

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Extração de Pró-Insulina Humana Recombinante **Produzida em Sementes de Milho Transgênico**

Cristiane Sanchez Farinas, M.Sc.

Doutoranda

Prof. Dr. Everson Alves Miranda, FEQ, UNICAMP

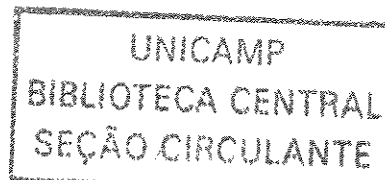
Orientador

Prof. Dr. Adilson Leite, CBMEG, UNICAMP

Co-Orientador (*in memoriam*)

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas, Novembro de 2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TI UNICAMP
	F226e
V	EX
TOMBO BC/	62556
PROC.	16-86-05
C	☐
	D ☒
PREÇO	11,00
DATA	1º/3/05
Nº CPD	

Bibrid 34343

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

F226e Farinas, Cristiane Sanchez
Extração de pró-insulina humana recombinante
produzida em sementes de milho transgênico / Cristiane
Sanchez Farinas.--Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadores: Everson Alves Miranda, Adilson Leite
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Extração (Química). 2. Insulina. 3. Plantas
transgênicas. 4. DNA recombinante. 5. I. Miranda,
Everson Alves. II. Leite, Adilson. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida por Cristiane Sanchez Farinas e aprovada em 26 de novembro de 2004 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda, FEQ, UNICAMP
Orientador



Prof. Dr. Zivko L. Nikolov, Texas A&M University



Prof. Dr. José Andrés Yunes, Centro Infantil Boldrini

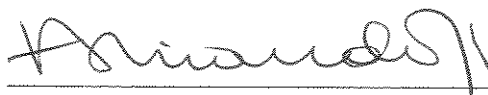


Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, EPUSP



Profª. Drª. Ângela Maria Moraes, FEQ, UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Cristiane Sanchez Farinas em 26 de novembro de 2004.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Miranda', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

Aos meus meninos Pedro e Paulo, sempre.

Agradecimentos

À Deus.

Ao Paulo, pelo amor, companheirismo e paciência e ao Pedro, por ser esse menino tão doce, que só me traz alegrias.

Ao meu pai e minhas irmãs e aos meus sogros, pela disposição em me ajudar sempre que preciso e à minha querida mãezinha, que mesmo não estando mais aqui, consegue estar sempre presente.

Ao Prof. Everson, pela orientação tão dedicada, pela confiança, motivação e presença constante.

Ao Prof. Adilson Leite, pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo exemplo de perseverança e dedicação.

Aos amigos de laboratório: Adriano, Ana Paula, André, Antenor, Elcimar, Érika, Geórgia, Goran, Isa, Ivanildo, Kátia, Leonardo, Líbia, Luciana, Marcos, Mariana, Marina, Moysés, Paula, Romi, Rosana e Vinícius, pela amizade e disposição em me ajudar em todos os momentos.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Plantas do CBMEG pelo grande auxílio na realização dos experimentos e constantes discussões e em especial ao Dr. Paulo De Lucca, pela doação das sementes transgênicas.

Aos Profs. Dr. José Andrés Yunes, do Centro Infantil Boldrini, e Dra. Maria Isabel Rodrigues, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

À EMBRAPA (Sete Lagoas, MG) pela doação das sementes de milho comerciais e ao Dr. Márcio José da Silva, do CBMEG, pelo auxílio na degerminação e preparação das farinhas de milho.

À BIOMM, especialmente à Heloísa Tunes, pela doação da pró-insulina humana e pelas dicas e sugestões.

Ao Sr. Dalcir Frolidi, pela confiança, possibilitando agilizar a compra dos kits de ELISA.

À profa. Dra. Wirla Tamashiro, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo auxílio na realização dos testes de ELISA.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos e à FAPESP, pelo apoio financeiro na compra dos kits de ELISA. Aos professores e funcionários da FEQ que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Resumo

Bioprodutos de aplicação farmacêutica têm sido produzidos em sistemas transgênicos diversos, incluindo células de animais, bactérias e leveduras. No futuro, é esperado que a demanda por novas proteínas terapêuticas cresça substancialmente, sendo que o uso de plantas como biorreatores tem se mostrado como uma das alternativas economicamente mais atraentes para a produção de proteínas recombinantes em larga escala. O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de extração da pró-insulina humana recombinante produzida no endosperma de milho transgênico. Neste contexto, avaliaram-se os extratos aquosos de seis variedades de milhos comerciais quanto às propriedades relacionadas à recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) — concentração de componentes nativos do milho (carboidratos, compostos fenólicos e proteínas), taxa de filtração e teor de lipídeos — e realizou-se a seleção e otimização das variáveis operacionais relevantes na extração da pró-insulina em conjunto com a minimização dos componentes nativos do milho. A análise das superfícies de resposta, geradas a partir do planejamento experimental, e do teste de Tukey indicou que a condição ótima para a extração de pró-insulina, utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM, é aquela na qual a razão volume:massa (v:m) é de 10:1 e a temperatura é de 25°C. Esta condição, em um tempo de extração de 2h e agitação a 500 rpm, é a indicada como ótima para a extração da pró-insulina humana recombinante do milho transgênico. Os valores máximos de concentração de pró-insulina obtidos foram 20,72 µg/ml ou 0,45% da proteína total solúvel. Como conclusões gerais, constatou-se que a escolha da variedade de milho comercial influenciou a complexidade do extrato; a presença do agente redutor no tampão de extração foi importante na solubilização da pró-insulina; a extração de pró-insulina foi mais eficiente em tampão alcalino em relação ao tampão alcoólico e, finalmente, as variáveis de processo que mais influenciaram a extração foram a temperatura e a razão v:m.

Abstract

Biopharmaceutical products have been produced by different transgenic systems such as animal cells, bacteria and yeasts. In the future, a substantial increase in the demand for new therapeutic proteins is expected and the use of plants as bioreactors is arising as an alternative system for large-scale production of recombinant proteins. The purpose of the present work was to study the extraction of recombinant human proinsulin from transgenic maize endosperm. Aqueous extracts from six commercial maize varieties were evaluated in terms of downstream processing parameters — concentration of native components (carbohydrates, phenolic compounds and proteins), filtration flux and lipids content — and a selection and optimization of operational variables was carried out in conjunction with minimization of the extraction of maize native components. Analysis of response surface plots and Tukey test both indicated that the optimum condition for proinsulin extraction (using 50 mM sodium carbonate buffer at pH 10.0 and 5 mM DTT) was at volume:mass (v:m) ratio of 10:1 and temperature of 25°C. This condition, at an extraction time of 2h and 500 rpm of agitation, was the optimum condition for proinsulin extraction from transgenic maize. The maximum proinsulin concentration value found was 20.72 µg/ml or 0.45% of the total soluble protein. As general conclusions, we noted that the choice of commercial maize will have an influence on extract quality; the presence of the reducing agent was crucial to proinsulin solubilization; proinsulin extraction was more efficient for an alkaline buffer than for alcoholic buffers, and the variables that had a more important influence on the extraction were the temperature and the v:m ratio.

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Objetivo e etapas do trabalho	3
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1. O uso de plantas transgênicas como biorreatores	5
2.2. Estratégias para a produção de proteínas recombinantes em plantas	10
2.3. Extração sólido-líquido	11
2.4. Extração de proteínas heterólogas de plantas transgênicas	14
2.5. O milho como sistema de expressão de proteínas heterólogas	17
2.5.1. Proteínas	19
2.5.2. Carboidratos	22
2.5.3. Compostos fenólicos	23
2.5.4. Lipídeos	25
2.6. Variedades de milho	25
2.6.1. Milho QPM (<i>Quality Protein Maize</i>)	26
2.6.2. Milho Doce	26
2.7. Produção de pró-insulina humana	27
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	31
3.1. Materiais	31
3.1.1. Reagentes	31
3.1.2. Sementes de milhos comerciais	31
3.1.3. Sementes de milho transgênico	32
3.2. Métodos	33
3.2.1. Degerminação da semente e preparação da farinha	34
3.2.2. Metodologia utilizada nos ensaios de extração	35
3.2.2.1. Extração aquosa com variação de pH e força iônica	35
3.2.2.2. Seleção de solventes para a extração da pró-insulina	35
3.2.2.3. Extração da pró-insulina do endosperma do milho transgênico em tampão bicarbonato e tampão alcoólico	37
3.2.2.4. Planejamento experimental da extração aquosa	37
3.2.2.5. Planejamento experimental da avaliação das variáveis de processo na extração de pró-insulina recombinante	38
3.2.2.6. Planejamento experimental da otimização da extração de pró-insulina recombinante	39
3.2.3. Metodologia analítica	41
3.2.3.1. Determinação da taxa de filtração	41
3.2.3.2. Concentração de proteína total	41
3.2.3.3. Concentração de carboidratos	42
3.2.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida	42
3.2.3.5. Conteúdo de óleo	43
3.2.3.6. Concentração de compostos fenólicos	43
3.2.3.7. ELISA quantitativo específico para pró-insulina humana	44
3.2.3.8. <i>Western blot</i>	44

Capítulo 4 - Resultados e Discussões I.....	47
Comparação de diferentes variedades de milhos comerciais em relação a variáveis relevantes à RPB	
4.1. Concentração de açúcares redutores (AR).....	50
4.2. Concentração de açúcares redutores totais (ART).....	54
4.3. Concentração de polifenóis.....	58
4.4. Concentração de proteínas.....	64
4.5. Taxa de filtração.....	74
4.6. Conteúdo de óleo da farinha do endosperma.....	79
4.7. Conclusões dos ensaios de avaliação dos milhos comerciais.....	80
 Capítulo 5 - Resultados e Discussões II.....	 83
Avaliação do efeito do pH e da força iônica na extração de pró-insulina de milho transgênico	
5.1. Concentração de pró-insulina recombinante.....	84
5.2. Concentração de proteínas totais.....	88
5.3. Concentração de AR.....	91
5.4. Concentração de ART.....	92
5.5. Concentração de polifenóis.....	93
5.6. Taxa de filtração.....	94
5.7. Conclusões da extração aquosa de sementes de milho transgênico.....	95
 Capítulo 6 - Resultados e Discussões III.....	 97
Seleção de solventes para a extração da pró-insulina humana do milho transgênico	
 Capítulo 7 - Resultados e Discussões IV.....	 107
Avaliação dos efeitos das variáveis operacionais na extração de pró-insulina humana recombinante do milho transgênico	
7.1. Extração com tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM...109	
7.1.1. Concentração de pró-insulina recombinante.....	111
7.1.2. Concentração de proteínas totais.....	117
7.1.3. Concentração de AR.....	119
7.1.4. Concentração de ART.....	120
7.1.5. Concentração de polifenóis.....	122
7.2. Extração com etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM...123	
7.2.1. Concentração de pró-insulina em solvente alcoólico.....	125
7.2.2. Concentração de proteínas em solvente alcoólico.....	129
7.2.3. Concentração de AR em solvente alcoólico.....	130
7.2.4. Concentração de ART em solvente alcoólico.....	131
7.2.5. Concentração de polifenóis em solvente alcoólico.....	133
7.3. Conclusões sobre o efeito das variáveis operacionais na extração.....	135

Capítulo 8 - Resultados e Discussões V.....	139
Otimização da extração da pró-insulina humana recombinante do milho transgênico	
8.1. Análise da extração de pró-insulina humana recombinante.....	142
8.2. Concentração proteínas.....	148
8.3. Concentração de AR.....	149
8.4. Concentração de ART.....	150
8.5. Concentração de polifenóis.....	151
8.6. Conclusões sobre a otimização da extração da pró-insulina.....	152
 Capítulo 9 - Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.....	 155
9.1. Conclusões.....	155
9.2. Sugestões para trabalhos futuros	157
 Capítulo 10 - Referências Bibliográficas	 159

Nomenclatura

μ - força iônica

AR - açúcares redutores

ART - açúcares redutores totais

bt 2 - *brittle 2*

DDT- ditiotreitol

D_m - diâmetro médio de partícula área-volume

DNS - ácido dinitrosalicílico

ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*

ITM - inibidor de tripsina de milho

ME - mercaptaetanol

QPM - *quality protein maize*

RPB- recuperação e purificação de bioprodutos

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo o detergente dodecil sulfato de sódio

sh2 - *shrunk 2*

sul - *sugary 1*

T - temperatura

TSP - proteínas totais solúveis

v:m - razão volume:massa

Capítulo 1

Introdução

As recentes descobertas no campo da genômica têm despertado interesse na busca de novos sistemas de produção de proteínas terapêuticas e um progresso significativo neste sentido é o uso de plantas transgênicas como biorreatores, também conhecido como *molecular farming*. A lista de proteínas, bastante complexas, produzidas com sucesso em plantas tem crescido consideravelmente, sendo que nos últimos dez anos mais de 100 proteínas recombinantes foram produzidas em diferentes espécies de plantas. Entre as vantagens do uso de plantas como sistema de expressão estão a praticidade e a economia.

A primeira proteína de aplicação farmacêutica produzida em planta foi o hormônio de crescimento humano (hGH), expressado em tabaco transgênico em 1986 (Barta *et al.*, 1986). A partir de então, a expressão de proteínas recombinantes em plantas inclui desde enzimas de aplicação industrial até anticorpos e vacinas contra o vírus da hepatite B e do HIV (vírus da imunodeficiência humana). Segundo Horn *et al.* (2004), não restam dúvidas de que o uso de plantas como biorreatores está se afirmando mundialmente como um novo ramo industrial. Conforme a produção industrial se desenvolve, cresce a demanda pela pesquisa relacionada ao desenvolvimento de processo, complementando, assim, a pesquisa fundamental realizada pelos biólogos moleculares visando à otimização da expressão de proteínas.

Ao contrário do uso de plantas para a produção de vacinas comestíveis

ou enzimas industriais, nas quais a purificação não é um requerimento essencial, as proteínas recombinantes para outras aplicações farmacêuticas requerem a purificação. E apesar de todos os avanços direcionados às estratégias de expressão de proteínas em plantas, pouca informação está disponível sobre o processo de recuperação e purificação destas biomoléculas (RPB). Os custos envolvidos na RPB são fundamentais para avaliar se um novo sistema de expressão é competitivo ou não com os sistemas tradicionais, tais como culturas de células de mamíferos, bactérias e leveduras. Sendo a extração a primeira operação do processo de RPB, ela é de suma importância, pois é esta operação que define qual será a composição da alimentação de todo o restante do processo. A etapa de extração deve proporcionar uma concentração eficiente da proteína recombinante, minimizando a presença de impurezas (proteínas, compostos fenólicos, carboidratos, óleo, etc.) no restante do processo.

Estudos relacionados aos custos de produção de proteínas recombinantes em plantas mostraram que a maior porcentagem dos custos totais de produção está relacionada à etapa de RPB, uma vez que 84% dos custos anuais de produção se devem às etapas de extração e purificação (Mison e Curling, 2000; Evangelista *et al.*, 1998). Portanto, estudos visando o desenvolvimento e a otimização das etapas de RPB podem reduzir efetivamente os custos totais associados ao uso de plantas como biorreatores, sendo determinantes na avaliação da viabilidade comercial desta nova tecnologia.

O milho se destaca como uma das espécies mais promissoras para a produção de proteínas recombinantes em plantas, tendo já sido veículo para a produção de três produtos comerciais. Além disso, o milho é uma das espécies de plantas mais estudada, tanto geneticamente como fisiologicamente. E apesar dos estudos de expressão de proteínas recombinantes em milho estarem avançados, não se encontrou na literatura estudos de avaliação de diferentes variedades de milho (e nem de outra espécie de planta) quanto à RPB.

1.1. Objetivo e etapas do trabalho

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de extração da pró-insulina humana recombinante produzida no endosperma de sementes de milho transgênico. Neste contexto, avaliaram-se os extratos aquosos de seis variedades de milhos comerciais quanto às propriedades relacionadas à RPB — concentração de componentes nativos do milho (carboidratos, compostos fenólicos e proteínas), taxa de filtração e teor de lipídeos — e realizou-se a seleção e otimização das variáveis operacionais relevantes na extração da pró-insulina humana do milho transgênico.

Este trabalho é complementar a outros projetos de pesquisa envolvendo a RPB de proteínas heterólogas, produzidas em sementes de milho transgênico, realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. Além disso, este projeto veio ao encontro dos esforços do grupo de pesquisa do Laboratório de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, até recentemente, coordenado pelo Dr. Adilson Leite, que foi responsável pela parte relacionada à expressão do gene da proteína heteróloga nas sementes de milho e à obtenção das plantas transgênicas.

Os estudos realizados neste trabalho envolveram cinco etapas, detalhadas a seguir.

Na primeira etapa do trabalho estudaram-se algumas características dos compostos nativos presentes nos extratos de endosperma de milho — carboidratos, compostos fenólicos e proteínas — além da taxa de filtração e teor de óleo de seis variedades de milhos comerciais, objetivando verificar a existência de diferenças que permitissem classificar estas variedades quanto à adequação à RPB. Essas informações poderiam auxiliar na seleção da variedade a ser utilizada como biorreator na síntese de proteínas heterólogas em larga-escala.

Na segunda etapa do trabalho, o mesmo estudo de extração aquosa, realizado na primeira etapa, foi feito com sementes de milho transgênico,

variedade QPM BR451 transformada com o gene da pró-insulina humana. Nestas duas etapas foram analisadas as influências do pH e da força iônica na extração aquosa utilizando um planejamento experimental completo 2^2 do tipo estrela e a metodologia de superfície de resposta. Na segunda etapa, além das variáveis relevantes à RPB que vinham sendo analisadas, avaliou-se também a concentração da proteína recombinante nos extratos.

Como a eficiência da extração de pró-insulina foi baixa nas condições que vinham sendo utilizadas, em comparação com os resultados obtidos por De Lucca (2003), na terceira etapa do trabalho, realizou-se um estudo para selecionar um solvente mais adequado para extrair a pró-insulina humana. Dois solventes foram escolhidos: o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM e uma solução de etanol 70% em tampão glicina-HCl pH 3,0 e DTT 5 mM.

Na quarta etapa do trabalho foi realizada uma avaliação das variáveis operacionais de processo relevantes na extração de pró-insulina do milho transgênico. A avaliação foi feita utilizando dois planejamentos fatoriais 2^4 completos envolvendo quatro variáveis independentes: o tempo de extração, a temperatura, a velocidade de rotação do impelidor e a razão volume:massa.

A quinta etapa consistiu na otimização da extração de pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM utilizando um planejamento fatorial completo 2^2 do tipo estrela e tendo como variáveis independentes a temperatura e a razão volume:massa.

A apresentação dos resultados obtidos nas cinco etapas do trabalho foi dividida em capítulos a fim de facilitar a leitura do texto. Assim, as etapas de 1 a 5 são descritas nos Capítulos 4 a 8, respectivamente. O Capítulo 2 trata da revisão bibliográfica pertinente, o Capítulo 3 contém uma descrição dos materiais e metodologia utilizados e, finalmente, no Capítulo 9 são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo são apresentadas informações obtidas na literatura sobre alguns aspectos da produção de proteínas recombinantes em plantas, incluindo dados atuais sobre os avanços desta tecnologia. Como este trabalho é focado na etapa de extração do processo de RPB, procurou-se detalhar as variáveis envolvidas na extração sólido-líquido, bem como apresentar estudos de extração de proteínas heterólogas em plantas. Também foram abordadas informações sobre os componentes estruturais da semente de milho, como por exemplo, as proteínas nativas, os compostos fenólicos, os carboidratos e os lipídeos, assim como algumas características das variedades de milho utilizadas neste trabalho. Os métodos atuais de produção de insulina humana, bem como algumas características desta molécula são também descritos.

2.1. O uso de plantas transgênicas como biorreatores

Biomoléculas de interesse farmacêutico têm sido produzidas por diversas técnicas de DNA recombinante, incluindo a cultura de células animais, bactérias e fungos. Entretanto, a necessidade de sistemas transgênicos mais seguros e de baixo custo tem motivado a busca de novas alternativas. A produção de proteínas recombinantes em plantas tem se mostrado como um dos meios economicamente mais atraentes para produção de fármacos em larga escala. Como exemplo, podemos citar Harris (1999) que comparou diferentes

métodos de expressão para a produção de fragmentos de anticorpos. O custo de produção por massa de fragmento utilizando-se células de mamíferos, leite de animais transgênicos e bactérias foi, respectivamente, 1000, 200 e 3,3 vezes maior que o custo para produção em plantas transgênicas.

Em outros estudos relacionados aos custos do processo, Evangelista *et al.* (1998) e também Mison e Curling (2000) mostraram, através de uma simulação detalhada do processo, que o custo da produção e purificação de uma proteína recombinante em milho transgênico seria de aproximadamente US\$43 por grama. Para fins de comparação, Young *et al.* (1997a) estimaram que o custo de produção e purificação de uma proteína recombinante produzida em leite de cabra transgênica seria de US\$105 por grama. Estes autores também estimaram o custo da proteína heteróloga utilizando cultura de células de mamíferos como sendo entre US\$300 e US\$3000 por grama.

A Tabela 2.1 apresenta algumas características dos principais sistemas de produção de proteínas recombinantes. As principais vantagens do uso de plantas como biorreatores incluem a capacidade de produzir proteínas com estrutura e função idênticas às das proteínas nativas, pois plantas apresentam sistemas de modificação e processamento pós-traducionais, baixo custo de cultivo, facilidade de aumento de escala, presença de órgãos naturais de estoque (sementes) e práticas já estabelecidas de colheita, armazenagem e processamento (Daniell *et al.*, 2001; Jilka *et al.*, 1999). Além disso, o risco de contaminação associado a microrganismos patogênicos é minimizado em relação a outros sistemas de produção de proteínas, pois as plantas não atuam como hospedeiras de agentes infecciosos ao homem (Commandeur *et al.*, 2003).

O fato da via de síntese de proteínas ser conservada entre animais e plantas faz com que plantas possam processar corretamente proteínas recombinantes humanas, sendo esta uma grande vantagem em relação aos sistemas de expressão em bactérias. Essa habilidade das plantas é demonstrada pela capacidade de produzir proteínas complexas como os anticorpos, que são formados por quatro cadeias polipeptídicas covalentemente

Tabela 2.1. Comparação dos atuais sistemas de produção de proteínas recombinantes (adaptada de Gomord *et al*, 2004).

	Bactéria	Fungos	Células de mamíferos	Células de insetos	Animais transgênicos	Plantas transgênicas
Risco de patogenicidade	Sim	Desconhecido	Sim	Sim	Sim	Desconhecido
Custos de produção	Médio	Médio	Alto	Alto	Alto	Baixo-médio: 10-50 vezes menor do que a mesma proteína produzida em <i>E. coli</i>
Tempo de investimento	Curto	Médio	Longo	Longo	Longo	Longo
Custos de escalonamento	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Baixo (biomassa ilimitada)
Produção	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada	Limitada	Ilimitada mundialmente
Rendimento (anticorpos, por exemplo)	Médio: 0,1 - 2 g/L	Alto: > 0,25 g/L (scFv)	Médio a alto: 0,4 - 2 g/L	Médio a alto: 5 - 70 mg/L	Alto: 4 - 14 g/L	Alto: 1200 - 2500 g/hectare/ciclo
Capacidade de enovelamento	Baixa	Média	Alta	Alta	Alta	Alta
Glicosilação						
N-glicosilação	Não	Sim (não usual) Não é conservado	Sim Conservado	Sim Conservado	Sim Conservado	Sim Conservado
Sítio de glicosilação		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Resíduos de açúcar não-humanos						
Homogeneidade do produto	Baixa	Média	Média	Baixa	Baixa	Média a alta
Complexidade da proteína (anticorpos, por exemplo)	Fab	Fab	IgG, IgM	IgG	IgG	IgG, sIgA
Consumo direto	Não	Não	Não	Não	Sim	Possível
armazenamento	-20 °C	-20 °C	N ₂	N ₂	N ₂	Temperatura ambiente
Distribuição	Praticável	Praticável	Difícil	Difícil	Difícil	Fácil
Preocupações éticas	Médio	Médio	Médio	Médio	Alto	Médio

unidas por pontes de dissulfeto (Stoger *et al.*, 2002).

Nos últimos vinte anos várias proteínas de aplicação farmacêutica têm sido expressas em plantas. Entre estas proteínas se incluem proteínas do plasma como a albumina humana (Sijmons *et al.*, 1990; Goddjin e Pen, 1995), aprotinina (Zhong *et al.*, 1999), hemoglobina (Dieryck *et al.*, 1995), fatores de crescimento, hormônios e citocinas (Goddjin e Pen, 1995; Matsumoto *et al.*, 1995; James *et al.*, 2000; Leite *et al.*, 2000). Seis tipos de anticorpos produzidos em plantas e também vacinas comestíveis estão na fase de testes pré-clínicos, sendo que o produto mais avançado está na fase II dos testes clínicos (Ma *et al.*, 2003).

Um dos fatores importantes na determinação da viabilidade comercial do uso de plantas como biorreatores é a obtenção de níveis de expressão adequados. Hood (2004) comparou o custo de produção da proteína avidina em milho transgênico com o custo da produção desta proteína a partir de sua fonte natural, ovos de galinha. Segundo o autor, um *bushel* (aproximadamente 25 kg) de milho produzindo avidina recombinante a 20% da proteína total solúvel, possui o mesmo rendimento de uma tonelada de ovos de galinha, mas a 0,5% do custo. Ainda que poucas proteínas possam ser produzidas a esses níveis de expressão, rendimentos na faixa de 0,1 a 1,0% da proteína total solúvel são tidos como suficientes para que o uso de plantas como biorreatores seja economicamente viável (Twyman *et al.*, 2003).

A empresa ProdiGene Inc. (EUA) foi a responsável pela produção das proteínas avidina e β -glucuronidase em sementes de milho transgênico, as primeiras proteínas recombinantes produzidas em plantas a serem comercializadas (pela empresa Sigma, EUA). Atualmente, a ProdiGene Inc. já colocou no mercado a tripsina bovina recombinante produzida em milho transgênico, que também está sendo comercializada pela Sigma, pelo nome fantasia TrypZean™. A tripsina é uma protease que possui uma variedade de aplicações, incluindo a produção de biofármacos, sendo esta proteína o primeiro produto de *molecular farming* a ser produzido em larga-escala, com um

mercado mundial estimado em 120 milhões de dólares para 2004 (Horn *et al.*, 2004). Outra proteína produzida em milho pela ProdiGene prestes a ser colocada no mercado é a aprotinina, uma serino protease utilizada como reagente (Horn *et al.*, 2004).

Dados de dezembro de 2003 sobre a produção comercial de proteínas recombinantes revelam que aproximadamente 100 pequenas empresas formam o mercado envolvido em *molecular farming* (Twyman *et al.*, 2003). Algumas destas empresas possuem colaboração com grandes indústrias farmacêuticas, inclusive com alguns produtos já na fase II dos testes clínicos, como a lipase gástrica humana, resultado de uma colaboração das empresas Meristem Therapeutics (França) com a Solvay Pharmaceuticals (França).

Horn *et al.* (2004) destacaram 11 empresas envolvidas em *molecular farming*, sendo que 4 delas utilizam o milho como sistema de expressão. E segundo os autores, além dos três produtos que já estão no mercado atualmente (avidina, β -glucuronidase e tripsina), outros nove produtos (aprotinina, colágeno, lipase, lactoferrina, lisozima, *brazzein*, vacina contra o vírus da gastroenterite (TGEV), anticorpos monoclonais contra cáries e herpes) estão bem perto de entrar para o mercado nos próximos cinco anos.

Em nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp), estudou-se a recuperação e purificação da aprotinina produzida em milho transgênico em um projeto de colaboração com o Dr. Zivko Nikolov, então na Iowa State University (EUA). A aprotinina foi inicialmente obtida a um nível de expressão em torno de 0,1% da proteína total solúvel (Zhong *et al.*, 1999). No entanto, em 2002, níveis de expressão de 8,9% da proteína total solúvel foram obtidos com o uso de um promotor específico de sementes. Um processo de RPB de aprotinina recombinante baseado em cromatografia de afinidade com tripsina imobilizada e cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC) propiciou uma recuperação de aprotinina de 71% e 80%, respectivamente. O seqüenciamento de aminoácidos indicou uma concordância de 100% com a seqüência da molécula de aprotinina, indicando

também uma purificação de aproximadamente 95% (Azzoni *et al.*, 2002).

Algumas limitações técnicas existem no uso de plantas como biorreatores, especialmente em relação aos níveis de expressão alcançados. As diferenças na glicosilação também têm sido objeto de vários estudos, principalmente na produção de anticorpos. Além disso, ainda existem diversos desafios a serem enfrentados envolvendo questões como o impacto ambiental e a biossegurança, que influenciam a liberação e o cultivo em grande escala de plantas transgênicas.

Essas questões vêm sendo debatidas e soluções focando diferentes estratégias têm sido investigadas, incluindo o uso de promotores específicos que fazem com que a proteína heteróloga se torne ativa apenas após a purificação, ou então métodos de macho-esterilidade ou ainda a tecnologia conhecida como *terminator*, utilizados para evitar o fluxo gênico indesejável para a biodiversidade (Menkhaus *et al.*, 2004a).

2.2. Estratégias para a produção de proteínas recombinantes em plantas

Duas estratégias têm sido utilizadas para a produção de proteínas recombinantes em plantas: a transformação estável da planta e a transformação transiente (Leite, 2001).

Na transformação estável, o gene que codifica a proteína de interesse é inserido no genoma e a expressão da proteína depende dos sistemas de transcrição e tradução da planta. A integração estável permite a expressão da proteína e a transferência desta característica à progênie da planta (Leite, 2001). Este método é o mais utilizado e tem sido atualmente utilizado na produção de todas as proteínas recombinantes que estão no mercado (Horn *et al.*, 2004). Esse sistema requer um método para a transferência do gene de interesse, que pode ser feito tanto pelo uso do *Agrobacterium tumefaciens* ou através da técnica de bombardeamento de partículas, por exemplo.

O emprego do patógeno de solo *A. tumefaciens* como vetor na transformação de plantas tem sido principalmente utilizado em dicotiledôneas

como o tabaco, a alfafa, ervilha e batatas (Horn *et al.*, 2004). Já o bombardeamento de partículas cobertas com o DNA de interesse, a biobalística, tem sido o método de maior sucesso para a produção de milho transgênico, uma vez que as gramíneas não são facilmente transformadas por *A. tumefaciens* (Carneiro *et al.*, 2000). Na biobalística, partículas de ouro ou tungstênio são revestidas com o DNA de interesse e, usando-se um equipamento chamado *particle gun*, as micropartículas são propulsionadas sob alta pressão, penetrando nas paredes celulares e membranas sem matar as células (Klein *et al.*, 1987).

A transformação transiente baseia-se na utilização de vírus que ocorrem naturalmente nas plantas. O fragmento de ácido nucléico que codifica a proteína de interesse é inserido no genoma do vírus e após a infecção da planta, o vírus promove sua auto-replicação e expressão de seus genes, incluindo o gene codificador da proteína de interesse (Leite, 2001). Como não ocorre a integração estável do gene, este tipo de expressão é apenas transitória.

A vantagem deste tipo de transformação em relação à transformação estável é a rapidez com que a planta transgênica pode ser obtida, podendo ser utilizada para a verificação da funcionalidade do produto antes de partir para a produção em larga-escala e também para a produção de proteínas de demanda variável e pequena (Fischer e Emans, 2000).

2.3. Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido é um processo de separação no qual ocorre a transferência de solutos de uma matriz sólida para um solvente. Do ponto de vista de engenharia, a extração sólido-líquido é uma operação unitária multicomponente e multifásica que envolve transferência de massa em um estado não-estacionário, na qual uma série de fenômenos ocorre durante o período de interação entre a partícula que contém o soluto e o solvente que irá efetuar a separação, incluindo (Aguilera, 2003):

1. A entrada do solvente na matriz sólida.

2. A solubilização dos componentes.
3. O transporte do soluto para o exterior da matriz sólida.
4. A migração do soluto extraído da superfície externa do sólido para o seio da solução.
5. O movimento do extrato com respeito ao sólido (isto é, deslocamento do extrato).
6. A separação do extrato do sólido.

As etapas que envolvem transferência de massa são afetadas pelo tamanho da partícula e sua microestrutura, bem como pelas condições de extração. O fenômeno 2 acima é influenciado principalmente pela temperatura e pelas propriedades físicas do solvente e pode ser a etapa limitante para alguns solutos (Russel e Tsao, 1982). O fenômeno 3, que ocorre por difusão, é considerado a etapa limitante na maioria dos casos (Schwartzberg e Chao, 1982). A taxa de difusão pode ser descrita pela segunda lei de Fick (equação 2.1):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{Equação 2.1.}$$

Onde C é a concentração do soluto, t é o tempo, D é o coeficiente de difusão ou difusividade e x é o caminho difusional. A difusividade é uma propriedade importante no processo de difusão e seu valor pode ser determinado experimentalmente ou predito teoricamente (Aguilera, 2003). A influência da temperatura na difusividade pode ser descrita pela equação de Einstein (equação 2.2):

$$D \propto \left(\frac{T}{\eta} \right) \quad \text{Equação 2.2.}$$

Onde T é a temperatura absoluta e η é o coeficiente de viscosidade dinâmica. Pela equação acima se pode perceber que um aumento na temperatura leva a um aumento na difusividade (Cacace e Mazza, 2003).

A resistência à transferência de massa interfacial é a mais simples de se

controlar e quando esta é a etapa limitante da transferência, o aumento da intensidade de agitação contribui para o aumento da convecção na superfície, aumentando a taxa de transferência e, conseqüentemente, a eficiência da extração (Dickey *et al.*, 1998).

Durante a preparação do sólido para a extração, este deve ser reduzido a partículas pequenas, pois, teoricamente, o tempo de extração varia inversamente com o quadrado da dimensão característica do sólido. Entretanto essa redução no tamanho de partículas é limitada devido ao aumento na queda de pressão do extrator, instabilidade do fluxo e possíveis entupimentos nas etapas de processo posteriores. Deve ser lembrado que a extração é somente uma das operações unitárias do processo de RPB e as etapas restantes de purificação dependem fortemente de quão limpo é obtido o extrato (Aguilera, 2003).

Um dos fatores que afeta diretamente a eficiência da extração é a seleção do solvente. Entre as propriedades que devem ser avaliadas se incluem:

1. A solubilidade do composto de interesse no solvente.
2. A viabilidade de recuperação do solvente.
3. A sua tensão interfacial e viscosidade. O solvente deve ser capaz de penetrar a matriz sólida e sua viscosidade deve ser relativamente baixa.
4. Idealmente, o solvente deve ser não-tóxico, estável, não-inflamável, não danoso ao meio ambiente e de baixo custo.

Além do tipo de solvente selecionado, outros fatores irão influenciar o processo de extração de proteínas de plantas, tais como a razão massa/volume, pH, força iônica, tempo, temperatura, velocidade de agitação e o número de estágios de extração (Rosenthal *et al.*, 1996).

Segundo Xu e Diosady (2003), a maioria dos processos de extração de proteínas de plantas são baseados em extrações aquosas realizadas em operações em batelada de um único estágio ou em multi-estágios, sendo que os mais recentes avanços nos métodos utilizados para extração de proteínas

envolvem a combinação de solventes e otimização dos parâmetros de extração com o uso de tecnologias avançadas de separação, tais como membranas.

2.4. Extração de proteínas heterólogas de plantas transgênicas

As etapas de processo que envolvem a recuperação e purificação são efetivamente as responsáveis pela maior parte dos custos de produção de proteínas terapêuticas a partir de plantas transgênicas, uma vez que a obtenção da biomassa vegetal só depende da existência de uma infra-estrutura agrônômica. Na fase atual, em que os produtos originados de plantas transgênicas caminham em direção à produção comercial e testes clínicos, há uma grande necessidade de se desenvolver métodos de extração das proteínas da biomassa vegetal efetivos e economicamente viáveis (Brandle *et al.*, 2001).

Na maioria dos trabalhos publicados, as proteínas recombinantes são extraídas juntamente com outras proteínas presentes nos tecidos vegetais a fim de determinar o nível de acúmulo alcançado, para estabelecer a funcionalidade da proteína, ou para a confirmação da seqüência de aminoácidos. Dependendo da planta transgênica e da natureza da proteína recombinante, diferentes soluções de extração são utilizadas. Além do controle do pH e da força iônica, diferentes aditivos têm sido utilizados, tais como: detergentes, agentes redutores e inibidores de proteases (Kusnadi *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria dos procedimentos desenvolvidos em escala de bancada não pode ser diretamente escalonada devido ao alto custo dos reagentes utilizados.

Larrick *et al.* (2001) avaliaram o uso de água na extração de fragmentos de anticorpos de tabaco transgênico em comparação com o uso de um tampão a um pH específico, contendo seis aditivos responsáveis por diferentes ações bioquímicas. Nesse estudo, constatou-se que a quantidade de IgG extraída em água foi 70% desta proteína extraída em tampão, sugerindo que nem todos os aditivos usualmente recomendados são vitalmente importantes. Com isso, a simplificação do tampão de extração a dois componentes e um pH específico pode reduzir os custos, mantendo-se ainda uma alta eficiência de extração.

Estudos de extração semelhantes foram realizados por Menkhaus *et al.* (2004b). O pH e a solução extratora (água, tampão fosfato de sódio ou solução de NaCl) foram avaliados na determinação da condição ótima para a extração de β -glucuronidase produzida em ervilhas transgênicas. E também neste trabalho, a extração da proteína recombinante em água, a um pH controlado, foi tão eficiente quanto à extração realizada utilizando o tampão.

Kusnadi *et al.* (1998b) avaliaram a eficiência de diferentes tampões na extração das proteínas avidina e β -glucuronidase de sementes de milho transgênico. Avaliou-se o uso de tampões fosfato, borato e Tris a diferentes valores de pH, com diferentes aditivos: ditioneitol (DTT) e β -mercaptoetanol (ME) como agentes redutores; EDTA como inibidor de proteases e sais de cloreto de cálcio e cloreto de sódio. Como foi constatado que a avidina estava acumulada na parede celular, utilizou-se uma alta concentração de sal a fim de enfraquecer a interação desta proteína com a parede celular. A maior atividade específica de avidina foi obtida usando o tampão Tris a pH 7,9 contendo 500 mM de NaCl e 1 mM de CaCl_2 , sendo que na ausência do NaCl, a atividade específica da avidina foi apenas 10% da atividade obtida na presença do sal. Já para a enzima β -glucuronidase, que se encontrava dispersa no citosol, a extração completa foi obtida utilizando o tampão fosfato de sódio a pH 7,5 com a adição de 1% de SDS e 2% de ME. Entretanto, a presença de 1% de SDS causou a inativação da enzima e, portanto, a extração da β -glucuronidase foi realizada com o tampão fosfato, com uma eficiência de extração de 70%, estimada em relação à quantidade da enzima remanescente na farinha.

A cinética da extração aquosa de β -glucuronidase recombinante produzida em canola transgênica foi avaliada por Bai *et al.* (2002). Os autores estudaram o efeito do tamanho da partícula na microestrutura e cinética de extração através da aplicação de um modelo que descreve o efeito da microestrutura por três classes de soluto com diferentes resistências à transferência de massa. Os autores concluíram que o aumento da área superficial das partículas propiciou um aumento na eficiência de extração e que

quando se processou as sementes para a obtenção de flocos antes da moagem, minimizou-se a necessidade de partículas muito pequenas que são difíceis de se remover na etapa seguinte, a separação sólido-líquido.

Segundo Menkhaus *et al.* (2004a), a moagem da semente de milho a seco (método conhecido como *dry milling*) tem sido preferencialmente utilizada nos processos de recuperação de proteínas heterólogas de milho. A moagem serve para quebrar a parede celular e disponibilizar os componentes intracelulares à ação do solvente e, assim, reduzir o caminho difusional necessário para a extração da proteína na fase aquosa (Aguilera e Stanley, 1999).

Este fenômeno foi observado por Bailey *et al.* (2004) estudando a recuperação da enzima lacase produzida em milho transgênico. A solubilização desta enzima em solução aquosa foi avaliada em diferentes tampões incluindo detergentes, sais, inibidores de proteases e diferentes valores de pH, resultando em um mesmo nível de extração da enzima. Somente a redução, em aproximadamente dez vezes, do tamanho de partícula da farinha do embrião possibilitou o aumento da quantidade de lacase extraída (cerca de duas vezes).

