

Artigo Original

recebido em 20/08/2002 e aceito em 20/04/2003

Obtenção de hemoglobina purificada: Uso de resinas de troca aniônica para a eliminação de fosfolípidos residuais

Stroma-free hemoglobin: Using anion-exchange chromatography to eliminate residual phospholipids

Cristina T. Andrade
Lúcio A.M. Barros
Katia M.P. Silva

Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Centro de Tecnologia, Bloco J,
Caixa Postal 68525, 21945-970 Rio de Janeiro, RJ,
E-mail: ctandrade@ima.ufrj.br

Celina C.R. Barbosa

Instituto de Engenharia Nuclear,
Comissão Nacional de Energia Nuclear,
Cidade Universitária, 21945-970 Rio de Janeiro, RJ

Edwin G. Azero
Eliete Bouskela

Depart. de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual do Rio de Janeiro,
Pavilhão Reitor Haroldo da Cunha,
Rua São Francisco Xavier 524,
20550-013 Rio de Janeiro, RJ

Resumo

A hemoglobina humana (Hb) vem sendo usada como ponto de partida para o desenvolvimento de substitutos para o sangue. Antes de ser submetida a reações de modificação química, a Hb precisa ser obtida com alto grau de pureza. Neste trabalho, concentrados de hemácias foram tratados por métodos convencionais para a obtenção de amostras de Hb, sob a forma de carbonil-hemoglobina (HbCO). A técnica de cromatografia de troca iônica foi usada com o objetivo de verificar-se a eficiência de resinas aniônicas na eliminação de fosfolípidos da parede celular, ainda residuais nas soluções de HbCO. Experimentos foram realizados com duas resinas de troca aniônica, uma fraca e outra forte. Os extratos orgânicos da solução de HbCO purificada convencionalmente e da solução purificada adicionalmente por meio de cromatografia em resina de troca aniônica forte, AG MP-1, foram analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os resultados mostraram que a resina AG MP-1, sob as condições utilizadas, foi capaz de reter grande parte do total de fosfolípidos pesquisados.

Palavras-chave: Cromatografia de troca iônica, Cromatografia líquida de alta pressão, Fosfolípidos, Hemoglobina, Substitutos para o sangue .

Abstract

Human hemoglobin (Hb) has been used to develop blood substitutes. Before being submitted to chemical modification reactions, purification procedures should be designed in order to obtain stroma-free hemoglobin. In the present work, red blood cells were treated with CO gas to convert Hb to carbonyl hemoglobin, and then conventional purification methods were applied. Ion-exchange chromatography was used to verify the efficiency of anionic resins to eliminate stroma contaminants. Weak and strong anion-exchangers were used. Better results were obtained with the strong anion-exchanger AG MP-1. Some modifications of the conventional purification procedure were also adopted, such as microfiltration of the hemolysate. Hemoglobin concentrations were determined by spectrophotometry. High-performance liquid chromatography was used to quantify the contents of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and sphingomyelin in the organic extracts from HbCO solutions prepared in the usual way and from HbCO solutions submitted to further purification by anion-exchange chromatography with the AG MP-1 resin. The results showed that the AG MP-1 resin was able to adsorb 94% of the total content of phospholipids present in the HbCO solution purified by the conventional method followed by microfiltration.

Keywords: Blood substitutes, Hemoglobin, High-performance chromatography, Ion-exchange chromatography, Phospholipids

Extended abstract

Introduction

The development of temporary oxygen carriers has been undertaken by several research groups for decades. These products aim at improving oxygen transport and delivery to the tissues. Oxygen carriers, also called "artificial blood" or blood substitutes, provide none of the complex and interrelated functions of blood. Blood shortage and transfusion-related risks constitute some of the motives to obtain reliable oxygen carriers. Such products would find applications mainly in cases of trauma and during surgery. Hemoglobin maintains its ability to transport oxygen outside of the red blood cell and the human hemoglobin molecule (Hb) has been used in two of the products currently under clinical evaluation. To achieve this objective, Hb should be exhaustively purified and chemically modified. Hb purification methods generally involve washings, lysing, centrifugations to sediment fragments of the cell membrane, filtrations and pasteurization. Such procedures should not disrupt its macromolecular conformation. In the present work, ion-exchange chromatography was used as an additional technique to obtain stroma-free Hb.

Materials and methods

Outdated banked human blood (RBC) were donated by the Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ) and the Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ). Amberlite IRA-99 (Rohm & Haas) and AG MP-1 (Biorad Labs) anion exchangers were used after conditioning. Standard phospholipids were purchased from Sigma. RBC samples were diluted with 0.9% NaCl and submitted to carbonylation reaction with CO gas to convert HbO₂ to HbCO. Lysing was carried out in methylene chloride. After centrifugation to sediment stroma fragments and elimination of residual solvent by evaporation, the Hb aqueous solution was heated at 60°C for 1h. Anion-exchangers were washed with ethyl alcohol and water, and conditioned by acid-basic treatments. A phosphate buffer solution at pH 7.4 was used as mobile phase in column chromatography. TLC and FTIR spectrometry experiments were carried out to characterize phospholipids contaminants in HbCO solutions purified by the weak anion-exchanger (Amberlite IRA-99). Some modifications in the conventional purification technique, such as microfiltration of the hemolysate, were introduced to obtain a new sample of HbCO. Part of this sample was submitted to additional purification with a strong anion-exchanger (AG MP-1). Spectrophotometry determination of hemiglobincyanide (HiCN) was used to calculate HbCO concentrations and high-performance chromatography

with a TSK Gel Silica-60 column, following a methodology developed previously, was used to analyze the organic extracts of the HbCO solution purified by the conventional procedure and of the HbCO solution resulting from further purification by anion-exchange chromatography with the AG MP-1 resin.

