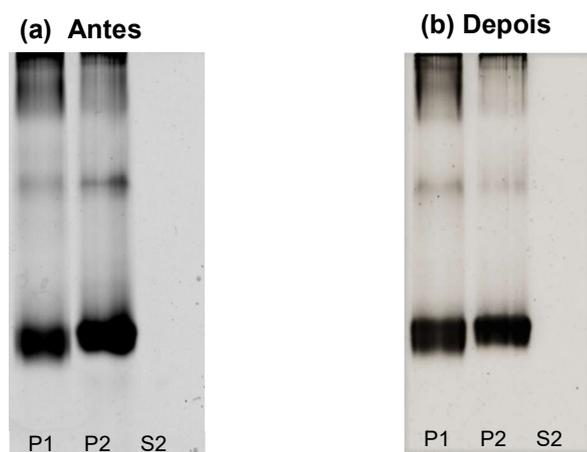


Para o AG, o ajuste de pH antes da adição do ácido não permite a modulação do pH desejado. Portanto, como o objetivo das nossas precipitações era precipitar as proteínas plasmáticas em seus pontos isoelétricos (pI), foi necessário fazer o ajuste do pH após adicionar o AG.

Embora o AG tenha demonstrando seu poder de precipitação no tópico anterior, ficou evidenciada a menor afinidade do AG em relação às proteínas plasmáticas, quando comparado ao AT. A menor capacidade de precipitação, a baixa solubilidade em água, maior oxidação com as variações de pH (sugerida pelas mudanças de cores dos experimentos) e a necessidade de concentração maior que 1,5% para precipitar todas as proteínas, podem comprometer sua utilização como agente precipitante de proteínas plasmáticas. Portanto, o AT foi eleito o agente precipitante para a continuação dos experimentos

Para o AT, através do gráfico 4 e da figura 24b, é possível observar que os ajustes de pH antes ou depois da adição do tanino não influenciam significativamente na precipitação proteica, tendo apenas um leve aumento na precipitação do experimento em que o ajuste foi realizado após a adição da solução de tanino (P1 = 74,8% e P2 = 25,2%).

Figura 24 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes ordens de ajuste de pH, (a) antes e (b) depois da adição da solução aquosa de AT

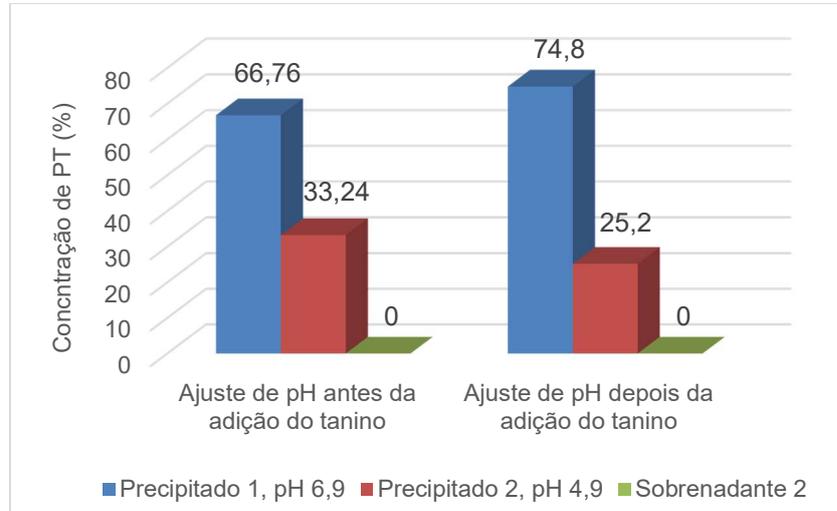


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

Parâmetros utilizados nas precipitações: água como solvente; pH 6,9 na 1ª precipitação e 4,9 na 2ª precipitação; 1,5 g de AT para 100 ml de plasma; tempo de homogeneização de 30 minutos.

Fonte: O autor.

Gráfico 4 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, utilizando diferentes ordens de ajuste de pH para o AT: antes e depois da adição do tanino.



PT – Proteínas Totais.

Como o intuito era precipitar proteínas distintas em seus pl, os experimentos seguintes foram realizados utilizando o ajuste de pH após a adição da solução de AT, permitindo a modulação do pH desejado. Segundo Lovrien e Matulis (1997), realizar o ajuste de pH depois da adição do tanino também serve, muitas vezes, como um agente protetor das proteínas, pois evita assim o desdobramento provocado pela alteração do pH.

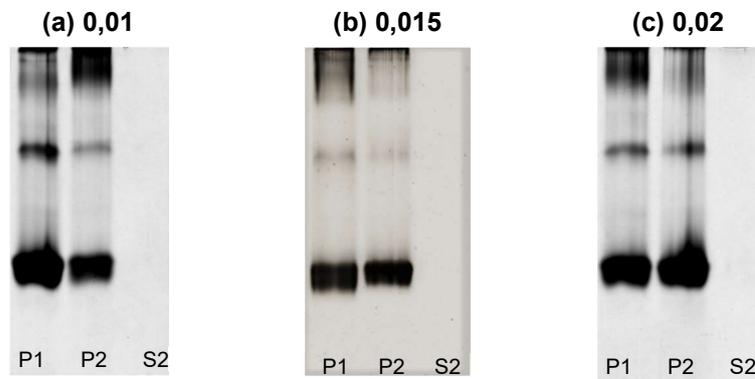
5.6 INFLUÊNCIA DA RAZÃO ÁCIDO TÂNICO/PROTEÍNA NAS PRECIPITAÇÕES

Diferentes razões AT/P foram utilizadas nas precipitações de proteínas plasmáticas, sendo estas 0,01, 0,015 e 0,02 (1, 1,5 g e 2 g para 100 ml de plasma). Estas razões foram determinadas em relação ao volume de plasma.

As figuras 25 a-c e o gráfico 5 demonstram que à medida que se aumentou as razões de AT de 0,01 para 0,02, as quantidades de proteínas no P1 aumentaram, sugerindo que as precipitações realizadas são concentração dependentes. As três razões utilizadas se mostraram suficientes para precipitar todas as proteínas em duas etapas, não restando proteínas remanescentes nos S2. Contudo, mesmo utilizando

os pHs 6,9 e 4,9, respectivamente, a razão de 0,01 demonstrou inespecificidade de bandas de IgG e de albumina, de acordo com os pHs utilizados (Figura 25a). As razões de 0,015 e 0,02 (figuras 25b e c) apresentam um melhor delineamento das bandas. Com o aumento da razão AT/P, é possível inferir que mais sítios proteicos foram preenchidos pelo AT, diminuindo a interação das proteínas com a água e aumentando, conseqüentemente, a precipitação. Portanto, maiores quantidades de precipitados são obtidas com uma maior razão tanino/proteína.

Figura 25 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes razões AT/P: (a) 0,01, (b) 0,015 e (c) 0,02.

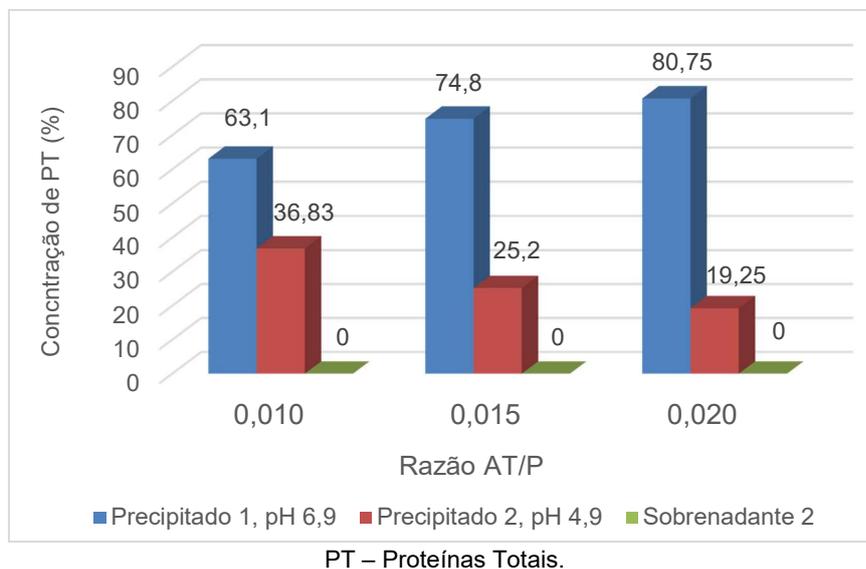


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

Parâmetros utilizados nas precipitações: água como solvente, pH 6,9 na 1ª precipitação e 4,9 na 2ª precipitação; tempo de homogeneização de 30 minutos; ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor

Gráfico 5 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, das precipitações realizadas utilizando diferentes razões de AT/P: 0,01, 0,015 e 0,02.