Azzoni (2002), em nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp), estudou o efeito das variáveis pH e força iônica na extração de aprotinina recombinante produzida em milho transgênico. O autor concluiu que o pH e a força iônica das soluções utilizadas influenciaram significativamente a extração tanto da proteína recombinante, como também das impurezas que foram quantificadas: carboidratos, compostos fenólicos, proteínas e lipídeos. Uma variação de pH de 3 a 10 aumentou a extração de proteínas totais do milho de 0,25 para 2% (w/w) da biomassa, com uma conseqüente variação no conteúdo de impurezas a serem removidas durante o processo de purificação.

Entre os trabalhos de produção de proteínas recombinantes em plantas que descrevem a etapa de extração apenas como uma etapa essencial, sem haver a preocupação com a otimização do processo, podemos citar a extração da enzima lactato desidrogenase produzida em tabaco transgênico (Mejère *et*

al., 1998). As folhas de tabaco foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 contendo 0,3 M de NaCl. Fieldler *et al.* (1997) também utilizaram apenas uma solução tampão (tampão PBS pH 7,6) na extração de fragmentos de anticorpos produzidos em tabaco. A extração de anticorpos contra a Hepatite B, produzidos em tabaco, também foi realizada com tampão PBS, agora em pH 8,0 e com a adição de ácido ascórbico à 4°C (Valdés *et al.*, 2003). Para o caso da enzima tripsina bovina recombinante expressa em milho transgênico, o primeiro produto comercial de larga escala produzido em plantas transgênicas, a extração da farinha do milho foi realizada com tampão acetato em pH 3,2 contendo 100 mM de NaCl em uma relação massa-volume de 1:3. A suspensão foi agitada durante 30 min e então centrifugada a 10.000 g para a remoção do material insolúvel (Woodard *et al.*, 2003).

2.5 O milho como sistema de expressão de proteínas heterólogas

Diversas espécies de plantas têm sido utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, tais como: tabaco, batata, milho, alfafa, canola e soja (Daniell *et al.*, 2001). O uso de sementes mostra-se mais vantajoso do que as folhas verdes por apresentar um menor teor de compostos fenólicos e uma mistura de proteínas e lipídeos menos complexa, o que facilita as etapas de RPB. Além disso, a expressão de proteínas em sementes, que são órgãos específicos para acumular e armazenar proteínas de reserva, possibilita um tempo maior de estocagem, mesmo a temperatura ambiente, uma vez que a maturação das sementes torna o ambiente bioquimicamente apropriado para o acúmulo de proteínas (Twyman *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado, por exemplo, que anticorpos produzidos em sementes permanecem estáveis por até 3 anos, à temperatura ambiente, sem nenhuma perda detectável de atividade (Stoger *et al.*, 2000).

Entre os vários critérios envolvidos na seleção da espécie de planta a ser utilizada na produção de uma proteína heteróloga inclui-se a facilidade de processamento inicial do material e subsequente RPB do produto de interesse.

Várias companhias têm desenvolvido sistemas de expressão que direcionam a produção da proteína heteróloga para as sementes de cereais e, entre os candidatos a biorreatores, o milho tem se destacado (Giddings *et al.*, 2000). Os principais fatores desta escolha incluem o alto rendimento em termos de biomassa, a relativa facilidade de transformação e manipulação *in vitro* e a facilidade de aumento de escala (Twyman *et al.*, 2003). Além disso, o milho é uma planta de cultivo bastante versátil e que já passou por diferentes melhoramentos genéticos.

O grão de milho consiste de embrião (12% da massa seca da semente); endosperma (82%), uma estrutura de reserva; pericarpo (5%), a camada externa do grão; e pedúnculo (1%) (Figura 2.1). Tais partes diferem significativamente quanto à estrutura de seus tecidos e composição química. Por exemplo, o endosperma é responsável por 98% do amido, 80% da proteína e 15% dos lipídeos presentes no grão, enquanto o embrião contém 84% dos lipídeos e 13% da proteína (Wilson, 1987). A camada de células que envolvem o endosperma é chamada de camada de aleurona e é formada por células ricas em proteínas e minerais.

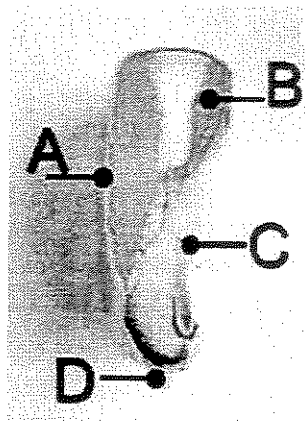


Figura 2.1. Estrutura do grão de milho. A - pericarpo, B - endosperma, C - embrião e D - pedúnculo (Carneiro *et al.*, 2000).

No processo de extração de uma proteína recombinante produzida em milho transgênico deve-se procurar minimizar a extração dos componentes do

grão que possam comprometer a eficiência da sequência de operações unitárias envolvidas na RPB. As proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e lipídeos são algumas das biomoléculas presentes no milho importantes neste contexto. A Tabela 2.2 lista a composição do grão de milho em relação a estes componentes.

Tabela 2.2. Proporção de alguns componentes da semente de milho (adaptada de Menkhaus *et al.*, 2004a).

Componente	Composição mássica em % (umidade incluída)
Umidade	10
Proteína	11
Carboidratos	66
Lipídeos	4
Fenóis (mg/g) base seca	0,31

O conhecimento das propriedades físico-químicas das proteínas nativas é de fundamental importância na escolha dos métodos de separação empregados durante a purificação da proteína recombinante presente no extrato de plantas transgênicas. Os compostos fenólicos são conhecidos por formarem complexos com proteínas do extrato, interferindo negativamente nos processos de separação. Os carboidratos e lipídeos podem gerar entupimentos de resinas cromatográficas e filtros, além do que, a presença de carboidratos no extrato também pode contribuir para o aumento da contaminação bacteriana, uma vez que, devido ao volume de material é inviável que sejam mantidas condições assépticas durante o processo de extração (Menkhaus *et al.*, 2004a).

2.5.1. Proteínas

A maior parte das proteínas em uma semente de milho madura está concentrada no endosperma e no embrião, sendo que as proteínas do embrião são superiores tanto em quantidade quanto em diversidade (Prasanna *et al.*,

2001).

As proteínas podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com a sua solubilidade: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (Osborne e Mendel, 1914). As albuminas são solúveis em água e as globulinas em soluções salinas diluídas. As albuminas e globulinas incluem proteínas biologicamente importantes como as enzimas, proteínas do núcleo, proteínas da membrana e as glicoproteínas. No milho, as albuminas e globulinas estão presentes principalmente no embrião, representando 28 e 24%, respectivamente, e apenas 3,5 e 2,5%, respectivamente, das proteínas do endosperma (Wall e Paulis, 1978). As glutelinas são proteínas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas enquanto as prolaminas são solúveis em soluções alcoólicas e não possuem atividade enzimática, sendo fonte de aminoácidos e esqueletos carbônicos para o desenvolvimento da planta durante a germinação (Carneiro *et al.*, 2000). A quantidade relativa destas classes de proteínas em cada parte do milho está apresentada na Tabela 2.3.

As prolaminas do milho são conhecidas como zeínas e constituem a grande maioria das proteínas do endosperma (Carneiro *et al.*, 2000). As zeínas são estocadas na forma de corpúsculos protéicos de aproximadamente 1 µm de diâmetro, distribuídos uniformemente pelo citoplasma das células do endosperma, entre grânulos de amido de 5 a 35 µm (Figura 2.2) (Lopes e Larkins, 1993).

Tabela 2.3. Proporção das principais classes de proteínas da semente de milho (Johnson, 2000).

Localização	Classe de proteínas (%)			
	Albuminas	Globulinas	Glutelinas	Prolaminas
Grão inteiro	8	9	40	39
Endosperma	4	4	39	47
Embrião	30	30	25	5

As zeínas são também classificadas em quatro tipos distintos com base na sua estrutura primária e solubilidade. As α -zeínas possuem massas moleculares de 19 e 22 kDa e são as mais abundantes (60% das prolaminas), sendo seguidas pelas γ -zeínas (25%) de massas moleculares de 16 e 27 kDa. As β -zeínas possuem massa molecular de 14 kDa e representam de 5 a 10% das prolaminas, enquanto as δ -zeínas (5%) possuem massa molecular de 10 kDa.

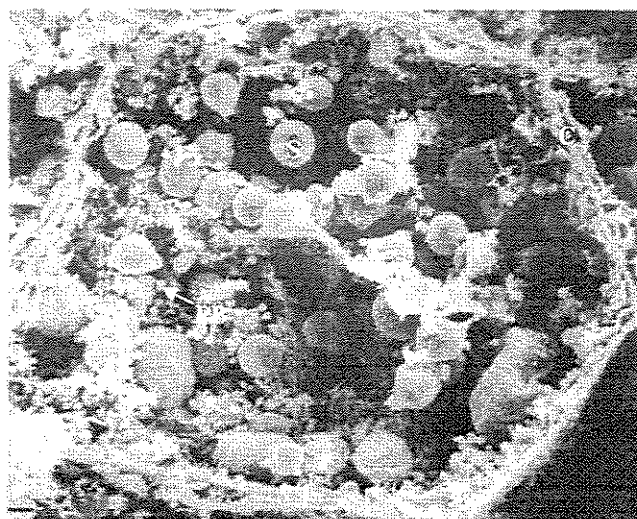


Figura 2.2. Micrografia eletrônica de uma célula de endosperma do milho em desenvolvimento, destacando os grânulos de amido (S), os corpos protéicos (PB) e a parede celular (C), barra de 5 μ m (Lopes e Larkins, 1993).

Lending e Larkins (1989) apresentaram estudos mostrando as diferenças na distribuição das zeínas no corpúsculo protéico (Figura 2.3). Os corpúsculos protéicos nas células mais novas, localizadas na periferia do endosperma ou região sub-aleurônica, contêm principalmente β e γ -zeínas, distribuídas por todo o corpúsculo protéico. Passando para o interior do endosperma, ocorre um aumento dos corpúsculos protéicos, com pequenos núcleos contendo as α -zeínas. Finalmente, nas células maduras do endosperma, esses núcleos se unem para formar uma região central contínua de α -zeínas, com as β e γ -zeínas localizadas na periferia do corpúsculo protéico.

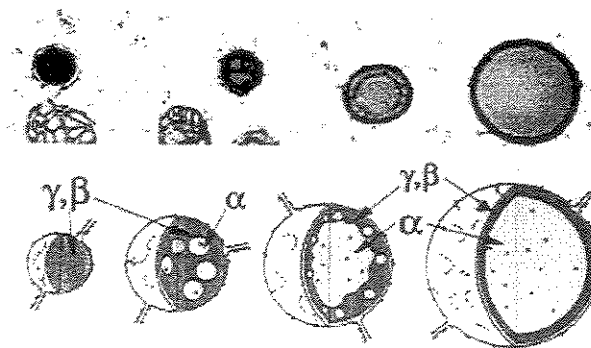


Figura 2.3. Esquema do desenvolvimento dos corpos protéicos no endosperma do milho. O desenvolvimento ocorre da esquerda para a direita. As letras gregas indicam a localização das correspondentes classes de zeínas (Coleman *et al.*, 1999).

A alta proporção de resíduos de aminoácidos apolares e a falta de aminoácidos básicos e ácidos são responsáveis pela baixa solubilidade das zeínas em água. O conteúdo helicoidal que as zeínas possuem sugere que a molécula assume uma estrutura globular em soluções não aquosas com propriedades conformacionais similares a proteínas globulares convencionais tais como a insulina e a ribonuclease (Danzer *et al.*, 1975).

2.5.2. Carboidratos

Os principais constituintes em massa da semente de milho são os carboidratos, sendo o amido o mais abundante. Em um endosperma maduro, o amido representa 86% da massa seca e os açúcares simples 1%. O amido é constituído basicamente de polímeros de glicose: a amilose, que é essencialmente linear, e a amilopectina, altamente ramificada. As moléculas de amido são estocadas no interior do endosperma na forma de grânulos insolúveis envolvidos por uma matriz protéica, chegando a atingir diâmetros de até 25 μm (Boyer e Shannon, 1987).

Os monossacarídeos presentes no endosperma consistem basicamente de D-glicose e D-frutose, em proporções aproximadamente iguais. A sacarose é o principal dissacarídeo da semente de milho e a sua quantidade em um endosperma em desenvolvimento chega a atingir 4 a 8% da massa seca. Entre os milhos do tipo doce, aqueles que contêm o gene *sugary* (*su*) possuem uma

quantidade de sacarose até duas vezes maior que a do milho comum e variedades com o gene *shrunk 2* (*sh2*) chegam a ter de três a quatro vezes mais sacarose. Além da sacarose, o milho contém também pequena quantidade de maltose (Boyer e Shannon, 1987).

O endosperma do milho comum possui em média 2% de polissacarídeos solúveis em água, entretanto, esse valor pode chegar a 35% nas variedades do tipo doce contendo o gene *su*. Entre os polissacarídeos do milho solúveis em água está o fitoglicogênio, um polissacarídeo ramificado, similar ao glicogênio animal, composto de cadeias de até 30 unidades de glicose (Boyer e Shannon, 1987).

2.5.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes no milho são qualitativamente similares aos de outros grãos de cereais e podem ser classificados em três grupos: ácidos fenólicos, flavonóides e as aminas conjugadas. Entre os ácidos fenólicos, o mais abundante no milho é o ácido ferrúlico (Figura 2.4). Os flavonóides constituem um amplo grupo de compostos fenólicos encontrados nas plantas, sendo que alguns deles estão entre os principais pigmentos presentes em vegetais. Os compostos fenólicos do milho se encontram concentrados no pericarpo, na camada aleurônica e no embrião, com apenas traços no endosperma (Sen *et al.*, 1994).

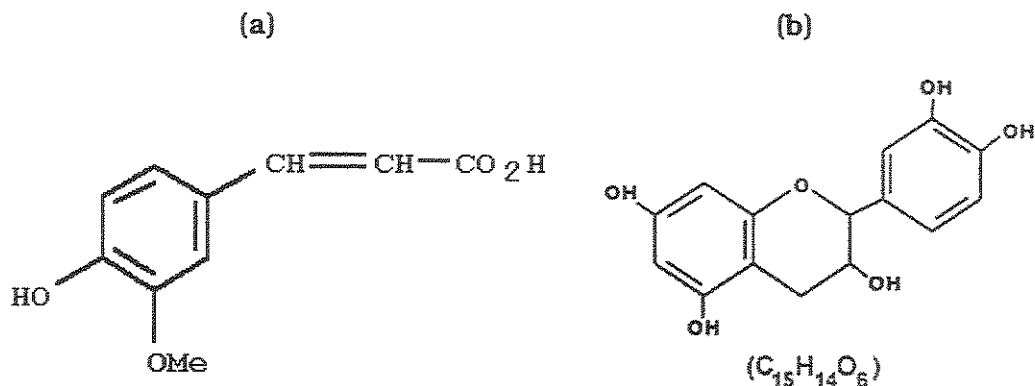


Figura 2.4. Estrutura do ácido ferrúlico (a) e da catequina (b).

Os compostos fenólicos mais simples, incluindo o catecol e a hidroquinona estão geralmente presentes em pequenas quantidades nas plantas. Em contraste, milhares de tipos de flavonóides são conhecidos, diferindo apenas no estado de oxidação dos anéis heterocíclicos e no tipo de glicosilação. Mas são os compostos fenólicos poliméricos, os taninos (polímeros tanto do ácido gálico, quanto dos flavonóides catequinas) cuja reatividade com as proteínas é mais conhecida (Jervis e Pierpoint, 1989).

O principal problema que os compostos fenólicos geram é a complexação com as proteínas, formando agregados. A natureza destas interações inclui pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica ou mesmo modificação covalente de grupos tióis, hidroxilas e aminas primárias (Gegenheimer, 1990). Segundo Jervis e Pierpoint (1989), os compostos fenólicos presentes nas plantas podem interferir e até mesmo impedir a extração de algumas proteínas.

Proteínas de alta massa molecular, de estrutura mais aberta e flexível e maior conteúdo de prolina apresentam maior associação com polifenóis. Com relação às características dos polifenóis que favorecem a interação se incluem o maior tamanho do composto, a conformação mais flexível e a baixa solubilidade (Magalhães *et al.*, 2001).

Spencer *et al.* (1988) propuseram um modelo para a interação dos taninos com as proteínas. Em um primeiro estágio, a molécula de tanino é atraída aos sítios da superfície da proteína onde os anéis aromáticos interagem com as regiões hidrofóbicas. Esta interação é intensificada pela formação de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos e os grupos polares da superfície, tais como os grupos carboxílicos, guanidino e amidas. O produto resultante é um complexo no qual a superfície da proteína se torna menos hidrofílica e, portanto, mais susceptível à agregação e precipitação em meio aquoso.

Maa e Hsu (1996) estudaram a agregação do hormônio de crescimento humano recombinante induzida por diferentes compostos fenólicos e concluíram que a presença destes compostos também causa mudanças

conformacionais na estrutura do hormônio. Essas mudanças se devem à hidrofobicidade dos compostos fenólicos, aumentando as interações hidrofóbicas entre as proteínas que passam a expor as porções hidrofóbicas da estrutura, levando a mudanças conformacionais nestas moléculas.

2.5.4. Lipídeos

O conteúdo de lipídeos presente na semente de milho (aproximadamente 4%) é relativamente baixo em comparação com a soja, que possui 20%. A maior parte dos lipídeos está concentrada no embrião, com 76 a 83% do total de lipídeos da semente, e o restante distribuído na seguinte proporção: 14 a 23% no endosperma, 1 a 2% no pericarpo e menos de 1% no pedúnculo (Weber, 1987).

Os triacilgliceróis constituem a maior fração do óleo de milho refinado (98,8%), representando também os principais lipídeos de reserva da semente de milho. Entre os outros tipos de lipídeos encontrados no milho estão os fosfolipídeos, os glicolipídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, carotenóides (precursores da vitamina A) e tocóis (vitamina E) (Weber, 1987).

O conteúdo de óleo da semente de milho pode ser aumentado em variedades que possuem um embrião maior, embrião com maior teor de lipídeos ou um endosperma menor. As variedades que carregam os genes *brittle-2*, *floury-2* e *sugary-2* possuem um maior conteúdo de óleo por quilograma do que os milhos comuns, devido principalmente ao reduzido tamanho do endosperma (Weber, 1987).

2.6. Variedades de milho

A escolha da variedade de milho comercial utilizada na produção da proteína heteróloga pode influenciar diretamente as etapas do processo de RPB. Além dos componentes acima citados, qualidades agrônomicas como produtividade e resistência a doenças são também importantes. A seguir apresentam-se algumas características das variedades comerciais utilizadas

neste trabalho.

2.6.1. Milho QPM (*Quality Protein Maize*)

Devido à deficiência em aminoácidos essenciais como a lisina, o triptofano e a metionina, o grão de milho normal possui uma má qualidade nutricional. A descoberta de mutantes de milho *opaco-2*, com elevado teor de lisina, por Mertz *et al.* (1964), estimulou as pesquisas para o desenvolvimento de variedades mais nutritivas. Não somente os teores de lisina são maiores no milho *opaco-2* como também os teores de triptofano, enquanto que os teores de leucina e ácido glutâmico são reduzidos. Essa variação no teor de aminoácidos se deve a diferentes distribuições das classes de proteínas e não a mudanças na composição de aminoácidos de proteínas individuais. Nos mutantes *opaco-2* a fração de zeínas é reduzida, enquanto que a fração de albuminas, globulinas e glutelinas é aumentada (Wall e Paulis, 1978). Conseqüentemente, nos mutantes de *opaco-2* quase não se observam corpúsculos protéicos devido ao baixo nível de zeína destes cultivares (Lásztity, 1984).

O milho QPM foi desenvolvido pelo CYMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo, México), e é um resultado do melhoramento genético do mutante *opaco-2*. O milho QPM supera algumas das deficiências encontradas nos milhos *opaco-2*, principalmente em relação ao seu baixo desempenho agrônômico (baixo rendimento, endosperma frágil e baixa resistência a doenças). Análises realizadas com as variedades QPM revelaram que a quantidade de γ -zeínas (massa molecular de 16 e 27 kDa) nestas variedades é de duas a quatro vezes superior à quantidade desta proteína de reserva no milho *opaco-2* e em variedades de milho comum (Wallace *et al.*, 1990).

2.6.2. Milho Doce

Os diversos estudos relacionados a mutações no endosperma do milho levaram a identificar diferenças qualitativas e quantitativas no metabolismo dos

carboidratos da semente. E entre estes mutantes existem aqueles que possuem uma deficiência na síntese de amido e que vêm sendo usados para a produção do milho doce (Young *et al.*, 1997b).

O milho doce é um dos vegetais mais populares nos Estados Unidos (Boyer e Shanon, 1982). As variedades de milho doce são caracterizadas por grãos com altos teores de açúcar e pouco amido no endosperma, o que os tornam enrugados e translúcidos quando secos. Os mutantes de milho doce mais conhecidos são o *sugary* (*su*), *shrunk* (*sh*) e *brittle* (*bt*). O gene *su* não condiciona a semente a excepcionais teores de açúcares, mas a altos teores de fitoglicogênio ou polissacarídeos solúveis em água e a um baixo conteúdo de amido. Os mutantes *bt* e *sh* acumulam açúcares às expensas de amido, e por causa dos elevados teores de açúcar, as variedades que carregam esses genes são chamadas de superdoces (Teixeira *et al.*, 2001). O açúcar predominante no milho tipo doce é a sacarose e, em menor extensão, a maltose, a glicose e a frutose (Cobb e Hannah, 1981).

2.7. Produção de pró-insulina humana

A pró-insulina é uma proteína α -helicoidal de massa molecular 9500 Da, precursora do hormônio insulina. A estrutura molecular da pró-insulina é formada por duas cadeias polipeptídicas, A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) interligadas por duas pontes de dissulfeto e unidas pelo peptídeo C (35 aminoácidos) (Figura 2.5).

A insulina é um hormônio que atua como regulador no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. No caso de uma deficiência na produção de insulina, o nível de glicose no sangue permanece elevado, caracterizando o desenvolvimento da doença conhecida como diabetes mellitus. Esta doença pode ser controlada pela administração parenteral de preparações de insulina (Walsh e Headon, 1994). A magnitude da demanda de insulina pode ser estimada pelo fato de que aproximadamente 0,7% da população mundial sofre de diabetes e que o consumo de insulina por paciente está entre 0,5 e 1,0 g ao

ano (Shimidt *et al.*, 1999). Isso implica em uma necessidade potencial de 20 ton anuais, o equivalente a uma receita anual de US\$ 2 bilhões (para um preço de US\$ 100.000/kg, segundo Ladisch, 2001).

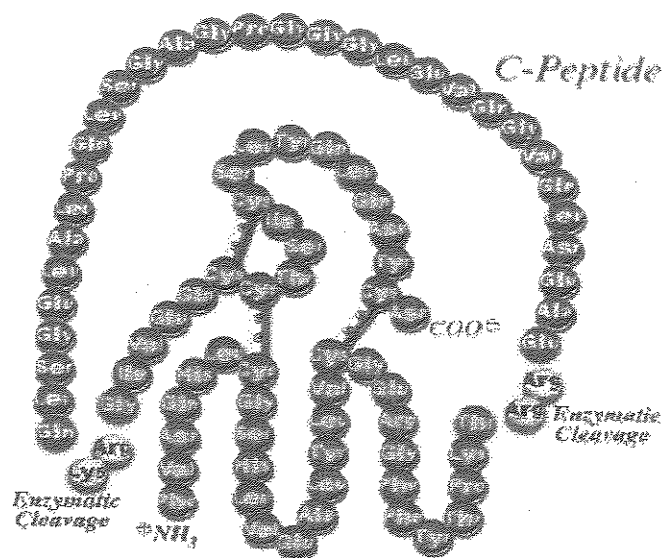


Figura 2.5. Estrutura da pró-insulina humana. Fonte: http://www.dpcweb.com/medical/diabetes/articles/99_spring_diabetes_propic.html.

Ao longo dos anos, alguns métodos foram desenvolvidos para a produção de insulina destinada ao tratamento de pacientes diabéticos, entre eles destacam-se: a extração de insulina do pâncreas bovino ou suíno e a produção através da tecnologia de DNA recombinante.

Através da tecnologia de DNA recombinante, o gene da pró-insulina humana pode ser expresso em células de *Escherichia coli* e posteriormente pode ser convertido à insulina pela remoção enzimática do peptídeo C. Entretanto, apesar de apresentarem um alto nível de produção, os sistemas procarióticos de produção de proteínas heterólogas resultam na formação de agregados constituídos de proteínas desnaturadas, denominados corpúsculos de inclusão, que acarretam processos de RPB complexos. Das cerca de 30 etapas da produção de insulina recombinante, aproximadamente 27 etapas são de RPB e a recuperação global é de apenas 30% da proteína sintetizada pelas células

(Ladisch, 2001).

A expressão em *E. coli* das cadeias A e B separadamente foi o primeiro método de sucesso na produção em larga escala de insulina recombinante, um resultado de cooperação das empresas Genentech e Eli Lilly (Ladisch, 2001). A expressão de pró-insulina em leveduras também foi demonstrada (Kjeldsen *et al.*, 1999), no entanto, as proteínas expressas nestes organismos são freqüentemente hiper-glicosiladas e instáveis.

A produção de pró-insulina em milho transgênico se destaca como uma nova alternativa de produção deste hormônio de importância vital à comunidade mundial. Recentemente, no CBMEG – UNICAMP, o grupo de pesquisa do Dr. Adilson Leite demonstrou a produção do hormônio pró-insulina humana em sementes de milho transgênico (De Lucca, 2003). Análises de *Western blot* indicaram um nível de produção em relação à proteína total solúvel de 2%. A expressão da proteína heteróloga foi direcionada especificamente para os corpúsculos protéicos do tecido de reserva, o endosperma, utilizando um promotor do gene que codifica proteínas de reserva do sorgo, a α -kafirina, e a seqüência codificadora do peptídeo sinal de uma α -coixina de *Coix*.

A expressão da proteína heteróloga no endosperma permite a simplificação do processo de RPB, uma vez que existem métodos industriais estabelecidos para a separação das partes da semente em endosperma, embrião e cascas. Além disso, como a maior parte das proteínas do endosperma são álcool-solúveis, para uma proteína heteróloga localizada no endosperma, a extração desta com um tampão aquoso neutro eliminaria do extrato a presença de 80% das proteínas nativas, enquanto que o uso deste mesmo tampão no embrião somente 30% das proteínas permaneceria insolúveis (Menkhaus *et al.*, 2004a). Além disso, minimiza-se a presença de lipídeos no extrato, uma vez que 84% do óleo da semente de milho está presente no embrião.

Ensaio de imunohistoquímica confirmaram a tecido-especificidade da expressão e a existência de um gradiente crescente da expressão em direção à

região periférica do endosperma, na qual predomina o acúmulo de proteínas de reserva. Além disso, análises das alíquotas obtidas por meio de um gradiente de sacarose mostraram a presença de pró-insulina somente nas frações correspondentes aos corpúsculos protéicos. Análises de espectrometria de massa da pró-insulina humana recombinante demonstraram uma concordância com a massa molecular da proteína nativa, mostrando que a proteína foi corretamente processada nas células do endosperma do milho transgênico (De Lucca, 2003).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

A pró-insulina humana recombinante utilizada como controle positivo nos experimentos foi doada pela BIOMM (Montes Claros, MG). Os principais reagentes utilizados na preparação dos solventes foram o agente redutor ditioneitol (DTT) da marca Pharmacia Biotech (Suécia), o bicarbonato de sódio (Synth, Brasil), o etanol anidro (Synth, Brasil) e a glicina (Merck, Alemanha).

3.1.2. Sementes de milhos comerciais

Farinhas do endosperma de seis variedades de milhos comerciais foram utilizadas nos experimentos de extração aquosa. Sementes de milho doce da variedade *shrunk2* (*sh2*) sintético, *brittle2* (*bt2*) BR400 e *sugary1* (*su1*) BR202 e sementes do tipo QPM (*Quality Protein Maize*) variedade BR451 e BR473 e sementes de um tipo de milho comercial comum foram doadas pela EMBRAPA (Sete Lagoas, MG) e plantadas no CBMEG - UNICAMP (colhidas em abril de 2002) sem receber qualquer tipo de fungicida que poderia vir a interferir nas análises experimentais. A Figura 3.1 ilustra as sementes comerciais utilizadas nos ensaios.

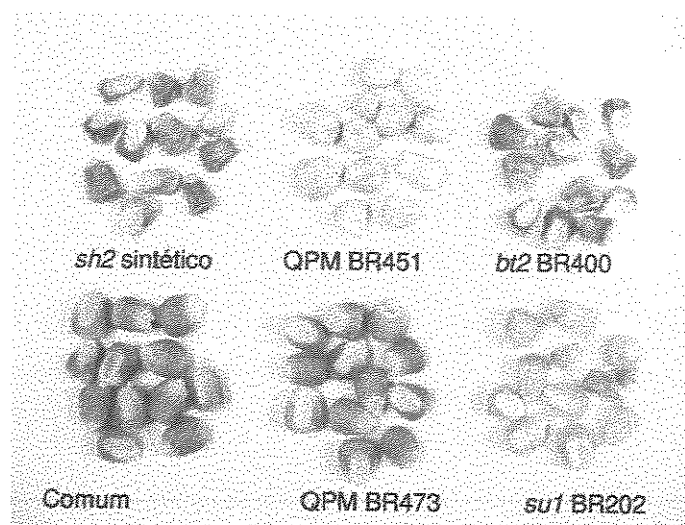


Figura 3.1. Sementes de milho comerciais avaliadas.

O milho QPM BR451 é uma variedade de milho branco, de excelente produtividade e adaptada às diferentes regiões brasileiras. Também, como é característico da variedade QPM, possui um alto valor protéico, com teores de lisina e triptofano até 85% superiores ao milho comum (página da internet da Embrapa: <http://www.cnpms.embrapa.br>). Já o milho QPM BR473 é uma variedade de milho de cor amarelo-alaranjada que é produtiva, de ciclo precoce com grãos semiduros, possui excelente valor energético e, assim como a BR451, possui altos teores de lisina e triptofano. A variedade BR400 é um milho superdoce de coloração amarelo-laranja que possui o gene *brittle bt2*. A variedade BR202 é um milho doce de coloração branca que possui o gene *sugary (su1)*. A terceira variedade de milho doce utilizada foi uma variedade sintética contendo o gene *shrunk (sh2)*.

3.1.3. Sementes de milho transgênico

Sementes de milho transgênico expressando a proteína heteróloga pró-insulina humana foram cedidas pelo grupo do Laboratório de Plantas do CBMEG - UNICAMP. Primeiramente, plantas de milho da linhagem Hi-II foram transformadas geneticamente e então cruzadas com plantas da variedade de

milho comercial QPM BR451. A produção da proteína heteróloga foi direcionada para o endosperma da semente de milho utilizando-se um promotor de gene de γ -kafirina (proteína do sorgo) e para o interior do retículo endoplasmático através de um peptídeo sinal de uma α -coixina de Coix. A transformação estável das plantas de milho foi feita utilizando a técnica de bombardeamento (De Lucca, 2003).

3.2. Métodos

Após a degerminação da semente e preparação da farinha, os experimentos realizados foram divididos em cinco etapas cuja sequência está esquematizada na Figura 3.2.

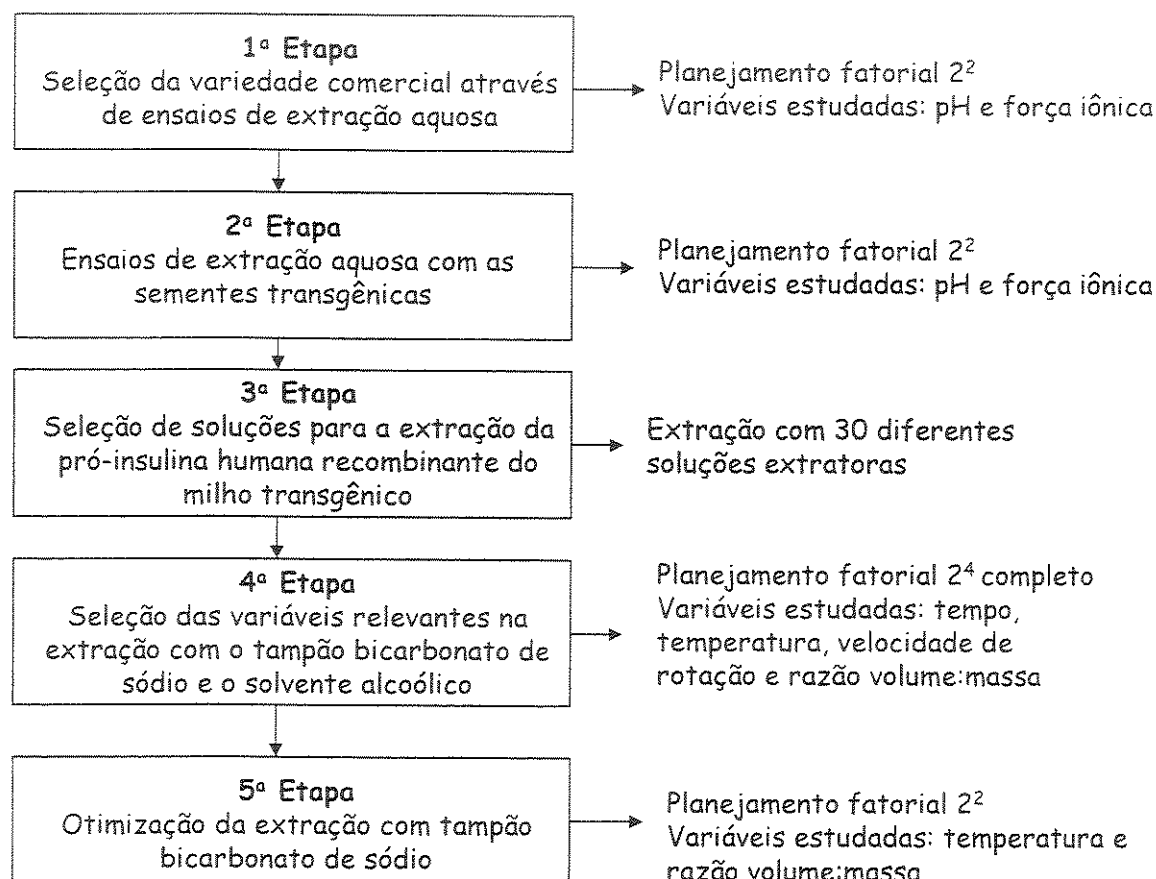


Figura 3.2. Fluxograma das etapas do trabalho.

3.2.1. Degerminação da semente e preparação da farinha

As sementes de milho foram degerminadas a seco utilizando um equipamento de degerminação do tipo moinho de facas (marca Renard, Brasil). Em seguida, foi realizada a separação da fração rica em endosperma da fração rica em gérmen utilizando uma peneira de abertura 0,5 mm. A fração retida nesta peneira (considerada rica em endosperma) foi passada em um moinho de rolos (marca Quadrumat, Alemanha) conectado a um jogo de peneiras, que além da produção da farinha fina, propiciou a separação das cascas das sementes. Os experimentos de extração foram realizados com a farinha obtida somente do endosperma do milho. As farinhas foram mantidas a 4°C até a realização dos experimentos.

Os diâmetros médios de partícula área-volume das partículas das farinhas de milho utilizadas nos experimentos (D_m), calculados pela equação:

$$D_m = \frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_i / D_{pi})} \quad \text{Equação 3.1}$$

onde D_{pi} é o diâmetro médio da partícula, tomado como a média aritmética do menor e do maior diâmetro da partícula em um dado incremento e x_i é a fração mássica em um incremento (McCabe *et.al*, 1993), são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Diâmetros médios de partícula área-volume das partículas das farinhas ricas em endosperma dos milhos.

Variedade de milho	Diâmetro médio (mm)
sh2 sintético	0,24
QPM BR451	0,23
bt2 BR400	0,25
comum	0,24
QPM BR473	0,22
su1 BR202	0,27
transgênico	0,22

3.2.2. Metodologia utilizada nos ensaios de extração

3.2.2.1. Extração aquosa com variação de pH e força iônica

O estudo de efeito de pH e força iônica na extração aquosa de compostos solúveis das farinhas das seis variedades de milhos comerciais e do milho transgênico foi realizado em tanques agitados. Em béqueres de 250 ml (5,5 cm de diâmetro), 10,0 g de farinha foram agitados com 100,0 ml de solução extratora (razão volume-massa de 10:1) por 30 min a 25°C. A força iônica da solução extratora foi variada pela adição de NaCl e o pH da suspensão mantido no valor específico desejado pela adição de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. O agitador utilizado nos ensaios foi um agitador mecânico modelo Q-251D da marca IKA Labortechnik (Alemanha), com um impelidor do tipo pás inclinadas (4 cm de diâmetro e inclinação de pás de 45°, construído e gentilmente doado ao LEBp pela empresa Kroma, Brasil) e a rotação utilizada foi de 270 rpm. Após o período 30 min, a suspensão foi filtrada seguindo a metodologia para a determinação da taxa de filtração (descrita no item 3.2.1.1) e este filtrado foi utilizado para as demais análises. O planejamento dos ensaios foi realizado de acordo com metodologia de planejamento estatístico experimental (Barros Neto *et al.*, 2001) e está descrito no item 3.2.2.4.

3.2.2.2. Seleção de solventes para a extração da pró-insulina

A extração da pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em diferentes solventes foi realizada em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 ml. Uma massa de 50 mg de farinha foi agitada vigorosamente em 0,50 ml de solvente durante 1 min em aparelho do tipo vórtex e depois durante 2 min em um aparato mecânico constituído de um rotor cônico conectado a uma furadeira elétrica. Em seguida, as amostras foram homogenizadas durante 3h a temperatura ambiente utilizando um agitador orbital (homogenizador de sangue AP 22 da marca Marconi, Brasil). As suspensões foram centrifugas por 10 min a 12000 *g* e as amostras analisadas em ensaio qualitativo de *Western Blot*. Os solventes utilizados estão listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Soluções testadas para a extração de pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico.

Identificação	Solvente
1	Uréia 4 M em água
2	Triton X-100 0,2% em água
3	Tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0
4	Etanol 70%
5	Uréia 4 M + DTT 5mM em água
6	Uréia 4 M + Triton X-100 0,2% em água
7	Tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 + uréia 4 M
8	Triton X-100 0,2% + DTT 5 mM em água
9	Tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH10,0 + Triton X-100 0,2%
10	Tampão glicina pH 3,0 + NaCl 200 mM
11	NaCl 300 mM em água a pH10,0 + 0,6% de mercaptoetanol
12	Etanol 70% + 5 mM DTT
13	Etanol 70% + tampão glicina 50 mM pH 3,0
14	Etanol 70% + tampão glicina 50 mM pH 3,0 + DTT 5 mM
15	Etanol 70% + tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0
17	Etanol 70% + tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 + DTT 5 mM
18	Isopropanol 70%
19	Isopropanol 70% + tampão glicina 50 mM pH 3,0
20	Isopropanol 70% + tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0
21	Isopropanol 30% + tampão acetato 30 mM pH 7,0
22	Isopropanol 70% + tampão glicina 50 mM pH 3,0 + DTT 5 mM
23	Isopropanol 80% + DTT 5 mM
24	Isopropanol 60% + DTT 5 mM
25	Isopropanol 45% + DTT 5 mM
26	Isopropanol 30% + DTT 5 mM
27	Tampão bicarbonato 50 mM pH 9,0 + DTT 5 mM
28	Tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 + DTT 5 mM
29	Tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 + DTT 5 mM + uréia 4 M
30	Tampão de extração controle do <i>Western Blot</i> (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 2 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM e Triton X-100 0,2%)

3.2.2.3. Extração da pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em tampão bicarbonato e tampão alcoólico

Os estudos de extração de compostos solúveis do milho em tampão bicarbonato de sódio 50 mM, 5 mM DTT e em solução de etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM foram realizados em tanques agitados. Em um reator encamisado de 250 ml (5,5 cm de diâmetro), a quantidade de farinha estabelecida no planejamento experimental (descrito no item 3.2.1.5) foi agitada em 50,0 ml de solução extratora durante diferentes intervalos de tempo. O agitador utilizado nos ensaios foi um agitador mecânico modelo Q-251D da marca IKA Labortechnik (Alemanha), com um impelidor do tipo pás inclinadas (4 cm de diâmetro e inclinação de pás de 45°). A velocidade de rotação do impelidor, o tempo e a temperatura da extração variaram de acordo com o planejamento experimental. Após a agitação, a suspensão foi centrifugada a 10°C e 13000 *g* durante 20 min. O planejamento dos ensaios foi realizado de acordo com metodologia de planejamento estatístico experimental (Barros Neto *et al.*, 2001).