Results and discussion

There are many papers on blood substitutes in the literature; however, most of them are reviews on general topics or report results from animal tests carried out with already developed products. Before chemical modifications, numerous purification procedures should be performed on RBCs. In the present work, hemolysis and conventional purification procedures, supposed to eliminate leukocytes, lipids and membrane proteins, water-soluble proteins other than Hb and other blood components, were carried out on the thermally stable form of Hb, HbCO. Despite good yields, the purity of the Hb was still low. At first, IRA-99 exchanger was used to improve HbCO purity. The weak anion-exchanger was able to separate a great amount of contaminants on the top of the column. FTIR spectra of 4 substances recovered by TLC were taken; sphingomyelin and phosphatidylcholine were identified. Some modifications on the conventional purification procedure were introduced; carbonylation was carried out for a longer period of time (3 min) and microfiltration through 0.2 µm membranes were carried out on the hemolysate. The new HbCO sample (C20) was further purified by ion-exchange chromatography with AG MP-1, giving rise to the C20R2 sample. Hb was converted to hemiglobincyanide and the Hb concentration determined by a standard method. HPLC was used to determine the contents of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and sphingomyelin, present in organic extracts from both HbCO samples. Total phospholipid contents of 281.1 µg/mlHb and of 17.7 µg/mlHb were found for C20 and C20R2, respectively.

Conclusion

Purification methods described in the literature to obtain stroma-free hemoglobin were applied to RBCs, previously treated with CO gas. A great amount of contaminants was separated by additionally using ion-exchange chromatography with a weak anion-exchanger. Some modifications introduced on the conventional procedure led to a new hemolysate sample, which was further purified by ion-exchange chromatography with a strong anion-exchanger. HPLC was used to analyze the organic extracts of both samples and quantify some phospholipids. The results showed that the strong anion-exchanger was able to adsorb 94% of the phospholipids analyzed.

Introdução

Substitutos para o sangue vêm sendo desenvolvidos há vários anos. Esses produtos não substituem o sangue em funções metabólicas mais complexas e inter-relacionadas; a função desses produtos é a de transportar o oxigênio e o dióxido de carbono, por um período limitado de tempo.

Os vários fatores que motivam o desenvolvimento de substitutos para o sangue são conhecidos. O mais importante deles constitui-se na demanda crescente, em casos de perda de volume elevado de sangue, devido a cirurgias ou a traumas, associada ao número decrescente de doações. Esse fator é agravado com o envelhecimento da população. Um déficit de 4 milhões de bolsas de sangue por ano foi projetado ocorrer até 2030, nos USA (Vam Vakas e Taswell, 1995). No Brasil, além de informação deficiente sobre doação, 20% dos doadores são considerados inaptos.

Apesar do desenvolvimento e da implementação de novos procedimentos de manipulação e de testes sensíveis, as transfusões de sangue ainda oferecem riscos relacionados à transmissão de vírus (como o da hepatite B, hepatite C, HIV), à contaminação bacteriana (Sanders *et al.*, 1996), à transmissão de malária, da leishmaniose e da doença de Chagas. Mais recentemente, o risco de transmissão de encefalopatias degenerativas tem sido debatido, principalmente na Europa (Andrews *et al.*, 2000; Dodd, Sullivan, 1998; Houston *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000).

Uma solução estável carreadora temporária de oxigênio ainda teria outras aplicações, como na conservação de órgãos para transplante e no aumento in vivo da sensibilidade de órgãos a terapias por radiação (Bunn, 1995). Além disso, um sistema carreador teria valor terapêutico em situações nas quais o sangue não é capaz de fornecer oxigênio aos tecidos, como em casos de infarto (Riess, 2001). Como a tipagem prévia não se faz necessária, as transfusões instantâneas seriam facilitadas (Goodnough, 1998).

Embora muitas das tentativas empreendidas tenham fracassado, quatro produtos encontram-se em fase adiantada de testes clínicos; dentre eles, dois são produtos obtidos a partir de hemoglobina humana (Hb) (Riess, 2001; Squires, 2002). No entanto, soluções de Hb não devem ser administradas na corrente sanguínea sem a prévia modificação química da proteína (Everse e Hsia, 1997; Palaparthi *et al.*, 2000; Winslow, 1992). Antes que tais reações de modificação química sejam realizadas, a Hb precisa ser obtida com alto grau de pureza, sob condições padronizadas de esterilização e sem que tenha sofrido desnaturação.

A purificação da Hb a partir de concentrados de hemácias (RBC) inclui várias etapas. A primeira etapa constitui-se na eliminação de proteínas do plasma, de leucócitos, de plaquetas e de anticoagulantes. A segunda etapa concentra-se na lise das células vermelhas do sangue. Grande parte de fragmentos da parede celular pode ser removida em etapa seguinte, por meio de lavagens e centrifugações. No entanto, os resíduos dessa parede celular e mesmo moléculas isoladas dos fosfolipídeos que a formam, e que tendem a interagir com a Hb, precisam ser exaustivamente eliminados da solução final. Para atingir tal objetivo, a técnica de cromatografia de troca iônica foi citada por alguns autores que, no entanto, não publicaram detalhes experimentais (Menu *et al.*, 1999; Winslow e Chapman, 1994). Durante todas essas etapas, a Hb pode sofrer processos oxidativos irreversíveis. Devido ao grande interesse comercial e à competição pelo mercado farmacêutico, as informações essenciais sobre cada uma dessas etapas não se encontra disponível na literatura.

No presente trabalho, foram desenvolvidos métodos de purificação e de análise da Hb, a partir de concentrado de hemácias. A técnica de cromatografia de troca iônica foi usada na purificação adicional de hemoglobina. As técnicas de espectrometria de absorção na região do infravermelho (FTIR), de cromatografia de camada fina (TLC) e de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foram usadas na caracterização qualitativa e quantitativa de contaminantes residuais da parede celular.

Materiais

Bolsas de concentrado de hemácias (RBC) com aproximadamente 320 ml de capacidade, com prazos de validade vencidos, foram fornecidas pelo Banco de Sangue Herbert de Souza do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HPE-UERJ) e pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ) e usadas para a obtenção de amostras de hemoglobina purificada. O reagente de Drabkin a 3% (v/v) foi fornecido pela Doles Reagentes, Goiânia, Brasil. As resinas de troca aniônica Amberlite IRA-99 (Rohm & Haas; Spring House, Pe, USA) e AG MP-1 (BioRad Labs; Bromley, England) foram utilizadas após condicionamento. Padrões de fosfolipídeos, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM) foram fornecidos pela Sigma (Saint Louis, Mo, USA). Acetonitrila e metanol (Grau HPLC) foram forneci-

dos pela Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ) e usados como recebidos. Os demais solventes (P.A.) também foram usados como recebidos.