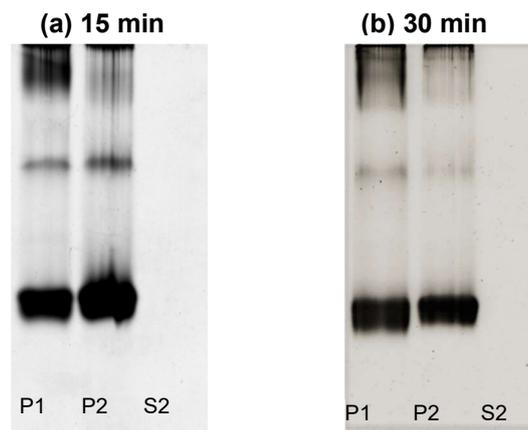


Brudzynski e Maldonado-Alvarez (2015) relataram que a formação dos complexos T/P e a solubilidade destes dependem da proporção de tanino em relação às proteínas, onde o aumento da proporção influencia no caráter hidrofílico dos complexos, favorecendo as interações hidrofóbicas entre os resíduos não polares dos taninos e proteínas. De acordo com Obreque-Slier et al. (2010) e Le Bourvellec e Renard (2012), a baixa proporção de AT/P favorece a interação com as moléculas de proteínas separadamente, pois há menos locais de ligação, e quando a proporção é elevada, as moléculas de tanino podem formar estruturas de dímeros ou supramoléculas, através da ligação de uma molécula de AT a uma ou mais proteínas.

5.7 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE HOMOGENEIZAÇÃO NAS PRECIPITAÇÕES

Em relação às condições de tempo de homogeneização, os dois tempos utilizados nas precipitações (15 e 30 minutos) se mostraram suficientes para precipitar todas as proteínas em duas etapas sucessivas.

Figura 26- Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes tempos de homogeneização: (a) 15 min, (b) 30 min.

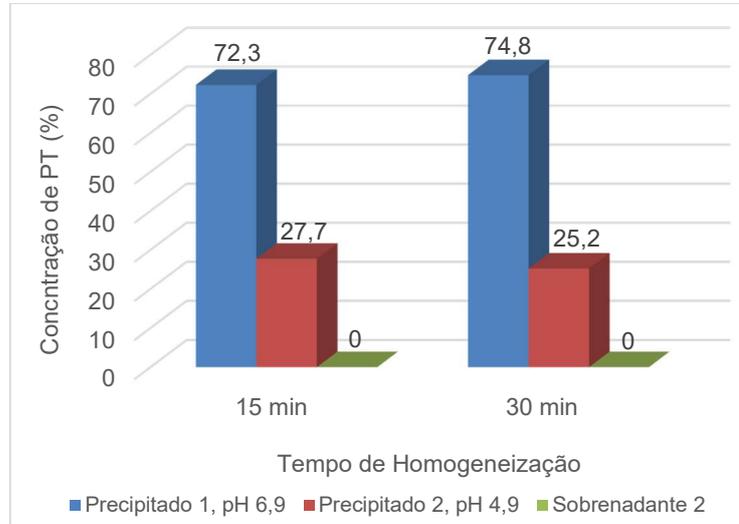


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

Parâmetros utilizados nas precipitações: água como solvente, pH 6,9 na 1ª precipitação e 4,9 na 2ª precipitação; 1,5 g para 100 ml de plasma e ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor

Gráfico 6- Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, das precipitações realizadas utilizando diferentes tempos de homogeneização: 15 min e 30 min.



PT – Proteínas Totais; min.- minutos.

Os dados demonstram que mesmo dobrando o tempo de homogeneização de 15 para 30 min, o aumento de P1 não foi significativo, sendo 72,3 % e 74,8 % respectivamente (figura 26a e b, gráfico 6). Desta forma, o tempo de 15 minutos mostra ser suficiente para precipitação com o AT

Em nossos ensaios, após a mistura da solução de AT nos sobrenadantes, era visível a formação de complexos AT/P. Em um estudo semelhante, Hagerman e colaboradores (1998) estudaram a interação da BSA com dois taninos, uma procianidina heptadecamérica e um pentagalactoglucose, e observaram que a precipitação da BSA ocorreu rapidamente após a mistura com ambos os taninos, independentemente do tempo de 5 a 60 minutos.

Adicionalmente, Canon et al. (2013) relataram que períodos longos de homogeneização de taninos e proteínas podem provocar lenta dissociação, com expansão e redispersão das moléculas. Com isso, alguns taninos podem alterar seus sítios de ligação, optando por ligar duas vezes a mesma proteína ao invés de se ligar a duas proteínas diferentes. Essas mudanças podem ser provocadas pela redistribuição dos taninos entre as proteínas disponíveis.

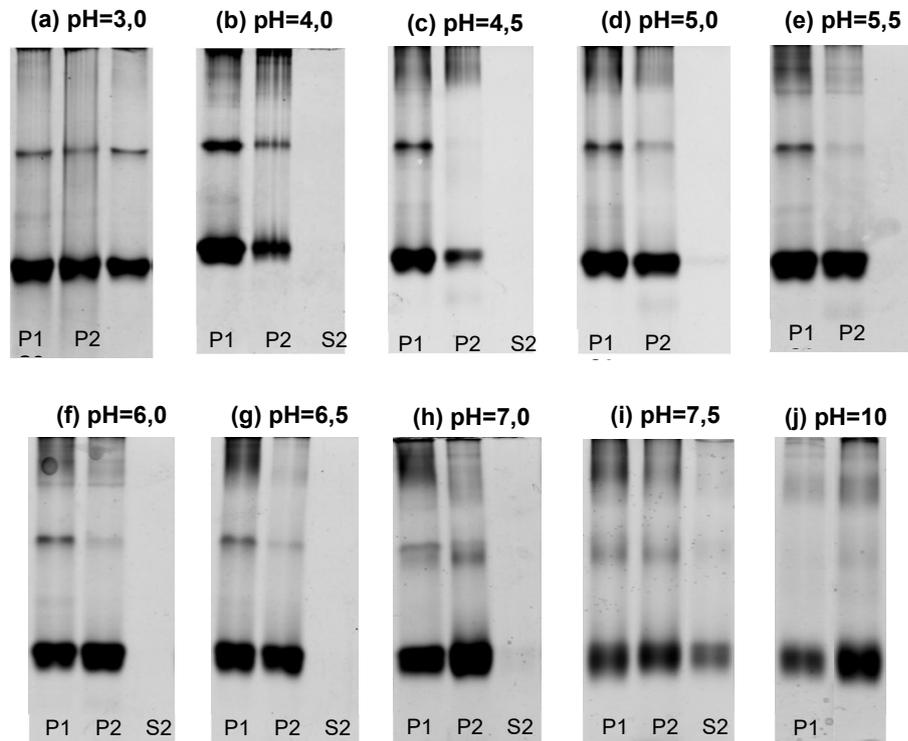
5.8 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES pHs NAS PRECIPITAÇÕES DE PROTEÍNAS

5.8.1 Avaliação do perfil de precipitação de proteínas plasmáticas pelo AT em diferentes pHs

O pH é um dos principais fatores que podem afetar as interações entre taninos e proteínas. Há relatos na literatura de que a precipitação de proteínas por taninos é pH sensível, ocorrendo de forma mais eficiente em torno dos pI (HAGERMAN; BUTLER, 1978; NACZK et al., 2001). Nos experimentos anteriores, foram utilizados os pHs 6,9 e 4,9, que correspondem aos pI da IgG e da albumina, respectivamente. No entanto, foi observado que outras proteínas eram precipitadas além destes pHs. Levando isso em consideração, foi realizada a avaliação do efeito do pH sobre a eficácia do AT para precipitar proteínas plasmáticas entre os pHs 3 e 10.

No pH 3 houve fraca interação AT/P e baixa precipitação do complexo. Na imagem de eletroforese, pode-se observar a presença de bandas no P1 e P2, todavia, é possível ver que no S2 ainda há proteínas que não foram precipitadas (figura 27a). Isso ocorre porque o AT apresenta fraca dissociação das hidroxilas (OH) e os grupos carboxílicos terminais das proteínas devem estar protonados. A presença de poucos sítios de interação justifica a fraca precipitação. Há um aumento significativo de P1 do pH 3 (48,24%) para 4,5 (88,86 %), conforme visualizado no gráfico 7. Essa variação se deve a uma maior dissociação das OH do AT e maior interação com as carbonilas das proteínas. Adicionalmente, pode-se observar nas eletroforeses do pH 4 ao pH 6,5 (figuras 27 b-g) e pelas quantificações (gráfico 7), que duas etapas de precipitação foram suficientes para precipitar todas as proteínas, não apresentando proteínas remanescentes no S2.

Figura 27 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações realizadas utilizando diferentes pHs: (a) 3,0, (b) 4,0, (c) 4,5, (d) 5,0, (e) 5,5, (f) 6,0, (g) 6,5, (h) 7,0, (i) 7,5, (j) 10,0.