3.2.2.4. Planejamento experimental da extração aquosa com variação de pH e força iônica

Os experimentos de extração aquosa das variedades de milho comerciais (resultados apresentados no Capítulo 4) e da extração aquosa do milho transgênico (resultados apresentados no Capítulo 5) foram realizados baseados em um planejamento fatorial completo (2² ensaios acrescido de 4 pontos axiais e 3 pontos centrais) envolvendo duas variáveis independentes, o pH e a força iônica (em termos de concentração do sal NaCl), sobre as seguintes variáveis respostas da etapa de extração: concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração de polifenóis, concentração de proteínas totais e taxa de filtração. Os ensaios realizados e os valores codificados e decodificados das variáveis estão apresentados na Tabela 3.3. Um modelo polinomial quadrático do tipo da equação 3.2 foi ajustado para cada uma das respostas. Os parâmetros não significativos foram retirados do

modelo e adicionados à falta de ajuste.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1 x_2 \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde Y representa a variável resposta ou dependente; x_1 e x_2 representam os níveis codificados das variáveis independentes; β_0 é o coeficiente que representa a média; β_1 e β_2 são os coeficientes dos termos lineares; β_{11} e β_{22} são coeficientes dos termos quadráticos e β_{12} é o coeficiente do termo de interação.

Tabela 3.3. Ensaios do planejamento experimental fatorial completo da extração aquosa utilizando variedades de milho comerciais e milho transgênico.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis descodificadas	
	pH	NaCl	pH	NaCl (mM)
1	+1	+1	9,0	300
2	+1	-1	9,0	100
3	-1	+1	4,0	300
4	-1	-1	4,0	100
5	0	0	6,5	200
6	0	0	6,5	200
7	0	0	6,5	200
8	+1,41	0	10,0	200
9	-1,41	0	3,0	200
10	0	+1,41	6,5	340
11	0	-1,41	6,5	60

3.2.2.5. Planejamento experimental da avaliação das variáveis operacionais na extração de pró-insulina do milho transgênico

O estudo do efeito das variáveis operacionais na extração da pró-insulina (metodologia descrita no item 3.2.1.3 e resultados apresentados no Capítulo 7) foi realizado segundo um planejamento fatorial completo (2⁴ ensaios mais 3 pontos centrais) envolvendo quatro variáveis independentes — o tempo, a temperatura, a velocidade de agitação e a razão volume-massa — sobre as seguintes variáveis respostas da etapa de extração: concentração de pró-

insulina humana, concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração de polifenóis e concentração de proteínas totais. Realizou-se um planejamento de extração para o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM e um outro para a solução de etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. Os ensaios realizados e os valores decodificados de cada nível estão apresentados na Tabela 3.4. Os valores para as diferentes variáveis selecionadas foram baseados em experimentos preliminares e também em dados existentes em literatura. Um modelo polinomial de primeira ordem, do tipo da equação 3.3, foi ajustado para cada uma das respostas. Os parâmetros não significativos foram retirados do modelo e adicionados à falta de ajuste.

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{12}X_1 X_2 + \beta_{13}X_1 X_3 + \beta_{14}X_1 X_4 + \beta_{23}X_2 X_3 + \beta_{24}X_2 X_4 + \beta_{34}X_3 X_4 \quad \text{Equação 3.3}$$

onde Y representa a variável resposta ou dependente; x_1 , x_2 , x_3 e x_4 , representam os níveis codificados das variáveis independentes; β_0 é o coeficiente que representa a média; β_1 , β_2 , β_3 e β_4 são os coeficientes dos termos lineares e β_{12} , β_{13} , β_{14} , β_{23} , β_{24} e β_{34} são coeficientes dos termos de interação.

3.2.2.6. Planejamento experimental da otimização da extração de pró-insulina recombinante

Os experimentos visando à otimização da extração de pró-insulina foram realizados segundo um planejamento fatorial completo (2^2 ensaios, 4 outros nos pontos axiais e 3 ensaios no ponto central) envolvendo duas variáveis independentes, a razão volume-massa e a temperatura, sobre as seguintes variáveis respostas da etapa de extração: concentração de pró-insulina humana recombinante, concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração de polifenóis, concentração de proteínas totais. Os ensaios realizados e os valores decodificados de cada nível utilizado estão apresentados na Tabela 3.5. Um modelo polinomial quadrático do tipo da equação 3.2 foi ajustado para cada uma das respostas. Os

parâmetros não significativos foram retirados do modelo e adicionados à falta de ajuste.

Tabela 3.4. Ensaios do planejamento experimental fatorial 2^4 completo da extração de pró-insulina da farinha de milho transgênico.

Ensaio	Rotação	Rotação (rpm)	Razão v:m	Razão v:m (ml/g)	Tempera- tura	Tempera- tura (°C)	Tempo	Tempo (min)
1	-1	300	-1	5:1	-1	4	-1	60
2	+1	700	-1	5:1	-1	4	-1	60
3	-1	300	+1	10:1	-1	4	-1	60
4	+1	700	+1	10:1	-1	4	-1	60
5	-1	300	-1	5:1	+1	40	-1	60
6	+1	700	-1	5:1	+1	40	-1	60
7	-1	300	+1	10:1	+1	40	-1	60
8	+1	700	+1	10:1	+1	40	-1	60
9	-1	300	-1	5:1	-1	4	+1	180
10	+1	700	-1	5:1	-1	4	+1	180
11	-1	300	+1	10:1	-1	4	+1	180
12	+1	700	+1	10:1	-1	4	+1	180
13	-1	300	-1	5:1	+1	40	+1	180
14	+1	700	-1	5:1	+1	40	+1	180
15	-1	300	+1	10:1	+1	40	+1	180
16	+1	700	+1	10:1	+1	40	+1	180
17	0	500	0	7,5:1	0	22	0	120
18	0	500	0	7,5:1	0	22	0	120
19	0	500	0	7,5:1	0	22	0	120

Tabela 3.5. Ensaios do planejamento experimental fatorial completo.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
	Temperatura	Razão v:m	Temperatura (°C)	Razão v:m (ml/g)
1	+1	+1	35	9:1
2	+1	-1	35	5:1
3	-1	+1	15	9:1
4	-1	-1	15	5:1
5	0	0	25	7:1
6	0	0	25	7:1
7	0	0	25	7:1
8	+1,41	0	40	7:1
9	-1,41	0	10	7:1
10	0	+1,41	25	10:1
11	0	-1,41	25	4:1

3.2.3. Metodologia analítica

3.2.3.1. Determinação da taxa de filtração

As suspensões das extrações das diferentes variedades de milho foram decantadas por 5 min após a etapa de extração. O volume de aproximadamente 50 ml localizado na parte superior do béquero de 250 ml foi filtrado em um sistema de filtração do tipo funil de Büchner (10 cm de diâmetro) utilizando uma membrana de filtro com um diâmetro de poro de 3 μ m (Inlab, Brasil). O funil estava conectado a uma proveta e mediu-se o tempo necessário para filtrar um mesmo volume de extrato em intervalos de 5,0 ml.

3.2.3.2. Concentração de proteína total

Proteína total em solução foi determinada através do método de azul de coomassie, segundo Bradford (1976). Albumina de soro bovino (Sigma, EUA) foi utilizada como referência para a obtenção de uma curva padrão. O método baseia-se na reação da proteína com um corante (coomassie), em meio ácido, formando um complexo de coloração azul, que pode ser quantificado através da

leitura da absorbância a 595 nm. A metodologia consiste em misturar 1,0 ml de solução de azul de coomassie (preparada segundo Bradford, 1976) a 20 µl de amostra ou tampão (solução de referência – branco). Agita-se as soluções em vortex e, após 10 min, realiza-se a medida da absorbância das soluções a 595 nm.

3.2.3.3. Concentração de carboidratos

Concentrações de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico) como descrito por Miller *et al.* (1959), que se baseia na reação de óxido-redução da glicose pelo DNS. As curvas de calibração foram feitas com glicose e sacarose da Synth (Brasil). A sensibilidade de detecção deste método é de 0,1 a 1,0 mg/ml de açúcares redutores.

O protocolo do método consiste em adicionar 0,5 ml da amostra (convenientemente diluída) a 0,5 ml de solução do reagente DNS e aquecer a 100°C durante 5 min. Em seguida, resfriar a amostra em banho de gelo e adicionar 8,0 ml de solução de tartarato de sódio e potássio 54 mM. Por fim, medir a absorbância a 540 nm. A concentração de AR é então determinada pela curva padrão de glicose. O procedimento para a determinação de ART possui uma etapa prévia adicional ao procedimento de AR, que é a etapa de hidrólise dos açúcares da amostra. Para tal, adiciona-se 2,0 ml de HCl 2,0 N a 2,0 ml da amostra e aquece-se a 100°C por 5 min. Após o resfriamento em banho de gelo, adiciona-se 2,0 ml de NaOH 2,0 N. A partir daí, determina-se o teor de AR como descrito anteriormente, porém utilizando uma curva padrão de sacarose, cujas soluções de concentrações conhecidas são também previamente hidrolisadas por HCl.

3.2.3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na condição redutora desnaturante (SDS-PAGE) foram realizadas de acordo com protocolo descrito

por Laemmli (1970), utilizando géis a 15%. A voltagem utilizada foi de 120 V e o volume de amostra carregada variou entre 5 a 20 μ l. O procedimento de coloração foi realizado com nitrato de prata segundo protocolo descrito por Morrysey (1981) e também por azul de comassie.

3.2.3.5. Conteúdo de óleo

A concentração de óleo das farinhas de endosperma do milho foi quantificada por extração com hexano em aparelho do tipo Soxhlet (Determinador de lipídeos Q-308G22, Químis, Brasil). Basicamente, o procedimento utilizado consistiu em pesar 7,0 g da farinha de milho, envolver esta amostra em papel de filtro e acomodar em um cilindro de celulose. A partir do momento que o solvente entrou em ebulição, imergiu-se o cilindro no solvente, deixando-se gotejar o solvente sobre a amostra durante 30 min. Decorrido o tempo de gotejamento, o cilindro foi levantado e o gotejamento foi mantido por mais 15 min. Depois da recuperação do solvente, o copo de fervura contendo o óleo foi levado para a secagem em estufa a 70 °C durante 15 min. Após o resfriamento, o copo de fervura, previamente tarado, foi pesado e o conteúdo de óleo determinado.

3.2.3.6. Concentração de compostos fenólicos

Polifenóis em solução foram quantificados através do método colorimétrico azul da Prússia proposto por Price e Butler (1977). A base química da metodologia é a redução pelos grupos hidroxi-fenólicos de íons Fe^{+3} a Fe^{+2} , os quais são complexados com $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ para produzir uma solução de coloração azul. O procedimento da análise consistiu em adicionar a 5,0 ml da amostra (diluída na proporção adequada) 250 μ l de solução de FeCl_3 0,1M (preparada em solução de HCl 0,1 N) e 250 μ l de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,1 M. Após 10 min da adição do último reagente, fez-se a leitura da absorbância da amostra a 720 nm. A concentração de compostos fenólicos foi então determinada pela curva padrão utilizando D-Catequina (Sigma, EUA).

3.2.3.7. ELISA quantitativo específico para pró-insulina humana

A quantificação de pró-insulina nos extratos foram realizadas através de ensaios tipo ELISA segundo a técnica de sanduíche com dois anticorpos utilizando um kit ELISA comercial específico para a detecção de pró-insulina humana total (DakoCytomation, Inglaterra). As análises foram realizadas de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante, que primeiramente, consistiu em adicionar 50 µl da amostra nos poços da placa, em duplicata, incluindo os padrões fornecidos, haja vista que os poços da placa são recobertos com anticorpo monoclonal anti-pró-insulina. Em seguida, adicionou-se 100 µl do tampão de amostra e deixou-se a placa em incubação durante 1h, sob agitação, a temperatura ambiente. Lavou-se quatro vezes os poços com o tampão de lavagem e adicionou-se 100 µl da solução contendo o anticorpo secundário anti-pró-insulina conjugado à enzima fosfatase alcalina e deixou-se a placa em incubação durante 1h, nas mesmas condições anteriores. Lavou-se novamente quatro vezes a placa com o tampão de lavagem e adicionou-se 100 µl do substrato contendo tampão dietalonamina. Incubou-se por 20 min e em seguida adicionou-se 100 µl da solução amplificadora. Incubou-se por 10 minutos e adicionou-se 100 µl da solução para interromper a reação (ácido sulfúrico). Finalmente a absorbância a 490 nm foi medida em uma leitora de micro placas da marca Multiskan II MS (Finlândia). A sensibilidade de detecção do método é da ordem de picomoles por litro.

3.2.3.8. Western blot

A análise de *Western Blot* foi realizada segundo a metodologia apresentada por Mazen *et al.* (1989) na qual ocorre o reconhecimento da substância de interesse por anticorpo específico, permitindo a sua detecção em concentrações baixas, da ordem de nanogramas.

O protocolo deste experimento consistiu em submeter as amostras a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (SDS-PAGE). As proteínas fracionadas foram então transferidas para uma membrana de Nylon®

com tamanho de poro de 0,22 μm . Utilizou-se o aparelho de transferência semi-seco Multiphor II (LKB-Pharmacia, Suécia) e como tampão de transferência o tampão Tris-HCl 125 mM contendo 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 20% de metanol. A transferência foi realizada por 2h a 0,8 mA/cm². O bloqueio da membrana foi realizado mantendo a membrana em agitação por 2h a temperatura ambiente em tampão TBS (tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 com 150 mM de NaCl) contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,05% de Tween-20. Em seguida, fez-se a incubação da membrana com o anticorpo de camundongo contra pró-insulina diluído 1:3000 em tampão TBS com 5% de leite desnatado. Lavou-se três vezes a membrana com TBS com 0,1% de Tween-20, a fim de remover proteínas e, principalmente, o excesso de anticorpo que não estivesse aderido especificamente a membrana. A seguir, fez-se a incubação com o segundo anticorpo, anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina, diluído 1:5000 em TBS com 5% de leite desnatado. Incubou-se a membrana por 5 min em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5 com 0,1 M de NaCl e, em seguida, incubou-se por mais 5 min neste mesmo tampão acrescido do substrato luminiscente diluído 1:1000. Por fim, fez-se a revelação da atividade de fosfatase através da exposição de filmes de raios-X à membrana envolta em filme de PVC.

Capítulo 4

Resultados e Discussões I

Comparação de diferentes variedades de milhos comerciais em relação a variáveis relevantes à RPB

No desenvolvimento de plantas de milho transgênicas para a produção de proteínas heterólogas, primeiramente utiliza-se uma variedade específica (cultivares que não são adequados para a produção em campo no Brasil) que permite a transformação genética, uma vez que variedades comerciais nacionais não são facilmente transformadas (Kemper *et al.*, 1996). A planta modificada geneticamente é então cruzada com a variedade comercial, para a obtenção de plantas contendo o gene responsável pela produção da proteína heteróloga e aptas à produção em larga escala. A escolha da variedade comercial da planta que atuará como biorreator na produção de proteínas heterólogas é de fundamental importância na viabilidade do processo, uma vez que esta escolha poderá influenciar diretamente as etapas de processo necessárias à purificação da biomolécula de interesse. Este processo de RPB é tido como uma etapa chave na produção de biofármacos, podendo representar mais de 80% dos custos de produção (Gomond *et al.*, 2004).

Segundo Menkhaus *et al.* (2004a), a variação que existe entre os componentes naturais das plantas oferece uma oportunidade para reduzir os custos do processo de RPB através da combinação certa entre a proteína recombinante e uma espécie que contenha componentes com propriedades físico-químicas diferentes. E apesar destes autores pressuporem que diferentes

variedades de uma mesma espécie de planta gerem poucas variações no processamento da proteína heteróloga, não há relatos na literatura sobre essa questão.

Neste capítulo, apresenta-se um estudo realizado com seis variedades de milhos comerciais, avaliadas como potenciais candidatas a biorreatores para a produção de proteínas heterólogas. Este estudo visou selecionar a variedade mais indicada dentro de algumas características relevantes ao processo de RPB. A avaliação foi feita com base nos extratos aquosos da farinha do endosperma das seis variedades, obtidos sob condições planejadas de acordo com um planejamento fatorial completo 2^2 do tipo estrela (descrito em 3.2.1.4).

O planejamento estatístico experimental foi usado para avaliar a influência de duas variáveis independentes, o pH e a força iônica (em termos da concentração do sal NaCl), sobre as seguintes variáveis respostas da etapa de extração: concentração de açúcares redutores (AR), concentração de açúcares redutores totais (ART), concentração de polifenóis, concentração de proteínas e taxa de filtração. O conteúdo de óleo na farinha do endosperma de cada variedade também foi quantificado.

A finalidade de se utilizar um planejamento experimental na etapa de extração foi buscar uma condição ótima de minimização dos componentes nativos do milho, considerados como impurezas, que podem prejudicar o processo de RPB. Carboidratos são fonte de energia e carbono em um eventual, e no caso indesejável, crescimento microbiano. Além de causar perdas de produto, os carboidratos são inconvenientes de altíssima relevância quando se tratar de produtos de aplicação farmacêutica. Compostos fenólicos foram analisados por serem indesejáveis uma vez que são desnaturantes de proteínas. A concentração de proteínas indicará o nível destas impurezas que são de grande relevância na RPB de produtos protéicos, pois sendo moléculas da mesma espécie que o produto de interesse, elas são geralmente as de mais difícil eliminação, por naturalmente apresentarem propriedades semelhantes. A determinação de taxa de filtração é uma maneira de inferir a influência destas

impurezas diretamente em, pelo menos, uma das operações unitárias. Já o óleo poderia ser emulsificado e, posteriormente, junto com carboidratos, causar problemas de deterioração de colunas cromatográficas, membranas e gerar baixas taxas de filtração.

Em Setembro de 2002, o FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulamentador de alimentos e medicamentos do governo dos Estados Unidos, disponibilizou uma primeira versão de algumas regras para regulamentar o uso de plantas como biorreatores, incluindo algumas considerações específicas relacionadas ao processo de RPB. Quanto à etapa de extração, é recomendado que haja uma concentração eficiente do produto de interesse de forma a minimizar as impurezas do processo. Além disso, como a extração envolve uma grande quantidade de material (biomassa vegetal) e solvente, não sendo viável manter todo o processo sob condições estéreis, recomenda-se minimizar todas as possíveis fontes de contaminação.

A escolha de avaliar um solvente aquoso na etapa de extração se deve, principalmente, ao fato de que a maior parte das proteínas presentes no endosperma do milho, as zeínas, são solúveis somente em solução alcoólica. Com isso, o uso da extração aquosa evitaria a presença desta classe de proteínas contaminantes no extrato, facilitando consideravelmente as etapas de RPB. Além disso, a maioria das proteínas heterólogas produzidas em plantas tem sido extraída em soluções aquosas, como exemplo podemos citar a aprotinina (Azzoni *et al.*, 2002), a β -glucuronidase (Kusnadi *et al.*, 1998a) e a tripsina (Woodard *et al.*, 2003).

Vale ressaltar que na aplicação das informações obtidas neste estudo utilizando milhos comerciais para a extração da proteína heteróloga expressa em milho transgênico, deve-se avaliar a estabilidade e a solubilidade da proteína de interesse para cada caso em particular, devendo haver um ajuste entre as variáveis envolvidas.

4.1. Concentração de açúcares redutores (AR)

A análise da concentração de carboidratos nos extratos foi realizada através da determinação da quantidade de AR, que incluem a glicose e a frutose, e dos ART que incluem também os oligossacarídeos, como a sacarose, e os polissacarídeos que sofreram a hidrólise ácida (descrita no item 4.2).

O planejamento experimental utilizado para avaliar a influência do pH e da força iônica (μ) sobre a concentração de AR na etapa de extração aquosa do endosperma de sementes de milho comerciais, bem como os resultados de concentração de AR obtidos, estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo para a concentração de AR nos extratos de endosperma dos milhos comerciais.

Ensaio	Fatores		Concentração de AR nos extratos (mg/ml)					
	pH	μ	<i>sh2</i> sintético	QPM BR451	<i>bt2</i> BR400	comum	QPM BR473	<i>su1</i> BR202
1	9,0	300	0,91	0,31	0,63	0,40	0,28	2,69
2	9,0	100	0,92	0,31	0,67	0,50	0,36	2,53
3	4,0	300	1,03	1,11	0,98	0,85	0,69	4,46
4	4,0	100	1,00	1,26	0,90	0,76	0,60	4,07
5	6,5	200	0,89	1,13	1,08	0,60	0,77	4,76
6	6,5	200	0,98	1,18	1,13	1,10	0,72	4,48
7	6,5	200	0,88	1,04	1,18	0,80	0,66	4,02
8	10,0	200	0,81	0,20	0,52	0,33	0,23	2,16
9	3,0	200	1,14	0,37	0,68	0,37	0,25	2,94
10	6,5	340	0,99	1,04	1,23	0,68	0,52	3,98
11	6,5	60	0,82	0,83	1,07	0,86	0,61	4,45

A concentração de AR nos extratos variou de 0,23 a 4,76 mg/ml, o que corresponde a 0,23 a 4,76% em termos de massa. Estes resultados estão de acordo com a literatura na qual se relata que o conteúdo dos açúcares simples glicose e frutose representam em torno de 0,60% da massa seca do milho, em

proporções aproximadamente iguais (Keruliuk *et al.*, 1995; Boyer e Shannon, 1987). Valores maiores de AR foram obtidos para a variedade de milho doce *su1* BR202.

A Tabela 4.2 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor *t* e o valor *p* para a concentração de AR nos extratos dos milhos comerciais. Somente o termo linear para o pH se mostrou estatisticamente significativo a 90% de confiança para o milho *sh2* sintético, enquanto que, para as outras cinco variedades de milho os termos linear e quadrático para o pH se mostraram estatisticamente significativos. O termo relativo à interação entre o pH e a força iônica não se mostrou significativo, ou seja, estatisticamente não há interação entre estas duas variáveis na extração de AR, para a faixa estudada.

Conclui-se que o pH exerce um efeito negativo sobre a extração de AR, ou seja, um incremento no valor do pH de 4,0 para 9,0 irá diminuir a extração de AR. Para todas as variedades de milho estudadas, a concentração de AR se mostrou mais dependente do pH do que da força iônica. Isto, porém, não significa que a força iônica não influencia a extração de AR, apenas permite dizer que o valor força iônica pode ser ajustado de forma a favorecer outras respostas de interesse.

A Tabela 4.3 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de AR dos milhos comerciais. Para todas as variedades de milho analisadas, o coeficiente de correlação e o teste *F*, a no mínimo 90% de confiança, se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. Os modelos obtidos para a concentração de AR em função do pH foram utilizados para a construção das curvas apresentadas na Figura 4.1.

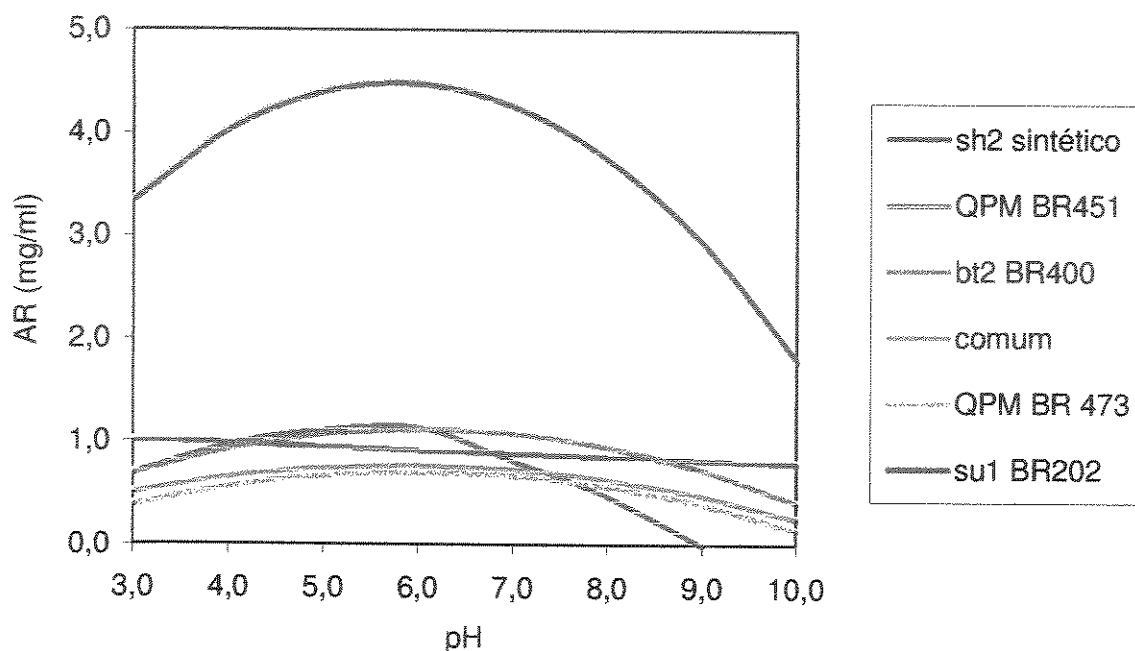
Tabela 4.2. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor de t e valor de p provenientes do planejamento fatorial completo para a concentração de AR nos extratos dos milhos comerciais.

	<i>sh2 sintético</i>				<i>QPM BR451</i>				<i>bt2 BR400</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,92**	0,03	28,82	0,001	1,12**	0,04	27,26	0,001	1,13*	0,03	39,14	0,001
pH (L)	-0,08**	0,02	-4,28	0,050	-0,25**	0,02	-9,92	0,010	-0,10*	0,02	-5,70	0,029
pH (Q)	0,04	0,02	1,53	0,266	-0,38**	0,03	-12,78	0,006	-0,28*	0,02	-13,54	0,005
μ (L)	0,03	0,02	1,67	0,236	0,02	0,02	0,73	0,540	0,03	0,02	1,88	0,200
μ (Q)	0,00	0,02	0,02	0,987	-0,06	0,03	-1,89	0,199	-0,01	0,02	-0,47	0,681
pHx μ	-0,01	0,03	-0,36	0,751	0,04	0,03	1,05	0,401	-0,03	0,03	-1,20	0,353
	<i>comum</i>				<i>QPM BR473</i>				<i>su1 BR202</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,78*	0,025	30,99	0,001	0,71*	0,032	22,01	0,002	4,42**	0,217	20,40	0,002
pH (L)	-0,09*	0,015	-6,22	0,025	-0,09*	0,020	-4,35	0,049	-0,55**	0,133	-4,17	0,053
pH (Q)	-0,19*	0,018	-10,80	0,008	-0,22*	0,024	-9,16	0,012	-0,92**	0,158	-5,84	0,028
μ (L)	-0,03	0,015	-2,15	0,165	-0,01	0,020	-0,67	0,570	-0,02	0,133	-0,12	0,918
μ (Q)	0,01	0,018	0,65	0,584	-0,06	0,024	-2,35	0,143	-0,09	0,158	-0,56	0,631
pHx μ	-0,05	0,022	-2,18	0,161	-0,04	0,028	-1,53	0,265	-0,06	0,188	-0,31	0,787

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

Tabela 4.3. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de AR.

Variedade	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
sh2 sintético	0,588	12,87	3,83
QPM BR451	0,774	13,73	4,41
bt2 BR400	0,919	45,12	10,12
Comum	0,779	14,07	3,15
QPM BR473	0,764	12,96	2,91
su1 BR202	0,866	25,81	8,29

**Figura 4.1.** Concentração de AR nos extratos como uma função do pH para as variedades de milhos comerciais.

As curvas da concentração de AR em função do pH apresentaram comportamento bastante similar. Os valores absolutos de concentração de AR extraído nos ensaios possuem a mesma ordem de grandeza para a maioria das sementes estudadas. Entretanto, a variedade *su1* BR202 se destacou com uma concentração de AR mais de seis vezes superior à obtida nas outras variedades.

Valores em torno do pH neutro favoreceram a extração de AR e desta forma, os valores de pH sugeridos para minimizar a extração de AR durante um

processo de RPB são os extremos de valores de pH. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa por Azzoni (2002), que avaliou a influência do pH e da força iônica isoladamente na extração de AR de uma farinha de milho transgênico. Segundo o autor, concentrações de AR foram menores em extrações realizadas com baixa força iônica e também quando o pH foi mantido em valores extremos.

Não foi observado nenhum destaque entre as variedades de milho analisadas quanto à seleção de uma variedade mais adequada para ser usada como um biorreator na produção de proteínas heterólogas, em termos de concentração de AR nos extratos. No entanto, seria desvantajoso usar a variedade *su1* BR202 haja vista que a concentração de AR nos extratos desta variedade foi superior.

4.2. Concentração de açúcares redutores totais (ART)

O planejamento experimental utilizado para avaliar a influência do pH e da força iônica sobre a concentração de ART na etapa de extração aquosa de sementes de milho comerciais, bem como os resultados de concentração de ART obtidos, estão apresentados na Tabela 4.4.

Os valores obtidos na Tabela 4.4 também correspondem à porcentagem de ART na massa da farinha de endosperma. Os conteúdos de ART nos extratos estiveram entre 0,89 e 3,67 mg/ml, exceto para a variedade *su1* cujas concentrações de ART foram de 16,79 a 22,78 mg/ml. Esses dados estão de acordo com as informações da literatura em que, segundo Boyer e Shannon (1987), o endosperma do milho comum possui em média 2% da massa seca em polissacarídeos solúveis em água, mas esse valor pode chegar a 35% nas variedades do tipo doce contendo o gene *su*. Como não foram utilizadas condições visando uma extração completa dos carboidratos solúveis, era de esperar obter valores menores do que os descritos na literatura.

Tabela 4.4. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo para a concentração de ART nos extratos de endosperma dos milhos comerciais.

Ensaio	Fatores		Concentração de ART nos extratos (mg/ml)					
	pH	μ	<i>sh2</i> sintético	QPM BR451	<i>bt2</i> BR400	comum	QPM BR473	<i>su1</i> BR202
1	9,0	300	3,18	0,89	3,61	1,04	1,21	19,95
2	9,0	100	3,04	0,96	3,56	1,06	1,18	19,26
3	4,0	300	2,95	1,38	3,43	1,36	1,56	16,79
4	4,0	100	2,99	1,58	3,42	1,42	1,49	17,30
5	6,5	200	2,83	1,59	3,55	1,76	1,62	21,08
6	6,5	200	2,82	1,52	3,57	1,61	1,55	21,25
7	6,5	200	2,81	1,39	3,58	1,34	1,42	17,86
8	10,0	200	3,16	0,89	3,54	1,01	1,21	20,30
9	3,0	200	2,74	0,89	3,18	1,00	1,14	22,78
10	6,5	340	2,76	1,20	3,67	1,21	1,28	22,12
11	6,5	60	2,72	1,29	3,57	1,43	1,44	18,38

A Tabela 4.5 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t e o valor p para a concentração de ART nos extratos dos milhos comerciais. Somente os termos linear e quadrático para o pH se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança na concentração de ART extraída das variedades *sh2* sintético, QPM BR451 e *bt2* BR400. Já para as variedades de milho comum e QPM BR473 somente o termo quadrático para o pH se mostrou estatisticamente significativo. Para a variedade *su1* BR202 nenhuma das variáveis influenciou significativamente a extração de ART. O termo relativo à interação entre o pH e a força iônica não se mostrou significativo, ou seja, estatisticamente não há interação entre estas duas variáveis na extração de ART das variedades de milho comerciais analisadas.

Tabela 4.5. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a concentração de ART nos extratos dos milhos comerciais.

	<i>sh2 sintético</i>				<i>QPM BR451</i>				<i>bt2 BR400</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(5)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(5)	p
Média	2,82**	0,077	36,650	0,000	1,50**	0,060	25,59	0,001	3,57*	0,021	171,03	0,000
pH (L)	0,11**	0,047	2,319	0,068	-0,14**	0,040	-3,87	0,061	0,10*	0,013	8,11	0,000
pH (Q)	0,11**	0,056	2,028	0,098	-0,27**	0,040	-6,35	0,024	-0,10*	0,015	-6,56	0,001
μ (L)	0,02	0,047	0,415	0,695	-0,05	0,030	-1,38	0,300	0,03	0,013	1,97	0,106
μ (Q)	0,01	0,056	0,156	0,882	-0,09	0,040	-2,19	0,159	0,03	0,015	2,05	0,096
pHx μ	0,04	0,067	0,675	0,529	0,03	0,050	0,64	0,587	0,01	0,018	0,55	0,604
	<i>comum</i>				<i>QPM BR473</i>				<i>su1 BR202</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(5)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	1,32*	0,070	18,697	0,000	1,53*	0,059	25,990	0,001	20,06*	1,104	18,173	0,003
pH (L)	-0,08	0,043	-1,930	0,111	-0,07	0,036	-1,958	0,189	0,20	0,676	0,298	0,794
pH (Q)	-0,14*	0,051	-2,756	0,040	-0,15*	0,043	-3,623	0,068	0,09	0,805	0,121	0,915
μ (L)	-0,05	0,043	-1,134	0,308	-0,02	0,036	-0,448	0,698	0,68	0,676	1,011	0,418
μ (Q)	0,02	0,051	0,313	0,767	-0,06	0,043	-1,468	0,280	-0,55	0,805	-0,682	0,565
pHx μ	0,01	0,061	0,164	0,876	-0,01	0,051	-0,143	0,899	0,30	0,956	0,313	0,784

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

Pôde-se observar que os efeitos das variáveis pH e força iônica sobre a extração de ART das variedades do tipo doce (*sh2* sintético, *bt2* BR400 e *su1* BR202) foram inversos aos das outras variedades, ou seja, enquanto o pH e a força iônica exerceu um efeito positivo na extração de ART para variedades do tipo doce, esses efeitos foram negativos para as outras variedades. Portanto, a extração de ART do milho poderá depender do tipo de semente utilizada, sendo que isto, possivelmente, está relacionado aos diferentes carboidratos predominantes em cada variedade de milho.

A Tabela 4.6 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de ART nos extratos dos milhos comerciais. Para o milho *sh2* sintético, QPM BR451 e *bt2* BR400 o coeficiente de correlação e o teste F, a no mínimo 90% de confiança, se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. Para as variedades de milho comum, QPM BR473 e *su1* BR202 não foi possível o desenvolvimento de um modelo para a extração de ART. Os modelos obtidos foram utilizados para a construção das curvas da Figura 4.2.

Tabela 4.6. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de ART.

Variedade	R	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}
<i>sh2</i> sintético	0,631	6,85	2,20
QPM BR451	0,645	7,26	2,33
<i>bt2</i> BR400	0,906	37,55	8,42
Comum	0,466	7,88	1,54
QPM BR473	0,381	5,54	1,65
<i>su1</i> BR202	0,165	0,20	0,06

Pode-se observar que as variedades do tipo doce (*sh2* sintético, *bt2* BR400 e *su1* BR202) possuem concentrações de ART maiores do que as outras variedades. Isto se deve a mutações em genes da biossíntese de amido, que conferem a característica doce ao milho, elevando a quantidade de sacarose nestas variedades. A sacarose é o principal dissacarídeo da semente de milho e a sua quantidade pode atingir até 4 a 8% da massa seca do milho na fase inicial de desenvolvimento. Entre os milhos do tipo doce, as variedades que contém o gene sugary (*su*) possuem uma quantidade de sacarose até duas vezes

a mais que a do milho comum e variedades com o gene *sh2* chegam a ter de três a quatro vezes mais sacarose (Boyer e Shannon, 1987).

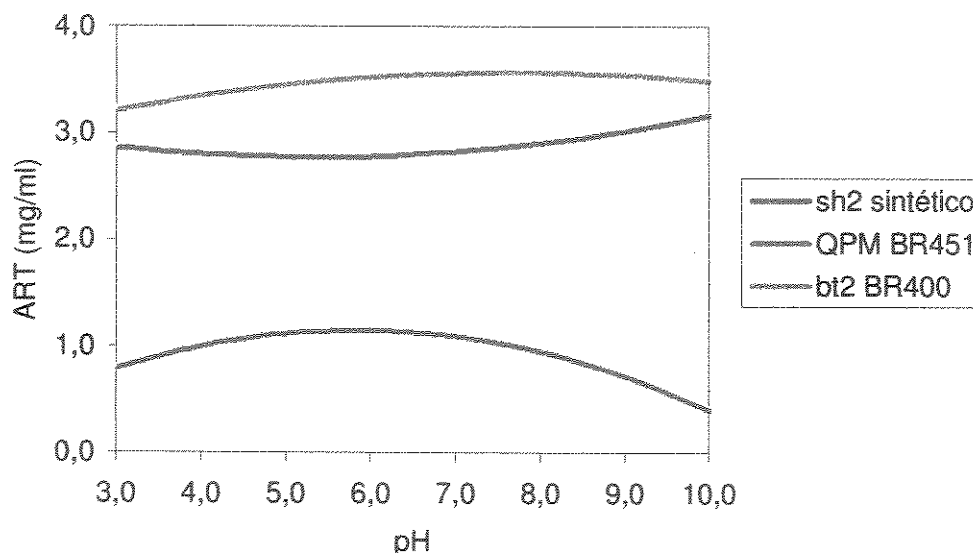


Figura 4.2. Concentração de ART nos extratos como uma função do pH para as variedades de milho *sh2* sintético, QPM BR451 e *bt2* BR400.

A extração de ART se mostrou mais dependente do pH em relação à força iônica para todas as variedades de milho analisadas, sendo que os efeitos destas variáveis são baixos quando comparados com a extração de AR (especialmente o efeito do pH), indicando pouca influência das variáveis estudadas na extração de ART. Estes resultados corroboram com os de Azzoni (2002) para a extração de ART de sementes de milho transgênico.

Entre as variedades de milho analisadas, em termos de concentração de ART nos extratos, seria desvantajoso usar as variedades de milho doce, principalmente a variedade *su1* BR202, haja vista que a concentração de ART nos extratos desta variedade foi bastante superior.

4.3. Concentração de polifenóis

Uma das principais dificuldades encontradas no desenvolvimento do processo de RPB de proteínas recombinantes expressas em plantas é a remoção

dos seus metabólitos secundários. Os compostos fenólicos estão entre os metabólitos secundários mais ativos quimicamente, podendo interagir com proteínas, desencadeando um processo de agregação (Brovko e Zagranichnaya, 1998). Portanto, uma condição ideal de extração de proteínas recombinantes é aquela na qual a co-extração de compostos fenólicos seja minimizada.

O planejamento experimental utilizado para avaliar a influência do pH e da força iônica sobre a concentração de polifenóis na etapa de extração aquosa das sementes de milho comerciais, bem como os resultados de concentração de polifenóis obtidos, estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo para a concentração de polifenóis nos extratos de endosperma dos milhos comerciais.

Ensaio	Fatores		Concentração de polifenóis nos extratos (mM)					
	pH	μ	<i>sh2</i> sintético	QPM BR451	<i>bt2</i> BR400	comum	QPM BR473	<i>su1</i> BR202
1	9,0	300	0,15	0,04	0,18	0,04	0,06	0,12
2	9,0	100	0,34	0,08	0,26	0,10	0,09	0,19
3	4,0	300	0,06	0,02	0,07	0,02	0,03	0,09
4	4,0	100	0,11	0,02	0,10	0,04	0,06	0,09
5	6,5	200	0,08	0,04	0,09	0,05	0,05	0,12
6	6,5	200	0,09	0,05	0,09	0,05	0,05	0,13
7	6,5	200	0,09	0,04	0,08	0,04	0,04	0,09
8	10,0	200	0,23	0,07	0,25	0,07	0,09	0,21
9	3,0	200	0,10	0,03	0,08	0,05	0,05	0,13
10	6,5	340	0,08	0,02	0,07	0,02	0,03	0,11
11	6,5	60	0,09	0,06	0,13	0,06	0,06	0,13

O menor valor de concentração de polifenóis nos extratos foi de 0,02 mM (em termos de D-catequina) ou 0,05 mg/g de farinha do endosperma e o maior valor foi de 0,34 mM ou 0,92 mg/g. Este valor máximo é da mesma ordem de grandeza do valor descrito por Sosulski *et al.* (1982) para o conteúdo de polifenóis no grão de milho, 0,31 mg/g de massa seca. Segundo estes autores,

a maioria dos ácidos fenólicos dos cereais está ligada a resíduos insolúveis, podendo ser solubilizados durante a extração aquosa em condições alcalinas. Os resultados aqui apresentados corroboram esta informação uma vez que maiores concentrações de polifenóis foram obtidas nos ensaios com pH alcalino.