Métodos

Obtenção de hemoglobina carbonilada (HbCO)

Quantidades pré-estabelecidas e variáveis (50 ou 100 g) de concentrado de hemácias foram diluídas com igual massa de solução salina fisiológica (NaCl 0,9% p/v). Essa solução diluída foi colocada em erlenmeyer e, sob agitação manual, gás CO foi introduzido no frasco durante 90 ou 180 s. A mistura foi centrifugada (Centrífuga Hermle Z 383K, National Labnet Company Inc., NJ, USA) sob 1000 g durante 15 min. Após descarte do sobrenadante, o processo de diluição/lavagem e centrifugação foi repetido outras duas vezes.

Hemólise de RBC; eliminação de proteínas contaminantes

Após as etapas de lavagens e centrifugações, a solução resultante foi diluída em solução salina fisiológica na proporção 1:3 (p/p), misturada com cloreto de metileno na proporção 5:1 e mantida sob agitação durante um período aproximado de 8 min. A mistura foi, então, centrifugada a 1900 g durante 30 min. A fase superior aquosa, que continha a HbCO, foi separada e novamente submetida ao tratamento com cloreto de metileno e à centrifugação. Em ambas as etapas, a camada intermediária entre as fases aquosa e orgânica, constituída de proteínas contaminantes e de fosfolípidos da membrana celular, foi separada cuidadosamente. A solução de HbCO foi aquecida a 40°C durante 30 min sob pressão reduzida, em evaporador rotatório ligado a uma trompa d'água, para a eliminação de cloreto de metileno residual. As proteínas contaminantes, ainda presentes na solução de HbCO, foram precipitadas ao abrigo da luz, após aquecimento a 60°C, durante 1 h. Após centrifugação sob 1900 g durante 20 min, o sobrenadante foi recuperado e filtrado através de carvão ativado.

Determinação da concentração de Hb

A concentração de Hb foi determinada por medidas espectrofotométricas do complexo cianeto de hemiglobina, HiCN (ICSH, 1996). Em tubo de ensaio de 10 ml, foram adicionados 20 µl de solução de HbCO e 5 ml do reagente de Drabkin. Após homogeneização, a mistura reacional foi deixada em repouso a 5°C, durante 1 noite. Findo esse período de tempo, a amostra foi filtrada através de membrana de diâmetro de po-

ros de 0,2 µm. Leituras a 540 nm foram realizadas em espectrofotômetro Thermolyne Turner, modelo SP-870 (Dubuque, USA). A concentração de Hb foi calculada pela equação 1,

$$\text{HbCN (g/dl)} = \frac{A^{540} \times M \times F}{\epsilon_{\text{HiCN}}^{540} \times b \times f1 \times f2} \quad (1)$$

onde A^{540} é a absorbância lida a 540 nm; M corresponde à massa molar da unidade constituinte da Hb (ou $\frac{1}{4}$ da massa molar da Hb, 64458/4); F = 251 é o fator de diluição da solução de Hb, 0,02 ml/ 5 ml do reagente; b é o caminho óptico em cm; $\epsilon_{\text{HiCN}}^{540} = 11$ é o coeficiente de extinção milimolar do cianeto de hemoglobina a 540 nm; f1 é o fator de conversão de litro para decilitro; f2 é o fator de conversão de miligrama para grama.

Preparação e ativação das resinas de troca aniônica

As resinas IRA-99 e AG MP-1 (aproximadamente 200 g) foram lavadas com álcool etílico e com água destilada e deionizada. Em seguida, as resinas foram tratadas com solução aquosa 0,1 M de NaOH e neutralizadas por meio de lavagens sucessivas com água destilada e deionizada; tratadas com solução aquosa 0,1 M HCl e novamente lavadas com água destilada e deionizada até a neutralidade.

Empacotamento e condicionamento de colunas

Em todos os experimentos, foram usadas colunas de vidro de 5 cm de diâmetro com placas de vidro sinterizado em uma das extremidades. A resina, suspensa em água destilada e deionizada foi transferida para a coluna em quantidade tal que, após a sua decantação, atingia 20 cm de altura de leito. A resina foi equilibrada com 0,05 M tampão fosfato pH 7,4 de condutividade 8,09 mS/cm.

Purificação de HbCO por meio de cromatografia de troca iônica

Aproximadamente 20 e 100 ml de HbCO em solução salina fisiológica foram adicionados às colunas empacotadas com a resina Amberlite IRA-99 ou com a resina AG MP-1, respectivamente. As substâncias foram eluídas com uma solução 0,005 M tampão fosfato pH 7,4 de condutividade 1,00 mS/cm. O fluxo foi fixado em 0,33 ml/min. O material retido na resina IRA-99 foi eluído com solução 0,016 M de NaCl de condutividade 1,75 mS/cm e posteriormente com solução 0,155 M de NaCl de condutividade 15,08 mS/cm, até que $A^{540} = 0$. O material retido na resina AG MP-1 foi eluído com

álcool etílico, até que $A^{540} = 0$. A Figura 1 mostra o fluxograma de purificação de HbCO por cromatografia de troca iônica com resina AG MP-1.