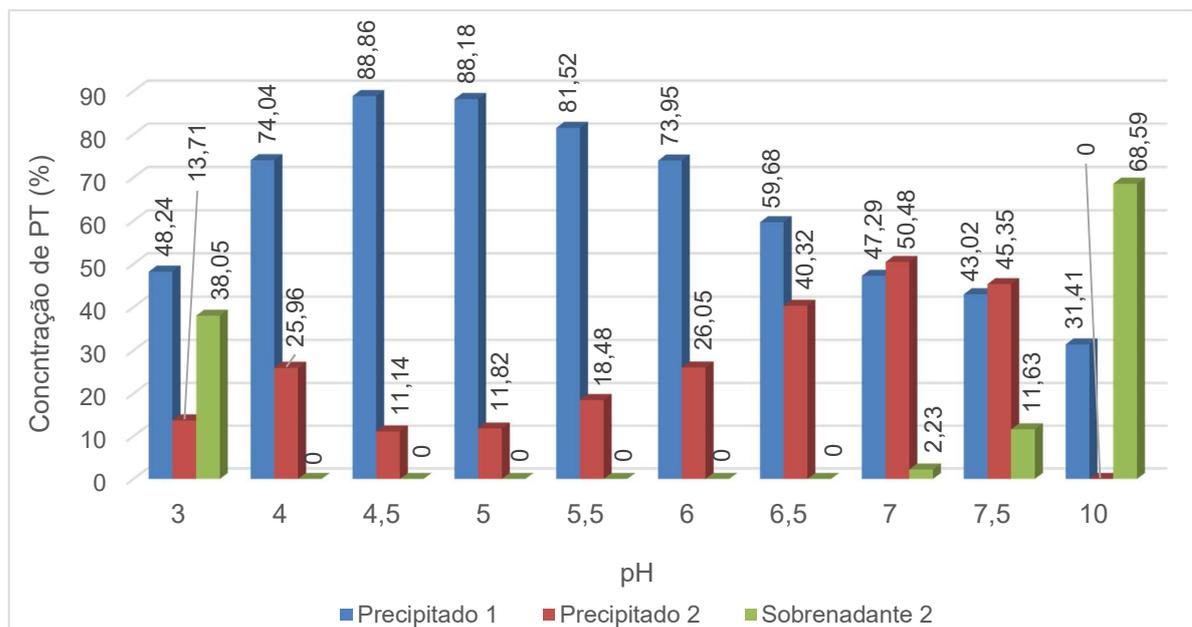


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

As precipitações foram realizadas com os seguintes parâmetros: água como solubilizante, pHs (citados acima) iguais nas duas precipitações; concentração de 1,5% de AT em relação ao volume de sobrenadante; tempo de homogeneização de 30 minutos; ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor

Gráfico 7 - Distribuição (%) das quantidades de proteínas plasmáticas nos P1, P2 e S2, das precipitações realizadas utilizando diferentes pHs: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 10.



PT – Proteínas Totais. Para cada valor de pH, o mesmo pH foi utilizado nas duas precipitações.

Os maiores valores de precipitação foram observados nos pHs 4,5 (88,86%) e 5,0 (88,18%), o que se justifica por serem pHs próximos ao *pI* da albumina (4,9). No *pI*, a carga líquida de uma proteína é igual a zero, pois suas cargas positivas e negativas estarão em equilíbrio. Logo haverá redução da repulsão eletrostática entre as proteínas, fazendo com que estas interajam menos com a água e se tornem menos solúveis. A menor solubilidade da proteína e a carga negativa do AT, favorecem a interação AT/P e a precipitação do complexo.

As quantidades de proteínas precipitadas nos P1 diminuíram sucessivamente com o aumento do pH de 4,5 (88,86%) para 10 (31,41%). Um dos motivos da diminuição dos P1 se deve ao fato da albumina ser a proteína mais abundante no plasma (60%) e, acima de seu *pI*, apresenta carga negativa devido à ionização de suas cadeias laterais ácidas (COOH). Assim, as cargas negativas do tanino repelem as cargas negativas da proteína, aumentando a repulsão entre elas à medida que se aumenta o pH. No entanto, essa diminuição é gradual, podendo serem vistas bandas de albumina nos precipitados e sobrenadantes (figuras 27 c-j). As eletroforeses e quantificações das condições de pH realizadas divergem do que foi descrito por Hagerman e Butler (1978), pois estes afirmam que a BSA é substancialmente precipitada por taninos hidrolisáveis apenas entre os pHs entre 3 e 5.

No pH 7, o P2 atinge sua concentração máxima (P2=50,48%). Tal fato pode ser justificado por este pH ser próximo ao *pI* da IgG, portanto, seus grupos carboxílicos ainda estão pouco desprotonados. As moléculas de IgG sofrem ionização até atingirem carga líquida igual a zero em seu *pI*, favorecendo a interação AT/P. A partir do pH 7, têm-se a diminuição do P2, que ocorre devido às cargas negativas da IgG repelirem as moléculas de AT, também negativamente carregadas.

De acordo com os dados da quantificação proteica, os maiores picos de precipitação ocorreram nos pHs 4,5 e 7, próximos aos *pI* da albumina e da IgG respectivamente, pontos estes que as proteínas apresentam carga nula, favorecendo a precipitação. Ozdal e colaboradores (2013) também chegaram a essa conclusão, onde o aumento de precipitado do complexo pode ser atribuído à solubilidade mínima da proteína nesse pH.

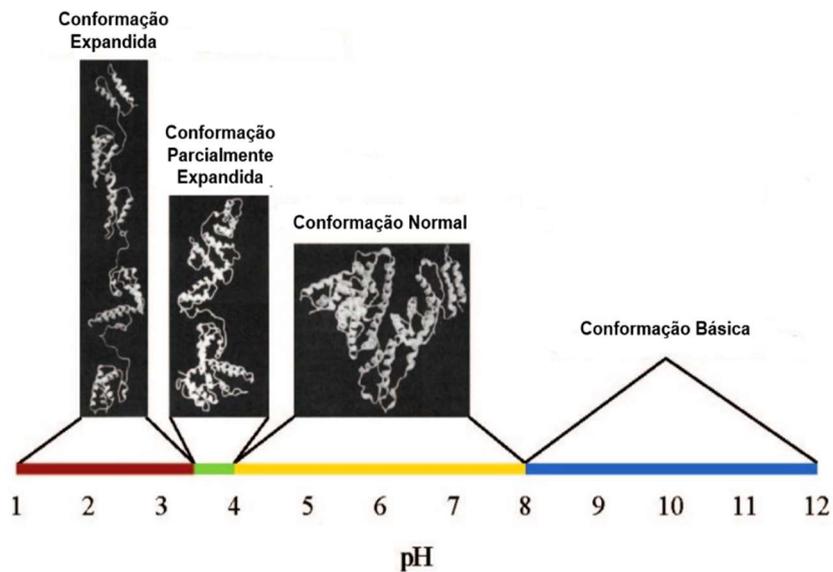
Com o aumento da ionização, a formação de P1 do pH 7,5 para o pH 10,0 diminuiu 26,99%, sem formação de P2 após o segundo ajuste de pH, aumentando o S2 em 51,24% (figuras 27i e j). Apesar da repulsão entre o AT e as proteínas no pH 10, ainda é possível observar uma fraca precipitação, que provavelmente é causada por interações hidrofóbicas entre os anéis aromáticos do AT e os sítios hidrofóbicos das proteínas.

É possível visualizar nas eletroforeses de todas as condições de pH (figura 27 a-j), que tanto no P1 quanto no P2, as bandas referentes a albumina e a gamaglobulina estão presentes, sugerindo que as proteínas também foram precipitadas fora de seus respectivos pontos isoelétricos. Le Bourvellec e Renard (2012) relatam que o fato de proteínas globulares com pI ácidos precipitarem mais facilmente, possivelmente justifique a presença constante da albumina.

Adamczyk et al. (2012) utilizaram em seus ensaios diferentes concentrações de AT e BSA, nos pHs 4,7 e 7. Para todos os experimentos com pH 4,7 a precipitação de BSA foi mais elevada, por estar próximo ao seu pI , e conseqüentemente, ter menor repulsão eletrostática entre as moléculas proteicas. Já em pH 7 foi observado que mesmo em menor concentração, houve precipitação de BSA com as diferentes razões de T/P utilizadas. Hagerman e Butler (1978) estudaram a precipitação de várias proteínas (BSA, pepsina, tripsina, lisozima e ovoalbumina) em função do pH e puderam concluir que, para as proteínas testadas, a precipitação não era inteiramente dependente da formação de ligação de hidrogênio com grupos fenólicos, mas que as interações hidrofóbicas também eram responsáveis pela formação de complexos.

Mesmo com o AT precipitando em todos os pHs testados, em meios muito ácidos ou básicos, as proteínas podem mudar sua conformação estrutural, podendo sofrer alterações parciais ou totais, com perda da função biológica (figura 28). Segundo (PONCIN-EPAILLARD et al., 2012), as proteínas são estáveis em sua conformação normal.

Figura 28 - Representação de alterações da estrutura conformacional proteica em função do pH do meio em que se encontra, utilizando como exemplo a BSA.



Em $\text{pH} < 3,5$, a estrutura da proteína se encontra completamente expandida, com aminoácidos expostos. Apresenta uma forma parcialmente expandida em pH 3,5 a 4. A conformação normal (nativa), com forma de coração, é encontrada em pH de 4 a 8. Em $\text{pH} > 8$, a BSA adota conformação básica e menos caracterizada.

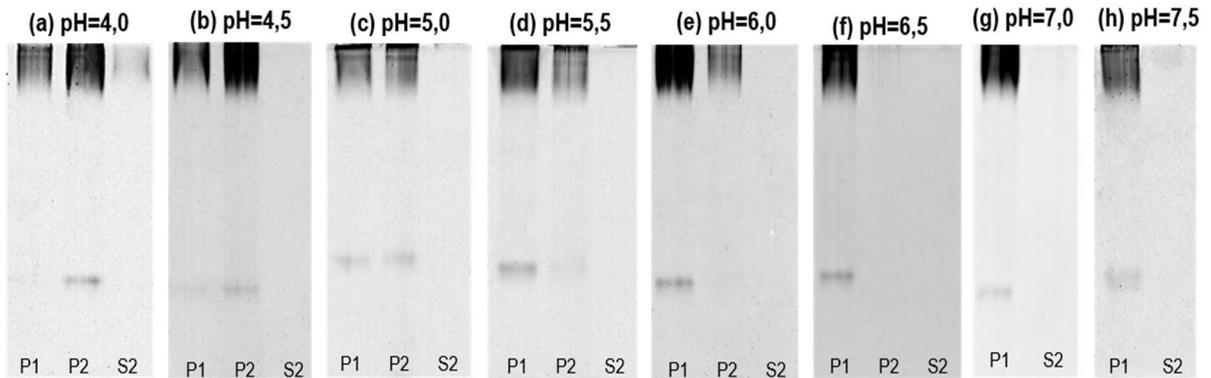
Fonte: Edri; Regev (2008).