A Tabela 4.8 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor *t* e o valor *p* para a concentração de polifenóis nos extratos dos milhos comerciais. Todos os termos se mostraram estatisticamente significativos na extração de polifenóis para as variedades de milho *sh2* sintético e *bt2* BR400, a 90% de confiança. Inclusive o termo relativo à interação entre o pH e a força iônica também se mostrou significativo, ou seja, estatisticamente há interação entre estas duas variáveis na extração de polifenóis destas variedades de milho. Para as sementes de milho QPM BR451 e para o milho comum somente os termos lineares para o pH e a força iônica e o termo relativo à interação entre o pH e a força iônica se mostraram significativos a 90% de confiança. Já para a variedade QPM BR473, os termos linear e quadrático para o pH e o termo linear para a força iônica se mostraram significativos a 95% de confiança, enquanto que para a variedade *su1* BR202, somente o termo linear para o pH se mostrou significativo na extração de polifenóis.

Menores concentrações de polifenóis foram obtidas para baixos valores de pH, porém elevadas concentrações de sal também minimizam a extração de polifenóis, mesmo na faixa de pH mais alcalino, mostrando a interação entre as variáveis estudadas. Segundo Price e Butler (1977), que estudaram a determinação de taninos em sementes de sorgo (cereal da mesma família do milho), a solubilização de polifenóis de elevada massa molecular é dificultada pela presença de sal.

A Tabela 4.9 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de polifenóis extraída dos milhos comerciais. O coeficiente de correlação e o teste *F* a 90% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição dos modelos, com exceção da variedade *su1* BR202.

Tabela 4.8. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a concentração de polifenóis nos extratos dos milhos comerciais.

	<i>sh2 sintético</i>				<i>QPM BR451</i>				<i>bt2 BR400</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,086**	0,003	26,00	0,001	0,043**	0,003	13,00	0,006	0,086*	0,003	26,00	0,001
pH (L)	0,062**	0,002	30,85	0,001	0,017**	0,002	8,36	0,014	0,064*	0,002	31,26	0,001
pH (Q)	0,049**	0,002	20,24	0,002	0,002	0,002	0,86	0,481	0,044*	0,002	18,18	0,003
μ (L)	-0,032**	0,002	-15,56	0,004	-0,012**	0,002	-5,91	0,027	-0,024*	0,002	-11,93	0,007
μ (Q)	0,009**	0,002	3,77	0,063	-0,003	0,002	-1,20	0,353	-0,011*	0,002	4,80	0,041
pHx μ	-0,035**	0,003	-12,12	0,007	-0,010**	0,003	3,46	0,074	-0,012*	0,003	-4,33	0,049
	<i>comum</i>				<i>QPM BR473</i>				<i>su1 BR202</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,047**	0,003	14,00	0,005	0,049*	0,003	15,309	0,004	0,114**	0,012	9,328	0,011
pH (L)	0,014**	0,002	6,63	0,022	0,012*	0,002	6,204	0,025	0,031**	0,007	4,108	0,054
pH (Q)	0,007	0,002	2,74	0,111	0,010*	0,002	4,180	0,053	0,021	0,009	2,416	0,137
μ (L)	-0,017**	0,002	-8,36	0,014	-0,012*	0,002	-6,213	0,025	-0,012	0,007	-1,557	0,260
μ (Q)	-0,003	0,002	-1,37	0,304	-0,001	0,002	-0,602	0,608	-0,003	0,009	-0,371	0,746
pHx μ	-0,010**	0,003	-3,46	0,074	-0,001	0,003	-0,431	0,708	-0,015	0,011	-1,385	0,300

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

Os modelos obtidos para a concentração de polifenóis extraída das farinhas de milho foram utilizados para a construção dos gráficos de superfície de resposta (Figura 4.3).

Tabela 4.9. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de polifenóis.

Variedade	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
<i>sh2</i> sintético	0,830	4,89	1,42
QPM BR451	0,924	28,33	9,23
<i>bt2</i> BR400	0,979	46,41	9,19
Comum	0,824	10,95	3,57
QPM BR473	0,976	40,40	8,00
<i>su1</i> BR202	0,512	9,46	2,82

O comportamento observado na extração de polifenóis para as todas as variedades de milho estudadas se mostrou bastante similar, ainda que em valores absolutos os extratos das farinhas dos milhos do tipo doce (*sh2* sintético, *bt2* BR400 e *su1* BR202) apresentaram concentrações de polifenóis superiores às das outras variedades, em aproximadamente uma ordem de grandeza para a maioria das condições estudadas.

As vantagens da utilização do planejamento fatorial na etapa de extração puderam ser observadas com a constatação da interação entre o pH e a força iônica na extração de polifenóis. Para Azzoni (2002), que estudou o efeito destas variáveis isoladamente através de experimentos univariáveis, não foi possível chegar a tais conclusões. O autor estudou o efeito da força iônica em uma solução de pH em torno de 6 e não obteve variações na extração de polifenóis de um milho transgênico. Porém, em termos gerais, os resultados aqui obtidos tiveram boa concordância para a faixa de valores estudada por esse autor.

A condição ótima para minimizar a extração de polifenóis é utilizar um pH ácido ou então utilizar elevada força iônica. Deve-se ressaltar que mesmo os valores mais elevados de concentração de polifenóis obtidos nos ensaios são considerados baixos para ocasionar a perda de proteínas por precipitação que, segundo Maa e Hsu (1996), são da ordem de 1 a 5 mg/ml.

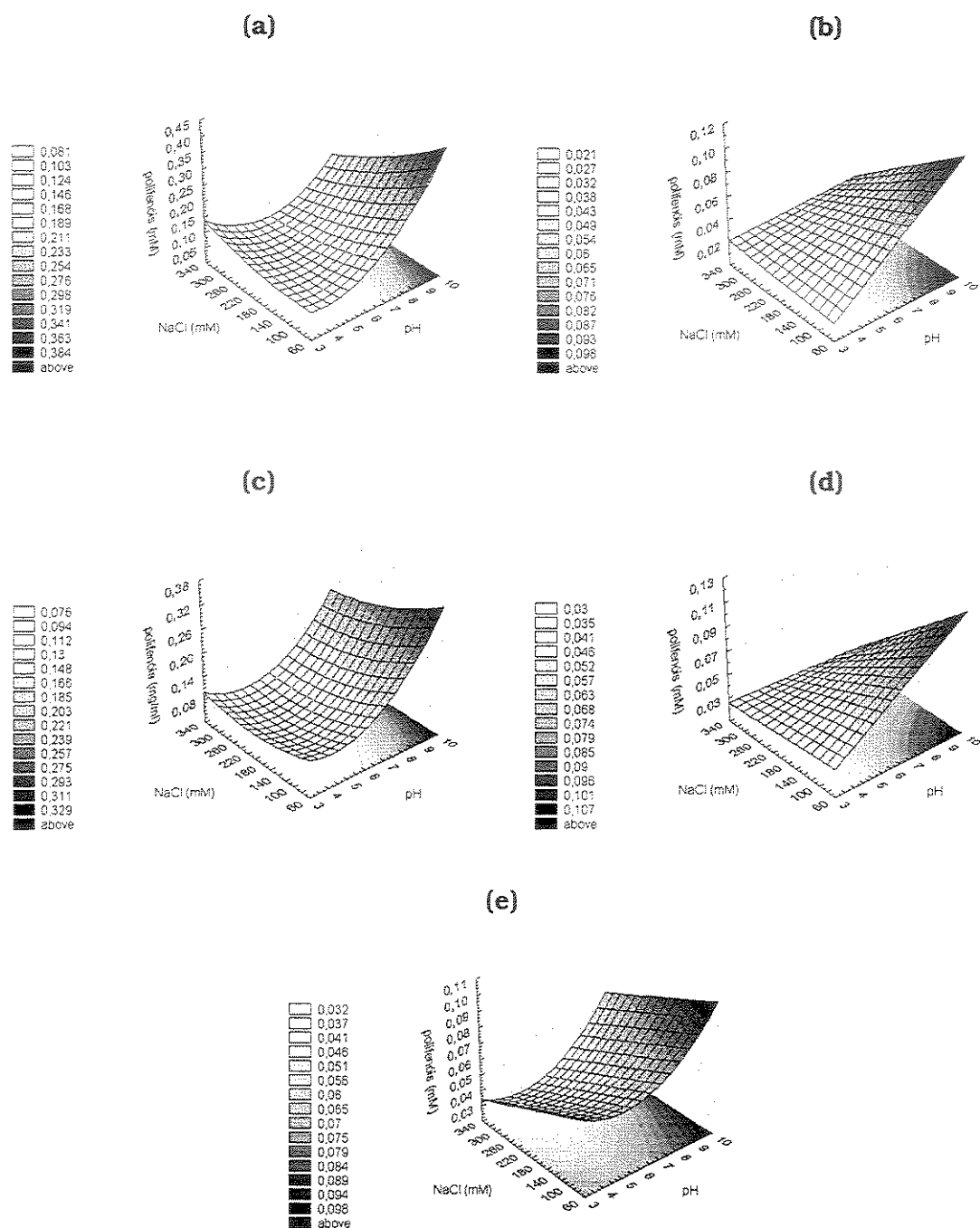


Figura 4.3. Superfície de resposta para a concentração de polifenóis nos extratos como uma função do pH e da força iônica para a variedade de milho *sh2* sintético (a), QPM BR451 (b), *bt2* BR400 (c), comum (d) e QPM BR473 (e).

Aparentemente, a extração de polifenóis das sementes de milho não depende de outros componentes presentes especificamente nas diferentes variedades de milho, pois o comportamento observado para todas as sementes estudadas foi bastante similar. Entretanto, observou-se a diferença em termos de valores absolutos de concentração de polifenóis extraída das sementes em torno de uma ordem de grandeza. Ainda assim, apesar da concentração de polifenóis nos extratos das variedades de milho doce ter sido superior em todas as condições experimentais utilizadas, esses valores não chegam a influenciar na escolha de uma variedade.

4.4. Concentração de proteínas

A quantidade de proteínas presente no endosperma do milho depende da variedade e das condições agronômicas, variando de 8 a 9% (Wilson, 1987). Segundo Wall e Paulis (1978) a eficiência da extração de proteínas do milho utilizando soluções aquosas é dependente do pH, da força iônica, da composição da solução extratora e da temperatura. Neste estudo de extração de endosperma de diferentes variedades de milho, realizado com solução aquosa e variando o pH e a força iônica, esperava-se solubilizar apenas as albuminas e globulinas, podendo também solubilizar as glutelinas em alguns dos ensaios devido ao pH alcalino.

O planejamento experimental utilizado para avaliar a influência do pH e da força iônica sobre a concentração de proteínas na etapa de extração aquosa, bem como os resultados de concentração de proteína, estão apresentados na Tabela 4.10. Os valores descritos nesta tabela também correspondem à porcentagem de proteínas na massa da farinha de endosperma.

Tabela 4.10. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo para a concentração de proteínas nos extratos de endosperma dos milhos comerciais.

Ensaio	Fatores		Concentração de proteínas nos extratos (mg/ml)					
	pH	μ	<i>sh2</i> sintético	QPM BR451	<i>bt2</i> BR400	comum	QPM BR473	<i>su1</i> BR202
1	9,0	300	3,20	0,62	2,80	0,54	0,62	6,54
2	9,0	100	2,66	0,68	3,03	0,50	0,64	2,47
3	4,0	300	0,40	0,23	0,39	0,17	0,29	5,45
4	4,0	100	0,33	0,20	0,34	0,14	0,22	0,21
5	6,5	200	0,85	0,52	0,72	0,35	0,50	0,95
6	6,5	200	0,87	0,49	0,69	0,38	0,61	1,11
7	6,5	200	0,84	0,48	0,76	0,35	0,57	1,03
8	10,0	200	3,29	0,64	3,26	0,48	0,73	2,45
9	3,0	200	0,40	0,29	0,38	0,11	0,29	0,51
10	6,5	340	0,81	0,52	0,69	0,39	0,56	0,98
11	6,5	60	0,75	0,41	0,62	0,32	0,53	0,85

Esses dados corroboram as informações de Wall e Paulis (1985), de que as albuminas e globulinas presentes no endosperma representam 3,5 e 2,5%, respectivamente, das proteínas do endosperma do milho comum. Como a maioria das proteínas do endosperma correspondem às zeínas, dos 8% da massa do endosperma que são proteínas, apenas 0,48% (6% do total de 8% da massa) correspondem as albuminas e globulinas. Valores nesta ordem foram obtidos para a maioria dos ensaios realizados com os milhos QPM e comum. Já para as variedades de milho doce, valores superiores foram observados, chegando a ser uma ordem de grandeza maiores para algumas das condições estudadas.

A Tabela 4.11 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t e o valor p para a concentração de proteína total. Para as variedades *sh2* sintético e *su1* BR202 todos os termos se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança na extração de proteínas. Inclusive o termo relativo à interação entre o pH e a força iônica também se mostrou significativo,

Tabela 4.1.1. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a concentração de proteínas nos extratos dos milhos comerciais.

	<i>sh2 sintético</i>				<i>QPM BR451</i>				<i>bt2 BR400</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,85*	0,009	96,76	0,0001	0,49*	0,012	41,32	0,001	0,23**	0,203	35,675	0,001
pH (L)	1,15*	0,005	213,33	0,0000	0,17*	0,007	23,18	0,001	1,15**	0,242	92,347	0,000
pH (Q)	0,58*	0,006	90,16	0,0001	-0,02	0,009	-2,73	0,112	0,65**	0,015	43,912	0,001
μ (L)	0,09*	0,005	16,08	0,0038	0,01	0,007	2,13	0,167	-0,10	0,012	-0,816	0,500
μ (Q)	0,05*	0,006	7,32	0,0181	-0,02	0,009	-2,73	0,112	0,66**	0,015	4,497	0,046
pHx μ	0,12*	0,008	15,38	0,0042	-0,02	0,010	-2,16	0,163	-0,70**	0,018	-3,986	0,058
	<i>comum</i>				<i>QPM BR473</i>				<i>su1 BR202</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,36**	0,010	36,000	0,001	0,56*	0,031	17,836	0,003	1,03*	0,047	21,861	0,002
pH (L)	0,16**	0,006	25,582	0,002	0,17*	0,019	8,915	0,012	0,76*	0,029	26,382	0,001
pH (Q)	-0,03**	0,007	-4,030	0,056	-0,05	0,023	-2,061	0,175	0,84*	0,034	24,489	0,002
μ (L)	0,02**	0,006	3,450	0,075	0,01	0,019	0,544	0,641	1,19*	0,029	41,063	0,001
μ (Q)	0,00	0,007	0,086	0,939	-0,03	0,023	-1,233	0,343	0,56*	0,034	16,230	0,004
pHx μ	0,00	0,009	0,289	0,800	-0,02	0,027	-0,755	0,529	-0,29*	0,041	-7,136	0,019

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

ou seja, estatisticamente, há interação entre estas duas variáveis. Para a variedade *bt2* BR400 todos os termos, com exceção do termo linear para a força iônica, se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. Para o milho comum os termos lineares para o pH e a força iônica e o termo quadrático para o pH se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. E finalmente, para os milhos QPM BR451 e QPM BR473 somente o termo linear para o pH se mostrou estatisticamente significativo a 95% de confiança.

O efeito positivo do pH é mais evidente para os milhos do tipo doce. Portanto, quando se deseja minimizar a extração de proteínas nativas (que no caso, estariam atuando como contaminantes no processo), o ideal seria evitar o uso de pH alcalino na etapa de extração. Balasubramaniam *et al.* (2003) mostrou que o pH do tampão utilizado na extração de proteínas do tabaco influenciou significativamente na concentração de proteínas no extrato, sendo que variando o pH de 3,0 a 9,0, o total de proteínas variou de 1,0 para 1,6 % da biomassa. Em um outro estudo de extração de proteínas, Azzoni *et al.* (2002) mostrou que a concentração de proteínas extraída de milho transgênico aumentou de 0,25% para 2,0% quando se variou o pH de 3,0 para 10,0.

Para aquelas variedades em que a interação entre o pH e a força iônica se mostrou significativa (variedades do tipo doce), a influência da força iônica foi mais pronunciada quando se utilizou pH mais alto, sendo que o efeito da força iônica se mostrou mais evidente para o milho *sul* BR202. Azzoni (2002) também constatou a influência da força iônica na extração de proteínas totais de sementes de milho transgênico, sendo que, quando a concentração de NaCl foi aumentada de zero para 300 mM, houve um aumento de 50% na extração das proteínas totais.

O efeito positivo da força iônica na extração de proteínas do milho se deve ao fato de que, quando se utiliza soluções salinas, além das albuminas, as globulinas também são solubilizadas. Segundo Wall e Paulis (1978) as

globulinas estão associadas por interações iônicas que são enfraquecidas na presença de sais, permitindo sua extração.

A Tabela 4.12 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de proteína total dos milhos comerciais. O coeficiente de correlação e o teste F a no mínimo 90% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição dos modelos. Somente para a variedade *su1* BR202, não foi possível a obtenção de um modelo para descrever a extração de proteínas como função do pH e da força iônica a partir da análise de variância. Os modelos obtidos para as outras cinco variedades (com a exclusão dos efeitos) para a concentração de proteína nos extratos foram utilizados para a construção das curvas da Figura 4.4.

Tabela 4.12. Análise de variância (ANOVA) para a concentração de proteínas.

Variedade	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
<i>sh2</i> sintético	0,699	32,19	6,37
QPM BR451	0,873	61,89	13,88
<i>bt2</i> BR400	0,965	41,62	13,09
Comum	0,969	74,99	24,43
QPM BR473	0,858	54,27	10,66
<i>su1</i> BR202	0,479	0,92	0,18

A análise da extração de proteínas do endosperma das sementes de milho nos leva a concluir que a melhor condição para minimizar a extração das proteínas nativas do milho, que poderiam comprometer o andamento de todo o processo de recuperação e purificação da proteína recombinante, é manter o pH e a força iônica em seus níveis inferiores durante a extração.

Em geral, a concentração de proteínas nos extratos obtidos utilizando as variedades de milho do tipo doce (*sh2* sintético, *bt2* BR400 e *su1* BR202) foi maior que nas demais. Isto significa que a quantidade de proteínas solúveis por unidade de massa nestas variedades é maior.

Se este comportamento se mantivesse também para a proteína heteróloga, seria vantajoso em termos de RPB utilizar uma variedade do tipo doce, uma vez que poderia se trabalhar com uma menor biomassa para o

mesmo rendimento. Entretanto, o conteúdo de proteína em uma variedade não pode ser determinante na escolha de um sistema de expressão. Stoger *et al.* (2002) testou diferentes espécies de plantas para a produção de anticorpos e constatou que, apesar da ervilha ser mais protéica do que o arroz, a quantidade de anticorpo por unidade de massa em ervilhas foi menor.

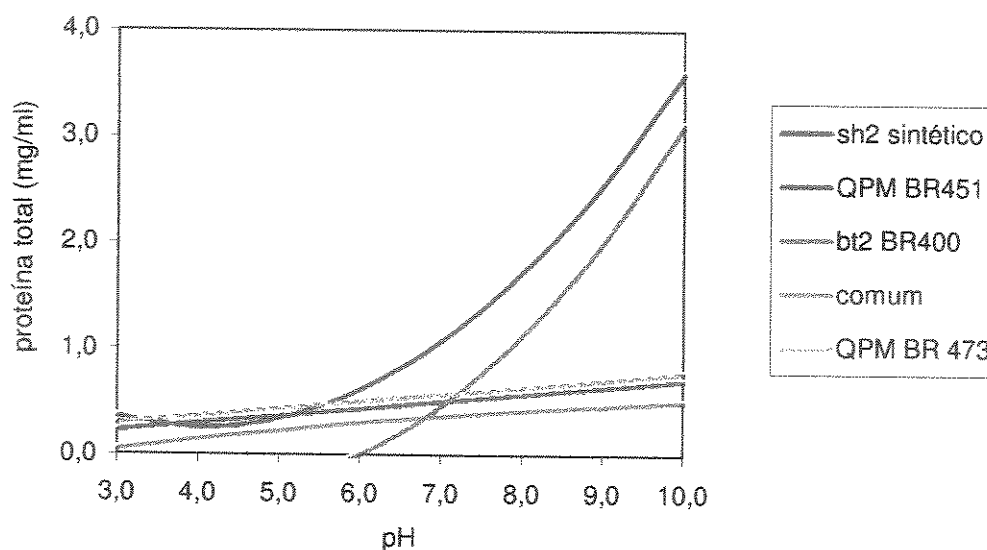


Figura 4.4. Concentração de proteínas totais nos extratos como uma função do pH para as variedades de milho comerciais.

Uma análise para indicar uma variedade de milho mais adequada à produção de proteínas heterólogas em termos de proteínas nativas é bastante complexa pois envolve diferentes pontos de vista. Uma variedade que produz um extrato com baixa complexidade protéica seria mais vantajoso em termos de RPB. Por outro lado, uma variedade que produz um extrato com elevada concentração de proteínas nativas pode ter uma maior potencialidade a produzir maiores concentrações da proteína heteróloga por unidade de massa.

Além da análise quantitativa das proteínas nativas do milho extraídas nos ensaios do planejamento experimental, também foi realizada uma análise

qualitativa, através de eletroforese SDS-PAGE, das amostras de cada ensaio da extração aquosa do endosperma dos milhos comerciais (Figuras 4.5 a 4.7). As amostras estavam todas congeladas e foram utilizadas sem diluição. A concentração do gel foi de 15% e a revelação foi feita com nitrato de prata.

Observou-se pouca diferença entre o perfil das bandas dos géis obtidos para as diferentes variedades de milho, corroborando o exemplo descrito por Wilson (1987), no qual o autor compara as bandas obtidas na extração de albuminas de um milho comum e de um milho *opaco-2* e conclui que a análise de SDS-PAGE não é adequada na identificação de variedades. Devido à alta heterogeneidade das proteínas nativas que podem ser encontradas nos extratos obtidos do milho, uma purificação completa baseada somente no tamanho ou carga da proteína é bastante difícil (Menkhaus *et al.*, 2004a).

Segundo Wilson (1987), as albuminas do endosperma do milho apresentam várias bandas em géis de SDS-PAGE e as globulinas apresentam menos bandas. A existência de várias bandas de albuminas se deve, entre outras proteínas, às diferentes enzimas envolvidas no desenvolvimento da semente.

Wall e Paulis (1978) investigaram a massa molecular das albuminas e globulinas por SDS-PAGE e encontraram componentes de massas moleculares variando de 12,0 a 62,0 kDa.

Pode-se observar nos géis das seis variedades uma banda correspondente à massa molecular de aproximadamente 14 kDa, em todas as condições experimentais utilizadas. Hojima *et al.* (1980) reporta a existência de inibidores da tripsina do milho (ITM) com massa molecular de 14,0 kDa (determinada por SDS-PAGE). Como estas proteínas são solúveis nas condições utilizadas nos ensaios de extração, supõe-se que as bandas que aparecem nesta massa sejam correspondentes ao ITM. Uma outra banda correspondente à massa molecular de aproximadamente 28 kDa também pôde ser observada na maioria dos géis, ficando mais evidente no gel da variedade *su1* BR202 (Figura 4.11). Ainda neste gel, uma outra banda de massa molecular em torno de 12 kDa se destacou.

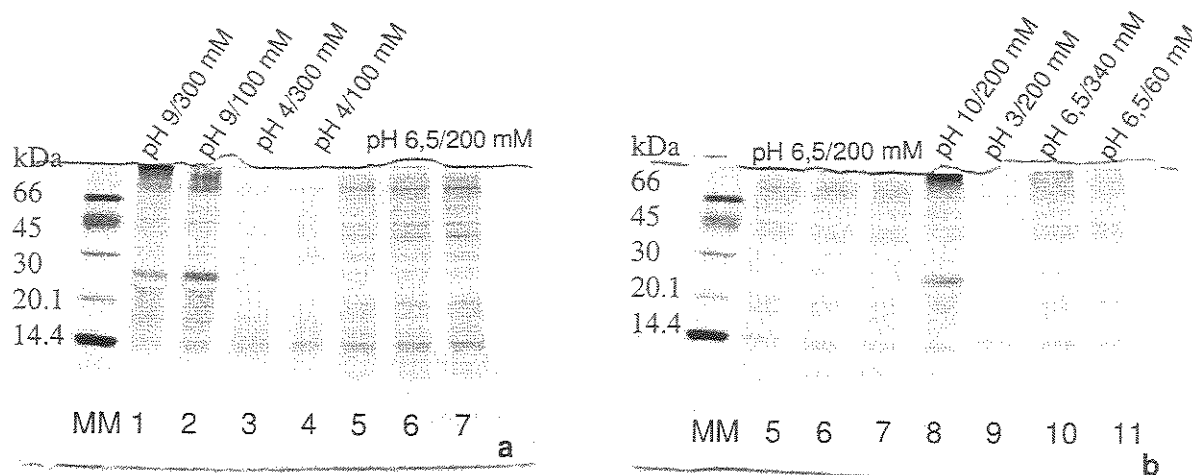
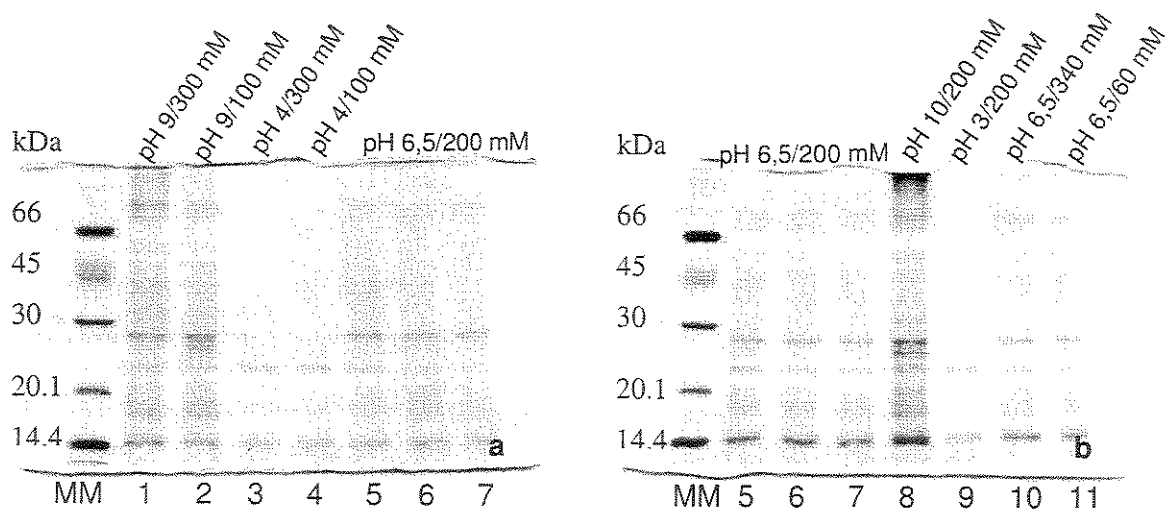
Milho *sh2* sintético**Milho QPM BR451**

Figura 4.5. Eletroforese SDS-PAGE em gel 15% dos extratos do endosperma das variedades *sh2* sintético e QPMBR451 nas condições do planejamento experimental **MM:** marcador de massa molecular. **Gel a. Pista 1:** extração em pH 9,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 2:** extração em pH 9,0 e 100 mM de NaCl. **Pista 3:** extração em pH 4,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 4:** extração em pH 4,0 e 100 mM de NaCl. **Pistas 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Gel b. Pista 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Pista 8:** extração em pH 10,0 e 200 mM de NaCl. **Pista 9:** extração em pH 3,0 e 200 mM de NaCl. **Pista 10:** extração em pH 6,5 e 340 mM de NaCl. **Pista 11:** extração em pH 6,5 e 60 mM de NaCl.

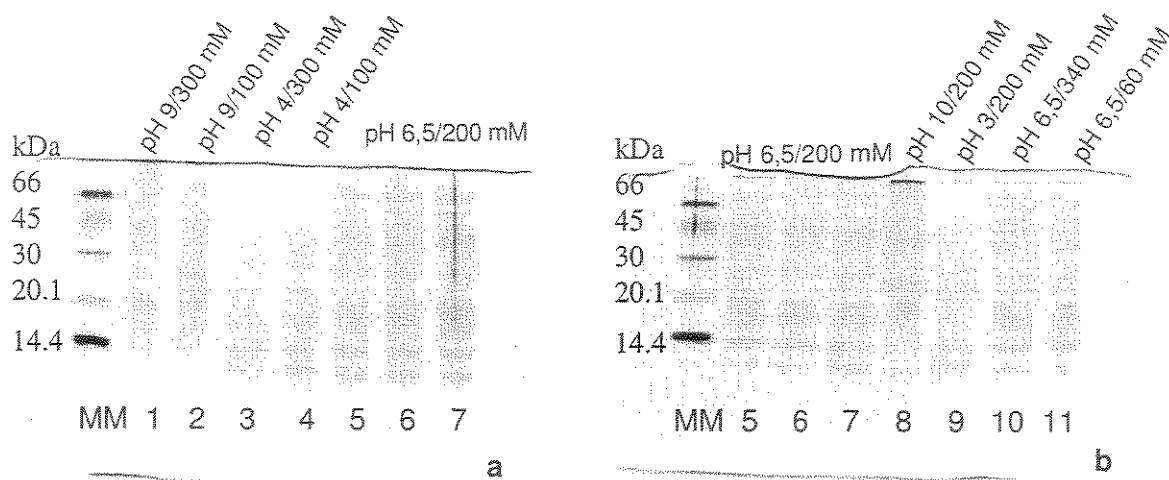
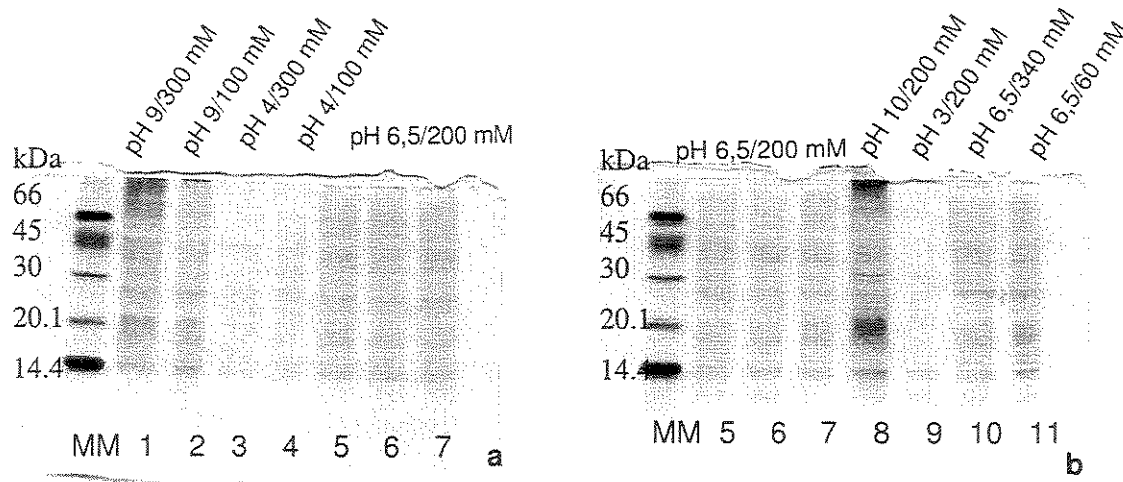
Milho *bt2* BR400**Milho comum**

Figura 4.6. Eletroforese SDS-PAGE em gel 15% dos extratos de endosperma das variedades *bt2* BR400 e comum nas condições do planejamento experimental **MM**: marcador de massa molecular. **Gel a. Pista 1:** extração em pH 9,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 2:** extração em pH 9,0 e 100 mM de NaCl. **Pista 3:** extração em pH 4,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 4:** extração em pH 4,0 e 100 mM de NaCl. **Pistas 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Gel b. Pista 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Pista 8:** extração em pH 10 e 200 mM de NaCl. **Pista 9:** extração em pH 3,0 e 200 mM de NaCl. **Pista 10:** extração em pH 6,5 e 340 mM de NaCl. **Pista 11:** extração em pH 6,5 e 60 mM de NaCl.

Milho QPM BR473

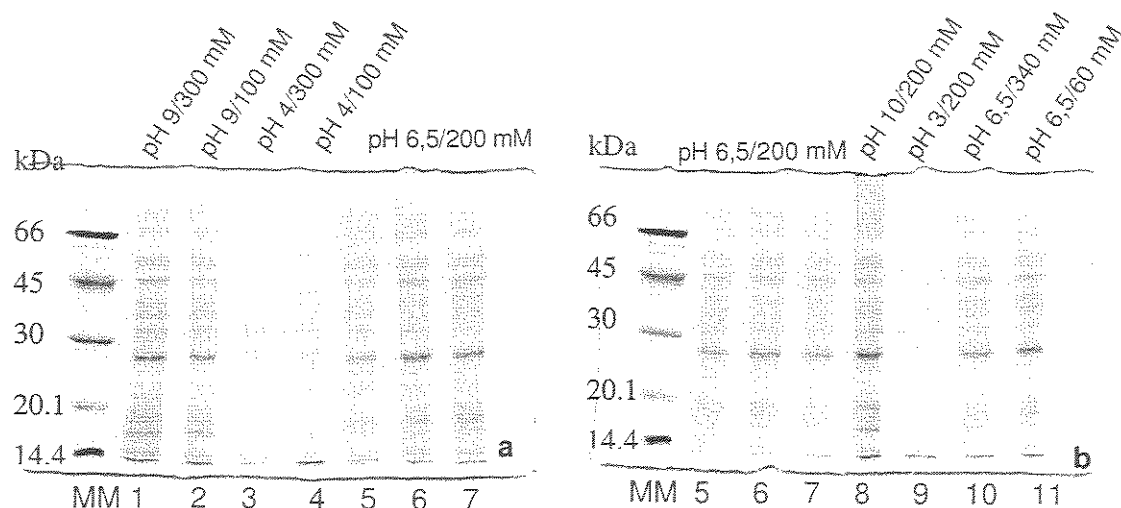
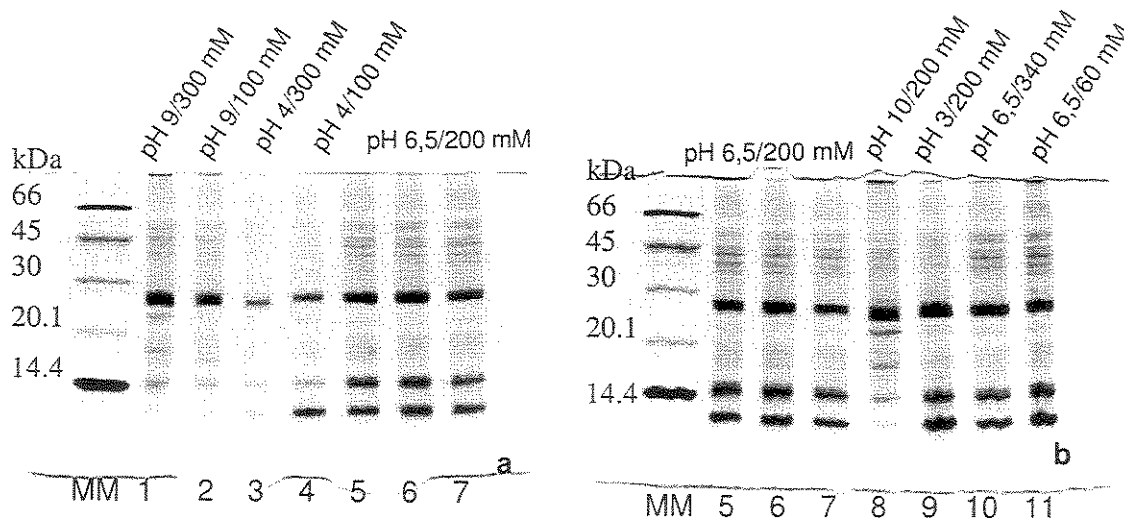
Milho *su1* BR202

Figura 4.7. Eletroforese SDS-PAGE em gel 15% dos extratos de endosperma das variedades QPM BR473 e *su1* BR202 nas condições do planejamento experimental **MM:** marcador de massa molecular. **Gel a. Pista 1:** extração em pH 9,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 2:** extração em pH 9,0 e 100 mM de NaCl. **Pista 3:** extração em pH 4,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 4:** extração em pH 4,0 e 100 mM de NaCl. **Pistas 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Gel b. Pista 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Pista 8:** extração em pH 10 e 200 mM de NaCl. **Pista 9:** extração em pH 3,0 e 200 mM de NaCl. **Pista 10:** extração em pH 6,5 e 340 mM de NaCl. **Pista 11:** extração em pH 6,5 e 60 mM de NaCl.

Uma característica comum a todas as variedades foi a baixa complexidade protéica obtida quando se utilizou um pH ácido (pistas 3, 4 e 9). Já a complexidade protéica obtida nos ensaios realizados em pH alcalino (pistas 1, 2 e 5) não diferiu muito da complexidade obtida em pH 6,5 (pistas 5, 6, 7, 10 e 11). Esta observação, aliada ao fato de que valores baixos de pH levarem a baixas concentrações protéicas nos extratos, completam o quadro geral da extração de proteínas nativas do endosperma de milho, ou seja, valores baixos de pH geram uma baixa concentração e baixa complexidade protéica, independente da variedade de milho analisada.

4.5. Taxa de filtração

A filtração é uma operação unitária extremamente importante em processos químicos e bioquímicos. A eficiência da remoção das partículas sólidas do meio pode influenciar toda a seqüência do processo, ocasionando entupimentos de colunas e danos a equipamentos. Diferentes tipos de filtros são requeridos dependendo da suspensão a ser filtrada, influenciando diretamente nos custos e eficiência do processo.

O planejamento experimental utilizado para avaliar a influência do pH e da força iônica sobre a taxa de filtração dos extratos aquosos, bem como os resultados de taxa de filtração, estão apresentados na Tabela 4.13.

A Tabela 4.14 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor *t* e o valor *p* para a taxa de filtração. Para a variedade *sh2* sintético somente o termo linear para o pH se mostrou estatisticamente significativo a 95% de confiança. Para o milho QPM BR451 os termos linear e quadrático para o pH se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança. Também o termo relativo à interação entre o pH e a força iônica se mostrou significativo, ou seja, estatisticamente, há interação entre estas duas variáveis sobre a taxa de filtração dos extratos obtidos utilizando o milho QPM BR451. Para as variedades *bt2* BR400 e comum os termos linear e quadrático para o pH e linear para a força iônica e o termo relativo à interação se mostraram

estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 4.13. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo para a taxa de filtração dos extratos de endosperma dos milhos comerciais.

Ensaio	Fatores		Taxa de filtração dos extratos (ml/min.cm ²)					
	pH	μ	<i>sh2</i> sintético	QPM BR451	<i>bt2</i> BR400	comum	QPM BR473	<i>su1</i> BR202
1	9,0	300	0,01	0,06	0,02	0,05	0,01	0,0004
2	9,0	100	0,01	0,12	0,01	0,04	0,02	0,0010
3	4,0	300	0,13	0,30	0,07	0,14	0,19	0,0013
4	4,0	100	0,14	0,25	0,11	0,20	0,34	0,0004
5	6,5	200	0,07	0,14	0,05	0,14	0,13	0,0016
6	6,5	200	0,04	0,13	0,06	0,13	0,09	0,0004
7	6,5	200	0,08	0,13	0,06	0,13	0,09	0,0006
8	10,0	200	0,01	0,06	0,01	0,04	0,02	0,0008
9	3,0	200	0,13	0,25	0,06	0,14	0,18	0,0004
10	6,5	340	0,04	0,11	0,03	0,13	0,08	0,0004
11	6,5	60	0,12	0,13	0,07	0,13	0,12	0,0006

Para a variedade QPM BR473 os termos lineares para o pH e para a força iônica e o termo relativo à interação se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança. Para a variedade *su1* BR202 nenhuma das variáveis se mostrou significativa para a taxa de filtração.

A influência da variável pH é bem mais significativa do que a força iônica, sendo que o efeito negativo do pH indica que maiores taxas de filtração são obtidas com a diminuição do pH utilizado na extração. Para aquelas variedades em que a interação entre o pH e a força iônica se mostrou significativa (variedades QPM B451, *bt2* BR400, QPM BR473 e comum) a influência da força iônica foi mais pronunciada quando se utilizou pH ácido, observando-se maiores taxas de filtrações nos ensaios em que o pH e a força iônica foram usados em seus níveis inferiores.

Tabela 4.14. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a taxa de filtração dos extratos dos milhos comerciais.