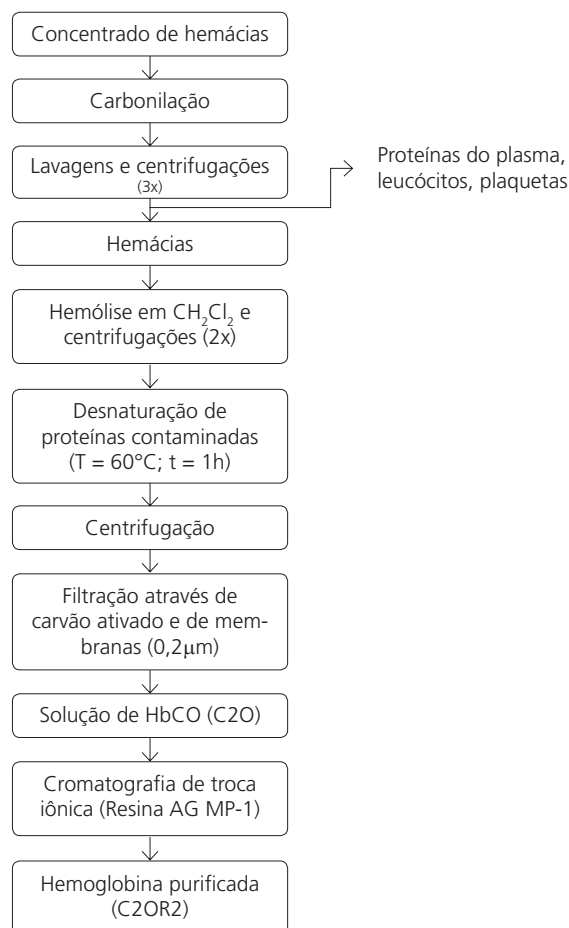


Figura 1. Fluxograma do processo de purificação de HbCO com a resina AG MP-1. **Figure 1.** Flow diagram for the purification process of HbCO on AG MP-1.

Análise dos fosfolipídeos contaminantes

Cromatografia de camada fina - Cromatografia de camada fina em placas de sílica gel 60, e com as misturas de solventes clorofórmio/álcool metílico/água (69:27:4) (solvente X) e clorofórmio/álcool metílico/água (65:31:4) (solvente Y) foi usada para a identificação das substâncias contaminantes, retidas na resina Amberlite IRA-99, e eluídas em soluções 0,016 e 0,155 M de NaCl. A Solução de 2,7-dicloro-fluoresceína em álcool propílico e uma lâmpada fluorescente foram usadas para a revelação dos cromatogramas.

Espectrometria de absorção na região do infravermelho - As amostras separadas por cromatografia

em camada fina foram caracterizadas por espectrometria de absorção na região do infravermelho, em pastilhas de KBr. A sílica foi retirada da placa e a mesma mistura solvente foi usada na extração de quatro das substâncias aparentemente encontradas em maior quantidade. As análises foram realizadas em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 1720 X.

Extração de fosfolipídeos residuais - Amostras de solução de HbCO (4 ml) foram transferidas para balão volumétrico de 50 ml de capacidade e completadas com água destilada e deionizada. Aliquotas de 20 ml desta solução foram transferidas para funil de decantação de 250 ml de capacidade. A cada alíquota, foram adicionados 50 ml de metanol e 25 ml de cloreto de metileno. A solução resultante foi agitada durante 10 minutos e, depois, 25 ml de cloreto de metileno e 25 ml de solução 2M de KCl foram adicionados. A solução foi mantida sob agitação durante 10 minutos e deixada em repouso durante 1 hora. Decorrido esse período, a camada inferior foi coletada e aquecida a 40°C sob pressão reduzida até a completa eliminação do solvente residual. O resíduo seco foi redissolvido em 1 ml de cloreto de metileno e filtrado através de membranas de diâmetro de poros igual a 0,2 µm (Sakai *et al.*, 1993).

Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A técnica de HPLC em fase normal foi usada para a análise quantitativa de fosfolipídeos remanescentes nas soluções de HbCO (Sakai *et al.*, 1993) antes (amostra C20) e após a purificação adicional por cromatografia de troca iônica em resina AG MP-1 (amostra C2OR2). Soluções-mãe dos padrões de fosfatidilcolina (PC, PM = 760,10), fosfatidil-etanolamina (PE, PM = 718,02) e esfingomielina (SM, PM = 875,41) foram preparadas separadamente a concentração de ~ 2 g/l e diluídas de acordo com a sensibilidade do equipamento.

Para o experimento propriamente dito, uma coluna de 250 mm x 4,6 mm (d.i.), empacotada com sílica gel com poros de 60 Å (TSK Gel Sílica-60, TOSOH Biosep LLC, Montgomeryville, Pe, USA) foi usada. Não se usou pré-coluna. De modo a minimizar possíveis danos à coluna, todas as amostras foram previamente filtradas em membrana Millipore de diâmetro de poros de 0,2 µm e um volume de 20 µl foi injetado. A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila/metanol/ácido fosfórico, na proporção 900:95:5. O experimento foi realizado em cromatógrafo HPLC (Pharmacia LKB-HPLC pump 2248, Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden), equipada com válvula de injeção Rheodyne 7725i (Cotati, CA, USA), integrador Shimadzu Chromatopac C-R6A e detector de UV-Vis

Shimadzu, modelo SPD-10AV (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Md, USA). Os solutos foram detectados a 210 nm. O fluxo foi mantido a 1,1 ml/min durante todos os experimentos.

Resultados e Discussão

Na primeira etapa de um projeto mais amplo, a purificação de hemoglobina humana (Hb) diz respeito à eliminação de proteínas do soro e de fosfolípidos, presentes na parede celular das células vermelhas do sangue. Etapas da purificação de Hb vêm descritas na literatura. Alguns autores relatam que a carbonilação da Hb deve constituir-se na etapa inicial do processo de purificação (Sakai *et al.*, 1993), de modo a que se possa trabalhar com uma forma de Hb mais estável termicamente. Por outro lado, outros autores não limitam o procedimento inicial. Afirmando que, anteriormente ao aquecimento para a eliminação de microorganismos e outros contaminantes, a Hb contida no hemolisado bruto deve estar ou no estado R ("relaxado") ou no estado T ("tenso"). O estado R é considerado como aquele de afinidade elevada e é o estado dominante quando alguma outra substância encontra-se ligada ao grupo heme. Tais ligantes incluem o oxigênio, o monóxido de carbono e o óxido nítrico. O estado T é o de baixa afinidade e é a forma dominante da Hb quando ela se encontra desoxigenada. No presente trabalho, foi escolhido como primeiro passo a carbonilação da solução de sangue (solução de RBC) e, assim, a forma HbCO para o desenvolvimento das etapas posteriores.