5.8.2 Avaliação do perfil de precipitação de IgG pelo AT em diferentes pHs

Com o intuito de verificar se há diferença no perfil de precipitação de uma proteína isolada em relação a um pool de proteínas plasmáticas, foram realizadas precipitações de IgG (96% de pureza) com AT.

No pH 4, devido à baixa dissociação do AT, há menor formação de precipitados com a IgG, com 31,01% no P1, 57,56% no P2, restando 11,13% de IgG no S2 (figura 29a e gráfico 8). Entre os pH s 5 e 7, há um aumento significativo de P1 (31,01% para 100%) e, conseqüentemente, uma diminuição do P2 (57,56 para 0%), conforme visualizado no gráfico 8. Esse aumento de P1 se deve ao aumento de dissociação das OH do AT e ligação ao grupo carboxílico da proteína. O aumento e a diminuição de P1 e P2 respectivamente, podem também serem visualizados nas imagens de eletroforese (figuras 29 a-g).

Figura 29 - Imagens de eletroforeses PAGE nativo das precipitações de IgG, realizadas utilizando diferentes pHs: (a) 4,0, (b) 4,5, (c) 5,0, (d) 5,5, (e) 6,0, (f) 6,5, (g) 7,0, (h) 7,5.

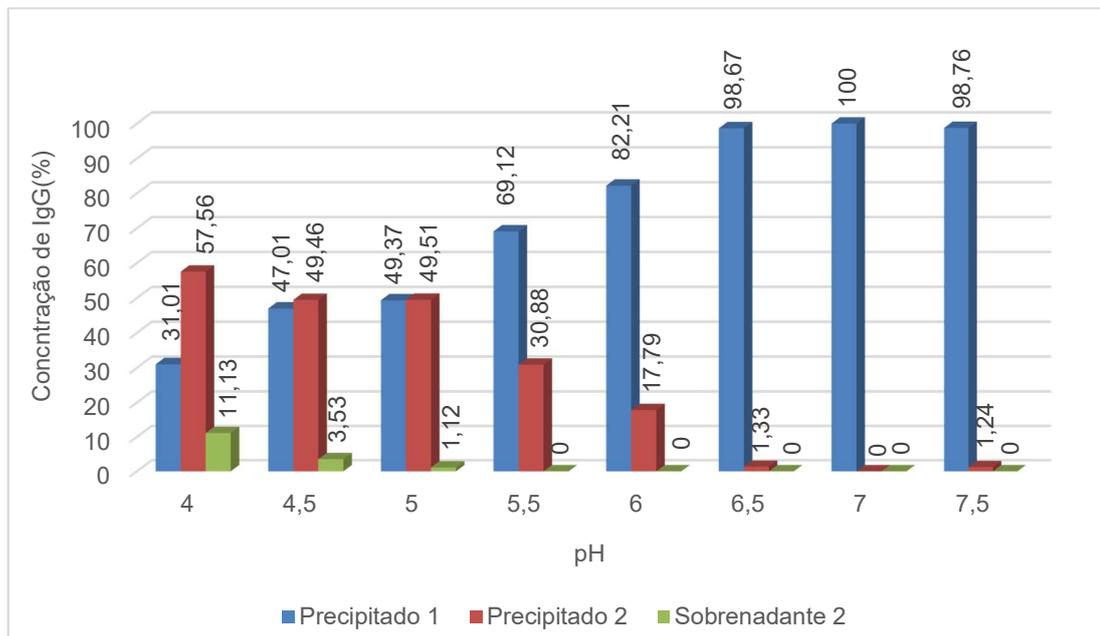


P1 = Precipitado I; P2 = Precipitado II; S2 = Sobrenadante II

As precipitações foram realizadas com os seguintes parâmetros: água como agente solubilizante, pHs iguais nas duas precipitações; concentração de 1,5% de AT em relação ao volume de IgG; tempo de homogeneização de 30 minutos; ajuste de pH após a adição do tanino.

Fonte: O autor.

Gráfico 8 - Distribuição (%) da quantidade de IgG precipitada nos P1, P2 e S2, para avaliação das precipitações realizadas utilizando diferentes pHs: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5.



PT – Proteínas Totais.

No pH 7, o P1 atinge sua concentração máxima (100%), por ser um pH próximo ao pI da IgG (6,9), com menor repulsão eletrostática das proteínas e maior interação com o AT. A figura 29g mostra que no pH 7, toda a IgG foi precipitada no P1,

apresentando apenas traços de albumina, devido a grau de pureza da amostra ser de 96%.

Entre os pHs 5,5 e 7,5, a concentração de 1,5% de AT, em relação ao volume de IgG, se mostrou suficiente para precipitar todas as proteínas em duas etapas sucessivas (gráfico 8). Isso pode ser comprovado pela ausência de proteínas no S2 (figuras 29 d-h). Essa faixa de pH é indicada para a precipitação da IgG pelo AT, pois evita alterações estruturais nas proteínas, mantendo sua conformação normal (pH 4 a 8) (figura 29).

Assim como ocorreu com as precipitações feitas a partir do plasma, a maior formação de complexos AT/IgG ocorre de em torno de seu pl (pH 7).

5.9 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO AT/IgG POR ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (EDL) E POTENCIAL ZETA (ζ)

Para uma melhor elucidação da interação do AT com a IgG, entre os pHs 3,0 e 10,0 aqui estudados, o perfil de agregação das moléculas, bem como suas cargas superficiais foram analisadas por EDL e ζ . Primeiramente foi avaliado o perfil de uma solução pura de IgG 0,5% e de uma solução de AT 1,5%, para fins de comparação. Posteriormente, foi avaliada a mistura da solução de IgG com a solução de AT 1,5% (em relação ao volume de IgG), proporção esta utilizada nas etapas anteriores deste trabalho.

Como pode ser visto no gráfico 9, os tamanhos médios de complexos a partir de uma solução de IgG encontram-se entre 4,521 nm (pH 3) e 6,458 nm (pH 10). Os complexos de IgG aumentaram de tamanho do pH 3 ao 7, de 4,521 nm para 12,11 nm, sendo este o tamanho máximo atingido. Tal fato ocorreu devido à desprotonação do grupo carboxílico à medida que o pH aumentou, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre as moléculas. Isto pode ser observado no gráfico 10, onde em pH 3,0 a carga superficial da IgG está em torno de 27 mV, chegando a 0, no seu pl, diminuindo mais até -29 mV no pH 10. No pl, as cargas positivas e negativas estão

em equilíbrio e favorecem a interação das proteínas. Do pH 7 ao 10, os tamanhos de partículas diminuem 1,88 vezes (12,11 nm para 6,458 nm), pois as proteínas estão negativamente carregadas, aumentando a repulsão eletrostática (gráfico 10).

Gráfico 9 – Demonstra a relação entre o raio hidrodinâmico dos complexos de IgG (medido pela intensidade de espalhamento de luz) e as diferentes condições de pH.

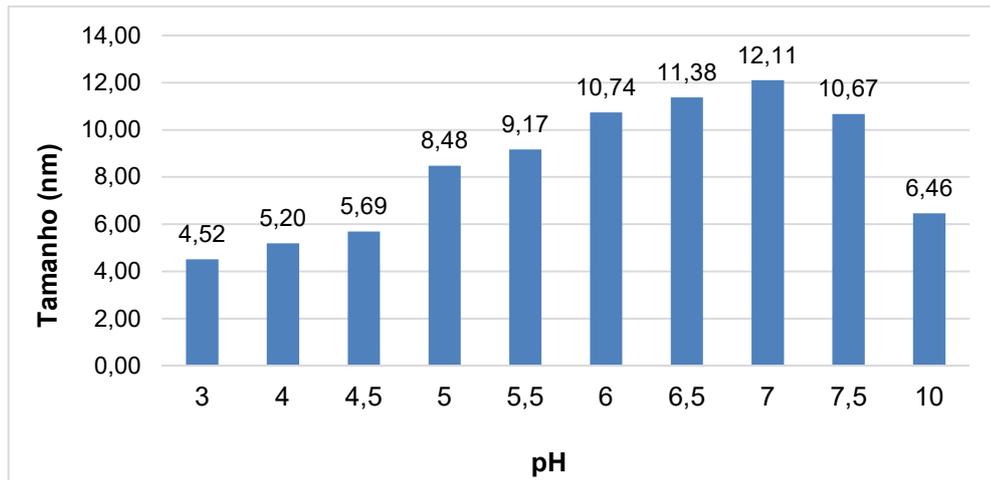
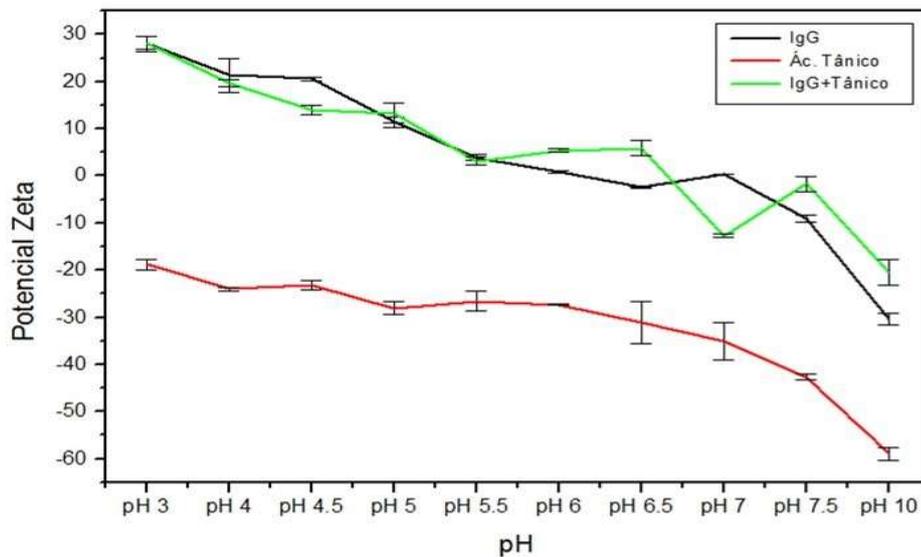