	<i>sh2 sintético</i>				<i>QPM BR451</i>				<i>bt2 BR400</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,063*	0,012	5,27	0,034	0,133*	0,003	40,00	0,0006	0,057**	0,003	17,000	0,003
pH (L)	-0,052*	0,007	-7,13	0,019	-0,079*	0,002	-39,11	0,0006	-0,028**	0,002	-13,516	0,005
pH (Q)	0,003	0,009	0,31	0,786	0,022*	0,002	9,09	0,0119	-0,008**	0,002	-3,430	0,076
μ (L)	-0,015	0,007	-2,09	0,171	-0,005	0,002	-2,34	0,1437	-0,011**	0,002	-5,301	0,034
μ (Q)	0,008	0,009	0,88	0,472	0,005	0,002	1,89	0,1999	-0,001	0,002	-0,343	0,764
pHx μ	-0,002	0,010	0,24	0,832	-0,027*	0,003	-9,53	0,0108	0,013**	0,003	4,330	0,049
	<i>comum</i>				<i>QPM BR473</i>				<i>su1 BR202</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	0,133**	0,003	40,000	0,001	0,102**	0,012	8,319	0,014	0,001*	0,000	2,307	0,147
pH (L)	-0,049**	0,002	-23,970	0,002	-0,090**	0,008	-11,876	0,007	0,000	0,000	0,125	0,912
pH (Q)	-0,022**	0,002	-9,175	0,012	0,009	0,009	1,008	0,420	0,000	0,000	-0,319	0,780
μ (L)	-0,006**	0,002	-3,062	0,092	-0,029**	0,008	-3,830	0,062	0,000	0,000	-0,069	0,952
μ (Q)	-0,002	0,002	-0,943	0,445	0,009	0,009	1,016	0,417	0,000	0,000	-0,417	0,717
pHx μ	0,018**	0,003	6,062	0,026	0,035**	0,011	3,292	0,081	0,000	0,000	-1,096	0,387

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

A Tabela 4.15 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a taxa de filtração para os extratos dos milhos comerciais. O coeficiente de correlação e o teste F a no mínimo 90% de confiança se mostraram satisfatórios, com exceção da variedade *su1* BR202. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados dos modelos utilizados para a construção dos gráficos de superfície de resposta (Figura 4.8).

Tabela 4.15. Análise de variância (ANOVA) para a taxa de filtração.

Variedade	R	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}
<i>sh2</i> sintético	0,807	37,59	7,34
QPM BR451	0,908	23,03	5,29
<i>bt2</i> BR400	0,876	10,55	3,32
Comum	0,926	18,66	5,87
QPM BR473	0,828	11,21	3,65
<i>su1</i> BR202	0,352	0,54	0,16

Conclui-se que a taxa de filtração é fortemente influenciada pelo pH e em menor proporção pela força iônica, e se mostra inversamente relacionada à extração de proteínas e polifenóis. Além disso, o fato dos valores da taxa de filtração serem menores para as variedades de milho doce vem a corroborar as outras análises nas quais estas variedades apresentaram maiores concentrações de proteína, carboidratos e polifenóis para a maioria dos ensaios.

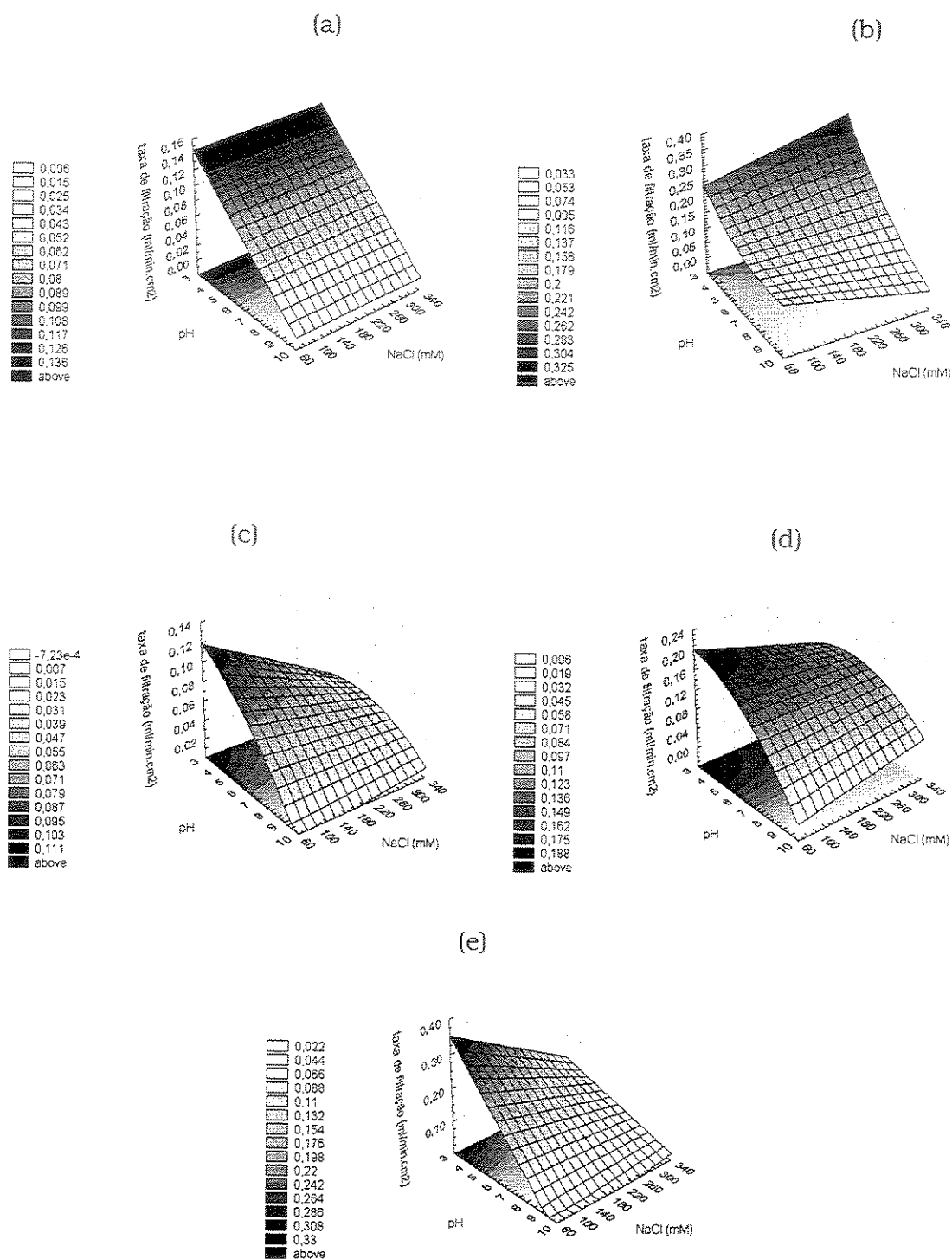


Figura 4.8. Superfície de resposta para a taxa de filtração dos extratos como uma função do pH e da força iônica para as variedades de milho *sh2* sintético (a), QPM BR451 (b), *bt2* BR400 (c), comum (d) e QPM BR473 (e).

4.6. Conteúdo de óleo da farinha do endosperma

A preocupação com lipídeos é constante entre aqueles que trabalham com recuperação e purificação de proteínas, sendo que a desengorduração da matéria-prima é uma prática comum antes da etapa de extração, pois as membranas e resinas cromatográficas são geralmente bastante afetadas pela presença de óleo. A maioria das sementes de milho contém quantidade relativamente pequena de lipídeos, aproximadamente 4% de sua massa, e normalmente a maior parte deste óleo se concentra no embrião da semente (Weber, 1987). Neste trabalho foi utilizada uma farinha do milho degerminado, o que leva a acreditar que a presença do óleo seja menos problemática. Para a verificação desta hipótese, o conteúdo de óleo da farinha do endosperma das seis variedades de milho foi quantificado por extração com hexano, em aparelho do tipo Soxhlet (Determinador de lipídeos Q-308G22, Quimis, Brasil), e está listado na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Conteúdo de óleo das farinhas de endosperma dos milhos comerciais.

Variedade de milho	Teor de óleo (%)
<i>sh2</i> sintético	7,2
QPM BR451	1,4
<i>bt2</i> BR400	6,0
Comum	1,6
QPM BR473	2,6
<i>su1</i> BR202	4,7

As variedades de milho do tipo doce (*sh2* sintético, *bt2* BR400 e *su1* BR202) apresentaram um conteúdo de óleo bastante superior ao das outras variedades. Este fato, provavelmente, se deve à menor quantidade de amido no endosperma destas sementes.

A co-extração do óleo de milho durante o processo de extração aquosa de aprotinina recombinante de milho transgênico foi estudada por Azzoni (2002). O autor, que estudou o efeito da força iônica e do pH isoladamente durante a

extração e quantificou o conteúdo de lipídeos remanescente na farinha, concluiu que a força iônica não influenciou o processo, sendo que aproximadamente 11% do óleo total da farinha foi extraído pelas soluções aquosas contendo ou não cloreto de sódio (300 mM). Quanto à influência do pH, o autor observou que quanto maior o pH da solução maior foi a quantidade de óleo extraída, chegando a 80% quando se utilizou pH 10 nas extrações.

Segundo Rosenthal *et al.* (1996), que estudaram o processo da extração aquosa de óleo de sementes de soja, deve existir alguma relação entre o mecanismo da extração de óleo e o de proteínas das sementes de alguns cereais, uma vez que as condições experimentais que favorecem a extração de óleo coincidem com as condições que maximizam a extração de proteínas. Portanto, o máximo rendimento na extração de óleo foi obtido quando se utilizou um pH longe do ponto isoelétrico (pI) da maioria das proteínas nativas dos cereais, uma vez que, devido à carga líquida nula, as proteínas possuem solubilidade mínima em valores de pH próximos ao pI.

4.7. Conclusão dos ensaios de avaliação dos milhos comerciais

Esta etapa do trabalho objetivou a avaliação de seis variedades de milho comerciais, candidatas a biorreatores na produção de proteínas recombinantes, dentro de algumas características relacionadas ao processo de RPB. Neste contexto, foi estudada a possível existência de diferenças entre os extratos aquosos das variedades de milho, através de um planejamento estatístico experimental para avaliar a influência de duas variáveis independentes, o pH e a força iônica, na qualidade dos extratos. Vale ressaltar que é de interesse que o conteúdo de impurezas nos extratos, em termos de concentração de carboidratos, polifenóis e proteínas nativas, seja minimizado.

As condições avaliadas influenciaram de tal forma a composição dos extratos de milho que cada uma das variáveis respostas analisadas apresentou uma importância independente, fornecendo informações básicas sobre a

solubilidade destes componentes do endosperma do milho. Tais informações podem, assim, contribuir para estudos de extração de diferentes proteínas heterólogas produzidas em milho.

Quanto à importância do uso do planejamento experimental nesta etapa do trabalho, destacou-se a possibilidade da análise dos efeitos do pH e da força iônica na solubilidade dos componentes nativos do milho realizando um número mínimo de experimentos e tirando conclusões importantes, principalmente em relação à interação entre essas duas variáveis, o que não é possível quando se realizam experimentos univariáveis. As principais conclusões para cada variável resposta estudada foram:

1. *Concentração de açúcares redutores (AR)*: Para todas as variedades de milho estudadas a concentração de AR se mostrou mais dependente do pH do que da força iônica. Os valores absolutos de concentração de AR extraído nos ensaios possuem a mesma ordem de grandeza (exceto para a variedade *su1* BR202), com pontos de mínima extração convergindo para valores extremos de pH, para todas as variedades estudadas.

2. *Concentração de açúcares redutores totais (ART)*: Os efeitos das variáveis pH e força iônica sobre a extração de ART das farinhas de milho doce foram inversos aos efeitos observados para as outras variedades, ou seja, a extração de ART do milho poderá depender do tipo de semente utilizada. Para todas as variedades de milho analisadas a concentração de ART se mostrou mais dependente do pH do que da força iônica.

3. *Concentração de polifenóis*: A condição ótima para minimizar a extração de polifenóis é utilizar elevada força iônica ou então utilizar um pH ácido. Foi observada uma diferença em termos de valores absolutos de concentração de polifenóis extraída das sementes do tipo doce, em torno de uma ordem de grandeza.

4. *Concentração de proteínas:* A concentração de proteína total extraída se mostrou mais dependente do pH em relação à força iônica. Menores concentrações de proteína foram obtidas para baixos valores de pH. Os valores de concentração de proteína total foram superiores para as variedades de milho doce e a interação entre o pH e a força iônica se mostrou significativa para estas variedades.

5. *Taxa de filtração:* A influência da variável pH foi maior em relação à força iônica para as seis variedades, sendo que maiores taxas de filtração são obtidas com a diminuição do pH utilizado na extração.

6. *Comparação geral entre as sementes de milho comerciais:* As sementes de milho do tipo doce apresentaram, em geral, um desempenho inferior às outras variedades em relação ao uso como matéria-prima em um processo de RPB de proteínas heterólogas uma vez que, as concentrações de carboidratos, proteínas e polifenóis extraídas das variedades de milho doce foram superiores para a maioria dos ensaios realizados. Como consequência, as taxas de filtração obtidas foram também inferiores. Outro fator negativo das variedades de milho doce foi a elevada concentração de óleo destas farinhas. Assim, pode-se dizer que, no tocante à RPB, as variedades de milho doce não são de alta prioridade frente a outras para serem utilizadas como biorreator na produção de proteínas recombinantes. No entanto, não foi observada nenhuma diferença expressiva na qualidade dos extratos obtidos utilizando as variedades QPM BR451, QPM BR473 e o milho comum, indicando que a escolha entre essas variedades não irá afetar significativamente o processamento da proteína recombinante.

Outra observação relevante quanto às condições das soluções da extração é o fato de que o pH da solução se destacou como sendo a variável que mais afetou a extração dos componentes nativos do endosperma dos milhos analisados. Portanto, no processamento de proteínas recombinantes que não necessitem da presença de sal para a sua solubilização, deve-se optar pela sua exclusão total ou parcial da solução extratora.

Capítulo 5

Resultados e Discussões II

Avaliação do efeito do pH e da força iônica na extração da pró-insulina recombinante de sementes de milho transgênico

A extração de uma proteína de interesse de um meio sólido envolve um compromisso entre a recuperação e a complexidade do extrato, de modo que a otimização das condições de extração deve favorecer a recuperação da proteína de interesse e ao mesmo tempo minimizar as impurezas de difícil remoção.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do pH e da força iônica na eficiência de extração da pró-insulina do milho transgênico, novamente aqui utilizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 do tipo estrela. Como variáveis respostas da etapa de extração analisou-se, além da concentração de pró-insulina humana, a concentração de proteínas totais, açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), polifenóis e a taxa de filtração. O planejamento experimental utilizado bem como os resultados obtidos para o milho transgênico estão apresentados na Tabela 5.1. Os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t e o valor p para as variáveis resposta analisadas estão apresentados na Tabela 5.2 e na Tabela 5.3 está apresentada a análise de variância (ANOVA).

Tabela 5.1. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo da extração aquosa da farinha do endosperma do milho transgênico.

Ensaio	Fatores		Concentrações					Taxa de filtração (ml/min.m ²)
	pH	μ	AR (mg/ml)	ART (mg/ml)	Polifenóis (mM)	Proteína total (mg/ml)	Pró-insulina (ng/ml)	
1	9,0	300	0,80	2,81	0,03	4,02	40,71	0,006
2	9,0	100	0,74	2,27	0,14	1,68	72,74	0,008
3	4,0	300	1,17	2,77	0,08	0,85	0,45	0,302
4	4,0	100	1,02	2,57	0,06	0,23	0,49	0,420
5	6,5	200	1,36	3,03	0,07	1,33	2,29	0,139
6	6,5	200	1,17	2,67	0,06	1,29	2,30	0,128
7	6,5	200	1,26	2,69	0,08	0,96	2,07	0,134
8	10,0	200	0,49	2,21	0,11	2,01	97,33	0,020
9	3,0	200	0,47	2,28	0,03	0,28	0,25	0,240
10	6,5	340	0,94	2,52	0,06	1,13	2,47	0,130
11	6,5	60	0,95	2,53	0,09	0,98	1,35	0,100

5.1. Concentração de pró-insulina recombinante

Na avaliação do efeito do pH e da força iônica na extração da pró-insulina recombinante expressa no endosperma do milho transgênico, todos os termos, incluindo o termo relativo à interação, se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança (Tabela 5.2). O pH exerceu um efeito positivo mais significativo estatisticamente, enquanto a força iônica exerceu um efeito negativo sobre a extração de pró-insulina (Figura 5.1).

O coeficiente de correlação (0,979) e o teste F (9,68 vezes o valor de F tabelado) a 95% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo preditivo. O modelo obtido para a concentração de pró-insulina nos extratos do milho transgênico foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 5.2).

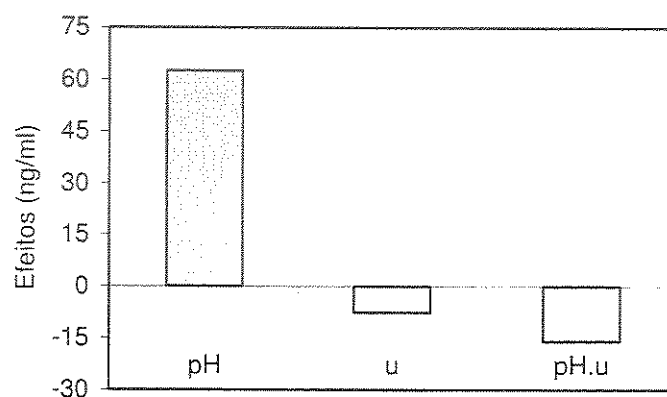
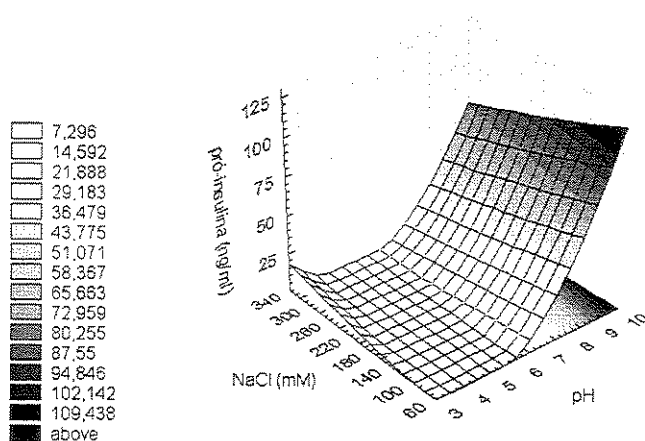
Tabela 5.2. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a extração do milho transgênico.

	<i>Pró-insulina</i>				<i>Proteína total</i>				<i>AR</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	2,220*	0,078	28,612	0,001	1,191**	0,116	10,230	0,009	1,264*	0,056	22,444	0,002
pH (L)	31,225*	0,048	657,166	0,000	0,885**	0,071	12,411	0,006	-0,077	0,034	-2,225	0,156
pH (Q)	24,097*	0,057	426,087	0,000	0,127	0,085	1,500	0,272	-0,337*	0,041	-8,215	0,014
μ (L)	-3,812*	0,048	-80,223	0,000	0,398**	0,071	5,577	0,031	0,024	0,034	0,692	0,561
μ (Q)	0,657*	0,057	11,608	0,007	0,080	0,085	0,944	0,445	-0,102	0,041	-2,495	0,130
pHx μ	-7,998*	0,067	-119,022	0,000	0,429**	0,101	4,251	0,051	-0,020	0,049	-0,412	0,720
	<i>ART</i>				<i>polifenóis</i>				<i>Taxa de filtração</i>			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	2,799**	0,117	23,915	0,002	0,069**	0,005	14,931	0,004	0,134*	0,003	43,855	0,001
pH (L)	-0,043	0,072	-0,605	0,607	0,016**	0,003	5,513	0,031	-0,128*	0,002	-68,530	0,000
pH (Q)	-0,221	0,085	-2,593	0,122	0,001	0,003	0,416	0,718	0,014*	0,002	6,362	0,024
μ (L)	0,091	0,072	1,274	0,331	-0,014**	0,003	-5,117	0,036	-0,009*	0,002	-4,900	0,039
μ (Q)	-0,083	0,085	-0,977	0,431	0,005	0,003	1,382	0,301	0,006	0,002	2,826	0,106
pHx μ	0,083	0,101	0,822	0,497	-0,033**	0,004	-8,245	0,014	0,029*	0,003	10,986	0,008

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

Tabela 5.3. Análise de variância (ANOVA) para o milho transgênico.

Variável Resposta	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
Concentração de pró-insulina	0,979	48,86	9,68
Concentração de proteínas	0,773	7,96	2,59
Concentração de AR	0,667	18,05	3,52
Concentração de ART	0,602	1,52	0,44
Concentração de polifenóis	0,871	15,73	3,62
Taxa de filtração	0,818	6,75	2,12

**Figura 5.1.** Efeito do pH e da força iônica sobre a extração de pró-insulina humana recombinante do milho transgênico.**Figura 5.2.** Superfície de resposta para a concentração de pró-insulina recombinante como uma função do pH e da força iônica.

No entanto, mesmo nas condições ótimas da superfície de resposta, utilizando o pH em seu nível superior e a força iônica em seu nível inferior, a concentração de pró-insulina nos extratos foi relativamente baixa — valor máximo obtido de 97,33 ng/ml — em relação aos resultados estimados visualmente por De Lucca (2003), através de ensaios de *Western Blot*. Esses resultados foram um tanto inesperados, pois segundo Tunes (comunicação pessoal), a pró-insulina humana recombinante (produzida em bactérias) na forma nativa é solúvel em soluções de pH baixo (em torno de 3,0) e pH acima de 7,0, e precipitam em soluções próximas do pH 5,0 e também na presença de alta força iônica (acima de 300 mM de NaCl). Portanto, acredita-se que a pró-insulina recombinante produzida no milho deva estar associada a outros componentes nativos do milho de forma a inviabilizar a sua solubilização completa nas condições de extração aquosa testadas.

Rees e Singer (1956) analisaram a solubilidade de várias proteínas, incluindo a insulina e as zeínas, em diferentes solventes e encontraram algumas particularidades para essas duas proteínas, sugerindo que existam similaridades em suas estruturas. E como as zeínas possuem uma característica fortemente hidrofóbica (Manley e Evans, 1943), acredita-se que a pró-insulina possa estar associada às zeínas, justificando a baixa solubilidade da pró-insulina nas soluções aquosas analisadas. Essa hipótese é ainda reforçada pelos resultados obtidos por De Lucca (2003), indicando que a pró-insulina está presente dentro dos corpúsculos protéicos, juntamente com as zeínas.

Bailey *et al.* (2003) obtiveram problemas semelhantes na solubilização da enzima recombinante lacase produzida em milho transgênico, que teve a sua expressão direcionada para a parede celular do embrião através do uso de um promotor específico. A extração aquosa em diferentes condições não foi eficiente na solubilização desta enzima, sendo que nas melhores condições avaliadas, cerca de 80 a 90% da enzima permaneceu aderida aos debrís celulares, indicando que a lacase estava imobilizada à matriz da parede celular.

Portanto, no desenvolvimento de um processo de RPB deve-se avaliar a possível associação da proteína heteróloga com componentes nativos da planta. Como a produção da planta transgênica requer um tempo considerável e nem sempre se dispõe prontamente de quantidades suficientes para realização de experimentos visando aumento de escala ou mesmo para ensaios de bancada, faz-se uso, freqüentemente, de plantas convencionais em estudos de RPB. Alguns autores (Zaman *et al.*, 1999; Zhang and Glatz, 1999; Azzoni, 2002; Menkhaus *et al.*, 2002; Balasubrananiam *et al.*, 2003) utilizaram variedades de plantas comerciais para realizar partes de estudos de RPB, fazendo adição da proteína heteróloga de interesse artificialmente (método conhecido como *spiking*). Nesta etapa do estudo, demonstrou-se que a utilização de uma solução extratora na qual a proteína heteróloga é solúvel não é suficiente para garantir sua solubilização e que, portanto, estudos utilizando o método de *spiking* devem ser planejados com critério.

Como a concentração de pró-insulina nos extratos foi baixa, optou-se por realizar um estudo de outros solventes mais adequados para a extração desta proteína (apresentados no Capítulo 6). Realizou-se também o ensaio de *Western Blot* para uma análise qualitativa da pró-insulina, porém não foi obtida nenhuma banda visível devido à baixa concentração da proteína (dado não apresentado).

5.2. Concentração proteínas totais

Os termos lineares para o pH e para a força iônica e o termo relativo à interação se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança na extração de proteínas das sementes do milho transgênico. Tanto o pH quanto a força iônica exercem efeitos positivos sobre a extração de proteínas (Figura 5.3).

O coeficiente de correlação (0,773) e o teste F (2,59) a 90% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a concentração de proteína extraída foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta

(Figura 5.4).

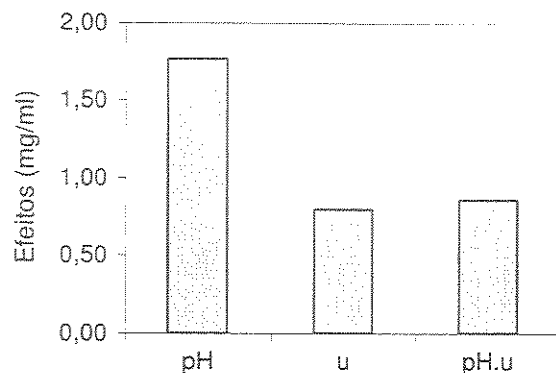


Figura 5.3. Histograma do efeito do pH e da força iônica sobre a extração de proteínas do milho transgênico.

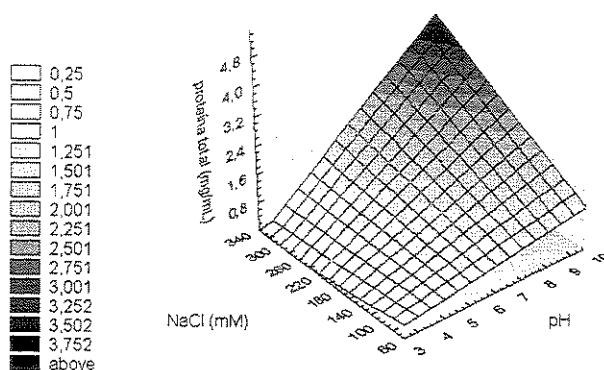


Figura 5.4. Superfície de resposta para a concentração de proteínas como uma função do pH e da força iônica para o milho transgênico.

Pode-se observar que as condições que propiciam uma extração máxima de proteínas nativas é aquela na qual o pH e a força iônica estão em seus níveis superiores. No entanto, o objetivo deste estudo é encontrar uma condição na qual a extração da proteína heteróloga seja maximizada, enquanto a extração de proteínas nativas seja minimizada. Em relação ao pH, ambas proteínas são extraídas em maior quantidade em pH alcalino, mas em relação à força iônica, quando se usa uma solução contendo uma força iônica em seu nível inferior (60 mM), é possível reduzir a extração de proteínas nativas e ainda assim, maximizar a extração da pró-insulina.

A análise qualitativa das proteínas extraídas do endosperma do milho transgênico nos ensaios do planejamento experimental foi feita através de eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.5). As amostras estavam todas congeladas e foram utilizadas sem diluição. A concentração do gel foi de 15% e a revelação foi feita com nitrato de prata.

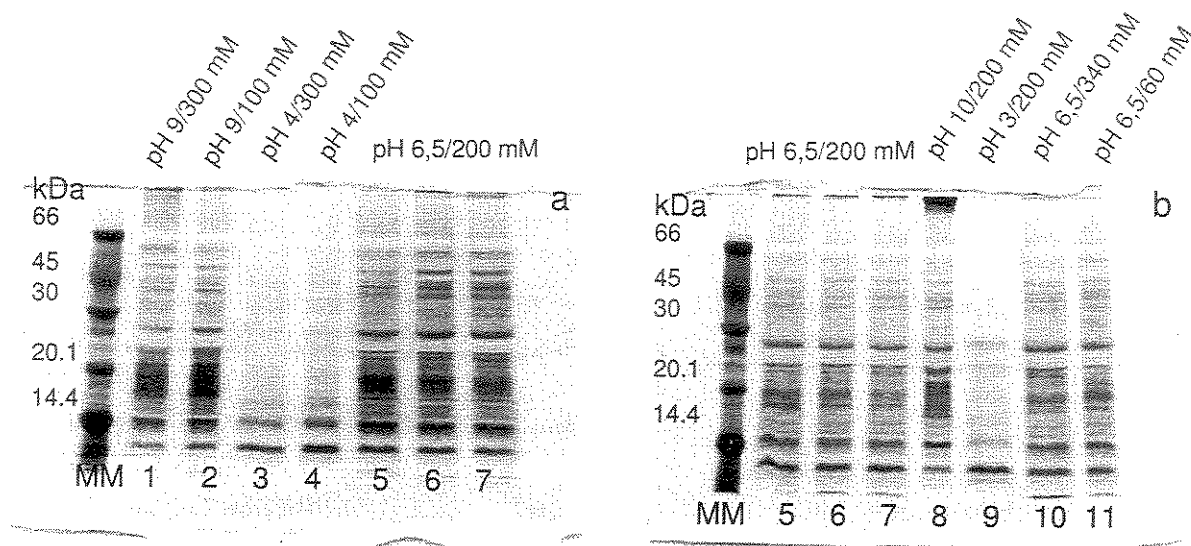


Figura 5.5. Eletroforeses SDS-PAGE dos ensaios de extração do planejamento experimental com as sementes de milho transgênico. **MM:** marcador de massa molecular. **Gel a. Pista 1:** extração em pH 9,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 2:** extração em pH 9,0 e 100 mM de NaCl. **Pista 3:** extração em pH 4,0 e 300 mM de NaCl. **Pista 4:** extração em pH 4,0 e 100 mM de NaCl. **Pistas 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Gel b. Pista 5, 6 e 7:** extração em pH 6,5 e 200 mM de NaCl. **Pista 8:** extração em pH 10 e 200 mM de NaCl. **Pista 9:** extração em pH 3,0 e 200 mM de NaCl. **Pista 10:** extração em pH 6,5 e 340 mM de NaCl. **Pista 11:** extração em pH 6,5 e 60 mM de NaCl.

Como a concentração de pró-insulina recombinante nos extratos foi baixa, provavelmente não há nos géis uma banda relativa à pró-insulina, apesar de ter uma banda de proteína de massa molecular próxima a da pró-insulina (9,4 kDa). Entretanto, essa mesma banda também foi observada em géis de SDS-PAGE de outros milhos não transgênicos apresentados no Capítulo 4.

5.3. Concentração de açúcares redutores (AR)

Somente o termo quadrático para o pH se mostrou estatisticamente significativo a 95% de confiança na extração de AR (Tabela 5.2). O termo relativo à interação entre o pH e a força iônica não se mostrou significativo, ou seja, estatisticamente não há interação entre estas duas variáveis na extração de AR para a faixa estudada. A Figura 5.6 mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a concentração de AR para as sementes do milho transgênico.

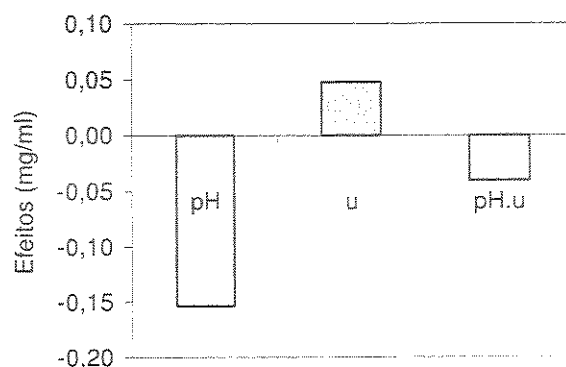


Figura 5.6. Histograma do efeito do pH e da força iônica sobre a extração de AR do milho transgênico.

O coeficiente de correlação (0,667) e o teste F (3,52) a 95% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a concentração de AR extraído do milho transgênico foi utilizado para a construção da curva da Figura 5.7.

Como a força iônica não influenciou significativamente a extração de AR, uma condição ideal para maximizar a extração da pró-insulina e minimizar a extração de AR seria utilizar o pH em seus níveis superiores e a força iônica em seus níveis inferiores.

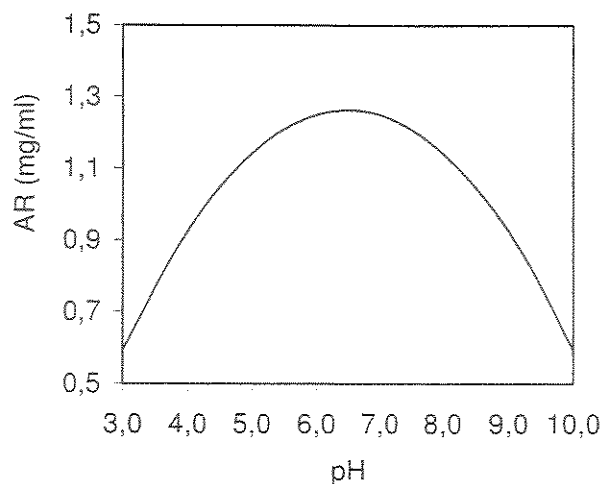


Figura 5.7. Concentração de AR como uma função do pH para o milho transgênico.

5.4. Concentração de açúcares redutores totais (ART)

Nenhum dos termos analisados se mostrou estatisticamente significativo, a 90% de confiança, na extração de ART. O pH exerce um efeito negativo sobre a extração de ART, enquanto a força iônica exerce um efeito positivo (Figura 5.8). O coeficiente de correlação (0,602) e o teste F (0,30 vez o valor do F tabelado) a 90% de confiança não se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo.

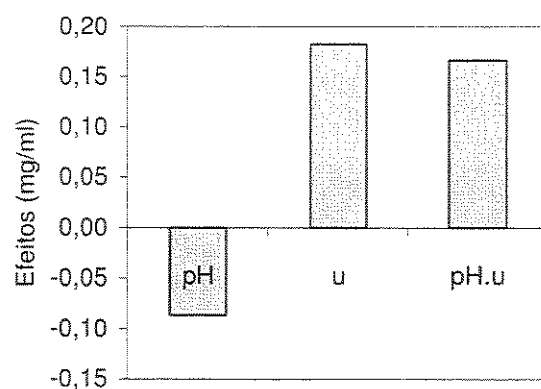


Figura 5.8. Histograma do efeito do pH e da força iônica sobre a extração de ART do milho transgênico.

Assim como na extração de AR, a condição ideal para maximizar a extração da pró-insulina e minimizar a extração de AR seria utilizar o pH em seus níveis superiores e a força iônica em seus níveis inferiores, uma vez que nenhuma destas variáveis se mostrou significativa na extração de ART.

5.5. Concentração de polifenóis

Os termos lineares para o pH e para a força iônica e o termo relativo à interação se mostraram estatisticamente significativos, a 90% de confiança, na extração de polifenóis. A Figura 5.9 mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a concentração de polifenóis para as sementes do milho transgênico.

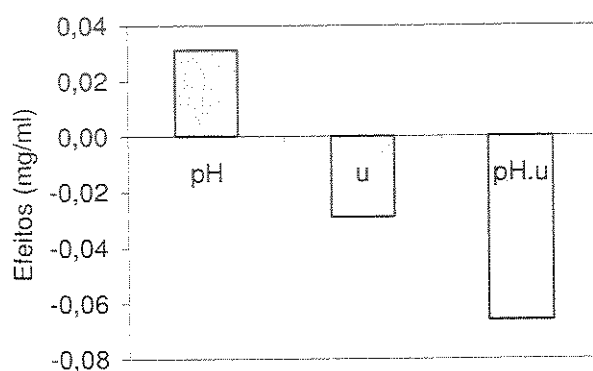


Figura 5.9. Histograma do efeito do pH e da força iônica sobre a extração de polifenóis do milho transgênico.

O coeficiente de correlação (0,871) e o teste F (5,11) a 90% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a concentração de polifenóis nos extratos do milho transgênico foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 5.10).

Pode-se observar que a condição na qual a concentração de polifenóis é maximizada coincide com a região na qual a extração de pró-insulina também é maximizada. No entanto, acredita-se que mesmo o valor máximo de concentração de polifenóis obtido, 0,14 mM ou 0,04 mg/ml, não seja suficiente para causar perda de proteínas por precipitação.

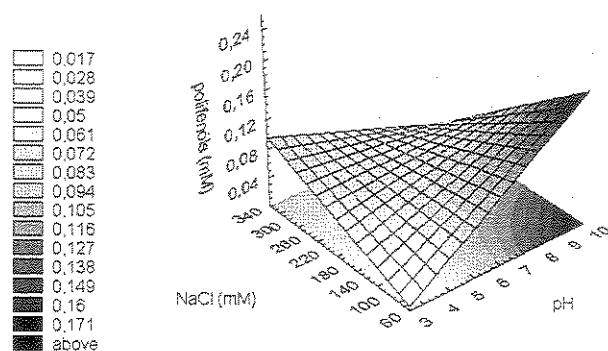


Figura 5.10. Superfície de resposta para a concentração de polifenóis como uma função do pH e da força iônica para o milho transgênico.

5.6. Taxa de filtração

Os termos linear e quadrático para o pH, o termo linear para a força iônica e o termo relativo à interação se mostraram estatisticamente significativos para a taxa de filtração dos extratos, a 95% de confiança. A Figura 5.11 mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a taxa de filtração dos extratos de endosperma do milho transgênico.

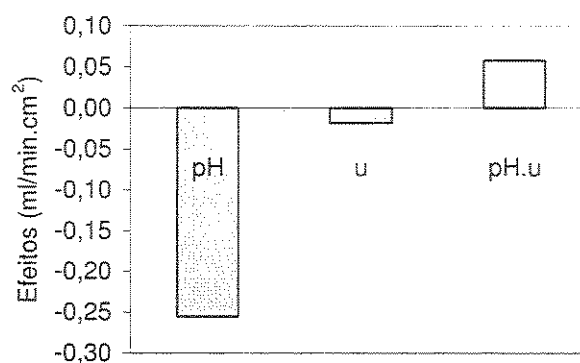


Figura 5.11. Histograma do efeito do pH e da força iônica sobre a taxa de filtração para os extratos do milho transgênico.

Conclui-se que o pH exerce um efeito negativo sobre a taxa de filtração e que embora a força iônica tenha se mostrado significativa, o efeito do pH se mostrou bem mais significativo. O coeficiente de correlação (0,818) e o teste F

(2,12 vezes o valor do F tabelado) a 90% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a taxa de filtração dos extratos foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 5.12).

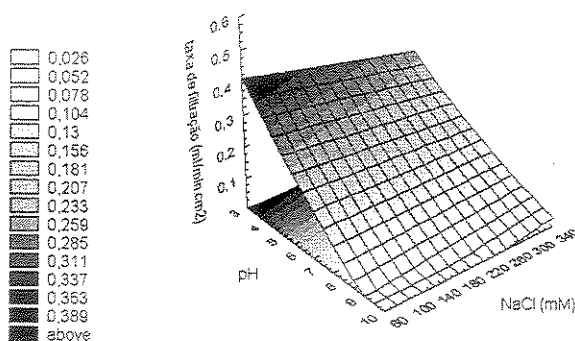


Figura 5.12. Superfície de resposta para taxa de filtração como uma função do pH e da força iônica para o milho transgênico.

Nota-se que a condição na qual a extração de pró-insulina é maximizada, ou seja, quando o pH está em seu nível superior e a força iônica em seu nível inferior, é justamente a região na qual a taxa de filtração é mínima, e, portanto, não é viável conciliar uma condição de máxima extração de pró-insulina e taxas de filtração elevadas.

5.7. Conclusões da extração aquosa de semente de milho transgênico

Esta etapa do trabalho teve como objetivo a avaliação da extração aquosa de pró-insulina humana recombinante de milho transgênico, em relação às características relevantes à RPB. Para tal, foi implementado um planejamento fatorial para avaliar a influência do pH e da força iônica, sobre as variáveis respostas da etapa de extração. As principais conclusões do efeito para cada variável resposta estudada foram:

1. *Concentração de pró-insulina:* A melhor condição para a extração da pró-insulina humana foi aquela utilizando pH alcalino e baixa força iônica. Ainda

assim, a pró-insulina não foi eficientemente extraída, provavelmente devido a interações com outros componentes nativos do milho. Portanto, conclui-se com este estudo a necessidade de avaliar diferentes solventes capazes de maximizar a extração da pró-insulina.