Inicialmente, a reação de carbonilação foi realizada durante um período de 90 s. De acordo com a literatura (Sakai *et al.*, 1993), esse período seria suficiente para a completa carbonilação dos grupamentos heme. No entanto, em experimentos posteriores, foi verificado que tempos reacionais duas vezes maiores (180 s) levavam a produtos que aparentemente eram mais estáveis. As suspensões de HbCO foram submetidas ao processo de hemólise em dicloreto de metileno. Em experimentos preliminares, foi verificado que tanto o número de vezes em que uma amostra era tratada com o solvente orgânico, como o volume do solvente, tinham influência na conversão, determinada por espectrofotometria. Volumes iguais de solução aquosa/solvente orgânico não levaram a bons resultados. A razão solução aquosa/solvente orgânico de 5:1 foi usada enquanto que 3 lavagens seguidas de centrifugações foram realizadas.

Para a infusão intravenosa, a eliminação de resíduos dos componentes da membrana celular faz-se

necessária. A técnica de cromatografia de troca iônica foi usada para a purificação adicional do hemolisado. Foi realizada uma série de experimentos com a resina Amberlite IRA-99. Em um desses experimentos, foram usados 180 g de resina e um volume de 380 ml de 0,005M fosfato a pH 7,4, com fluxo de 0,33 ml/min. Para esse experimento, 100 ml de solução de HbCO foram usados e alíquotas de 5, 20 e 30 ml foram recolhidas e analisadas. Os primeiros 60 ml foram incolores. A partir dos 20 ml seguintes, as alíquotas eluídas foram consideradas como soluções de HbCO purificada porque apresentaram coloração levemente avermelhada, o que possibilitou a leitura no espectrofotômetro. Só após a eluição de 100 ml uma coloração vermelha mais intensa foi observada. A coloração persistiu até que aproximadamente 430 ml tivessem sido recolhidos. A partir daí, foi iniciada a eluição do material contaminante adsorvido na resina, por gradiente descontínuo salino. A Figura 2 mostra a curva de eluição obtida nesse experimento, que sugere a não-homogeneidade da Hb. Nesse experimento, a concentração de hemoglobina sob a forma HbCO foi determinada levando-se em conta a absorvância na região do visível ($I_{\max \text{ HbCO}} = 418 \text{ nm}$; $e = 154$) (The Merck Index, 1969).

Uma quantidade grande de resíduos da parede celular, cuja presença podia ser observada visualmente com facilidade, ficou retida na coluna. Quatro frações de 30 ml foram eluídas com solução 0,016 M de NaCl. Outras duas frações de 100 ml foram eluídas com so-

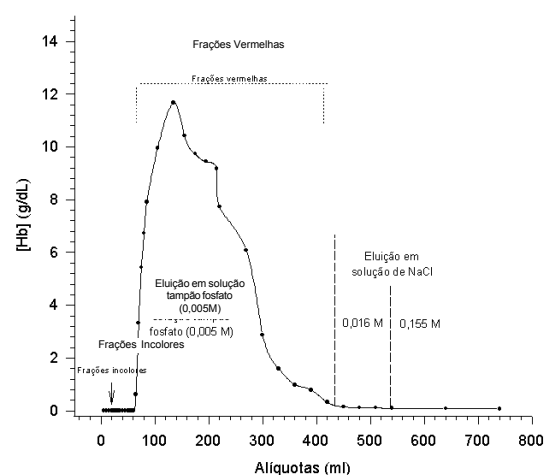


Figura 2. Curva de eluição de solução de HbCO purificada por meio de cromatografia de troca aniônica em resina Amberlite IRA-99. **Figure 2.** Chromatogram of HbCO solution on Amberlit IRA-99.

lução 0,155 M de NaCl. Todas as frações aquosas que continham os fosfolipídeos contaminantes foram reunidas, concentradas sob vácuo e submetidas à extração líquido-líquido com a mistura clorofórmio/álcool metílico (2:1). A técnica de cromatografia em camada fina foi usada para a separação e identificação das substâncias contaminantes. Duas corridas foram realizadas em placa de sílica; com o solvente X, 5 substâncias foram separadas com valores de R_f iguais a 0,05, 0,12, 0,60, 0,73 e 0,93. Foi possível identificar os contaminantes fosfatidilcolina ($R_f = 0,60$) e fosfatidiletanolamina ($R_f = 0,78$), em relação a dados da literatura, quando a mesma mistura de solventes foi empregada para a separação de fosfolipídeos (Zweig e Sherma, 1985). Na segunda corrida de cromatografia de camada fina, o solvente Y levou à separação de 8 substâncias. A sílica foi retirada da placa e a mesma mistura solvente foi usada na extração de 4 das substâncias aparentemente encontradas em maior quantidade. Após secagem, as substâncias A, B, C e D foram analisadas por espectrometria de absorção no infravermelho. A Figura 3 mostra os espectros obti-

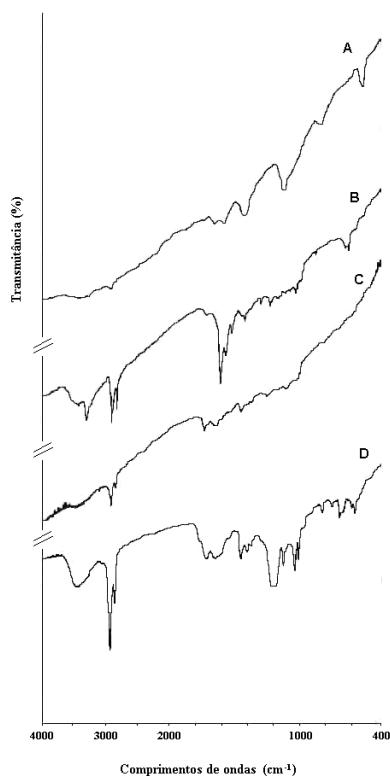


Figura 3. Espectros de absorção na região do infravermelho de contaminantes retidos pela resina Amberlite IRA-99. **Figure 3.** Infrared spectra of contaminants retained by Amberlite IRA-99.

dos. Como pode ser observado, os espectros ficaram mal resolvidos, devido à pequena quantidade das amostras e a resíduos de sílica. No entanto, bandas na região 1299 a 1250 cm^{-1} , características de grupamentos éster fosfato, e na região 1050 a 970 cm^{-1} , características de grupamentos P-O-C (C alifático) foram detectadas. Comparação com espectros no infravermelho de padrões de fosfolipídeos sugerem a identificação do contaminante B como sendo a esfingomiélna e do contaminante D como sendo a fosfatidilcolina, fosfolipídeos que ficaram retidos na resina Amberlite IRA-99.