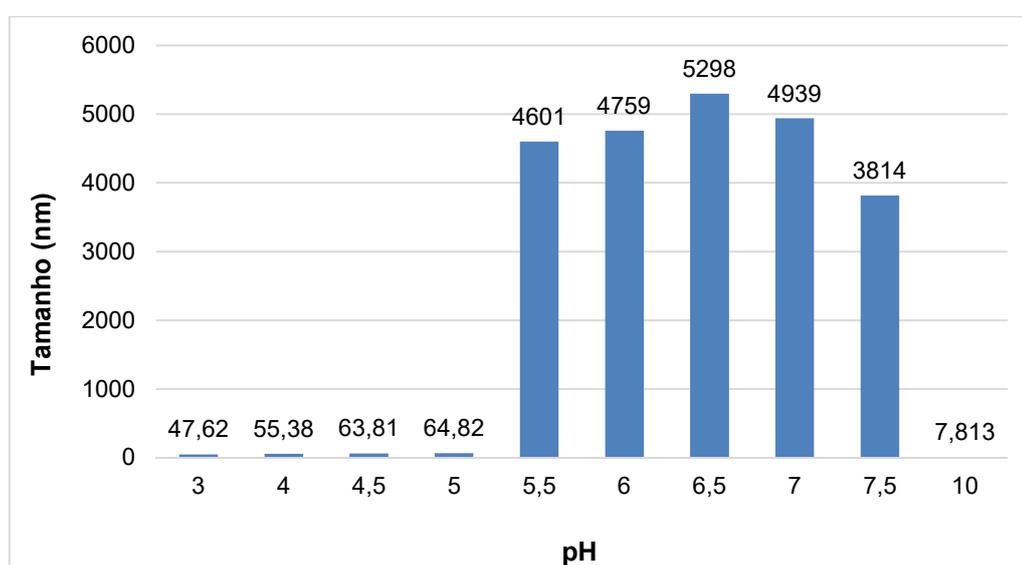
Gráfico 10 - Variações do potencial zeta da IgG, do ácido tânico e da mistura de IgG e ácido tânico, em diferentes pHs.



A adição de uma solução de AT à solução de IgG provoca leve alteração na carga superficial do complexo AT/IgG, mas em compensação, provoca grande

alteração no perfil de agregação (Gráficos 10 e 11). Entre os pHs 3 e 5, as variações de tamanho dos complexos AT/P são pequenas, se mantendo entre 47,62nm e 64,82 nm (gráfico 11). Entretanto, é possível observar que os complexos AT/IgG já se mostram maiores em relação aos agregados apenas de IgG, nestes mesmos pHs (gráficos 9 e 11). A fraca afinidade pode ser explicada pela baixa dissociação do AT (HYOK; DULTZ, 2007). Os complexos formados podem ter sido favorecidos por interações hidrofóbicas e, com menos intensidade, por interações eletrostáticas.

Gráfico 11 – Distribuição do tamanho de partícula do complexo IgG/AT em função do pH.



Os tamanhos dos complexos de AT/IgG aumentaram acentuadamente entre os pHs 5,5 ao 6,5 (4601 nm - 5298 nm), devido à ionização proteica e maior dissociação do AT, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre as moléculas à medida que o pH aumenta. Os complexos atingiram tamanho máximo no pH 6,5 (5298 nm), pH próximo ao pI da IgG.

Os complexos de AT/IgG formados (5298 nm no pH 6,5) foram 437,5 vezes maiores que os complexos somente de IgG (12,11 nm no pH 7). Isso pode ser explicado pelo tamanho e a capacidade de ligação da molécula do AT às proteínas. Elevados tamanhos de partículas podem ser obtidos pela ação do AT como um ligante multidentado, se ligando a mais de uma proteína, ou várias moléculas de AT se ligam à mesma proteína ou com a auto agregação de complexos já formados (CHARLTON

et al., 2002). Segundo Canon et al. (2013), tais recombinações podem ocorrer em função do movimento browniano e da disponibilidade de tanino nas superfícies das moléculas.

Do pH 6,5 para o pH 10, os tamanhos de partículas diminuem bruscamente (5298 nm para 7,813 nm), pois as proteínas estão negativamente carregadas devido à ionização dos grupos carboxílicos, e o AT apresenta maior densidade de carga negativas ($\zeta = -58\text{mV}$), aumentando a repulsão eletrostática, a expansão da estrutura proteica e a solubilidade das moléculas (HAYNES; NORDE, 1994). Ocwieja e colaboradores (2015) citam também a possibilidade de hidrólise das moléculas de AT em condições básicas, onde a liberação de ácido gálico durante a hidrólise poderia desfavorecer a interação com outras moléculas.

Como pode ser observado no gráfico 10, por ser o AT um poliânion, apresenta-se negativamente carregado para toda a gama de pH testado, com uma mobilidade eletroforética de -19 mV (pH 3) e -58 mV (pH 10). A eletronegatividade do AT se deve ao grande número de grupos galoi presentes em sua molécula, que permitem interações com as proteínas, sendo ligações de hidrogênio através das hidroxilas ou interações hidrofóbicas através dos anéis aromáticos (ABOUELMAGD et al., 2016).

A alteração da carga superficial da IgG ao ser misturada ao AT ocorreu entre os pHs 5,5 e 7,5 (Gráfico 10), justamente na faixa de pH onde ocorrem maiores agregações (Gráfico 11). O aumento das cargas negativas na superfície da IgG, devido à desprotonação, favorece a formação de ligações de hidrogênio com as hidroxilas livres do AT, o que favorece a agregação entre as moléculas. A estabilidade dos complexos aumenta quando as cargas das proteínas e dos taninos se anulam (HAYNES; NORDE, 1994). Como esperado, a maior agregação ocorreu próximo ao equilíbrio das cargas (pI).

Comparando-se os resultados do EDL e do potencial zeta entre as soluções contendo apenas IgG e AT/IgG é possível observar que a medida que o pH aumenta em direção ao pI da IgG há uma maior interação entre as moléculas de proteínas e taninos, sendo esta interação claramente maior próximo ao pI. Estes dados corroboram os resultados obtidos na quantificação proteica e nas imagens de eletroforese (item 4.8.2), onde a precipitação máxima da IgG ocorre em seu pI.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a capacidade de precipitação de proteínas por taninos hidrolisáveis estruturalmente diferentes e a solubilidade dos complexos podem ser alterados a partir de variações de parâmetros durante a técnica de precipitação.

A água, comparada à solução etanólica 30%, mostrou-se o solubilizante mais indicado para o AT, pois além de não ser um agente desnaturante, permite a exposição de grupos fenólicos para realizar interações hidrofóbicas com as proteínas. Assim sendo, favoreceu a precipitação, que pôde ser observada no teste quantificação proteica. Todavia, a solubilização do AG com água, não demonstrou resultado semelhante. Para a solubilização do AG com solução etanólica 30%, apesar de ter demonstrado melhor resultado do que com água, com maior interação AG/P, a concentração de 1,5% não foi suficiente para uma precipitação total das proteínas plasmáticas. Isso demonstra a influência dos solubilizantes sobre a formação de precipitado e, mesmo quando se utilizou a mesma concentração para os dois taninos, houve variação de acordo com a estrutura molecular do tanino.

Neste estudo observou-se que a realização do ajuste de pH após a adição do tanino é mais eficiente, visto que permitiu a modulação do pH da mistura T/P conforme desejado. Essa ordem de ajuste favoreceu a precipitação de proteínas plasmáticas de acordo com seus pontos isoelétricos, evitando a variação de pH de acordo com a acidez do tanino.

A variação no tempo de homogeneização mostrou não ser significativa para a precipitação de proteínas plasmáticas, devido à pequena variação na quantidade de precipitados entre os dois tempos utilizados. O tempo de 15 minutos se mostrou suficiente para as precipitações, evitando assim a reorganização dos complexos, onde mais taninos podem se ligar a menos proteínas.

Quando estudada a influência da concentração de AT, as precipitações demonstraram que a formação de precipitado depende da relação T/P, com maior ocupação de sítios proteicos. Porém, as concentrações de 1,5% e 2% demonstraram

maior especificidade de bandas de acordo com os pHs utilizados, no pH 6,9 para a IgG e no pH 4,9 para a albumina.