2. *Concentração de proteínas totais:* As condições que propiciam uma extração máxima de proteínas nativas são aquelas nas quais o pH e a força iônica estão em seus níveis superiores. No entanto, quando se usa uma solução em pH alcalino contendo uma baixa força iônica (em seu nível inferior, 60 mM) é possível reduzir a extração de proteínas nativas e ainda assim, maximizar a extração da pró-insulina.

3. *Concentração de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART):* Para minimizar a concentração destes interferentes nos extratos deve-se usar baixa força iônica e pH alcalino, ou seja, a condição ideal também para maximizar a pró-insulina.

4. *Concentração de polifenóis:* A condição na qual a concentração de polifenóis é maximizada coincide com a região na qual a extração de pró-insulina também é maximizada, não sendo possível a minimização deste interferente.

5. *Taxa de filtração:* A região na qual a taxa de filtração é máxima coincide com a qual a extração de pró-insulina é mínima, e, portanto, não é viável conciliar uma condição de máxima extração de pró-insulina e taxas de filtração elevadas.

Capítulo 6

Resultados e Discussões III

Seleção de solventes para a extração da pró-insulina humana do milho transgênico

A escolha de um solvente de extração simples e de baixo custo é fundamental nos custos totais do processo de produção de proteínas recombinantes em plantas. Como exemplo, Nikolov e Hames (2002) citam a otimização da extração de uma proteína recombinante do milho transgênico utilizando água a um pH controlado, resultando em uma redução significativa nos custos do processo. Entretanto, em algumas extrações, a proteína de interesse está ligada a membranas ou partículas, ou então se encontra agregada devido a interações hidrofóbicas. Nestes casos, é necessário utilizar agentes caotrópicos ou detergentes a fim de minimizar tais interações e solubilizar a proteína de interesse (Janson e Rydén, 1989).

Apesar da pró-insulina humana recombinante ser solúvel nas condições analisadas no Capítulo 5 (solução aquosa de baixa força iônica e pH distante de seu pI, aproximadamente 5,5), estudos realizados com a semente de milho transgênico por De Lucca (2003) indicaram que esta proteína está presente dentro dos corpúsculos protéicos formados por prolaminas do milho — as zeínas —, e que, para solubilizar a pró-insulina seria necessário primeiro romper estes corpúsculos. Segundo Shukla e Cheryan (2001) a característica que define as zeínas é a sua insolubilidade em água, exceto na presença de

álcool, altas concentrações de uréia, altas concentrações de álcali (pH 11 ou superior) ou detergentes.

Os solventes utilizados para a homogenização de tecidos de plantas, normalmente, incluem agentes redutores como o ditioneína (DTT) e o β -mercaptaetanol (ME), inativador de polifenóis (polivinilpirrolidona, PVP) e inibidores de proteases como EDTA, benzamidina, aprotinina, fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF), diazoacetil D,L-norleucina metil éster (diazo AcNleOMe) (Gegenheimer, 1990). No entanto, Kusnadi *et al.* (1998a) realizam um estudo para avaliar a eficiência da extração da enzima β -glucuronidase produzida em milho transgênico em diferentes solventes e concluíram que a presença de ME 10 mM, EDTA 5 mM e do coquetel de inibidores de proteases contendo ME 10 mM, EDTA 5mM, PMSF 1 mM, diazo AcNleOMe 0,2 M no tampão de extração (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,5) não contribuiu para o aumento da eficiência da recuperação da β -glucuronidase.

Nesta etapa do trabalho, fez-se uma análise qualitativa da eficiência de extração da pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em diferentes soluções através do ensaio de eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot*. Partindo-se do tampão de extração utilizado por De Lucca (2003) nos ensaios de *Western Blot* (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 2 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM e Triton X-100 0,2%) e das informações da literatura de soluções utilizadas para solubilizar zeínas, investigou-se o efeito de alguns componentes isoladamente, na tentativa de identificar os mais eficazes e se chegar a propor uma solução simples, de baixo custo e alta eficiência.

Primeiramente, investigou-se o efeito isolado da uréia, do detergente Triton X-100, do agente redutor DTT, do tampão bicarbonato de sódio pH 10,0 e de uma solução de etanol 70%. A uréia é um agente caotrópico solubilizante e desnaturante de proteínas bastante utilizado em processos industriais, especialmente na solubilização de corpos de inclusão gerados durante a produção de proteínas recombinantes em bactérias, inclusive na produção de pró-insulina recombinante. O detergente Triton X-100 é um detergente não

iônico que possui um efeito solubilizante e não-desnaturante, entretanto seu uso possui o inconveniente de interferir negativamente nas etapas seguintes do processo de RPB devido à formação de micelas. O agente redutor DTT age na quebra de ligações dissulfeto, solubilizando a proteína. Optou-se pelo DTT, apesar de seu custo ser superior ao β -mercaptaetanol, por este ser mais eficiente a baixas concentrações e devido ao seu odor ser menos desagradável. Agentes redutores também são bastante utilizados em processos industriais.

Também avaliou-se a extração em solução de etanol 70% que é amplamente descrita na literatura para a solubilização de zeínas (Shukla e Cheryan, 2001) e além disso, De Lucca (2003) também utilizou uma solução alcoólica na extração da pró-insulina do milho transgênico (etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM).

Wallace *et al.* (1990) desenvolveram um método de solubilização completa das proteínas do endosperma do milho utilizando um tampão alcalino contendo um agente redutor e um detergente. Os autores demonstraram que a agitação da farinha do milho durante 60 min a temperatura ambiente em tampão borato de sódio 125 mM pH 10,0 contendo SDS a 1% e ME a 2% proporcionou uma extração mais representativa quantitativamente das proteínas do milho. Com base nesta informação, também se avaliou, neste conjunto de experimentos, o tampão bicarbonato de sódio em pH 10,0, numa primeira etapa sem a adição de agente redutor e de detergente. A escolha do tampão bicarbonato de sódio, ao invés do tampão borato, se deve ao fato de que a eficiência de extração de proteínas do milho com tampão bicarbonato já havia sido demonstrada em nosso grupo de pesquisa (Azzoni, 2002).

Como se pode observar no *Western Blot* apresentado na Figura 6.1a, a tentativa de utilizar solventes com um único componente não teve sucesso, uma vez que não foram observadas as bandas correspondentes à pró-insulina nas pistas de 1 a 5. Neste mesmo ensaio, avaliou-se também solventes constituídos de combinações de dois componentes.

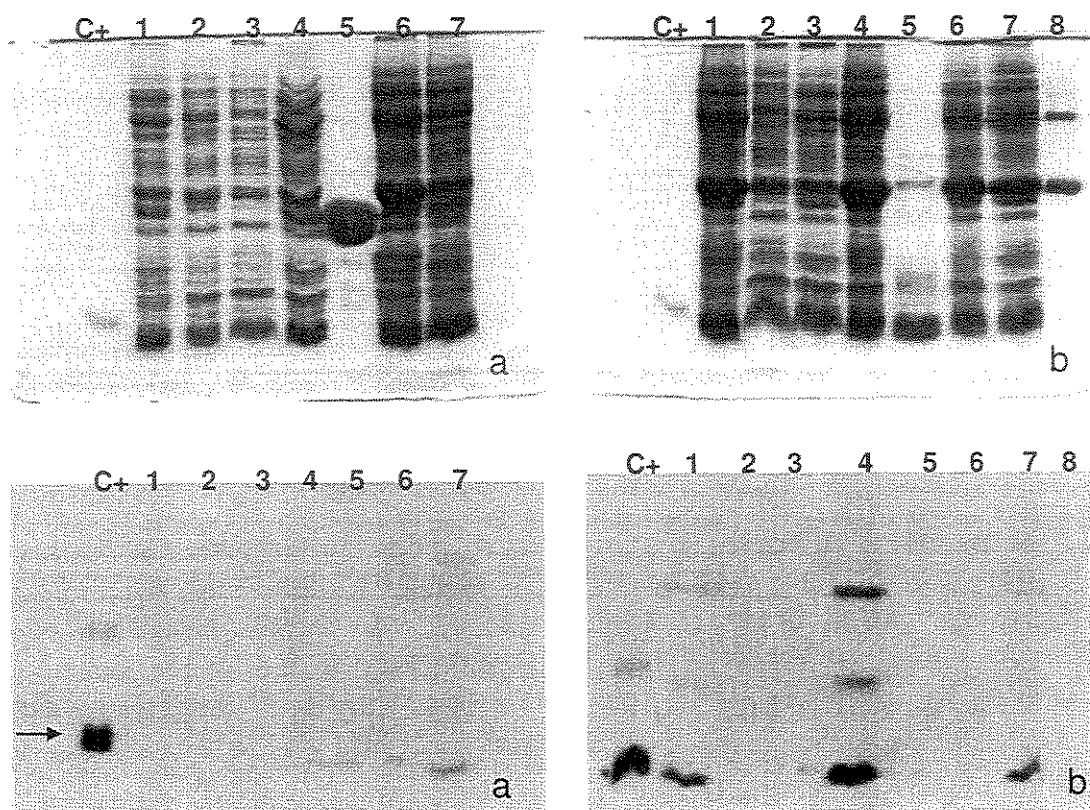


Figura 6.1. Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot dos ensaios de extração com diferentes solventes.

Gel e Western a: C+ controle positivo (300 ng de pró-insulina da Biommm) **Pista 1:** extração em solução de uréia 4 M **Pista 2:** extração em solução de DTT 5 mM **Pista 3:** extração em solução de Triton X-100 0,2% **Pista 4:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0. **Pista 5:** extração em solução de etanol 70%. **Pista 6:** extração em solução de uréia 4 M e DTT 5 mM **Pista 7:** extração em solução de uréia 4 M e Triton X-100 0,2%. A seta indica a banda da pró-insulina.

Gel e Western b: C+ controle positivo (300 ng de pró-insulina da Biommm) **Pista 1:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e uréia 4 M **Pista 2:** extração em solução de Triton X-100 0,2% e DTT 5 mM **Pista 3:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e Triton X-100 0,2% **Pista 4:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM. **Pista 5:** extração em tampão glicina pH 3,0 e NaCl 200 mM. **Pista 6:** extração em solução de NaCl 300 mM, pH 10,0 e 0,6% de ME **Pista 7:** extração em tampão de extração do Western Blot (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 2 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM e Triton X-100 0,2%). **Pista 8:** controle negativo, milho comum.

A melhor combinação foi tampão bicarbonato de sódio pH 10 e DTT 5 mM, como pode ser observado pela intensidade da banda obtida na pista 4 do *Western Blot* da Figura 6.1b. O tampão de extração utilizado por De Lucca (2003) nos ensaios de *Western Blot* foi utilizado como um tipo de controle positivo dos ensaios de extração.

Realizou-se também uma extração em tampão glicina-HCl pH 3,0 e NaCl 200 mM (pista 5 do gel de SDS-PAGE e *Western Blot* da Figura 6.1b) na tentativa de confirmar a baixa eficiência de extração de pró-insulina em pH ácido. Uma condição bastante próxima já havia sido avaliada nos ensaios do Capítulo 5 (água ajustada em pH 3,0 e NaCl 200 mM) e como a complexidade protéica obtida foi bastante favorável, repetiu-se o experimento, e novamente não se obteve sucesso na extração da pró-insulina, não sendo observada a banda corresponde à pró-insulina na pista 5 do *Western Blot* da Figura 6.1b. A extração em solução de NaCl 300 mM, pH 10,0 e ME 0,6% (pista 6 da Figura 6.1b) foi realizada com base em artigo de Landry e Moreaux (1981) em que os autores conseguiam a solubilização das glutelinas do milho neste solvente. Essa condição também não foi eficiente na solubilização da pró-insulina.

A complexidade protéica visualizada nos géis de eletroforese da Figura 6.1a e b é bastante alta, com exceção das pistas 5 dos géis "a" e "b". O extrato da pista 5 do gel "a" foi obtido com solvente etanol 70% e as proteínas solúveis nesta condição são as zeínas. O extrato da pista 5 do gel "b" foi obtido com extração em tampão glicina-HCl pH 3,0 e NaCl 200 mM. Apesar da baixa complexidade, uma característica desejada, ele não é eficiente na extração de pró-insulina.

Neste conjunto de ensaios pôde-se observar o efeito importante da presença do agente redutor DTT no tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 na solubilização da pró-insulina, comparando as pistas 4 dos *Western* a e b da Figura 6.1.

Como neste ensaio não foi possível obter a combinação de um solvente para extrair a pró-insulina que gerasse uma baixa complexidade protéica,

partiu-se para a investigação de outros solventes. Devido à baixa complexidade protéica obtida no extrato utilizando solvente alcoólico, optou-se por investigar combinações envolvendo os álcoois etanol ou isopropanol, o agente redutor DTT e os tampões glicina-HCl pH 3,0 e bicarbonato de sódio pH 10,0.

O isopropanol é um álcool que favorece a extração das zeínas, quando comparado ao etanol. Segundo Shukla e Cheryan (2001), o isopropanol é mais eficiente em termos de capacidade, isto é, consegue-se extrair uma concentração de zeínas maior para a mesma razão solvente-sólido do que com etanol.

Como as γ -zeínas são ditas solúveis em soluções compostas de 0 a 80% isopropanol na presença de um agente redutor e também em isopropanol 30% em tampão acetato de sódio 30 mM (Shukla e Cheryan, 2001), avaliou-se diferentes porcentagens deste álcool na presença de DTT 5 mM. Também neste ensaio, utilizou-se o tampão bicarbonato 50 mM e DTT 5 mM em pH 9,0, na tentativa de minimizar possíveis reações adversas devido ao pH muito alcalino. Avaliou-se também a presença de uréia 4 M no tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM. A extração no tampão utilizado por De Lucca (2003) nos ensaios de *Western Blot* foi aqui, novamente, utilizado como um controle positivo.

Apesar da baixa complexidade protéica dos extratos, visualizada nos géis das Figuras 6.2, obtidos quando feitas as extrações em solvente alcoólico (pistas 1 a 8 no gel a e pistas 1 a 5 no gel b), a eficiência de extração de pró-insulina foi baixa em comparação com a extração em tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM (pista 7 do gel b).

Realizou-se um novo ensaio de *Western Blot* repetindo os resultados mais promissores obtidos anteriormente utilizando diferentes combinações com o tampão bicarbonato e também com o solvente alcoólico (Figura 6.3).

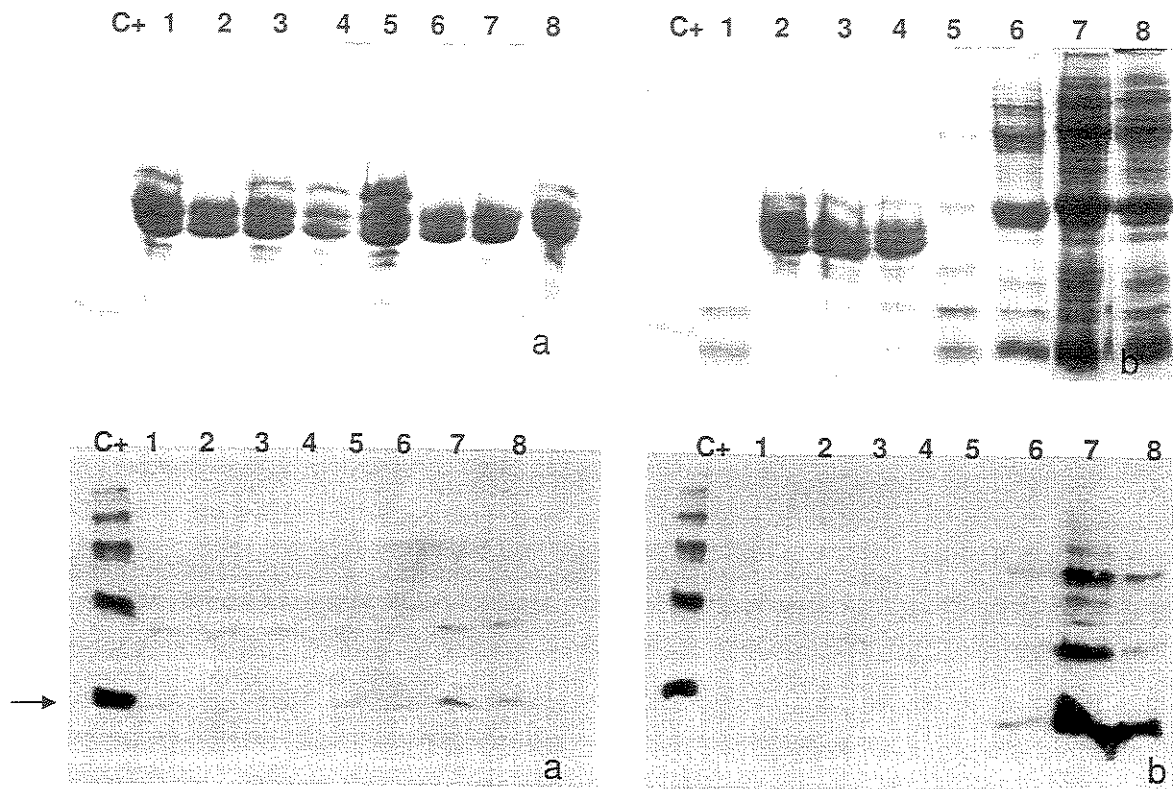


Figura 6.2. Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot dos ensaios de extração com diferentes solventes.

Gel e Western a: C+ controle positivo (300 ng de pró-insulina da Biommm) **Pista 1:** extração em solução de etanol 70% e DTT 5 mM **Pista 2:** extração em solução de etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0. **Pista 3:** extração em solução de etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. **Pista 4:** extração em solução de etanol 70% em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH10,0. **Pista 5:** extração em solução de etanol 70% em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH10,0 e DTT 5 mM. **Pista 6:** extração em isopropanol 70% **Pista 7:** extração em isopropanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0. **Pista 8:** extração em isopropanol 70% em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0. A seta indica a banda da pró-insulina.

Gel e Western b: C+ controle positivo (300 ng de pró-insulina da Biommm) **Pista 1:** extração em isopropanol 30% em tampão acetato de sódio 30 mM pH 7,0. **Pista 2:** extração em isopropanol 80% e DTT 5 mM. **Pista 3:** extração em isopropanol 60% e DTT 5 mM. **Pista 4:** extração em isopropanol 45% e DTT 5 mM. **Pista 5:** extração em isopropanol 30% e DTT 5 mM. **Pista 6:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,0 e DTT 5 mM **Pista 7:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e uréia 4 M e DTT 5 mM **Pista 8:** extração em tampão de extração do Western Blot (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 2 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM e Triton X-100 0,2%).

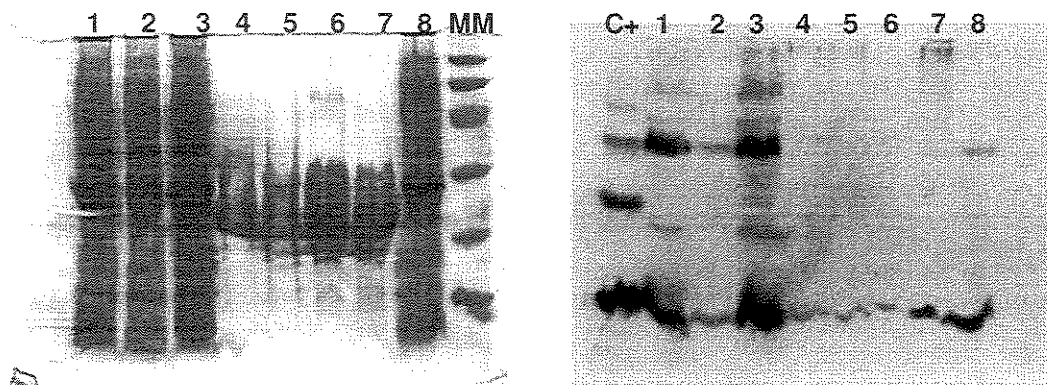


Figura 6.3. Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot dos ensaios de extração com diferentes solventes. **C+** controle positivo (300 ng de pró-insulina) **Pista 1:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM **Pista 2:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 9,0 e DTT 5 mM **Pista 3:** extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM e uréia 4 M. **Pista 4:** extração em solução de isopropanol 70% **Pista 5:** extração em solução de isopropanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. **Pista 6:** extração em etanol 70% em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM. **Pista 7:** extração em etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. **Pista 8:** extração em tampão de extração do Western Blot (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5; EDTA 2 mM; benzamidina 5 mM; DTT 5 mM e Triton X-100 0,2%).

Neste ensaio pôde-se confirmar a importância do pH na solubilização da pró-insulina, sendo que a utilização do tampão bicarbonato de sódio 50 mM e DTT 5 mM em pH 10,0 (pista 1 da Figura 6.3) se mostrou muito mais eficiente na extração da pró-insulina do que a utilização da mesma solução em pH 9,0 (pista 2 da Figura 6.3).

Optou-se por prosseguir os estudos de extração com o tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM e também com um tampão alcoólico composto por uma solução de etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. Este tampão alcoólico foi selecionado por ter sido utilizado por De Lucca (2003) em experimentos de extração da pró-insulina do milho transgênico. Além disso, como há evidências de que a pró-insulina se encontra associada a corpúsculos protéicos, formados por zeínas, é de interesse um estudo mais detalhado utilizando solventes alcoólicos, já amplamente usados na extração de zeínas em processos industriais (Shukla e Cheryan, 2001).

Uma vez selecionados os solventes para a extração da pró-insulina do milho, na etapa seguinte do estudo, apresentado no Capítulo 7, avaliou-se a influência das variáveis operacionais do processo de extração, visando à maximização da extração da proteína recombinante nestes dois solventes.

Capítulo 7

Resultados e Discussões IV

Avaliação dos efeitos das variáveis operacionais na extração de pró-insulina humana recombinante do milho transgênico

No desenvolvimento de um processo de produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas, a etapa de extração é a primeira etapa de RPB e, portanto, irá influenciar na eficiência de todas as etapas seguintes. A extração é uma operação unitária bastante complexa e requer a otimização das variáveis envolvidas no processo (tipo de solvente, temperatura, pH, força iônica, intensidade de agitação, tempo, razão volume:massa, etc.) para que se atinja a eficiência e seletividade desejada.

Realizou-se, nesta etapa do trabalho, uma avaliação dos efeitos das variáveis operacionais relevantes na extração de pró-insulina do milho transgênico para duas soluções extratoras: o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM e a solução alcoólica 70% em tampão glicina-HCl 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. A avaliação foi feita utilizando dois planejamentos fatoriais 2^4 completos envolvendo quatro variáveis independentes: o tempo, a temperatura, velocidade de rotação do impelidor e a razão volume:massa (v:m). As variáveis respostas analisadas foram: concentração de pró-insulina, proteínas totais, AR, ART e polifenóis. O objetivo de utilizar um planejamento experimental foi buscar uma condição ótima para a extração da pró-insulina, realizando um número mínimo de experimentos.

A temperatura é uma variável diretamente ligada à solubilidade de compostos, sendo que proteínas podem ter solubilidade retrógrada, sendo assim, difícil se prever a tendência da variação desta com a temperatura. A velocidade de rotação está relacionada à fragmentação das partículas e à solubilização do soluto, influenciando na resistência à difusão na camada estagnada externa às partículas. Quanto ao tempo de extração, sabe-se que este fator está associado à cinética da transferência de massa, e a razão v:m está relacionada à viscosidade da suspensão e ao gradiente de concentração entre a superfície da partícula e o seio da líquido. Deve-se ressaltar que estes fatores estão inter-relacionados, destacando a importância do planejamento experimental na determinação de possíveis interações.

Os valores decodificados de cada nível utilizado estão apresentados na Tabela 7.1. Os valores selecionados foram baseados em experimentos preliminares e também em dados existentes em literatura (Shukla *et al.*, 2000).

Tabela 7.1. Valores utilizados no planejamento fatorial 2^4 completo da extração de pró-insulina de endosperma do milho transgênico.

Fatores	-1	Níveis 0	+1
Tempo (min)	60	120	180
Razão v:m (ml/g)	5:1	7,5:1	10:1
Rotação (rpm)	300	500	700
Temperatura (°C)	4	22	40

Como mencionado anteriormente no Capítulo 2, o *cassete* de expressão empregado na transformação genética do milho transgênico utilizado neste trabalho possui uma sequência codificadora de peptídeo sinal que direciona a proteína para o interior do retículo endoplasmático, assim como ocorre com as zeínas (De Lucca, 2003). Por ser uma proteína hidrofóbica, a pró-insulina pode estar sendo incluída nos corpúsculos protéicos. Portanto, acredita-se que a extração da pró-insulina esteja de alguma forma relacionada com a extração das zeínas, justificando a escolha destes dois tipos de solventes, um alcoólico e

outro alcalino, já conhecidos da literatura em solubilizar zeínas (Wall e Paulis, 1978; Wallace *et al.*, 1990; Shukla *et al.*, 2000).

7.1.Extração em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM

Os resultados do planejamento experimental fatorial completo 2^4 da extração com tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM estão listados na Tabela 7.2. Os valores dos coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t e o valor p para as variáveis resposta analisadas estão apresentados na Tabela 7.3 e na Tabela 7.4 está apresentada a análise de variância (ANOVA).

Tabela 7.2. Resultados do planejamento fatorial 2^4 completo para a extração com tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

Ensaio	Variáveis descodificadas				Concentração				
	Rotação (rpm)	Razão v:m (g/ml)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	AR (mg/ml)	ART (mg/ml)	Polifenóis (mM)	Proteína total (mg/ml)	Pró-insulina (µg/ml)
1	300	5:1	4	60	0,64	4,49	0,83	9,50	1,28
2	700	5:1	4	60	0,75	4,67	0,85	11,14	1,24
3	300	10:1	4	60	0,48	2,32	0,87	3,03	0,27
4	700	10:1	4	60	0,38	2,30	0,81	3,28	0,16
5	300	5:1	40	60	1,15	5,05	1,15	5,48	4,56
6	700	5:1	40	60	1,04	5,29	0,72	6,32	3,90
7	300	10:1	40	60	0,39	2,42	0,80	4,68	1,30
8	700	10:1	40	60	0,46	2,69	0,76	4,48	2,06
9	300	5:1	4	180	0,96	4,65	0,81	5,19	2,57
10	700	5:1	4	180	0,79	4,53	0,81	6,95	4,11
11	300	10:1	4	180	0,36	2,25	0,85	2,78	0,19
12	700	10:1	4	180	0,36	2,36	0,88	3,15	0,20
13	300	5:1	40	180	1,52	5,59	0,82	6,33	1,40
14	700	5:1	40	180	1,12	7,18	0,95	8,87	2,04
15	300	10:1	40	180	0,64	3,04	0,66	4,68	2,17
16	700	10:1	40	180	0,52	3,83	1,01	6,15	4,37
17	500	7,5:1	22	120	0,83	3,58	0,88	4,26	3,50
18	500	7,5:1	22	120	0,61	3,35	0,86	4,22	3,40
19	500	7,5:1	22	120	0,63	3,33	0,81	4,66	3,42

Tabela 7.3. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a extração do milho transgênico com tampão bicarbonato.

	Pró-insulina				Proteína total				AR			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	2,217**	0,330	6,708	0,0002	5,534*	0,056	99,145	0,0001	0,717*	0,028	25,703	0,002
Rotação (1)	0,270	0,360	0,750	0,4748	0,542*	0,060	8,908	0,0124	-0,045	0,030	-1,480	0,277
Razão m.v(2)	-0,648	0,360	-1,800	0,1096	-1,722*	0,060	-28,307	0,0012	-0,274*	0,030	-9,001	0,012
Temperat (3)	0,736**	0,360	2,042	0,0754	0,123	0,060	2,024	0,1803	0,132*	0,030	4,357	0,049
Tempo (4)	0,142	0,360	0,396	0,7027	-0,238	0,060	-3,915	0,0595	0,061	0,030	2,014	0,182
1x2	0,087	0,360	0,242	0,8150	-0,306*	0,060	-5,024	0,0374	0,026	0,030	0,863	0,479
1x3	0,097	0,360	0,270	0,7943	0,039	0,060	0,647	0,5838	-0,025	0,030	-0,822	0,497
1x4	0,278	0,360	0,771	0,4627	0,226	0,060	3,709	0,0656	-0,041	0,030	-1,356	0,308
2x3	0,400	0,360	1,111	0,2990	0,846*	0,060	13,902	0,0051	-0,079	0,030	-2,589	0,122
2x4	0,249	0,360	0,692	0,5083	0,399*	0,060	6,566	0,0224	-0,040	0,030	-1,315	0,319
3x4	-0,372	0,360	-1,033	0,3317	0,872*	0,060	14,334	0,0048	0,034	0,030	1,110	0,383
	ART				polifenóis							
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p				
Média	3,838*	0,032	120,41	0,0001	0,849*	0,008	102,633	0,0001				
Rotação (1)	0,190*	0,035	5,471	0,0318	0,000	0,009	0,000	1,0000				
Razão m.v (2)	-1,265*	0,035	-	0,0008	-0,019	0,009	-2,080	0,1730				
Temperat (3)	0,470*	0,035	13,533	0,0054	0,010	0,009	1,109	0,3828				
Tempo (4)	0,262*	0,035	7,558	0,0171	0,000	0,009	0,000	1,0000				
1x2	-0,046	0,035	-1,332	0,3145	0,035	0,009	3,883	0,0604				
1x3	0,171*	0,035	4,931	0,0388	0,001	0,009	0,139	0,9024				
1x4	0,106	0,035	3,059	0,0923	0,064*	0,009	7,072	0,0194				
2x3	-0,126	0,035	-3,635	0,0680	-0,033	0,009	-3,606	0,0691				
2x4	-0,044	0,035	-1,260	0,3349	0,020	0,009	2,219	0,1567				
3x4	0,261*	0,035	7,522	0,0172	0,001	0,009	0,139	0,9024				

* fatores estatisticamente significativos a p<0,05 (95% nível de confiança) e ** a p<0,10 (90% nível de confiança).

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

Tabela 7.4. Análise de variância (ANOVA) para o milho transgênico.

Variável Resposta	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
Concentração de pró-insulina	0,377	4,85	1,82
Concentração de proteínas	0,855	11,77	5,05
Concentração de AR	0,802	32,47	8,94
Concentração de ART	0,953	40,57	13,52
Concentração de polifenóis	0,326	8,24	2,72

7.1.1. Concentração de pró-insulina recombinante

Somente a variável temperatura se mostrou estatisticamente significativa, a 90% de confiança, na extração de pró-insulina em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM (Tabela 7.3). A Figura 7.1 mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a concentração de pró-insulina nos extratos do endosperma do milho transgênico.

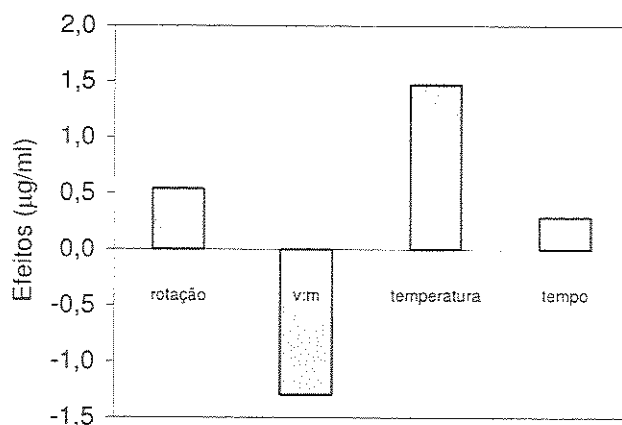


Figura 7.1. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de pró-insulina nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

A temperatura apresentou um efeito positivo na extração de pró-insulina, indicando que um incremento da temperatura do nível -1 para o nível +1 gerou um aumento na concentração de pró-insulina no extrato. Entretanto, esse comportamento não foi observado em todos os ensaios. Por exemplo,

comparando o ensaio 9 com o ensaio 13, um incremento da temperatura levou a uma diminuição na concentração de pró-insulina de 2,57 para 1,40 µg/ml. Uma possível explicação para estes resultados é o fato de que possa ter ocorrido evaporação do solvente durante os ensaios realizados em um tempo maior, levando a valores de concentração maiores do que os reais. Já a razão v:m apresentou um efeito negativo na extração de pró-insulina, enquanto a velocidade de rotação e o tempo de extração apresentaram efeitos positivos.

Shukla *et al.* (2000) investigaram o efeito da temperatura na extração das zeínas na faixa de 20 a 60 °C e concluíram que a solubilização das zeínas foi maior na temperatura de 50 °C. Os autores atribuem esse resultado ao fato de que o transporte de zeínas das partículas da farinha para a solução é limitado pelo transporte das zeínas para fora das células do endosperma e que o coeficiente de difusão da proteína aumenta de 3 a 3,4% por °C.

Russel e Tsao (1982) estudaram o efeito do tamanho de partícula, tempo e agitação na extração de zeínas do endosperma do milho e observaram que a extração da zeínas se mostrou independente da intensidade de agitação, implicando que a taxa de transferência de massa externa exerce pequena influencia no processo. Uma avaliação da cinética de solubilização das zeínas indicou que este processo foi relativamente rápido, atingindo sua completude em aproximadamente 30 minutos quando se utilizou partículas de 100 µm. Entretanto, esse tempo aumentou para 5 a 10 horas quando se utilizou partículas maiores.

Como não foi possível a validação do modelo através do valor do coeficiente de correlação (0,377) e do teste F (1,82 vezes o valor tabelado), optou-se por fazer a análise da extração da pró-insulina do milho transgênico também em termos de porcentagem da proteína total solúvel (%TSP) e com base na produtividade, isto é, a quantidade de pró-insulina extraída por massa de farinha (Tabela 7.5). As Figuras 7.2 e 7.3 mostram os efeitos das variáveis estudadas na extração da pró-insulina em termos da produtividade e %TSP, respectivamente.

Tabela 7.5. Resultados do planejamento fatorial completo para a extração de pró-insulina com tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

ENSAIO	Concentração de pró-insulina (µg/ml)	Concentração de proteína total (mg/ml)	% TSP	Massa de pró-insulina(µg)/massa de farinha(g)
1	1,28	9,50	0,013	6,41
2	1,24	11,14	0,011	6,18
3	0,27	3,03	0,009	2,74
4	0,16	3,28	0,005	1,59
5	4,56	5,48	0,083	22,80
6	3,90	6,32	0,062	19,48
7	1,30	4,68	0,028	12,98
8	2,06	4,48	0,046	20,62
9	2,57	5,19	0,050	12,87
10	4,11	6,95	0,059	20,55
11	0,19	2,78	0,007	1,87
12	0,20	3,15	0,006	1,97
13	1,40	6,33	0,022	6,99
14	2,04	8,87	0,023	10,18
15	2,17	4,68	0,046	21,72
16	4,37	6,15	0,071	43,72
17	3,50	4,26	0,082	26,22
18	3,40	4,22	0,081	25,47
19	3,42	4,66	0,073	25,64

Pode-se observar na Tabela 7.5 que as condições utilizadas no ponto central (ensaios 17 a 19) proporcionaram valores de %TSP e produtividade bastante satisfatórios, uma vez que em termos de processo, a condição do ponto central (temperatura próxima da ambiente: 22 °C, rotação de 500 rpm, tempo de 2h e razão v:m de 7,5:1) é mais vantajosa quando comparada à condição na qual se obteve a máxima produtividade, ensaio 16, no qual todas as variáveis estavam em seus níveis superiores. A produtividade média do ponto central foi aproximadamente 60% do valor máximo obtido.

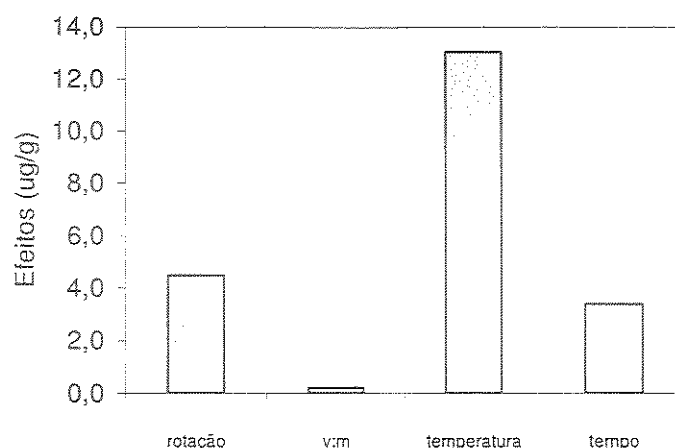


Figura 7.2. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a produtividade de pró-insulina extraída por massa de farinha do endosperma de milho transgênico utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

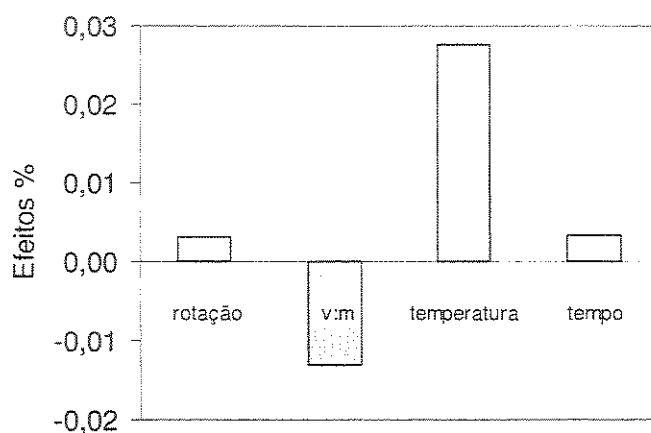


Figura 7.3. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a porcentagem de pró-insulina em relação à proteína total solúvel (%TSP) nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

Os efeitos principais das variáveis independentes sobre a produtividade de pró-insulina se mostraram todos positivos, sendo que, também aqui, somente a temperatura se mostrou estatisticamente significativa a 90% de confiança. Em relação à %TSP, os efeitos principais da temperatura e da razão v:m se mostram significativos na extração da pró-insulina.

As análises de concentração de pró-insulina dos extratos obtidos no

planejamento também foram feitas qualitativamente por SDS-PAGE e *Western Blot* e são apresentadas na Figuras 7.4 e 7.5, respectivamente. A complexidade protéica dos extratos aparentemente não variou para as diferentes condições de extração. Pode-se notar nos géis de eletroforese uma banda mais intensa de uma proteína de massa molecular em torno de 27 kDa, possivelmente γ -zeínas. O milho transgênico que foi utilizado nos ensaios é uma variedade QPM que possui como característica um alto nível de γ -zeínas (Wallace *et al.*, 1990). Estes autores desenvolveram um método de extração completo de zeínas utilizando também um tampão alcalino, o tampão borato de sódio 125 mM a pH 10,0 SDS 1% e ME 2% e agitação durante 60 min a temperatura ambiente.

O *Western Blot* dos extratos obtidos a 40 °C e 180 min, correspondente aos ensaios 14 e 16, apresentaram um perfil diferente dos ensaios conduzidos a 40 °C e 60 min, com uma aparente separação da banda correspondente à pró-insulina, indicando que a combinação de um tempo longo de extração e uma temperatura elevada podem ter causado algum dano à estrutura protéica.

Liadakis *et al.* (1995) estudaram o efeito das variáveis tempo, temperatura, pH e razão v:m na extração de proteínas da farinha de sementes de tomate e concluíram que a combinação de temperatura alta e tempo curto ou, então, temperatura baixa e tempo longo, possibilitou uma redução na desnaturação das proteínas.

Apesar de somente a temperatura ter se mostrado estatisticamente significativa ($p < 0,10$) na concentração de pró-insulina nos extratos, a razão v:m também mostrou uma influência importante no processo, quando comparada às outras variáveis analisadas. Portanto, selecionaram-se estas duas variáveis para serem analisadas em um planejamento fatorial 2^2 completo do tipo estrela visando à otimização da extração de pró-insulina do endosperma do milho transgênico, apresentada no Capítulo 8.

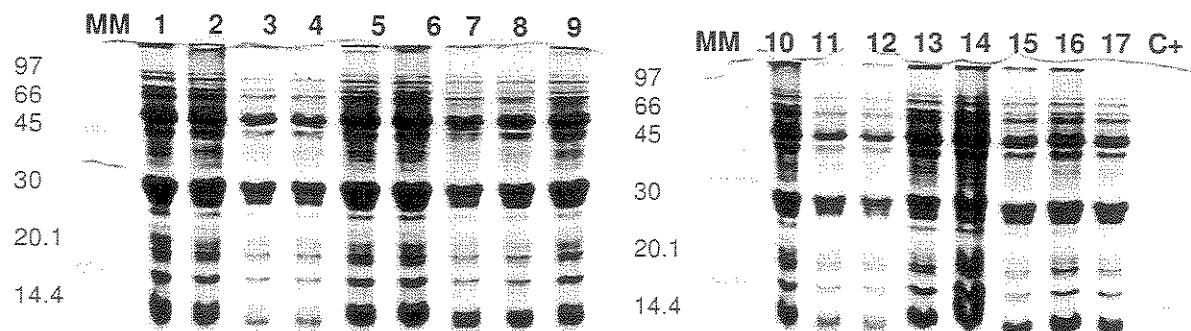


Figura 7.4. Eletroforese SDS-PAGE (gel 15%) dos extratos dos ensaios de extração com o endosperma do milho transgênico e tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM. **MM:** marcadores de massa molecular. **Pistas de 1 a 17:** amostras dos extratos obtidos nas diferentes condições dos ensaios de 1 a 17, previstas no planejamento experimental. **C+:** amostra de pró-insulina. Volume de amostra: 10 μ l.