Algumas modificações foram introduzidas no processo de obtenção de duas outras amostras de HbCO purificada. Para a obtenção da primeira dessas amostras (amostra C20), a carbonilação foi realizada durante um período de tempo mais longo (180 s). Após a eliminação por filtração das proteínas contaminantes desnaturadas por calor, a solução de HbCO foi filtrada através de membranas com diâmetro de poros de 0,2 μm e a concentração de HbCO, calculada a partir do produto seco em estufa, foi de 5,98%. Parte da amostra C20 foi submetida à purificação adicional por cromatografia de troca iônica, em resina AG MP-1 e deu origem à amostra C20R2. Após a saída da amostra C20R2 da coluna, observação visual não revelou a retenção de contaminantes, como no experimento descrito anteriormente, muito provavelmente devido à filtração adicional.

A concentração de HbCO das amostras C20 e C20R2 foi também determinada pela técnica colorimétrica descrita na parte experimental. A Tabela 1 apresenta os valores correspondentes à concentração de HbCO determinados para as amostras C20 e C20R2, e para dois concentrados de hemácias (RBC1 e RBC2). Os valores obtidos para ambos os concentrados encontram-se no intervalo citado para tais produtos (Carvalho, 2002; van Assendelft *et al.*, 1976).

Tabela 1. Concentração de HbCO determinada para as amostras C20 e C20R2, e para concentrados de hemácias **Table 1.** HbCO concentration determined for the C20 and C20R2 samples, and for red blood cells concentrates

Amostra ^a	[HbCO] (g/dl)
C20	4,2
C20R2	3,8
RBC1	16,5
RBC2	15,7

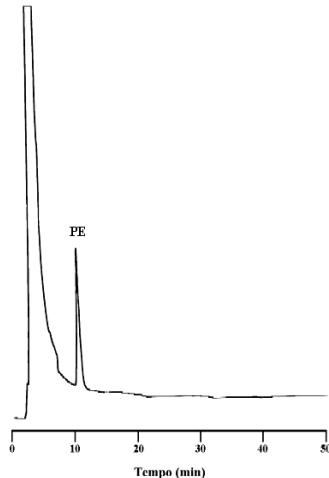


Figura 4. Cromatograma do padrão de fosfatidil-etanolamina. **Figure 4.** Chromatogram of the phosphatidylethanolamine standart.

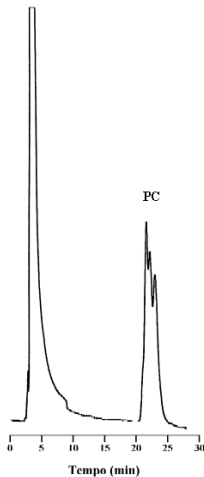


Figura 5. Cromatograma do padrão de fosfatidilcolina. **Figure 5.** Chromatogram of the phosphatidylcholine standart.

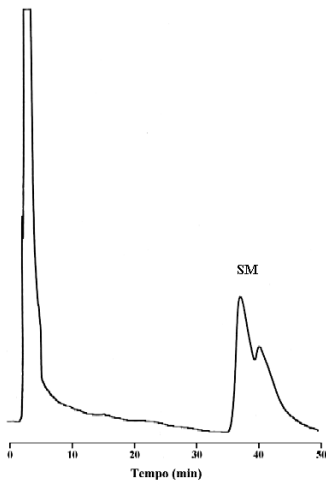


Figura 6. Cromatograma do padrão de esfingomielin. **Figure 6.** Chromatogram of the sphingomyelin standart.

A técnica de HPLC em fase normal foi usada para quantificar os teores de fosfolípidos remanescentes nas soluções de HbCO (amostras C20 e C20R2), em relação a seus respectivos padrões comerciais. O padrão de fosfatidilserina (PS) não foi injetado, devido à elevada instabilidade dessa substância. Soluções dos padrões de fosfatidil-etanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e esfingomielin (SM) foram preparadas e analisadas. As Figuras 4 a 6 mostram os resultados das análises individuais dos padrões, que apresentaram tempos de eluição de 10,3 min (PE), 21,6 min (PC) e 37,2 e 40,0 min (SM). A SM aparece como um pico largo (Sakai *et al.*, 1993) ou duplo (Nakai e Sekiguchi, 1997).

PE, PC e SM, juntamente com a fosfatidilserina (PS) que não foi analisada, são os principais fosfolípidos da membrana das hemácias (Nakai e Sekiguchi, 1997). A lisofosfatidilcolina (LPC), que se constitui em outro fosfolípido da membrana, cujo teor é de 1/20 a 1/30 daquele correspondente à PC, foi identificada pelos mesmos autores (Nakai e Sekiguchi, 1997) em hemolisados, por meio de HPLC com coluna recheada com resina de troca catiônica; no presente trabalho, a presença de LPC não foi pesquisada. O aparecimento de três picos no cromatograma de PC pode ser devido à heterogeneidade do padrão. Para a integração da área correspondente à PC, os três picos foram considerados.