A variação de pH provocou mudanças nas cargas superficiais dos taninos e proteínas, demonstrando a capacidade do pH de afetar as propriedades de ligação deste, e conseqüentemente, a precipitação. Tanto nas precipitações realizadas com proteínas totais quanto com a IgG pura, ocorreram precipitações em todos os pHs testados, entretanto, as precipitações foram substanciais próximo aos pontos isoelétricos das proteínas mais abundantes.

Através das eletroforeses foi possível observar que embora tenha sido utilizado o ponto isoelétrico de uma única proteína em cada etapa de precipitação, bandas de outras proteínas foram visualizadas fora de seus pontos isoelétricos. Percebemos também que a formação dos complexos T/P tem sua mobilidade eletroforética alterada, em função de sua massa e tamanho molecular, sendo visualizadas bandas adjacentes às proteínas. A mobilidade também varia em função dos grupos químicos das moléculas, justificando a diferença de mobilidade entre o AG e o AT.

O EDL e o ζ comprovaram que os maiores complexos formados e a maior interação entre o AT/IgG ocorrem próximo ao pI da proteína, mas mesmo em menor quantidade, houve formação de precipitados em todos os pHs testados. Os estudos da interação de T/P demonstraram que o fato de algumas precipitações terem ocorrido em pH básico envolve associações fracas, sendo possível admitir que a precipitação não dependa somente da formação de ligações de hidrogênio com os grupos fenólicos não ionizados, mas também de interações hidrofóbicas.

Nosso trabalho demonstrou que os taninos hidrolisáveis aqui descritos, podem formar complexos solúveis com proteínas globulares, e as relações competitivas dos taninos com as proteínas dependem de suas estruturas e condições do meio, onde a mudança de uma variável pode afetar a precipitação e ter diferentes efeitos. Diante dos resultados obtidos, concluímos que os taninos hidrolisáveis são efetivos como precipitantes de proteínas plasmáticas humanas. O AT, por demonstrar maior eficiência nas precipitações do que o AG, fornece alternativa para precipitações escalonáveis reversíveis.

7 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos com este estudo, testes futuros deverão ser realizados para o estudo da influência da temperatura e força iônica em precipitações de proteínas plasmáticas com os taninos aqui utilizados. Vê-se importante estudar a influência dos parâmetros aqui empregados através de técnicas que possibilitem avaliar a conformação e estabilidade proteica após a formação de complexos com os taninos (dicroísmo circular, RMN).

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, p. 386–396, dez. 1969.

ABOUELMAGD, A. A. et al. Tannic acid-mediated surface functionalization of polymeric nanoparticles. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 12, p. 2294–2303, 2016.

ADAMCZYK, B. et al. Tannic acid and Norway spruce condensed tannins can precipitate various organic nitrogen compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 628–637, mar. 2011.

ADAMCZYK, B. et al. Precipitation of proteins by tannins: Effects of concentration, protein/tannin ratio and pH. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 875–878, 2012.

AFONSO, A. F. B.; JOÃO, C. M. P. The Production Processes and Biological Effects of Intravenous Immunoglobulin. **Biomolecules**, v. 6, n. 1, p. 15, 2016.

AHMED, A. A. et al. Structural characterization of anti-inflammatory immunoglobulin G Fc proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 18, p. 3166–3179, 2014.

AKINYEMI, A. J. et al. Inhibitory effect of tannic acid and its derivative (gallic acid) against cisplatin – induced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production in rat kidney – in vitro. **Internacional Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 1, p. 116–126, 2015.

AKIYAMA, H. et al. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 487–491, 2001.

AMORIM FILHO, L. M. Cenário mundial do fracionamento industrial de plasma e da produção de hemoderivados. **Divulgação em Saúde para Debates**, n. 50, p. 93–101, nov. 2013.

ANVISA. **RDC Nº 46, de 18 de maio de 2000. Normatiza os processos de produção e controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados par uso humano** Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasília-DF, Brasil Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2000.

Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2000/anexo/anexo_res0046_18_05_2000.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2016.

ANVISA. **Consulta Pública nº 36, de 20 de maio de 2004. Proposta de Resolução que aprova as Diretrizes para o Uso de Imunoglobulinas.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2004. Disponível em:

<<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B7489-5-0%5D.PDF>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

ANVISA. **RDC Nº 55 de 16 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências.** Registro de Produtos Biológicos. Bases legais e Guias - Coletânea Brasília ANVISA, , 2011. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/935aed0048bd2755a7cdaf9a6e94f0d0/Registro_Produtos_Biologicos_Hemoterapicos_10102011_WEB.pdf?MOD=AJPERES>

ANVISA. **RDC Nº 34, de 11 de Junho de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue** Brasília Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2014. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC_34_2014_COMP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a>. Acesso em: 12 mar. 2017.

BAKER, D. WHY THEY ARE MADE THIS WAY. Plasma Derivates. **The Source - Magazine of The Plasma Protein Therapeutics Industry**, v. Fall, p. 28–31, 2014.

BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. **Flavonoid compounds**. New York: Academic Press, 1962.

BENDER, C. R. **Efeito dos ânions de líquidos iônicos dicatiônicos na formação de agregados em solução.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

BERRYMAN, M. A. et al. Effects of tannic acid on antigenicity and membrane contrast in ultrastructural immunocytochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 845–857, 1992.

BERTOLINI, J.; GOSS, N.; CURLING, J. **Producion of Plasma Proteins for Therapuetic Use.** Nova Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

BIO-RAD. **A Guide to Polyacrilamide Electrophoresis and Detection** Bio-Rad Laboratories, Inc., , 2012. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2017.

BOWEN, W. R. et al. The relevance of particle size and zeta-potential in protein processing. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 8, p. 785–787, ago. 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRASIL. **Lei nº 10205, de 21 de março de 2001. Regulamenta o parágrafo 4º do artigo 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação dos sangue, seus componentes e hemoderivados, estabelece o ordenamento institucio** Presidência da República Brasília-DF, BRASIL Diário Oficial da União, , 2001a. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/LEIS_2001/L10205.htm>. Acesso em: 18 out. 2015.

BRASIL. **Decreto nº 3.990, de 30 de outubro de 2001. Regulamenta o art. 26 da Lei no 10.205, de 21 de março de 2001, que dispõe sobre a coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, e estabelece o ordenamento i** Presidência da República Brasília-DF, Brasil Diário Oficial da União, , 2001b. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2001/d3990.htm>. Acesso em: 31 out. 2015

BRASIL. **Manual de Diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand**. 1ª ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. **Anexo da Portaria nº 364, de 6 DE Maio de 2014. Protocolo de Uso de Profilaxia Primária para Hemofilia Grave. Protocolo de Uso de Profilaxia Primária para Hemofilia Grave**, 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2014/anexo/anexo_prt0364_06_05_2014.pdf>. Acesso em: 6 maio. 2017.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2014**. 9ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. ANVISA. **Como a Anvisa vê o uso off label de medicamentos Registro de Medicamentos** Brasília Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/registro_offlabel.htm>. Acesso em: 22 abr. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS. **Perfil das Coagulopatias Hereditárias no Brasil 2014**. Brasília: Ministério da Saúde., 2015.

BRUDZYNSKI, K.; MALDONADO-ALVAREZ, L. Polyphenol-protein complexes and their consequences for the redox activity, structure and function of honey. A current view and new hypothesis - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, p. 71–80, 2015.

BUENO, J. S.; SILVA, B. J. .; QUEIROZ, M. E. C. Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, p. 1221–1228, jul. 2011.

BUNGLAVAN, S. J.; DUTTA, N. Use of Tannins as Organic Protectants of Proteins in Digestion of Ruminants. **Journal of Livestock Science**, v. 4, p. 67–77, 2013.

BURNOUF, T. Modern Plasma Fractionation. **Transfusion Medicine Reviews**, v.

21, n. 2, p. 101–117, abr. 2007.

BURNOUF, T. New approaches for manufacturing plasma derivatives. **ISBT Science Series**, v. 9, n. 1, p. 160–167, jul. 2014.

BURNOUF, T. Current status and new developments in the production of plasma derivatives. **ISBT Sciences Series**, v. 11, n. 2, p. 18–25, 2016.

CAIRUTAS, C. M. **O que ocorre em nossas veias. Fragmento de sua história.** Recife: EBGE, 2001.

CANNAS, A. **Tannins: fascinating but some dangerous molecules.** Disponível em: <<http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/tannin.html>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

CANON, F. et al. Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG. **Langmuir**, v. 29, n. 6, p. 1926–1937, 2013.

CARVALHO, E. B. **Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos.** Portugal: Universidade do Porto, 2007.

CARVALHO, E. B.; FREITAS, V. A. P.; MATEUS, N. F. DA C. B. Overview of Protein-Tannin Interactions. In: **Tomorrow's Chemistry Today**. 2ª ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2010. p. 375–394.

CARVALHO, E.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 1, p. 97–101, 2004.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Hemoderivados** Rio de Janeiro Rede de Tecnologia e Informação do Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://www.redetec.org.br/wp->

content/uploads/2015/02/tr07_hemoderivados.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2015.

CHARLTON, A. J. et al. Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1593–1601, mar. 2002.

CHTOUROU, S. Production and Clinical Profile of Human Plasma Coagulation Fator VIII. In: **Production of Plasma Protein For Therapeutic Use**. Geneva: WILEY, 2013. p. 56–68.