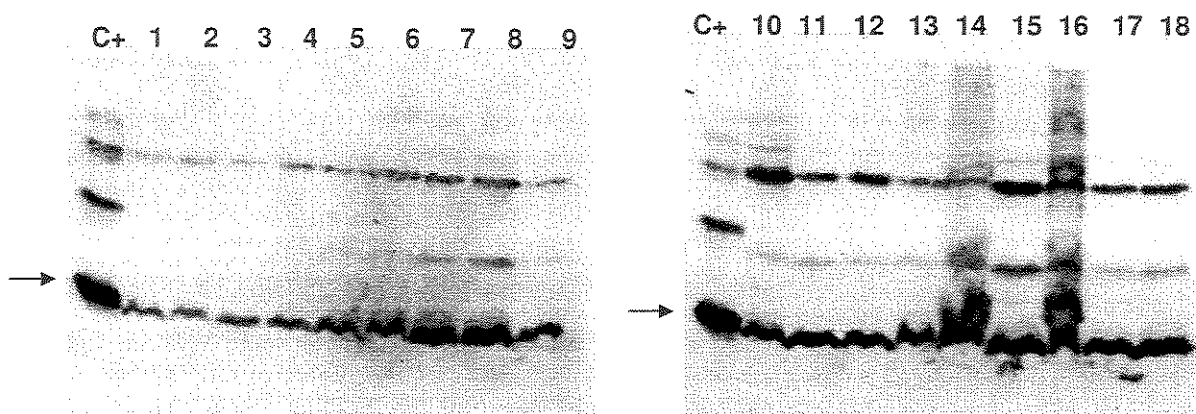


Figura 7.5. Western Blot dos ensaios de extração com o endosperma do milho transgênico e tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM. **C+:** amostra de pró-insulina. **Pistas de 1 a 18:** amostras extratos obtidos nas diferentes condições dos ensaios de 1 a 18, previstas no planejamento experimental. Volume de amostra: 15 μ l. A seta indica a banda correspondente a pró-insulina.

7.1.2. Concentração de proteínas totais

Os efeitos das variáveis rotação e razão v:m se mostraram estatisticamente significativos na extração de proteínas, a 95% de confiança (Tabela 7.3). O coeficiente de correlação (0,855) e o teste F (5,05) se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. A Figura 7.6 mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a concentração de proteínas para o milho transgênico.

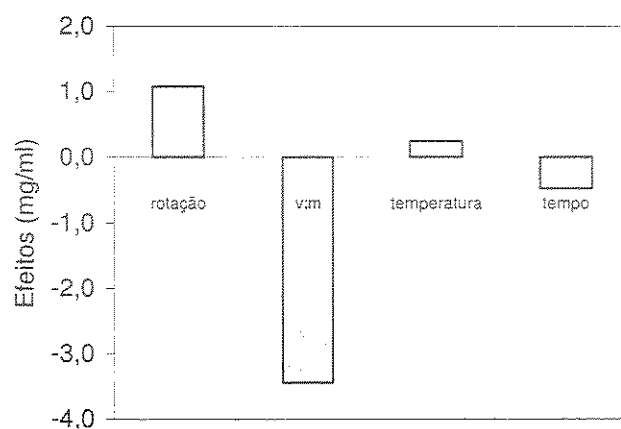


Figura 7.6. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de proteínas totais nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

O efeito positivo da velocidade de rotação está provavelmente relacionado ao fato de que houve um aumento da taxa de cisalhamento das partículas, possibilitando uma maior solubilização das proteínas. Segundo Hood (2004), as proteínas tendem a ficar aderidas à superfície dos grânulos de amido quando o endosperma sofre o processo de moagem para a preparação da farinha.

Já a razão v:m apresentou um efeito negativo indicando que o aumento da quantidade de solvente em relação à massa de farinha utilizada na extração levou a uma diluição das proteínas extraídas. Segundo os princípios de transferência de massa, a força motriz durante o processo de transferência de massa é o gradiente de concentração, que é maior quanto maior é a razão v:m (Cacace e Mazza, 2003). Portanto, no caso da extração das proteínas, se

analisado em termos de concentração de proteínas no extrato, não há limitações de solubilidade em relação à resistência à transferência de massa.

Shukla *et al.* (2000) obtiveram resultados bastante similares quando estudaram o efeito da razão v:m na extração de zeínas de farinha de milho na faixa de 2:1 até 10:1. A quantidade de zeínas foi maior na razão v:m de 8:1, sendo que valores mais baixos de concentração foram obtidos para razão v:m maiores. Os autores atribuem esses resultados à própria diluição do extrato.

Uma análise objetivando a minimização da concentração de proteínas nativas do milho deve ser feita avaliando os efeitos de interação que se mostraram significativos. A interação entre a razão v:m e a velocidade de rotação indica que o aumento da razão v:m leva a uma diminuição na concentração de proteínas no extrato, sendo que esse efeito é ainda mais pronunciado quando a rotação está em seu nível superior (-4,06 mg/ml) do que no nível inferior (-2,83 mg/ml). O mesmo tipo de análise pode ser feito para a interação entre a razão v:m e temperatura, e também entre a razão v:m e o tempo. Um aumento na razão v:m leva a uma diminuição na concentração de proteínas e esse efeito é mais pronunciado no nível inferior da temperatura (-5,14 mg/ml) e do tempo (-4,25 mg/ml) do que nos níveis superiores (-1,76 mg/ml para a temperatura e -2,65 mg/ml para o tempo). Aqui o efeito da interação entre a temperatura e o tempo também é significativo. O aumento da temperatura diminuiu a extração de proteínas quando o tempo estava em seu nível inferior (-1,5 mg/ml) e aumentou a extração quando o tempo estava em seu nível superior (+1,99 mg/ml). Esse resultado indica a possibilidade de ter ocorrido evaporação do solvente com o tempo, levando a uma concentração dos solutos presentes.

Portanto, para minimizar a extração de proteínas deve-se procurar trabalhar em condições nas quais a razão v:m esteja em seu nível superior (10:1) e a temperatura, o tempo e a velocidade de rotação em seus níveis inferiores (4°C, 60 min e 300 rpm).

7.1.3. Concentração de açúcares redutores (AR)

Os efeitos das variáveis operacionais na extração dos carboidratos da farinha do endosperma do milho foram analisados primeiramente em termos da concentração de AR. As variáveis temperatura e razão v:m se mostraram estatisticamente significativas a 95% de confiança (Tabela 7.3). O coeficiente de correlação (0,802) e o teste F (8,94 vezes o valor de F tabelado) se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. A Figura 7.7 mostra os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a concentração de AR para o milho transgênico.

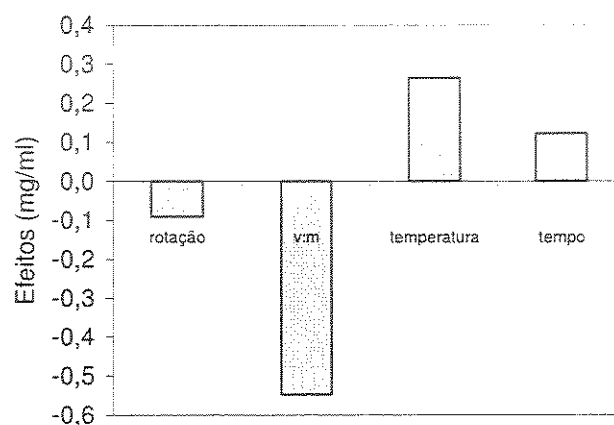


Figura 7.7. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de AR nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

O efeito negativo da razão v:m provavelmente pode ser atribuído à diluição do extrato. Já o efeito positivo da temperatura indica o aumento da solubilidade dos açúcares redutores com a temperatura, possivelmente devido ao aumento do coeficiente de difusão. Esse aumento da difusividade com a temperatura pode ser atribuído ao aumento na energia interna das moléculas, aumentando assim, sua mobilidade, ou então, devido à redução da viscosidade do solvente (Cacace e Mazza, 2003).

Como o objetivo desta análise é a minimização da extração de impurezas, neste caso os açúcares redutores, e uma vez que a razão v:m apresentou um

efeito negativo sobre a extração de AR, deve-se procurar manter uma razão v:m no seu nível mais elevado (10:1) para minimizar esta impureza. Quanto à temperatura, o efeito observado foi positivo, ou seja, um incremento na temperatura irá favorecer a extração de AR, portanto deve-se preferir as condições em que a temperatura esteja próxima a seu nível inferior (4°C). Como as variáveis velocidade de rotação e tempo de extração não se mostraram significativas na extração de AR, seus valores devem ser ajustados de forma a maximizar a extração da proteína recombinante.

7.1.4. Concentração de açúcares redutores totais (ART)

Apesar de todos os efeitos principais das variáveis analisadas se mostrarem estatisticamente significativos a 95% de confiança na extração de ART, o efeito da temperatura e da razão v:m foram maiores em comparação com as outras variáveis, da mesma forma que a extração de AR (Tabela 7.3). O coeficiente de correlação (0,953) e o teste F (13,52 vezes o valor de F tabelado) se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. A Figura 7.8 mostra os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a concentração de ART nos extratos.

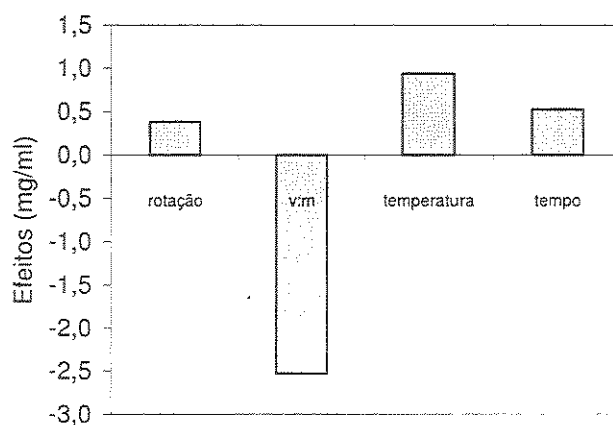


Figura 7.8. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de ART nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

Assim como para a extração de AR, a razão v:m apresentou um efeito negativo na extração dos ART, provavelmente devido à diluição do extrato. A temperatura apresentou um efeito positivo indicando o aumento da solubilidade dos açúcares redutores totais com a temperatura.

Kim *et al.* (2003) estudando a otimização da extração de oligossacarídeos da farinha de soja, avaliaram também o efeito da temperatura na extração da sacarose e constataram que o aumento da temperatura de 25 até 50 °C favoreceu a extração, sendo que em temperaturas mais altas (65 e 80 °C) houve um decréscimo de mais de 50% na extração de sacarose.

Os resultados em relação ao efeito positivo da temperatura também corroboram os obtidos por Nielsen *et al.* (1970). Estudando o efeito da temperatura de extração da farinha de milho nas propriedades das proteínas glutelinas utilizando NaOH 100 mM, os autores também concluíram que a extração a temperatura ambiente removeu mais compostos nitrogenados e mais carboidratos do que os extratos obtidos a 1°C.

A minimização da concentração de ART pode ser obtida utilizando uma razão v:m mais elevada haja vista que esta variável apresentou um efeito negativo sobre a extração de ART. Já os efeitos da temperatura, do tempo e da velocidade de rotação foram positivos, ou seja, um incremento nestas variáveis de extração irá favorecer a extração de ART. Entretanto, como o efeito da interação entre a temperatura e o tempo e também entre a temperatura e a velocidade de rotação foram significativos, é preciso interpretar estes efeitos conjuntamente para uma análise mais precisa. Um aumento da temperatura, seja qual for a velocidade de rotação, aumenta a concentração de ART. Esse aumento é mais pronunciado no nível superior de rotação (+1,28 mg/ml) do que no nível inferior (+0,59 mg/ml). Novamente, na análise da interação do tempo de extração com a temperatura, o aumento da temperatura favoreceu a extração de ART, sendo que este aumento foi maior (+1,46 mg/ml) quando realizada a extração em 180 min do que em 60 min (+0,19 mg/ml). Como o objetivo dos experimentos é minimizar a concentração de ART nos extratos,

deve-se preferir as condições nas quais as variáveis temperatura, tempo e velocidade de rotação estejam em seus níveis inferiores e a razão v:m em seu nível superior.

7.1.5. Concentração de polifenóis

Nenhuma das variáveis analisadas se mostrou estatisticamente significativa a 95% de confiança na extração de polifenóis, ou seja, a concentração de polifenóis nos extratos independe dos fatores analisados, para a faixa estudada (Tabela 7.3). A Figura 7.9 mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a concentração de polifenóis nos extratos.

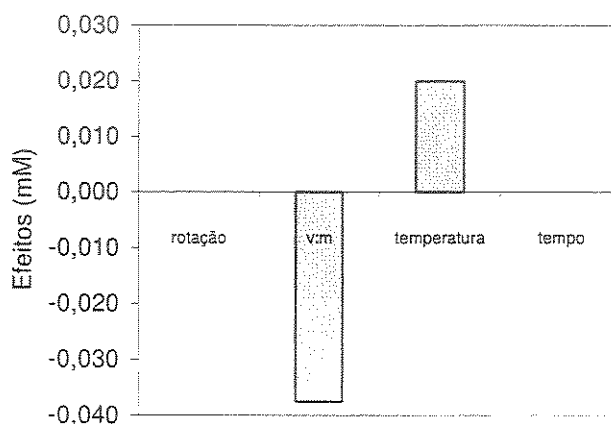


Figura 7.9. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de polifenóis nos extratos de endosperma de milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

Como nenhuma das variáveis analisadas se mostrou estatisticamente significativa na extração de polifenóis, seus valores devem ser ajustados de forma a maximizar a extração da proteína recombinante.

Entretanto, segundo Oh *et al.* (1980), que descrevem a presença de interações hidrofóbicas entre complexos formados entre as proteínas e taninos, a formação destes complexos aumenta com a temperatura e com a hidrofobicidade da proteína. Portanto, apesar da temperatura não tenha sido considerada significativa na extração de polifenóis, é recomendado que ela seja mantida em seus níveis inferiores para evitar a formação de tais complexos.

7.2. Extração com etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM

Os resultados do planejamento experimental fatorial completo 2⁴ da extração de pró-insulina humana recombinante de milho transgênico com etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM estão listados na tabela 7.6. Os valores dos coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t e o valor p para as variáveis resposta analisadas estão apresentados na Tabela 7.7 e na Tabela 7.8 está apresentada a análise de variância (ANOVA).

Tabela 7.6. Resultados do planejamento fatorial 2⁴ completo para a extração com etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

Ensaio	Variáveis descodificadas				Concentração				
	Rotação (rpm)	Razão v:m (ml/g)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	AR (mg/ml)	ART (mg/ml)	Polifenóis (mM)	Proteína total (mg/ml)	Pró-insulina (ng/ml)
1	300	5:1	4	60	0,27	3,69	1,48	0,86	55,89
2	700	5:1	4	60	0,29	3,80	1,38	0,67	60,76
3	300	10:1	4	60	0,14	1,27	1,32	0,42	49,48
4	700	10:1	4	60	0,17	1,94	1,46	0,54	43,07
5	300	5:1	40	60	0,47	3,99	0,91	3,20	105,11
6	700	5:1	40	60	0,54	4,07	1,96	3,56	135,11
7	300	10:1	40	60	0,29	2,63	1,86	1,97	77,17
8	700	10:1	40	60	0,28	2,58	1,98	2,15	96,40
9	300	5:1	4	180	0,31	3,75	1,54	1,09	52,56
10	700	5:1	4	180	0,30	3,78	1,56	0,83	61,02
11	300	10:1	4	180	0,18	1,53	1,32	0,49	47,94
12	700	10:1	4	180	0,18	1,94	1,40	0,59	36,92
13	300	5:1	40	180	0,47	5,30	0,95	4,95	66,14
14	700	5:1	40	180	0,45	9,64	2,52	2,25	44,10
15	300	10:1	40	180	0,30	2,58	1,96	2,45	109,98
16	700	10:1	40	180	0,12	5,10	2,21	0,70	37,69
17	500	7,5:1	22	120	0,39	3,26	1,38	1,14	51,02
18	500	7,5:1	22	120	0,27	2,73	1,37	1,69	57,43
19	500	7,5:1	22	120	0,35	3,01	0,81	1,34	52,30

Tabela 7.7. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a extração do milho transgênico com tampão alcoólico.

	Pró-insulina				Proteína total				AR			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(8)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p
Média	65,267**	4,275	15,266	0,0000	1,626*	0,064	25,456	0,0015	0,304*	0,014	21,665	0,0021
Rotação (1)	-3,076	4,659	-0,660	0,5276	-0,259	0,070	-3,718	0,0653	-0,006	0,015	-0,409	0,7221
Razão m:v(2)	-5,127	4,659	-1,101	0,3031	-0,506*	0,070	-7,274	0,0184	-0,090*	0,015	-5,892	0,0276
Temperat (3)	16,504**	4,659	3,542	0,0076	0,984*	0,070	14,135	0,0050	0,068*	0,015	4,419	0,0476
Tempo (4)	-10,415**	4,659	-2,236	0,0558	-0,001	0,070	-0,018	0,9873	-0,009	0,015	-0,573	0,6246
1x2	-5,736	4,659	-1,231	0,2532	0,090	0,070	1,293	0,3252	-0,014	0,015	-0,900	0,4630
1x3	-2,564	4,659	-,550	0,5972	-0,230	0,070	-3,305	0,0806	-0,011	0,015	-0,736	0,5381
1x4	-9,037**	4,659	-1,940	0,0884	-0,317*	0,070	-4,562	0,0448	-0,020	0,015	-1,309	0,3206
2x3	1,474	4,659	,316	0,7598	-0,330*	0,070	-4,742	0,0417	-0,027	0,015	-1,800	0,2136
2x4	6,217	4,659	1,334	0,2188	-0,105	0,070	-1,509	0,2704	-0,004	0,015	-0,245	0,8290
3x4	-9,069**	4,659	-1,947	0,0874	-0,065	0,070	-,934	0,4489	-0,021	0,015	-1,391	0,2987
ART												
polifenóis												
Média	3,505*	0,061	57,618	0,0003	1,573*	0,064	24,633	0,0000				
Rotação (1)	0,507*	0,066	7,647	0,0167	0,196*	0,070	2,812	0,0228				
Razão m:v(2)	-1,153*	0,066	-17,396	0,0033	0,076	0,070	1,087	0,3087				
Temperat (3)	0,887*	0,066	13,380	0,0055	0,181*	0,070	2,596	0,0318				
Tempo (4)	0,603*	0,066	9,099	0,0119	0,069	0,070	0,997	0,3479				
1x2	-0,063	0,066	-0,952	0,4414	-0,122	0,070	-1,752	0,1179				
1x3	0,354	0,066	5,346	0,0333	0,178*	0,070	2,560	0,0336				
1x4	0,406*	0,066	6,119	0,0257	0,044	0,070	0,638	0,5414				
2x3	1,914	0,0920	-0,111	0,066	-1,669	0,2371	0,133	0,070				
2x4	-0,512	0,6224	-0,262	0,066	-3,951	0,0585	-0,036	0,070				
3x4	0,674*	0,5194	0,566	0,066	8,533	0,0135	0,047	0,070				

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança) e ** a $p < 0,10$ (90% nível de confiança).

Tabela 7.8. Análise de variância (ANOVA) para o milho transgênico.

Variável Resposta	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
Concentração de pró-insulina	0,652	6,58	2,75
Concentração de proteínas	0,839	18,30	5,89
Concentração de AR	0,796	31,19	8,59
Concentração de ART	0,872	10,73	3,57
Concentração de polifenóis	0,540	5,88	1,79

7.2.1. Concentração de pró-insulina em solvente alcoólico

Os efeitos principais das variáveis temperatura e tempo de extração se mostraram estatisticamente significativos a 90% de confiança (Tabela 7.7). A Figura 7.10 mostra os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a concentração de pró-insulina extraída do endosperma do milho transgênico.

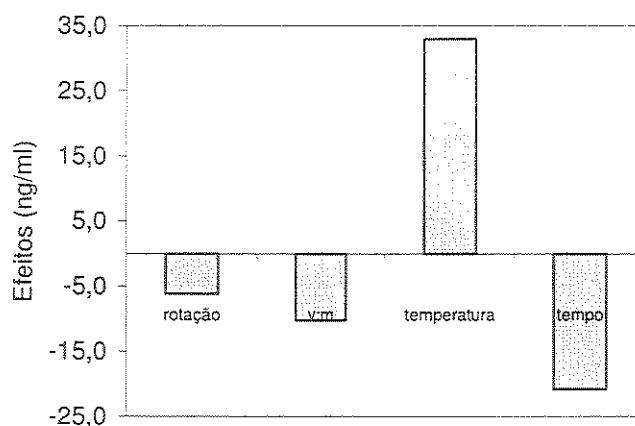


Figura 7.10. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de pró-insulina nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

Os efeitos da interação entre a velocidade de rotação e o tempo e entre a temperatura e o tempo também se mostraram estatisticamente significativos. O aumento do tempo de extração levou a uma diminuição na concentração de pró-insulina, seja qual for a velocidade de rotação ou temperatura. A redução

foi maior no nível superior da velocidade de rotação (-41,84 g/ml) do que no nível inferior (-3,74 mg/ml). Novamente, para a temperatura a redução foi maior no nível superior da temperatura (-43,61 g/ml) do que no nível inferior (-2,76 mg/ml). Como o objetivo é maximizar a extração de pró-insulina, a temperatura deve ser mantida em seu nível superior (40°C). Já as outras variáveis devem ser mantidas em seus níveis inferiores: velocidade de rotação 300 rpm, tempo 60 min e razão v:m 1:5.

Como não foi possível a validação do modelo através do valor do coeficiente de correlação (0,652) e do teste F (2,75 vezes o valor de F tabelado), a análise da extração da pró-insulina do milho transgênico também foi feita com base na porcentagem da proteína total solúvel (%TSP) e com base na produtividade (Tabela 7.9). Pode-se observar que as condições utilizadas nos ensaios proporcionaram valores de %TSP e produtividade baixos quando comparados aos ensaios utilizando tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10 e DTT 5mM. A produtividade média do ponto central e a máxima dos ensaios foram 64 e 40 vezes menores, respectivamente, utilizando o solvente alcoólico.

As análises de SDS-PAGE e *Western Blot* dos extratos obtidos no planejamento estão apresentadas na Figuras 7.11 e 7.12, respectivamente. Pode-se observar que a complexidade protéica dos extratos foi baixa para a maioria das condições de extração testadas. O *Western Blot* dos extratos obtidos nos ensaios a 40 °C (ensaios 5, 6, 7, 8, 13 e 15) apresentaram bandas mais intensas, indicando que o efeito positivo da temperatura na extração.

Apesar da baixa complexidade protéica obtida nos ensaios utilizando o solvente etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM, a concentração de pró-insulina extraída foi baixa quando comparada a concentração obtida usando o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5mM.

Tabela 7.9. Resultados do planejamento fatorial completo para a extração de pró-insulina com etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

ENSAIO	Concentração de pró-insulina (ng/ml)	Concentração de proteína total (mg/ml)	%TSP	Massa de pró-insulina(μ g)/massa de farinha(g)
1	55,89	0,86	0,006	0,28
2	60,76	0,67	0,009	0,30
3	49,48	0,42	0,012	0,49
4	43,07	0,54	0,008	0,43
5	105,11	3,20	0,003	0,53
6	135,11	3,56	0,004	0,68
7	77,17	1,97	0,004	0,77
8	96,40	2,15	0,004	0,96
9	52,56	1,09	0,005	0,26
10	61,02	0,83	0,007	0,31
11	47,94	0,49	0,010	0,48
12	36,92	0,59	0,006	0,37
13	66,14	4,95	0,001	0,33
14	44,10	2,25	0,002	0,22
15	109,98	2,45	0,004	1,10
16	37,69	0,70	0,005	0,38
17	51,02	1,14	0,004	0,38
18	57,43	1,69	0,003	0,43
19	52,30	1,34	0,004	0,39

7.2.2. Concentração de proteínas totais em solvente alcoólico

Os efeitos principais das variáveis velocidade de rotação, razão v:m e temperatura se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança (Tabela 7.7). A Figura 7.13 mostra os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a concentração de proteínas extraída do milho transgênico. O coeficiente de correlação (0,839) e o teste F (5,89 vezes o valor de F tabelado) se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo.

Os efeitos da interação entre a razão v:m e a temperatura e entre a velocidade de rotação e o tempo também se mostraram significativos. Um aumento na razão v:m leva a uma diminuição na concentração de proteínas, seja qual for a temperatura utilizada (dentro da faixa estudada). Esse efeito é mais pronunciado no nível superior da temperatura (-1,67 mg/ml) do que no nível inferior (-0,40 mg/ml). O aumento da velocidade de rotação diminuiu a extração de proteínas quando o tempo estava em seu nível superior (-1,18 mg/ml) e quase não variou quando o tempo estava em seu nível inferior (+0,12 mg/ml). A minimização da concentração de proteínas nos extratos é obtida utilizando condições nas quais a razão v:m, velocidade de rotação e tempo estejam nos níveis superiores e temperatura no nível inferior.

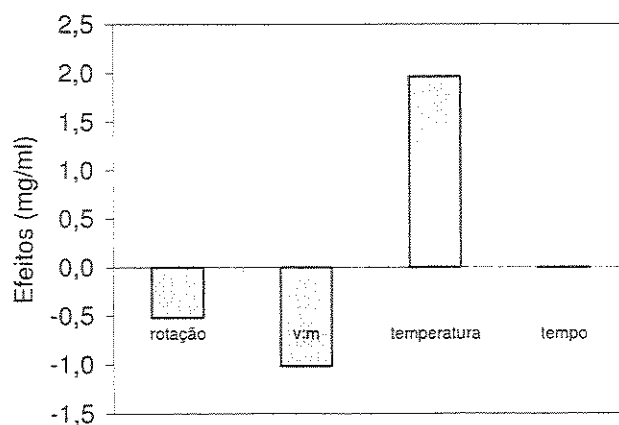


Figura 7.13. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de proteínas totais nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

A concentração de proteínas nos ensaios realizados com solvente alcoólico foi bem inferior àquela obtida com o tampão bicarbonato. A significância dos efeitos das variáveis analisadas também diferiu, indicando que o solvente utilizado irá influenciar no comportamento das variáveis sobre a extração de proteínas do milho. Isto se deve, provavelmente, a diferentes classes de proteínas extraídas nestes dois solventes utilizados. Como dito anteriormente (Capítulo 6), as zeínas são as principais proteínas extraídas em solventes alcoólicos.

Shukla *et al.* (2000) estudaram a extração de zeínas de milho utilizando solvente alcoólico através de um planejamento fatorial 2^4 completo. As variáveis independentes estudadas foram a temperatura, o tempo, a razão volume-massa e a concentração de etanol. Os autores também concluíram que os efeitos da temperatura e da razão volume-massa são estatisticamente significativos ($p < 0,05$) na extração das zeínas, sendo que as condições de máxima extração encontradas foram em temperatura de 45°C, 68% de etanol, razão volume-massa de 7,8:1 (g/ml) e tempo de extração de 55 min.

7.2.3. Concentração de AR em solvente alcoólico

Os efeitos das variáveis temperatura e razão v:m se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança (Tabela 7.7). O coeficiente de correlação (0,796) e o teste F (8,59 vezes o valor de F tabelado) se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. A Figura 7.14 mostra os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a concentração de AR extraída do endosperma do milho transgênico.

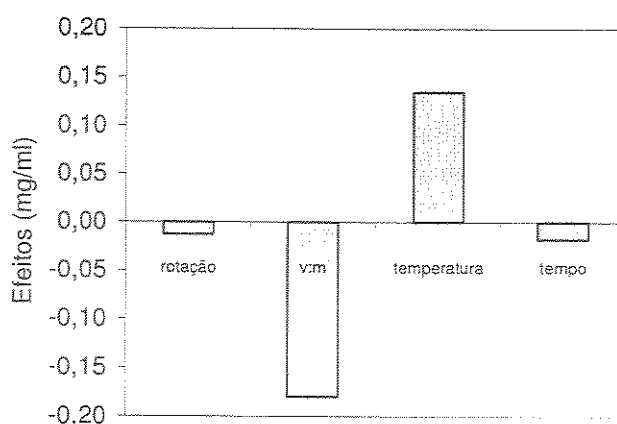


Figura 7.14. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de AR nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

O comportamento da extração de AR foi bastante similar para os dois tipos de solvente utilizados, sendo que a concentração de AR foi um pouco maior nos ensaios realizados com o tampão bicarbonato. Portanto, assim como nos ensaios de extração de AR com o tampão bicarbonato, o efeito negativo da razão v:m, provavelmente, pode ser atribuído à diluição do extrato e o efeito positivo da temperatura ao aumento da solubilidade dos açúcares redutores, possivelmente, devido ao aumento do coeficiente de difusão.

Como a razão v:m apresentou um efeito negativo sobre a extração de AR, deve-se procurar manter uma razão v:m mais elevada para minimizar esta impureza. Já o efeito da temperatura foi positivo, ou seja, um incremento na temperatura de extração irá favorecer a extração de AR e, portanto deve-se preferir a região da superfície de resposta em que a temperatura esteja em seu nível inferior (4°C). Como as variáveis velocidade de rotação e tempo de extração não se mostraram significativas na extração de AR, seus valores devem ser ajustados de forma a maximizar a extração da proteína recombinante.

7.2.4. Concentração de ART em solvente alcoólico

Todos os efeitos principais das variáveis analisadas se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança na extração de ART (Tabela

7.7). O coeficiente de correlação (0,872) e o teste F (3,57 vezes o valor de F tabelado) se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. A Figura 7.15 mostra os efeitos principais das variáveis estudadas sobre a concentração de ART extraída do endosperma do milho transgênico.

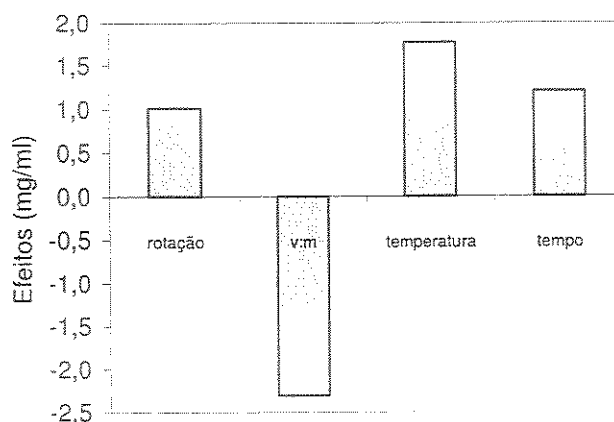


Figura 7.15. Histograma dos efeitos principais das variáveis independentes sobre a concentração de ART nos extratos de endosperma de milho transgênico utilizando etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

Como os efeitos de interação entre a temperatura e o tempo, entre a velocidade de rotação e o tempo e também entre a temperatura e a velocidade de rotação foram significativos é preciso interpretar estes efeitos conjuntamente. Um aumento da temperatura, seja qual for a velocidade de rotação, aumenta a concentração de ART. Esse aumento é mais pronunciado no nível superior de rotação (+2,48 mg/ml) do que no nível inferior (+1,07 mg/ml). Novamente, na análise da interação do tempo de extração com a temperatura, o aumento da temperatura, favoreceu a extração de ART, sendo que este aumento foi maior quando realizada a extração em 180 min (+2,90 mg/ml) do que em 60 min (+0,65 mg/ml). A velocidade de rotação favoreceu a extração de ART, sendo esse efeito maior quando realizada a extração em 180 min (+1,82 mg/ml) do que em 60 min (+0,20 mg/ml).

Os efeitos das variáveis sobre a extração de ART utilizando solvente alcoólico foram similares aos efeitos obtidos utilizando o tampão bicarbonato,

O efeito da interação entre a velocidade de rotação e a temperatura também se mostrou significativo. Um aumento da velocidade de rotação, seja qual for a temperatura, aumenta a extração de polifenóis. O aumento é mais pronunciado no nível superior da temperatura (+0,62 mM) do que nível inferior (+0,11 mM). Em geral, como os efeitos principais das variáveis foram todos positivos na extração de polifenóis, seus valores devem ser mantidos nos níveis inferiores de forma a minimizar a extração deste interferente.

O comportamento da extração de polifenóis diferiu para os dois tipos de solventes utilizados. Enquanto que nos ensaios realizados com tampão bicarbonato nenhum dos efeitos se mostrou significativo, para o solvente alcoólico, a extração de polifenóis foi influenciada significativamente pelas variáveis analisadas. Além disso, a concentração de polifenóis foi superior na maioria dos ensaios realizados com tampão alcoólico.

7.3. Conclusões sobre o efeito das variáveis operacionais na extração

Esta etapa do trabalho teve como objetivo principal analisar os efeitos de quatro variáveis operacionais na extração da pró-insulina humana recombinante produzida em milho transgênico — temperatura, tempo, velocidade de rotação e razão volume:massa — utilizando duas soluções extratoras, sendo importante ressaltar que, além da eficiência da recuperação da proteína heteróloga, era de interesse que o conteúdo de impurezas no extrato em termos de concentração de carboidratos, polifenóis e proteínas nativas fosse minimizado.

Também nesta etapa do trabalho, as condições operacionais influenciaram significativamente a composição dos extratos de milho, fornecendo informações básicas sobre a solubilidade destes componentes do milho. Tais informações podem assim contribuir para estudos de extração de diferentes proteínas heterólogas produzidas em milho.

As principais conclusões dos efeitos da temperatura, razão v:m, tempo e

velocidade de rotação para cada variável resposta analisada são detalhadas a seguir tanto para os ensaios do planejamento experimental utilizando o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5mM, quanto para os ensaios com o solvente etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM.

1. *Concentração de açúcares redutores (AR)*: As variáveis que mais influenciaram na extração destes carboidratos foram a razão v:m e a temperatura, sendo que os efeitos destas variáveis se mostraram significativos na extração de AR para os dois tipos de solventes utilizados, ou seja, a influência das variáveis operacionais na extração de AR independe do solvente utilizado. No entanto, a concentração de AR nos extratos utilizando o tampão bicarbonato foi aproximadamente o dobro da obtida em solvente alcoólico, para a maioria dos ensaios. Como o efeito da razão v:m foi negativo e da temperatura foi positivo, para minimizar a concentração de AR nos extratos deve-se procurar manter uma razão v:m no seu nível mais elevado (10:1) e a temperatura em seu nível inferior (4°C).

2. *Concentração de açúcares redutores totais (ART)*: Todas as variáveis analisadas se mostraram estatisticamente significativas na extração de ART para as duas soluções extratoras. Isso nos leva a estender a conclusão obtida para a extração de AR, de que influência das variáveis operacionais na extração de AR independe do solvente utilizado, para a extração de carboidratos em geral. A concentração de ART nos extratos utilizando o tampão bicarbonato foi superior à concentração obtida em solvente alcoólico, para a maioria dos ensaios. O efeito da razão v:m foi negativo, enquanto que a temperatura, a velocidade de rotação e o tempo tiveram efeitos positivos na extração de ART, de forma que, para minimizar a concentração de carboidratos no extrato, deve-se manter uma razão v:m no seu nível mais elevado (10:1) e a temperatura, rotação e tempo em seus níveis inferiores (4°C, 300 rpm e 60 min, respectivamente).

3. *Concentração de polifenóis*: A extração de compostos fenólicos utilizando o tampão bicarbonato não sofreu influência significativa das

variáveis operacionais analisadas, enquanto que quando se utilizou o solvente alcoólico, as variáveis velocidade de rotação e temperatura foram consideradas estatisticamente significativas. Além disso, a concentração de polifenóis nos extratos alcoólicos foi superior para todas as condições experimentais analisadas. Os efeitos das quatro variáveis na extração de polifenóis com solvente alcoólico foram positivos, de forma que para minimizar a concentração de polifenóis nestes extratos deve-se manter a razão v:m, a temperatura, rotação e tempo em seus níveis inferiores (5:1, 4°C, 300 rpm e 60 min, respectivamente).

4. *Concentração de proteínas:* As variáveis que influenciaram a extração de proteínas em tampão bicarbonato foram a razão v:m e a velocidade de agitação, enquanto que em solvente alcoólico além destas duas variáveis, a temperatura também foi significativa, apresentando um efeito positivo na extração de proteínas. A velocidade de rotação apresentou um efeito positivo quando se utilizou o tampão bicarbonato e negativo para o solvente alcoólico. Já a razão v:m apresentou um efeito negativo para ambos solventes. Essas diferenças na influência das variáveis operacionais pode ser atribuída às diferentes classes de proteínas que são extraídas em cada um destes solventes. Por exemplo, como discutido anteriormente, em tampão alcoólico se extrai majoritariamente as prolaminas do milho, enquanto que em tampão alcalino pode-se extrair proteínas das quatro classes, ou seja, albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas.

5. *Concentração de pró-insulina:* Assim como na extração de proteínas nativas do milho, a influência das variáveis operacionais na extração de pró-insulina diferiu dependendo do solvente utilizado. Para as extrações realizadas com o tampão bicarbonato, as variáveis que mais influenciaram foram a temperatura, seguida pela razão v:m, que apesar de não ter sido estatisticamente significativa, o seu efeito foi importante na concentração de pró-insulina nos extratos. O efeito da temperatura foi positivo, enquanto que a razão v:m teve um efeito negativo. Já para os extratos obtidos utilizando o

solvente alcoólico, as variáveis tempo e temperatura se mostraram estatisticamente significativas. A temperatura também teve um efeito positivo com este solvente e o tempo teve um efeito negativo na extração da pró-insulina.

No entanto, a eficiência da recuperação de pró-insulina foi bastante superior quando se utilizou o tampão bicarbonato, sendo que, a concentração de pró-insulina nos extratos obtidos com o tampão bicarbonato chegou a ser mais de 100 vezes superior ao valor da concentração de pró-insulina no extrato alcoólico, para uma mesma condição experimental. Portanto, selecionou-se o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5mM e as variáveis independentes temperatura e razão v:m para serem analisadas em um planejamento fatorial 2^2 completo do tipo estrela visando à otimização da extração de pró-insulina do endosperma do milho transgênico pois, de uma maneira geral, estas foram as variáveis operacionais que mais influenciaram na extração dos componentes do milho analisados.

Capítulo 8

Resultados e Discussões V

Otimização da extração da pró-insulina humana recombinante do milho transgênico

A otimização da extração de pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM foi realizada utilizando um planejamento fatorial completo 2^2 do tipo estrela para avaliar a influência de duas variáveis independentes selecionadas no Capítulo 7, a temperatura e a razão volume:massa, sobre as mesmas variáveis respostas da etapa de extração analisadas anteriormente: concentração de pró-insulina, açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), polifenóis e proteínas totais. O planejamento em estrela permite que sejam gerados modelos quadráticos através da adição de ensaios nos pontos axiais, possibilitando assim um conhecimento sobre a curvatura da superfície de resposta. Os valores decodificados de cada nível utilizado estão apresentados nas Tabela 8.1.

Tabela 8.1. Valores utilizados no planejamento fatorial da otimização da extração de pró-insulina.

Nível	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Razão v:m (ml/g)	4:1	5:1	7:1	9:1	10:1
Temperatura (°C)	10	15	25	35	40

Como a faixa de temperatura utilizada no Capítulo 7, de 4 a 40 °C, foi uma faixa relativamente grande, optou-se por reduzir este intervalo para de 10 a 40 °C. A razão v:m foi avaliada de 4:1 a 10:1 que é uma relação adequada para evitar a diluição excessiva do extrato e ao mesmo tempo minimizar a concentração das impurezas analisadas. A velocidade de rotação do impelidor foi mantida no valor do ponto central do planejamento anterior do Capítulo 7 (500 rpm) e o tempo necessário à extração de pró-insulina foi monitorado em três intervalos de tempo, visando uma análise da cinética para cada condição testada. As outras variáveis respostas foram analisadas somente no final da extração (após 3h). O planejamento experimental utilizado bem como os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.2. Os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t e o valor p para as variáveis resposta estão apresentados na Tabela 8.3 e a Tabela 8.4 apresenta a análise de variância (ANOVA).