As Figuras 7 e 8 mostram os cromatogramas obtidos para os extratos orgânicos das amostras C20 e C20R2. Os picos com tempos de eluição a aproximadamente 12,6 min (Figuras 7 e 8) podem ser atribuídos à PE. Na Figura 7 (amostra C20), a SM aparece como um pico duplo, com tempos de eluição a 38,5 e a 41,5 min. Na Figura 8 (amostra C20R2), a SM apresenta tempo de eluição de 39,2 min. Embora o padrão de PS não tenha sido injetado, dados da literatura mostram que, quando a mesma mistura de solventes é usada como fase móvel, o tempo de eluição desse fosfolípido é menor do que o de PE. Assim sendo, os picos com tempos de eluição de aproximadamente 11,5 min, em ambas as figuras, podem ser atribuídos à PS.

No cromatograma de C20 (Figura 7), o pico correspondente à PC, com tempo de eluição de 21,7 min, não se encontra resolvido. Picos de área maior, como aqueles denominados U1 e U2 nas Figuras 7 e 8, foram observados por outros autores e a sua origem ainda não foi totalmente esclarecida (Nakai e Sekiguchi, 1997). Foi observado que os teores de U1 e U2 aumentam quando soluções de HbCO purificada convencionalmente são aquecidas a 60 °C durante 2 h

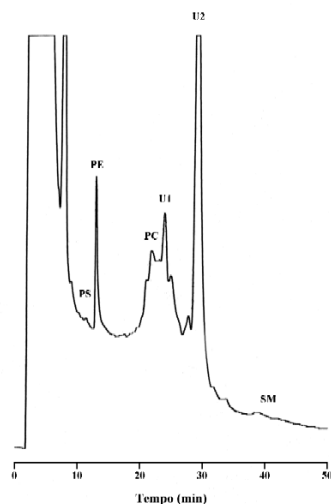


Figura 7. Cromatograma do extrato orgânico obtido a partir da amostra C20. **Figure 7.** Chromatogram of the organic extract obtained from the C20 sample.

ou são acidificadas a pH 3,5 durante 30 min. Testes foram realizados com soluções de Hb obtidas de RBCs armazenados durante 1, 21 e 48 dias a 4 °C. Enquanto que os teores dos quatro principais fosfolípidos diminuíram com o tempo de armazenagem do RBC, os teores de U1 e U2 aumentaram para o extrato obtido a partir do RBC armazenado durante 21 dias, e diminuíram para aquele originado do RBC armazenado durante 48 dias. Esses resultados sugeriram que U1 e U2 muito provavelmente são produtos resultantes da degradação de fosfolípidos, um deles identificado preliminarmente como um diacilglicerídeo (Nakai *et al.*, 1997).

Embora a amostra C20R2 ainda não possa ser considerada totalmente livre dos constituintes da parede celular, pois concentrações de PE superiores a 3,5 µg/ml foram consideradas tóxicas (Nakai *et al.*, 1997), a Tabela 2 mostra que os teores dos fosfolípidos pesquisados diminuíram significativamente na amostra C20R2, submetida à purificação adicional por

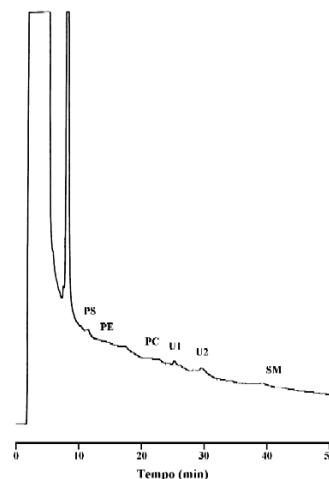


Figura 8. Cromatograma do extrato orgânico obtido a partir da amostra C20R2. **Figure 8.** Chromatogram of the organic extract obtained from the C20R2 sample.

cromatografia de troca iônica, na resina AG MP-1. A Tabela 3 mostra valores dos fatores de purificação, calculados de acordo com a Equação 2.

$$\text{Fator de purificação} = \frac{([\text{Hb}]/[\text{Fosfolípido}]_{\text{C20R2}})}{([\text{Hb}]/[\text{Fosfolípido}]_{\text{C20}}} \quad (2)$$

onde [Hb] indica a concentração de HbCO em mg/dl; [Fosfolípido] indica a concentração de PE, PC ou de SM em mg/dl.

De acordo com os dados da Tabela 3, em relação à concentração de HbCO, a SM foi o fosfolípido eliminado em menor proporção, enquanto que a PE foi o fosfolípido eliminado em maior proporção.

A resina AG MP-1 foi ainda capaz de adsorver grande parte das substâncias resultantes da degradação dos fosfolípidos, que deram origem aos picos U1 e U2 no cromatograma de C20 (Figura 7) e que se encontram sensivelmente diminuídos no cromatograma de C20R2 (Figura 8).

Tabela 2. Concentrações de fosfatidil-etanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e esfingomiélna (SM) determinadas por HPLC nas amostras C20 e C20R2 **Table 2.** Concentrations of phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM) from the C20 and C20R2 samples, determined by HPCL

Fosfolípido	Concentração	
	C20 (mg/dl)	C20R2 (mg/dl)
PE	15,57	0,97
PC	7,76	0,69
SM	4,78	1,01
Total	28,11	1,77

Tabela 3. Fatores de purificação da amostra C20R2 em relação à amostra C20 após a eliminação parcial dos fosfolípidos fosfatidil-etanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e esfingomiélin (SM), determinados por HPLC. **Table 3.** Purification factors for the C20R2 sample in relation to the C20 sample, after partial elimination of the phospholipids phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM), determined by HPLC.