CHTOUROU, S.; POULLE, M. Production and Clinical Profile of Human Plasma-Derived von Willebrand Factor. **Production of Plasma Protein For Therapeutic Use**, p. 69–79, 2013.

CHUNG, K.-T. et al. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, ago. 1998.

CHUNG, S. Y.; REED, S. Removing peanut allergens by tannic acid. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1468–1473, 2012.

COHN, E. J. et al. 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, n. 3, p. 459–475, mar. 1946.

CURLING, J.; GOSS, N.; BERTOLINI, J. The History and Development of the Plasma Protein Fractionation Industry. In: **Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use**. [s.l.] WILEY, 2013. p. (45)690.

DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S.; HOMAYOUN, N. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 53, n. 3, p. 776–778, 2008.

DAWRA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; SINGH, B. Protein-binding capacity of microquantities of tannins. **Analytical Biochemistry**, v. 170, n. 1, p. 50–53, 1988.

DEGUCHI, T. G. F. **Estudo do equilíbrio químico de compostos modelo de taninos com íons metálicos para o tratamento de efluentes industriais**. Curitiba, Brasil: Universidade Federal do Paraná, 2014.

DOMINGUES, M. M. et al. What can light scattering spectroscopy do for membrane-active peptide studies? **Journal of Peptide Science**, v. 14, n. 4, p. 394–400, abr. 2008.

DORES, R. G. R. DAS. **Análise Morfológica e Fitoquímica da Fava D'Anta (Dimorphandra mollis Benth): Determinação dos Teores de Compostos Fenólicos em Dimorphandra mollis Benth**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2007.

EDRI, E.; REGEV, O. pH Effects On BSA-Dispersed Carbon Nanotubes Studied by Spectroscopy-Enhanced Composition Evaluation Techniques. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 11, p. 4049–4054, jun. 2008.

EMA. **Directive 75/318/EEC. Note For Guidance on Manufacture of The Finished Dosage Form** Londres European Medicines Agency, , 1996. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002916.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2016.

FARRUGIA, A. Clinical Need for Plasma Protein Therapies Compensation for Plasma Donation in Ontario: A Cautionary Tale Canadian Blood Services Viewpoint the Source. **The Source: Magazine of The Plasma Protein Therapeutics Industry**, n. Fall, p. 4–6, 2014.

FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Critical reviews in analytical chemistry / CRC**, v. 46, n. 3, p. 257–65, 2015.

FOUCHE, A. et al. Retrospective Evaluation of IVIG Use: Appropriateness and Potential Cost Savings from Body-Weight dosing at a Northeastern Tertiary Hospital in the United States. **Research & Reviews: Journal of Hospital and Clinical Pharmacy**, v. 2, n. 3, p. 19–26, 2016.

FRANCHINI, M.; LIPPI, G. Prothrombin complex concentrates: an update. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, v. 8, n. 3, p. 149–54, jul. 2010.

FRAZIER, R. A. et al. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5189–5195, 2003.

FREITAS, V. DE; CARVALHO, E.; MATEUS, N. Study of carbohydrate influence on protein–tannin aggregation by nephelometry. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 503–509, jun. 2003.

FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE. **História do Sangue**. Disponível em: <<http://www.prosangue.sp.gov.br/artigos/estudantes>>. Acesso em: 23 abr. 2017.

GOUVEIA, F. L. **Produção de Imunoglobulinas Humana e Estudos Visando Novas Aplicações Terapêuticas**. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

GRANCHA, S. et al. Fator IX. In: **Production of Plasma Protein For Therapeutic Use**. [s.l.] Wiley, 2013. p. 120–134.

HAGERMAN, A. E. Tannin—Protein Interactions. **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I. Analysis, Occurrence, & Chemistry**, n. 4, p. 236–247, 1992.

HAGERMAN, A. E. et al. Tannin chemistry in relation to digestion. **Journal of Range Management**, v. 45, n. 1, p. 57–62, 1992.

HAGERMAN, A. E. Protein Precipitation by Tannins. **The Tannin Handbook**, p. 1, 2002.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 809–812, 1978.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Determination of Protein in Tannin-Protein Precipitates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 944–947, 1980.

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin 16 (4→8) Catechin (Procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2590–2595, 1998.

HAYNES, C. A.; NORDE, W. Globular proteins at solid/liquid interfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, n. 6, p. 517–566, 1994.

HEGYI, G. et al. **Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)**. Disponível em: <<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/index.html>>. Acesso em: 27 mar. 2017.

HILTBRUNNER, K. In-Line Process Analytics for Fractionation. **Genetic Engineering & Biotechnology News**, v. 30, n. 3, 2010.

HOFFMANN, E. M.; MUETZEL, S.; BECKER, K. A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds. **The British journal of nutrition**, v. 87, n. 5, p. 421–6, 2002.

HOFMANN, T. et al. Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta- O -galloyl- β - d -glucopyranose, Castalagin, and

Grandinin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9503–9509, dez. 2006.

HORIBA INSTRUMENTS. **Zeta Potential of Bovine Serum Albumin (BSA)**

Protein Horiba Instruments, , 2009. Disponível em:

<http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/AN184_app.pdf>

HUNTER, R. J. Charge and Potential Distribution at Interfaces. In: OTTEWILL, R. H.; ROWELL, R. L. (Eds.). . **Zeta Potential in Colloid Science**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 1981. p. 11–58.

HYOK, J. A.; DULTZ, S. Adsorption of tannic acid on chitosan-montmorillonite as a function of pH and surface charge properties. **Applied Clay Science**, v. 36, n. 4, p. 256–264, 2007.

JAYNE, D. Plasmapheresis in Renal Diseases. In: WILCOX, C. S. (Ed.). . **Therapy in Nephrology & Hypertension: A Companion to Brenner & Rector's The Kidney**. 3. ed. [s.l.] Saunders Elsevier, 2008. p. 125–139.

JOVINO, C. N. **Estudo do Potencial Zeta e da Elasticidade de Eritrócitos utilizando Pinças Ópticas e Avaliação da Ação Conservante do Polifosfato de Sódio sobre Eritrócitos**. Recife, Brasil: Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

JUNIOR, V., R. N. et al. Especificidades na legislação de Registro de Medicamentos Hemoderivados no âmbito da ANVISA. **Red Parf - Rede Panamericana para la Armoziación da Reglamentación Farmacêutica**, p. 7, 2011.

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

KATEEL, R.; RAI, M. S.; KUMAR J., A. Evolution of diuretic activity of gallic acid in normal rats.pdf. **Research, Journal of Scientific & Innovative**, v. 3, n. 2, p. 217–

220, 2014.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F. Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. **Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 479–483, out. 1997.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1427–1431, 1996.

KHANBABAEE, K.; REE, T. VAN. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641–649, 2001.

KILKUSKIE, R. E. et al. HIV and reverse transcriptase inhibition by tannins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 12, p. 1529–1534, dez. 1992.

KIM, T. J. et al. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 740–746, 2010.

KIM, Y. H. et al. Tannic acid, a higher galloylated pentagalloylglucose, suppresses antigen-specific IgE production by inhibiting ϵ germline transcription induced by STAT6 activation. **FEBS Open Bio**, v. 3, p. 341–345, 2013.

KONISHI, E.; HOTTA, S. On the Mechanism of Inactivation of Chikungunya Virus by Tannic Acid. **Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 9, p. 847–859, set. 1980.

KOUPANTISIS, T.; PAVLIDOU, E.; PARASKEVOPOULOU, A. Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins - CMC complex coavervates for flavour encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 62–71, 2016.

KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 41–66, set. 2003.

KRUGER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. **The Protein Protocols Handbook**, v. 32, p. 15–21, 2002.

KUNDU, S.; ASWAL, V. K.; KOHLBRECHER, J. Effect of ethanol on structures and interactions among globular proteins. **Chemical Physics Letters**, v. 670, n. December, p. 71–76, 2017.

KURLBAUM, M.; HÖGGER, P. Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 1, p. 127–132, 2011.

KUSUDA, M.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. Water-soluble complexes formed by natural polyphenols and bovine serum albumin: evidence from gel electrophoresis. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 152–160, 2006.

KUTZ, S. A. et al. Precipitation of serum proteins by extracts of cotton dust and stems. Identification of beta-lipoprotein and production of specific antibodies. **Environ Research**, v. 22, n. 2, p. 476–484, 1980.

LAWRIE, A. S. et al. A comparative evaluation of a new automated assay for von Willebrand factor activity. **Haemophilia**, v. 19, n. 2, p. 338–342, mar. 2013.

LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 3, p. 213–248, mar. 2012.

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

LOVRIEN, R. E.; MATULIS, D. Selective Precipitation of Protein. In: COLIGAN, J. E. et al. (Eds.). **Current Protocols in Proteins Science**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1997. v. Supplementp. 4.5.1-4.5.36.

MADHAN, B. et al. Density functional theory calculations on dipeptide-gallic acid interaction. **Chemical Physics Letters**, v. 369, n. 1–2, p. 131–138, 2003.

MAKKAR, P.; DAWRA, R.; SINGH, B. Determination of Both Tannin and Protein in a Tannin-Protein Complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 523–525, maio 1988.

MALVERN. **Zetasizer Nano Series**. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

MANSO, V. M. DA C. et al. **Panorama Histórico e Distribuição da Hemofilia no Brasil**. V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. **Anais...**São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2007Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00098_01C.pdf>. Acesso em: 6 maio. 2017

MARKETING RESEARCH BUREAU (MRB). **History of Plasma Fractionation**. Disponível em: <<http://marketingresearchbureau.com/plasma-industry/history-of-plasma-fractionation/>>. Acesso em: 15 mar. 2017a.