Fosfolípídeo	[HbCO] / [Fosfolípídeo]		Fator de Purificação
	C20	C20R2	
[HbCO]/[PE]	0,27	3,92	14,52
[HbCO]/[PC]	0,54	5,51	10,20
[HbCO]/[SM]	0,88	3,76	4,27
[HbCO]/[Fosfolípídeos totais]	0,15	2,15	14,33

Conclusão

Uma das etapas para a utilização da hemoglobina humana (Hb) como ponto de partida para o desenvolvimento de substitutos para o sangue consiste na eliminação de fosfolípidos constituintes da parede celular. Altos teores dessas substâncias ainda permanecem em soluções de Hb purificadas pelos métodos convencionais. A técnica de cromatografia de troca iônica foi usada para a purificação adicional de soluções de HbCO. Em resina de troca aniônica fraca (Amberlite IRA-99), uma quantidade significativa de contaminantes ficou retida no topo da coluna; após eluição e análise por cromatografia de camada fina, os fosfolípidos fosfatidilcolina e fosfatidil-etanolamina puderam ser identificados por espectrometria de absorção no infravermelho. Em experimentos posteriores, foi verificado que a microfiltração contribuiu para a eliminação de grande parte dos resíduos. O uso de resina de troca aniônica forte (AG MP-1) mostrou alta eficiência na remoção de fosfolípidos ainda residuais nas soluções purificadas pelo método convencional seguido de microfiltração. De acordo com os resultados de cromatografia líquida de alta pressão, obtidos na análise de extratos orgânicos das soluções de HbCO, a metodologia seguida permitiu a redução de 94% no teor total de fosfolípidos pesquisados na solução de HbCO purificada adicionalmente por cromatografia de troca aniônica na resina AG MP-1, em relação à solução purificada apenas pelo método convencional modificado seguido de microfiltração. Novos experimentos estão em andamento com o objetivo de obter-se soluções mais concentradas e com níveis ainda mais baixos de contaminantes.

Agradecimentos

A equipe agradece à Dra. Selma Magalhães de Brito, Banco de Sangue Herbert de Souza, Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ) e à Dra. Carmen Martins Nogueira, Serviço de Hemoterapia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ) pelo fornecimento de bolsas de concentrado de hemácias e ao Professor Luiz Carlos Trugo, do Instituto de Química (IQ-UFRJ) pela liberação do cromatógrafo. Os autores também agradecem o apoio financeiro dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pela Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB).

Referências

- Andrews, N.J., Farrington, C.P., Cousens, S.N., Smith, P.G., Ward, H., Knight, R.S.G., Ironside, J.W., Will, R.G. (2000), "Incidence of variant Creutzfeldt-Jacob disease in the UK", *Lancet*, v. 356, p. 481-482.
- Bunn, H.F. (1995), "The role of hemoglobin based substitutes in transfusion medicine", *Transfusion Clinique Biologique*, v. 2, p. 433-439.
- Carvalho, W. (2002), *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia*, Belo Horizonte: Coopmed Editora, 7ª edição.
- Dodd, R.Y., Sullivan, M.T. (1998), "Creutzfeldt-Jacob disease and transfusion safety: tilting at icebergs?", *Transfusion*, v. 38, p. 221-223.
- Everse, J., Hsia, H. (1997), "The toxicities of native and modified hemoglobins", *Free Radical Biology Medicine*, v. 22, p. 1075-1099.
- Goodnough, L.T., Scott, M.G., Monk, T.G. (1998), "Oxygen carriers as blood substitutes: past, present and future", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 357, p. 89-100.

- Houston, F., Foster, J.D., Chong, A., Hunter, N., Bostock, C.J. (2000), "Transmission of BSE by blood transfusion in sheep", *Lancet*, v. 356, p. 999-1000.
- International Council for Standardisation in Haematology: Expert Panel on Haemoglobinometry (1996), "Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition), *Journal of Clinical Pathology*, v. 49, p. 271-274.
- Menu, P., Longrois, D., Faivre, B., Donner, M., Labrude, P., Stoltz, J.-F., Vigneron, C. (1999), "Rheological behaviour of red cells suspended in hemoglobin solutions. *In vitro* study comparing dextran-benzene-tetracarboxylate hemoglobin, stroma free hemoglobin and plasma expanders", *Transfusion Science*, v. 20, p. 5-16.
- Nakai, K., Sekiguchi, S. (1997), "Quality control of stroma-free hemoglobin", In: *Artificial Red Cell*, Ed.: E. Tsuchida, Chichester: John Wiley & Sons, p. 131-149.
- Palaparthi, R., Wang, H., Gulati, A. (2000), "Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 40, p. 185-198.
- Riess, J.G. (2001), "Oxygen carriers ("Blood substitutes") - raison d'être, chemistry, and some physiology", *Chemical Reviews*, v. 101, p. 2797-2919.
- Sakai, H., Takeoka, S., Yokohama, H., Seino, Y., Nishide, H., Tsuchida, E. (1993), "Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment", *Protein Expression and Purification*, v. 4, p. 563-569.
- Sanders, K.E., Ackers, G., Sligor, S. (1996), "Engineering and design of blood substitutes", *Current Opinion Structural Biology*, v. 6, p. 534-540.
- Squires, J.E. (2002), "Artificial Blood", *Science*, v. 295, p. 1002-1005.
- The Merck Index: Na Encyclopedia of Chemicals and Drugs (1969), Ed: P.G. Stecher, Rahway: Merck & Co, v. 1, p. 521.
- Vam Vakas, E.C., Taswell, H.F. (1995), "Epidemiology of blood transfusion", *Transfusion*, v. 35, p. 802-812.
- van Assendelft, O.W., Buursma, A., Holtz, A.H., van Kampen, E.J., Zijlstra, W.G. (1976), "Quality control in haemoglobinometry with special reference to the stability of haemoglobinocyanide reference solutions", *Clinica Chimica Acta*, v. 70, p. 161-169.
- Wilson, R., Code, C., Ricketts, M.N. (2000), "Risk of acquiring Creutzfeldt-Jacob disease from blood transfusions: systematic review of case-control studies", *British Medical Journal*, v. 321, p. 17-19.
- Winslow R.M. (1992), "Red cell substitutes: current status, 1992", In: *Blood safety: current challenges*, Ed.: S.T. Nance, New York: American Association of Blood Banks, p. 151-167.
- Winslow, R.M., Chapman, K.W. (1994), "Pilot-scale preparation of hemoglobin solutions", *Methods Enzymology*, v. 231, p. 3-16.
- Zweig, G., Sherma, J. (1985), "Chromatographic data: thin-layer chromatography tables", In: *Handbook of Chromatography*, Ed.: G. Zweig, J. Sherma, Boca Raton: CRC Press, v. 1, p. 437-657.