MARKETING RESEARCH BUREAU (MRB). **Clinical Uses of Plasma Products**. Disponível em: <<http://marketingresearchbureau.com/plasma-industry/clinical-uses-of-plasma-products/>>. Acesso em: 15 mar. 2017b.

MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. **Analytical Biochemistry**, v. 147, n. 1, p. 136–143, 1985.

MARTINS, J. E. S. **Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos Hemoderivados: Uma Visão Mundial Da Regulação Sanitária**. Brasília, Brasil: Universidade de Brasília, 2014.

MCMANUS, J. P. et al. The association of proteins with polyphenols. **Journal of the**

Chemical Society, Chemical Communications, n. 7, p. 309–311, 1981.

MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, W. et al. Regeneration of Protein from Insoluble Protein-Tannin Compounds. **Nature**, v. 184, n. 4701, p. 1799–1800, 5 dez. 1959.

MESCHER, A. L. **Junqueira's Basic Histology Text And Atlas**. 13. ed. [s.l.] Mc Graw Hill Education, 2013.

MOHAMED FAKER EL-DIN, H. et al. Interaction Between Some Plants Tannins and Milk Protein. **International Journal of Food and Nutricional Sciences**, v. 4, n. 1, 2015.

MOHAMMAD-BEIGI, H. et al. Preparation and in vitro characterization of gallic acid-loaded human serum albumin nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 4, p. 167, 2015.

MORE, J.; BULMER, M. Human Serum Albumin: A Multifunctional Plasma Protein. In: **Production of Plasma Protein For Therapeutic Use**. [s.l.] WILEY, 2013. p. 222–253.

NABAVI, S. F. et al. Hepatoprotective effect of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 50–55, jan. 2013.

NACZK, M. et al. Protein precipitating capacity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose and faba bean. **Food Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 467–471, 2001.

NANOCOMPOSIX. **Characterization Techniniques: Zeta Potencial**. Disponível em: <<https://nanocomposix.com/pages/characterization-techniques#smpps>>. Acesso em: 20 maio. 2017.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Compounds Database: CID 370**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid>. Acesso em: 14 set. 2016a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Compounds Database: CID 16129778**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129778#section=Top>>. Acesso em: 13 jul. 2017b.

NAYEEM, N. et al. Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. **Journal of Applied Pharmacy**, v. 8, n. 2, p. 8–11, 2016.

NGUYEN, D. M. C. et al. Antifungal activity of gallic acid purified from Terminalia nigrovenulosa bark against Fusarium solani. **Microbial Pathogenesis**, v. 56, n. January 2013, p. 8–15, 2013.

NOUBIGH, A. et al. Solubility of gallic acid in liquid mixtures of (ethanol + water) from (293.15 to 318.15) K. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 55, p. 75–78, 2012.

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

OBREQUE-SLIER, E. et al. Quantitative Determination of Interactions Between Tannic Acid and a Model Protein Using Diffusion and Precipitation Assays on Cellulose Membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8375–8379, 28 jul. 2010.

OC'WIEJA, M.; ADAMCZYK, Z.; MORGA, M. Adsorption of tannic acid on polyelectrolyte monolayers determined in situ by streaming potential measurements. 2015.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-

hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2191–2217, 2011.

OLIVEIRA, G. C. **Plasma Humano: Componentes E Derivados. Conservação e Utilização terapêutica em ambiente hospitalar**. Almada, Portugal: Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moni, 2016.

OMAR, A.; MORGENTHALER, J. J. Patentes Method for the removal of viruses from protein solutions. p. 1–6, 2016.

OSAWA, R.; WALSH, T. P. Effects of acidic and alkaline treatments on tannic acid and its binding property to protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 704–707, maio 1993.

OWUSU-APENTEN. The Bradford Method - Principles. In: OWEN R. FENNEMA et al. (Eds.). . **Food Protein Analysis - Quantitative Effects on Processing**. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 2002. p. 188–194.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 954–970, 2013.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, SP: Manole, 2005.

PONCIN-EPAILLARD, F. et al. Surface treatment of polymeric materials controlling the adhesion of biomolecules. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 3, p. 528–543, 7 ago. 2012.

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.

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. **Food Chemistry**, v. 220, p. 93–99, 2017.

REPÚBLICA, B. P. DA. **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. Brasília Casa Civil, , 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicaocompilado.htm>. Acesso em: 12 mar. 2017

ROBERT, P. Worldwide Supply and Demand of Plasma And Plasma- Derived Medicines. **Iranian Journal of Blood and Cancer**, v. 3, n. 3, p. 111–120, 2011.

ROBERT, P. **Global plasma supply and product demand**. IPFA/BCA Global Symposium on The Future for Blood and Plasma Donations. **Anais...**Sacramento-CA: The Marketing Reseach Bureau, Inc., 2014Disponível em: <[http://www.ipfa.nl/UserFiles/File/WS 2014/Symposium 2014 IPFA BCA/Proceedings Sacramento 2014/1_5_Robert_IPFA_BCA_2014.pdf](http://www.ipfa.nl/UserFiles/File/WS%202014/Symposium%202014%20IPFA%20BCA/Proceedings%20Sacramento%202014/1_5_Robert_IPFA_BCA_2014.pdf)>

ROBERT, P. **Global Use of Plasma-Derived Medicinal Products IPFA Workshop on Improving Access to Plasma and Plasma Products in the Southern African Region**. IPFA Workshop on Improving Access to Plasma and Plasma Products in the Southern African Region. **Anais...**Cape Town: The Marketing Reseach Bureau, Inc., 2015Disponível em: <[http://www.ipfa.nl/UserFiles/File/WS 2015/IPFA Cape Town 2015/Proceedings Publicly Published/1_4_Robert_amended.pdf](http://www.ipfa.nl/UserFiles/File/WS%202015/IPFA%20Cape%20Town%202015/Proceedings%20Publicly%20Published/1_4_Robert_amended.pdf)>

ROMISCH, J.; POCK, K. Prothrombin Complex. In: **Production of Plasma Protein For Therapeutic Use**. [s.l.] WILEY, 2013. p. 100–119.

SALGIN, S.; SALGIN, U.; BAHADIR, S. Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths. **Interational Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 12404–12414, 2012.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 1104.

SCHÄRER, C. Good practice in plasma collection and fractionation. **ISBT Sciences Series**, v. 5, p. 95–98, 2010.

SCHILCHER, G. et al. Ethanol Causes Protein Precipitation—New Safety Issues for Catheter Locking Techniques. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 9, 31 dez. 2013.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Effect of Ethanol on Red Wine Tannin-Protein (BSA) Interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3148–3151, ago. 1997.

SHAW, R. Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing. **Dynamic Light Scattering Training: Achieving reliable nano particle sizing (online)**, 2014.

SHEWANGZAW, A. EFFECT OF DIETARY TANNIN SOURCE FEEDS ON RUMINAL FERMENTATION AND PRODUCTION OF CATTLE; A REVIEW. **Online J. Anim. Feed Res. Scienceline/Journal Online Journal of Animal and Feed Research**, v. 6, n. 2, p. 45–56, 2016.

SIENIAWSKA, E.; BAJ, T. Tannins. In: MCCREATH, S. B.; DELGODA, R. (Eds.). . **Pharmacognosy - Fundamentals, Applications and Strategies**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 199–232.

SIMON, C. et al. Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin–Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach †. **Biochemistry**, v. 42, n. 35, p. 10385–10395, set. 2003.

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

SORENSEN, B. et al. Clinical review: Prothrombin complex concentrates - evaluation of safety and thrombogenicity. **Critical Care**, v. 15, n. 409, 2011.

THONGKAEW, C. et al. Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 103–112, dez. 2014.

TUAZON, S. A. Serum Protein Electrophoresis: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels. **New England Journal of Medicine**, p. 1–8, 2014.

VERZA, S. G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

VINCENT, J.-L. Relevance of albumin in modern critical care medicine. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 23, n. 2, p. 183–191, jun. 2009.

VINCENT, J.-L. et al. Albumin administration in the acutely ill: what is new and where next? **Critical Care**, v. 18, n. 4, p. 231, 2014.

WANG, K. et al. Investigation of Gallic Acid Induced Anticancer Effect in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 28, n. 9, p. 387–393, set. 2014.

WESTERMEIER, R. et al. **Electrophoresis in Practice - A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations**. 4^a ed. Freiburg: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

WILSON, K.; WALKER, J. M. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7^a ed. Nova York: Cambridge University Press, 2009.

WONGSAGONSUP, R. et al. Zeta Potential (?) Analysis for the Determination of Protein Content in Rice Flour. **Starch - Starke**, v. 57, n. 1, p. 25–31, jan. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Clinical Use of Blood**. Geneva: World Health Organization, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Technical Report Series n° 941, Annex 4 - Recommendations for the Production, Control and Regulation of Human Plasma for Fractionation** World Health Organization, , 2007. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19650en/s19650en.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2017

XIAO, J.; KAI, G. A Review of Dietary Polyphenol-Plasma Protein Interactions: Characterization, Influence on the Bioactivity, and Structure-Affinity Relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 1, p. 85–101, jan. 2012.

YOSHIKAWA, H. et al. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 865–871, abr. 2012.

ZUMBO, P. Ethanol Precipitation. **Weill Cornell Medical College**, v. 1932, n. Pauling, p. 1–12, 2013.