Tabela 8.2. Resultados dos ensaios do planejamento fatorial completo para a extração de pró-insulina do endosperma do milho transgênico.

Ensaio	T (°C)	Razão v:m (ml/g)	Concentração				
			Pró-insulina (µg/ml)	Proteínas (mg/ml)	AR (mg/ml)	ART (mg/ml)	Polifenóis (mg/ml)
1	35	9:1	12,22	5,04	0,91	2,92	1,15
2	35	5:1	10,66	6,78	1,96	5,31	1,35
3	15	9:1	9,22	4,76	0,82	2,73	1,43
4	15	5:1	6,20	6,51	1,50	5,03	1,53
5	25	7:1	9,49	5,72	1,03	3,12	1,47
6	25	7:1	10,91	5,76	1,00	3,15	1,42
7	25	7:1	10,07	5,89	1,07	3,24	1,40
8	40	7:1	16,26	5,85	1,41	3,86	1,16
9	10	7:1	5,82	5,13	0,92	3,42	1,51
10	25	10:1	13,46	4,39	0,74	2,28	1,57
11	25	4:1	8,09	7,43	2,70	7,15	1,49

Tabela 3.2. Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t e valor p provenientes do planejamento fatorial completo para a extração do milho transgênico.

	Pró-insulina				Proteína total				AR			
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(5)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(5)	p
Média	10,156*	0,907	11,192	0,0001	5,792*	0,049	117,770	0,0001	1,032*	0,110	9,376	0,0002
T (L)	2,779*	0,556	5,001	0,0041	0,195*	0,030	6,483	0,0230	0,153	0,067	2,276	0,0719
T (Q)	0,110	0,661	0,166	0,8748	-0,133	0,036	-3,714	0,0655	0,031	0,080	0,384	0,7170
v:m (L)	1,523*	0,556	2,741	0,0407	-0,974*	0,030	-32,331	0,0010	-0,561*	0,067	-8,327	0,0004
v:m (Q)	-0,023	0,661	-0,035	0,9735	0,078	0,036	2,176	0,1615	0,307*	0,080	3,825	0,0123
Txv:m	-0,365	0,786	-0,464	0,6621	0,004	0,043	0,090	0,9366	-0,092	0,095	-0,960	0,3811
	ART				polifenóis							
	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(5)	p	Coeficiente regressão	Desvio padrão	t(2)	p				
Média	3,172*	0,213	14,921	0,0000	1,431*	0,021	66,736	0,0002				
T (L)	0,136	0,130	1,048	0,3428	-0,121*	0,013	-9,227	0,0115				
T (Q)	0,189	0,155	1,223	0,2758	-0,065	0,016	-4,189	0,0525				
v:m (L)	-1,447*	0,130	-11,113	0,0001	-0,022	0,013	-1,713	0,2288				
v:m (Q)	0,727*	0,155	4,693	0,0054	0,032	0,016	2,059	0,1757				
Txv:m	-0,023	0,184	-0,123	0,9068	-0,025	0,019	-1,329	0,3151				

* fatores estatisticamente significativos a $p < 0,05$ (95% nível de confiança).

Tabela 8.4. Análise de variância (ANOVA) para o milho transgênico.

Variável Resposta	R	F _{cal}	F _{cal} /F _{tab}
Concentração de pró-insulina	0,861	24,78	5,56
Concentração de proteínas	0,961	99,17	22,24
Concentração de AR	0,882	30,02	6,73
Concentração de ART	0,949	75,73	16,98
Concentração de polifenóis	0,589	12,92	2,52

8.1. Análise da extração de pró-insulina humana recombinante

Antes da realização da sequência de ensaios prevista no planejamento experimental, realizou-se um estudo da cinética da extração da pró-insulina nas condições do ponto central (razão v:m 7:1 e temperatura de 25°C) visando a determinar o tempo necessário para a máxima extração desta proteína nesta condição. As amostras foram analisadas por ensaio ELISA (Figura 8.1) e também, qualitativamente, por SDS-PAGE e *Western Blot* (Figura 8.2).

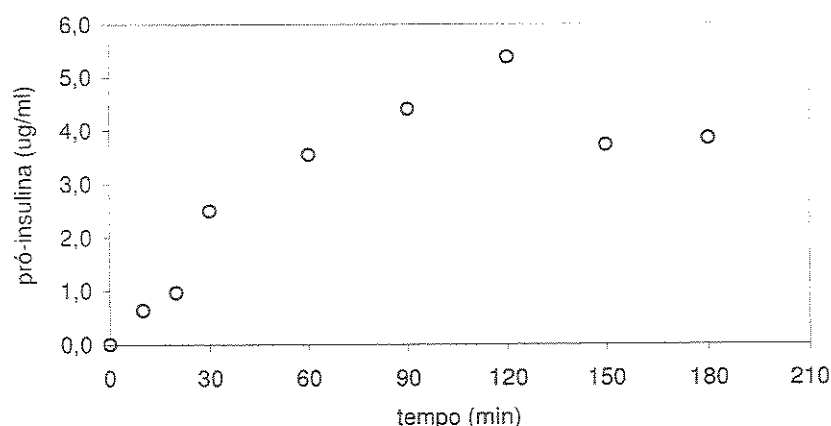


Figura 8.1. Cinética da extração de pró-insulina do endosperma do milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5mM na razão v:m 7:1 e temperatura de 25°C e velocidade de rotação do impelidor de 500 rpm.

Os resultados obtidos indicam que a cinética da extração de pró-insulina é relativamente lenta e que somente após 2h de extração parece haver um

equilíbrio na concentração desta proteína no extrato. A fim de avaliar a influência dos parâmetros temperatura e razão v:m na cinética de extração da pró-insulina, realizou-se um acompanhamento da concentração de pró-insulina em todos os ensaios previstos no planejamento experimental durante 3h, coletando-se uma amostra do extrato a cada 1h (Figura 8.3).

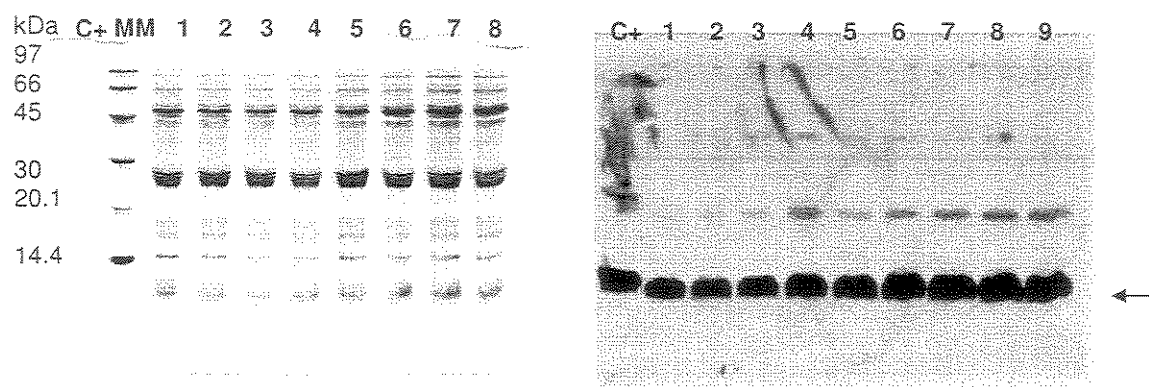


Figura 8.2. Eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot* da cinética da extração de pró-insulina em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10 e DTT 5mM na razão v:m 7:1 e temperatura de 25 °C e 500 rpm de velocidade de rotação do impelidor. **MM:** marcadores de massa molecular. **Pistas de 1 a 8:** amostras coletadas após 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min de extração. **Pista 9:** duplicata da amostra em 180 min. **C+:** amostra de pró-insulina. Volume de amostra: 5 µl (SDS-PAGE) e 15µl (*Western Blot*). A seta indica a banda de pró-insulina.

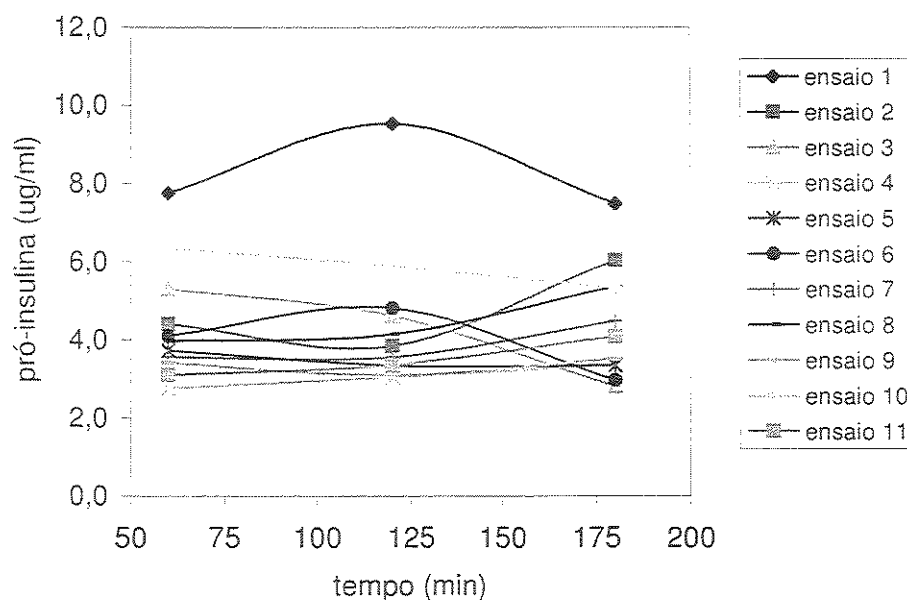


Figura 8.3. Acompanhamento da concentração de pró-insulina nos extratos do milho transgênico.

Dependendo da condição de extração utilizada, a concentração da proteína parece somente aumentar com o tempo de extração, enquanto que em outras condições, ocorre um máximo após 2h de extração. Como o objetivo é maximizar a extração de pró-insulina, a avaliação dos efeitos das variáveis foi feita com amostras obtidas após 2h de extração.

O termo linear para a temperatura e para a razão v:m se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança (Tabela 8.3). Tanto a temperatura quanto a razão v:m exerceram um efeito positivo sobre a extração de pró-insulina.

O coeficiente de correlação (0,861) e o teste F (5,56 vezes o valor de F tabelado) a 95% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. Ignorando os efeitos não significativos na resposta final, o modelo linear (codificado) obtido mostrou que a extração de pró-insulina depende da temperatura e da razão v:m através da seguinte equação de primeira ordem (Equação 8.1):

$$[\text{Pró-insulina}] (\mu\text{g/ml}) = 10,16 + 2,78 \cdot (\text{Temperatura}) + 1,52 \cdot (\text{Razão v:m}) \quad \text{Equação 8.1}$$

Esse modelo foi então utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 8.4).

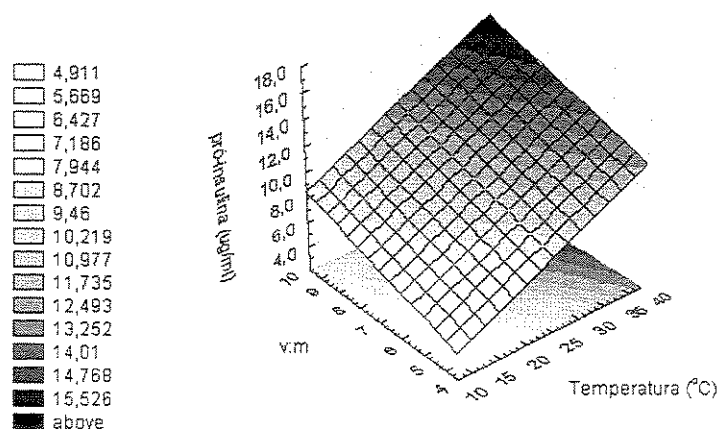


Figura 8.4. Superfície de resposta para a extração de pró-insulina do milho transgênico como uma função da temperatura e razão v:m.

A superfície de resposta indica que a região ótima para maximizar a extração de pró-insulina do milho transgênico é aquela na qual a temperatura e a razão v:m estão em seus níveis superiores, uma vez que o valor máximo de temperatura utilizado, 40°C, é um valor limite para que se evite a desnaturação da maioria das proteínas (Damodaran, 1985) e a razão v:m 10:1 é uma relação adequada para evitar a diluição excessiva do extrato.

A análise da extração da pró-insulina do milho transgênico também foi feita com base na porcentagem da proteína total solúvel (%TSP) e com base na produtividade, isto é, a quantidade de pró-insulina extraída por massa de farinha (Tabela 8.5). A análise dos efeitos para a produtividade e %TSP também apresentou comportamento similar ao da concentração (dados não apresentados).

Tabela 8.5. Porcentagem da proteína total solúvel e produtividade da extração de pró-insulina do milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

Ensaio	T	v:m	pró-insulina ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% TSP	Massa de pró-insulina(μg)/massa de farinha(g)
1	35	9:1	12,224	0,243	109,93
2	35	5:1	10,664	0,157	53,32
3	15	9:1	9,219	0,194	82,90
4	15	5:1	6,200	0,095	31,00
5	25	7:1	9,493	0,166	66,48
6	25	7:1	10,908	0,189	76,39
7	25	7:1	10,066	0,171	70,49
8	40	7:1	16,260	0,278	113,86
9	10	7:1	5,821	0,113	40,76
10	25	10:1	13,464	0,306	134,64
11	25	4:1	8,086	0,109	32,35

O ensaio de SDS-PAGE dos extratos obtidos no planejamento está apresentado na Figura 8.5. Nota-se que a complexidade protéica dos extratos

aparentemente não variou para as diferentes condições de extração.

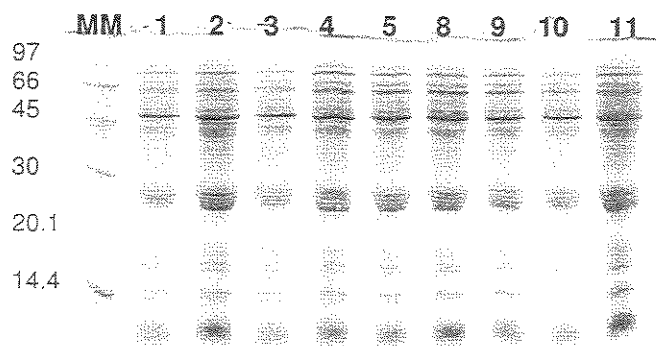


Figura 8.5. Eletroforese SDS-PAGE (gel 15%) dos ensaios da otimização da extração de pró-insulina humana recombinante do milho transgênico. **MM:** marcadores de massa molecular. **Pistas de 1 a 11:** amostras dos extratos obtidos nos ensaios de 1 a 11, respectivamente.

Pode-se observar que os valores das concentrações de pró-insulina utilizados para fazer as análises estatísticas são superiores aos valores apresentados nos ensaios da cinética (Figura 8.1) e também da Figura 8.3. A justificativa desta variação se deve ao fato de que, após a realização dos ensaios de validação do modelo, observou-se que os valores de concentração de pró-insulina foram quantitativamente superiores aos esperados. Suspeitou-se que isto ocorreu devido à mudança de lote de um dos reagentes utilizados na extração, o DTT. Para a verificação desta hipótese, repetiram-se todos os ensaios do planejamento experimental com o novo reagente e como resultado, os valores das concentrações de pró-insulina aumentaram significativamente, mantendo, no entanto, a mesma tendência observada anteriormente.

A validação do modelo obtido (Equação 8.1) foi feita através da realização de ensaios em triplicatas em três condições experimentais presentes na superfície de resposta da Figura 8.4. As condições selecionadas e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 8.6. Estes dados foram usados na realização do teste de Tukey, que é um teste para avaliar a existência de significância estatística na diferença das médias. O teste de Tukey fornece a mínima diferença significativa para que duas amostras possam ser consideradas

significativamente diferentes, dentro de um determinado intervalo de confiança.

Tabela 8.6. Ensaios da validação do modelo de extração de pró-insulina do milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM.

Tratamento	Ensaio	T	v:m	Concentração de pró-insulina (µg/ml)	Média	Diferença entre as médias
A	1	1,41	1,41	21,71	20,72±1,06	$\Delta_{A-B} = 1,85$
	2	(40°C)	(10:1)	19,60		
	3			20,84		
B	4	0	1,41	18,63	18,87±0,48	$\Delta_{B-C} = 11,79$
	5	(25°C)	(10:1)	19,42		
	6			18,55		
C	7	-1,41	-1,41	6,81	7,08±0,70	$\Delta_{A-C} = 13,64$
	8	(10°C)	(4:1)	7,87		
	9			6,56		

Para a realização do teste de Tukey foi feita uma análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 8.7, e então se calculou o valor da menor diferença significativa (MDS), utilizando a equação 8.2:

$$MDS = q \sqrt{\frac{MQ_{erro}}{n}} \quad \text{Equação 8.2}$$

Onde q é tabelado de acordo com o número de tratamentos e graus de liberdade do erro, para um determinado intervalo de confiança; MQ_{erro} é a média dos quadrados do erro e n é o número de réplicas dos tratamentos.

Tabela 8.7. Análise de variância para o teste de Tukey a 95% de confiança.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	Teste F
Tratamento	328,27	2	164,14	266,89
Erro	3,69	6	0,62	
Total	331,96	8		

Para um intervalo de confiança de 95%, o valor de $q(0,05, 3, 6)$ é 4,34. Assim, o valor da MDS calculado pela equação 8.2 foi de 1,97, ou seja, para que haja diferença significativa entre as diferentes condições experimentais (Tratamento A, B e C) é preciso que a diferença entre as médias obtidas seja igual ou maior que 1,97.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 8.6, a única diferença entre as médias cujo valor é menor que a MDS é a diferença entre os tratamentos A e B ($\Delta_{A-B} = 1,85$). Desta forma, pode-se afirmar que não há diferença significativa, a 95% de confiança, entre os valores de concentração de pró-insulina obtidos a temperaturas de 25 e 40°C, na razão v:m de 1:10.

Como, em relação à engenharia de processo, a extração à temperatura ambiente é mais vantajosa, em termos de custo, do que a 40°C, a condição experimental ótima para a extração da pró-insulina é a seguinte: temperatura de 25°C, razão v:m de 10:1, tempo de extração de 2h e velocidade de rotação de 500 rpm, tendo como solvente o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5mM.

8.2. Concentração de proteínas totais

Somente os termos lineares para a temperatura e para razão v:m se mostraram estatisticamente significativos, a 95% de confiança, na extração de proteínas (Tabela 8.3). A razão v:m exerceu um efeito negativo sobre a extração de proteínas, enquanto a temperatura apresentou um efeito positivo.

O coeficiente de correlação (0,961) e o teste F (22,24 vezes o F tabelado) a 95% de confiança se mostraram bastantes satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a concentração de proteína nos extratos foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 8.6).

Para minimizar a extração de proteínas nativas do milho deve-se procurar trabalhar na região da superfície de resposta na qual a razão v:m esteja em seu nível superior e considerar a temperatura ótima de extração da proteína

recombinante no processo.

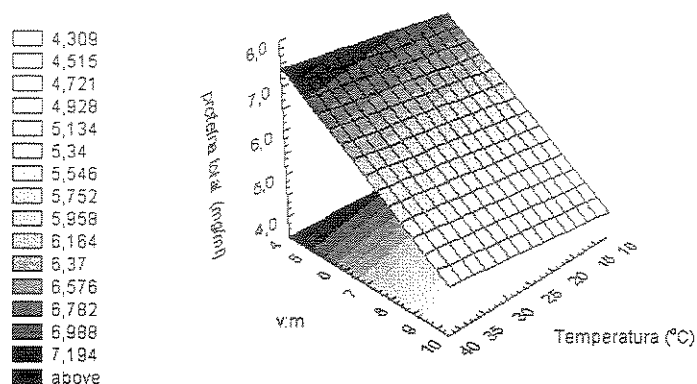


Figura 8.6. Superfícies de resposta para a extração de proteínas do milho transgênico como uma função da temperatura e razão v:m.

8.3. Concentração de açúcares redutores (AR)

Somente os termos linear e quadrático para a razão v:m se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança, enquanto a faixa de temperatura estudada não influenciou significativamente a extração de AR (Tabela 8.3). A razão v:m exerceu um efeito negativo sobre a extração de AR, indicando que um incremento na razão v:m de 5:1 para 7:1 irá diminuir a concentração de AR presente no extrato. Este fato, como já discutido no item 7.1.3, se deve a uma maior quantidade de solvente em relação à massa de farinha.

O coeficiente de correlação (0,882) e o teste F (6,73 vezes o valor de F tabelado) a 95% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a concentração de AR nos extratos foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 8.7).

Como o objetivo desta análise é encontrar uma condição ótima para minimizar a extração de impurezas, no caso os açúcares redutores, deve-se procurar trabalhar na região da superfície de resposta na qual a razão v:m

esteja em seu nível superior e como a temperatura não influenciou significativamente a extração de AR, deve-se considerar a temperatura ótima de extração da proteína recombinante no processo.

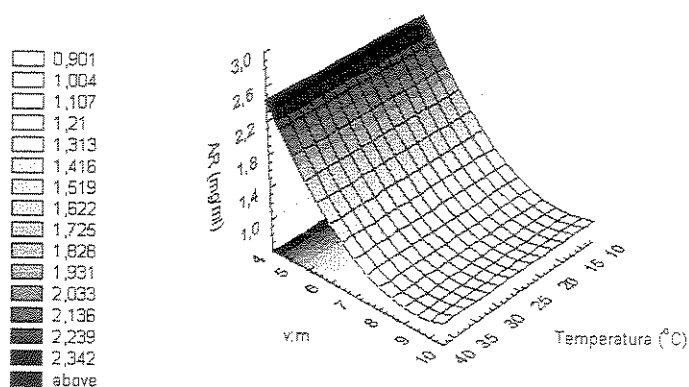


Figura 8.7. Superfície de resposta para a extração de AR do endosperma do milho transgênico como uma função da temperatura e razão v:m.

8.4. Concentração de açúcares redutores totais (ART)

Assim como na extração de AR, somente os termos linear e quadrático para a razão v:m se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança e aqui, novamente, a razão v:m exerceu um efeito negativo sobre a extração de ART (Tabela 8.3).

O coeficiente de correlação (0,949) e o teste F (16,98 vezes o valor de F tabelado) a 95% de confiança se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. O modelo obtido (com a exclusão de efeitos não significativos) para a concentração de ART foi utilizado para a construção do gráfico de superfície de resposta (Figura 8.8).

Apesar de no planejamento completo 2^4 do capítulo anterior os efeitos principais de todas as variáveis terem se mostrados significativos na extração de ART (descrito no item 7.1.2), neste planejamento experimental a temperatura não se mostrou estatisticamente significativa. Uma possível explicação para este resultado seria a grande influência que o efeito da razão v:m na concentração de ART do extrato, que pode ter minimizado a influência

da temperatura no processo. No geral, o comportamento da extração de ART se mostrou bastante similar ao de AR e, portanto, para minimizar a extração de ART nos extratos deve-se procurar trabalhar na região da superfície de resposta na qual a razão v:m esteja em seu nível superior e considerar a temperatura ótima de extração da proteína recombinante no processo.

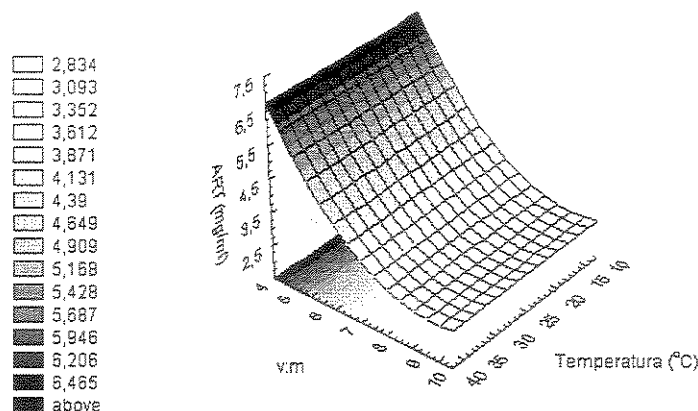


Figura 8.8. Superfícies de resposta para a extração de ART do endosperma do milho transgênico como uma função da temperatura e razão v:m.

8.5. Concentração de polifenóis

Somente o termo linear para a temperatura se mostrou estatisticamente significativo para a extração de polifenóis, a 95% de confiança. Isto significa que, estatisticamente, na faixa de valores estudada, a extração de polifenóis independe dos valores de razão v:m utilizados no processo (Tabela 8.3).

O coeficiente de correlação (0,589) e o teste F (2,52 vez o valor de F tabelado) a 95% de confiança não se mostraram satisfatórios para a proposição de um modelo. Como a temperatura teve um efeito negativo na extração de polifenóis, deve-se utilizar a temperatura em seus níveis superiores para minimizar a extração de polifenóis e considerar as condições ótimas de razão v:m para a extração da proteína recombinante.

8.6. Conclusões sobre a otimização da extração da pró-insulina

Nesta etapa do trabalho realizou-se um estudo visando à otimização da extração de pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM, através de um planejamento fatorial completo 2^2 do tipo estrela. As variáveis independentes do processo — temperatura e razão v:m — foram previamente selecionadas em um planejamento experimental 2^4 , descrito no Capítulo 7. A análise de otimização da extração de pró-insulina foi realizada em conjunto com a minimização de alguns dos componentes naturais do milho, incluindo os carboidratos, polifenóis e proteínas nativas.

Observaram-se algumas alterações na significância estatística dos efeitos das variáveis temperatura e razão v:m em relação ao planejamento experimental do Capítulo 7. Provavelmente, o efeito da variável razão v:m possa ter dissimulado o efeito da temperatura em algumas das respostas. Outra possível causa destas alterações seria o fato de que a farinha de endosperma utilizada neste planejamento foi diferente daquela utilizada anteriormente. Esta nova farinha foi preparada a partir de milhos transgênicos de uma geração diferente (mais avançada) e pelos resultados obtidos, a expressão de pró-insulina foi maior nesta última geração de sementes. Os valores máximos de concentração de pró-insulina obtidos com a nova farinha foram 20,72 µg/ml ou 0,45% TSP, comparados a 4,56 µg/ml e 0,08% TSP obtidos com a farinha utilizada nos ensaios descritos no Capítulo 7. Segundo Twyman *et al.* (2003), níveis de expressão entre 0,1 e 1% TSP são suficientemente competitivos em relação a outros de sistemas de expressão para viabilizar economicamente o uso de plantas como biorreatores.

As análises das superfícies de resposta e do teste de Tukey indicaram que a região ótima para maximizar a extração de pró-insulina do milho transgênico e ao mesmo tempo minimizar a concentração dos compostos interferentes é aquela na qual a razão v:m seja de 1:10 e a temperatura de 25 °C. Esta condição, em um tempo de extração de duas horas e agitação a 500 rpm, é a

indicada como ótima para a extração da pró-insulina humana recombinante do milho transgênico. A análise da extração da pró-insulina do milho transgênico em termos de produtividade e %TSP também levaram a esta mesma conclusão.

Capítulo 9

Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

9.1. Conclusões

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de extração da pró-insulina humana recombinante produzida no endosperma de milho transgênico. Neste contexto, avaliaram-se os extratos aquosos de seis variedades de milhos comerciais quanto às propriedades relacionadas à RPB — concentração de componentes nativos do milho (carboidratos, compostos fenólicos e proteínas), taxa de filtração e teor de lipídeos — e realizou-se a seleção e otimização das variáveis operacionais relevantes na extração da pró-insulina em conjunto com a minimização dos componentes nativos do milho.

Em relação à primeira etapa do trabalho, que envolveu a comparação dos extratos aquosos de seis variedades de milhos comerciais, concluiu-se que as sementes de milho do tipo doce apresentaram, em geral, um desempenho inferior às outras variedades em relação ao uso como matéria-prima em um processo de RPB de proteínas heterólogas. No entanto, não foi observada nenhuma diferença expressiva na qualidade dos extratos obtidos utilizando as variedades QPM BR451, QPM BR473 e o milho comum, indicando que a escolha entre essas variedades não irá afetar significativamente o processamento da proteína recombinante.

Na segunda etapa do trabalho, através da análise dos efeitos do pH e da força iônica na extração da pró-insulina humana do milho transgênico, pôde-se concluir que a pró-insulina não foi eficientemente extraída nas condições

avaliadas e que esta se encontra, possivelmente, associada a outros componentes nativos do milho.

Assim, na terceira etapa do trabalho, foi realizada uma análise da eficiência de extração da pró-insulina da farinha do endosperma do milho transgênico em diferentes soluções e selecionaram-se duas, entre trinta soluções extratoras mais eficientes para prosseguir os estudos de extração: o tampão bicarbonato 50 mM pH 10,0 e DTT 5 mM e o tampão alcoólico composto por uma solução de etanol 70% em tampão glicina 50 mM pH 3,0 e DTT 5 mM. Estes estudos também permitiram a verificação do efeito importante do agente redutor na solubilização da pró-insulina recombinante.

A influência das variáveis operacionais do processo de extração nestes dois solventes selecionados foi avaliada visando à maximização da extração da proteína recombinante e a minimização do conteúdo de impurezas no extrato. Neste estudo pode-se concluir que a influência das variáveis operacionais diferiu dependendo do solvente utilizado. A eficiência da recuperação de pró-insulina foi bastante superior quando se utilizou o tampão bicarbonato, sendo que, a concentração de pró-insulina nos extratos obtidos com o tampão bicarbonato chegou a ser mais de 100 vezes superior ao valor da concentração de pró-insulina no extrato alcoólico, para uma mesma condição experimental. Portanto, selecionou-se o tampão bicarbonato de sódio 50 mM pH 10,0 e DTT 5mM e as variáveis independentes temperatura e razão v:m para serem analisadas em um planejamento fatorial 2² completo do tipo estrela visando a otimização da extração de pró-insulina do endosperma do milho transgênico.

Os valores máximos de concentração de pró-insulina obtidos foram 20,72 µg/ml ou 0,45% TSP. As análises das superfícies de resposta e do teste de Tukey indicaram que a região ótima para maximizar a extração de pró-insulina do milho transgênico e ao mesmo tempo minimizar a concentração dos compostos nativos analisados é aquela na qual a temperatura seja 25 °C e a razão v:m 10:1. Esta condição, em um tempo de extração de duas horas em agitação a 500 rpm, é a indicada como ótima para a extração da pró-insulina

humana recombinante do milho transgênico.

Como conclusões gerais, constatou-se que a escolha da variedade de milho comercial influenciou a complexidade do extrato, sendo que as variedades QPM e o milho do tipo comum foram os que apresentaram, em termos de processo, características mais vantajosas do que as variedades de milho do tipo doce; a pró-insulina não foi eficientemente extraída em soluções simples de água a um pH controlado e a presença do agente redutor no tampão de extração foi importante na solubilização desta proteína; a extração de pró-insulina foi mais eficiente em tampão alcalino em relação ao tampão alcoólico, que é amplamente utilizado na solubilização das zeínas do milho e, finalmente, as variáveis de processo que mais influenciaram a extração foram a temperatura e a razão v:m.

9.2. Sugestões para trabalhos futuros

Para dar continuidade a este trabalho, sugere-se que sejam realizados experimentos em uma escala maior, utilizando reatores de volumes suficientes para obtenção de dados que permitam estudar a fluidodinâmica do processo. Pode-se ainda complementar os estudos com uma avaliação da influência dos tipos de agitadores empregados, bem como uma avaliação da influência do tamanho de partícula na eficiência de extração. Uma outra sugestão seria avaliar a eficiência da extração após a adição de um segundo estágio.

Em relação às etapas posteriores à extração, sugere-se que sejam realizados estudos visando à concentração e purificação da pró-insulina nos extratos. Como técnicas de concentração poderiam ser avaliadas a precipitação isoelétrica e também a precipitação com o sal sulfato de amônio. A cromatografia de filtração em gel poderia também ser utilizada para concentrar a pró-insulina. Como técnicas de purificação poderiam ser utilizadas a cromatografia de troca iônica ou a hidrofóbica. Poderia também ser avaliada a purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC), uma vez que a pró-insulina possui resíduos de histidina superficialmente localizados.

Adicionalmente, como uma das principais dificuldades encontradas neste trabalho foi relacionada à parte analítica, sugere-se que seja estudado o desenvolvimento de um protocolo de ELISA para a quantificação da pró-insulina. O uso de kits comerciais de ELISA apresentaram resultados bastante satisfatórios, no entanto, como eles possuem um custo elevado, as análises foram limitadas.

Capítulo 10

Referências Bibliográficas

1. Aguilera, J.M. (2003). Solid-Liquid Extraction. In: Extraction Optimization in Food Engineering. Eds. Tzia, C. e Liadakis, G. Editora Marcel Dekker, Inc., New York, pp 35-55.
2. Aguilera, J.M. e Stanley, D.W. (1999). Microstructure and mass-transfer: solid-liquid extraction. In: Microstructural Principles of Food Processing and Engineering, Aspen Publishers, Gaithersburg, pp 325-372.
3. Azzoni, A.R. (2002). Plantas como biorreatores: Recuperação e purificação de aprotinina recombinante a partir de semente de milho transgênico. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
4. Azzoni, A.R.; Kusnadi, A.R.; Miranda, E.A. e Nikolov, Z.L. (2002). Recombinant Aprotinin Produced in Transgenic Corn Seed: Extraction and Purification Studies. *Biotechnology and Bioengineering*, **80**: 268-276.
5. Bai, Y.; Nikolov, Z.L.; Glatz, C.E. (2002). Aqueous extraction of B-glucuronidase from transgenic canola: kinetics and microstructure. *Biotechnology Progress*, **18**: 1301-1305.
6. Bailey, M.R.; Woodard, S.L.; Callaway, E.; Beifuss, K.; Magallanes-Lundback, M.; Lane, J.R.; Horn, M.E.; Delaney, D.D.; Ward, M.; Van Gastel, F.; Howard, J.A. e Hood, E.E. (2004). Improved recovery of active recombinant laccase from maize seed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **63**: 390-397.
7. Balasubramaniam, D.; Wilkinson, C.; Van Cott, K. e Zhang, C. (2003). Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, **989**: 119-129.
8. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. e Bruns, R. E. (2001). Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora da Unicamp, Campinas.
9. Barta, A.; Sommergruber, K.; Thompson, D.; Hartmuth, K.; Matzke, M. e Matzke, A. (1986). The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, **6**: 347-357.

10. Boyer, C.D. e Shannon, J.C. (1987). Carbohydrates of the kernel. In: Corn chemistry and technology. Eds. Watson, S.A. e Ramstad, P.E. Editora: AACC, St. Paul, pp 253-272.
11. Bradford, M. M. A (1976). Rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
12. Brandle, J.E.; Rymerson, R. e Menassa, R. (2001). Perspectives on the production of recombinant proteins in plants. *AgBiotechNet*, **3**: ABN 070.
13. Brovko, F.A. e Zagranichnaya, T.K. (1998). Separation of proteins from phenols in cereal leaf extract by hydrophobic interaction- ammonium sulfate fractionation. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**: 773-777.
14. Cacace, J.E. e Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*. **59**: 379-389.
15. Carneiro, A.A.; Carneiro, N.P.; Carvalho, C.H.S.; Vasconcelos, M.J.V.; Paiva, E.; Lopes, M.A. (2000). Milho Transgênico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, **15**: 42-46.
16. Cobb, B.G. e Hannah, L.C. (1981). The metabolism of sugars in maize endosperms. *Plant Physiology*, **67**: 107.
17. Coleman, C.E. e Larkins, B.A. (1999). The prolamins of maize. In: Seed Proteins. Eds. Shewry, P.R. e Casey, R. Editora Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 109-139.
18. Commandeur, U.; Twyman, R.M. e Fisher, R. (2003). The biosafety of molecular farming in plants. *AgBiotechNet*, **5**: ABN 110.
19. Damodaran, S. (1985). Amino Acids, peptides, and proteins. In: Food Chemistry. Ed. Fennema, O.R. Editora M. Dekker, New York, pp 321-429.
20. Daniell H.; Streatfield, S.J. e Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, **6**: 219-226.
21. Danzer, L.A.; Ades, H. e Rees, E.D. (1975). The helical content of zein, a water insoluble protein, in non-aqueous solvents. *Biochimica et Biophysica Acta*, **386**: 26-31.
22. De Lucca, P.C. (2003). Produção dos Hormônios Recombinantes de Crescimento e Pró-insulina Humanos em Plantas Transgênicas de Milho. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
23. Dickey, L.C.; Dallmer, E.R.; Radewonuk, E.R.; Parris, N.; Kurantz, M. e Craig, J.C. (1998). Zein batch extraction from dry-milled corn: cereal disintegration by dissolving fluid shear. *Cereal Chemistry*, **75**: 443-448.
24. Dieryck, W.; Gruber, V.; Baudino, S.; Lenee, P.; Pagnier, J.; Merot, B. e Poyart, C. (1995). Expression of recombinant human hemoglobin in plants. *Transfusion Clinical Biology*, **2**: 441-447.
25. Evangelista, R.L.; Kusnadi, A.R.; Howard, J.A. e Nikolov, Z.L. (1998). Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant β -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, **14**: 607-614.

26. Fieldler, U.; Phillips, J.; Artsaenko, O. e Conrad, U. (1997). Optimization of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology*, **3**: 205-216.
27. Fischer, R. e Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, **9**: 279-299.
28. Gegenheimer, P. (1990). Preparation of extracts from plants. In: *Methods in Enzimology*, Academic Press, London, pp 174-193.
29. Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D. e Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology*, **18**: 1151-1155.
30. Goddijn, O.J.M. e Pen, J. (1995). Plants as bioreactors. *Trends in biotechnology*, **13**: 379-387.
31. Gomond, V.; Sourrouille, C.; Fitchette, A.C.; Bardor, M.; Pagny, S.; Lerouge, P. e Faye, S. (2004). Production and glycosilation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnology Journal*, **2**: 83-100.
32. Harris, B. (1999). Exploiting antibody-based technologies to manage environmental pollution. *Trends in Biotechnology*, **17**: 290-296.
33. Hojima, Y.; Pierce, J.V. e Pisano, J.J. (1980). Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thrombosis Research*, **20**: 149-162.
34. Hood, E. E.; Witcher, D. R.; Maddock, S.; Meyer, T.; Basczysnski, C.; Bailey, M.; Flynn, P.; Register, J.; Marchal, L.; Bond, D.; Kulisek, E.; Kusnadi, A.; Evangelista, R.; Nikolov, Z.; Wooge, C.; Mehig, R. J.; Hernan, R.; Kappel, W. K.; Ritland, D.; Li, P. C. e Howard, J. A. (1997). Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding*, **3**: 291-306.
35. Hood, E.E. (2004). Where, oh where has my protein gone? *Trends in Biotechnology*, **22**: 53-55.
36. Horn, M.E.; Woodard, S.L. e Howard, J.A. (2004). Plant Molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*, **22**: 711-720.
37. James, E.A.; Wang, C. e Wang, Z. (2000). Production and characterization of biologically active human GM-CSf secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expression and Purification*, **19**: 131-138.
38. Janson, J. e Ryden, R. (1998). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. Wiley-VCH Publishers, New York.
39. Jervis, L. e Pierpoint, W.S. (1989). Purification technologies for plant proteins. *Journal of Biotechnology*, **11**: 161-198.
40. Jilka, J.M.; Hood, E.E.; Dose, R. e Howard, J. (1999). The benefits of protein produced in transgenic plants. *AgBiotechNet*, **1**: ABN 027.
41. Johnson, L.A. (2000). Corn: The major cereal of the Americas. In: *Handbook of Cereal Science and Technology*, Eds. Kulp, K. e Ponte, J.G. Editora Dekker, New York, pp 31-80.
42. Kemper, E.L.; Silva, M.J. e Arruda, P. (1996). Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science*, **121**: 85-93.

43. Keruliuk, G.R.; Sosulski, F.W. e Kaldy, M.S. (1995). Carbohydrates of North American corn (*Zea mays*). *Food Research International*, **28**: 311-315.
44. Kim, S.; Kim, W. e Hwang, I.K. (2003). Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**: 337-342.
45. Kjeldsen, T.; Petersson, A.F. e Hach, M. (1999). The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, **75**: 195-208.
46. Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R. e Sandford, J.C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, **6117**: 70-73.
47. Kusnadi, A. R.; Evangelista, R.; Hood, E.E.; Howard, J. e Nikolov, Z. (1998a). Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant β -glucuronidase. *Biotechnology and Bioengineering*, **60**: 44-52.
48. Kusnadi, A.R.; Hood, E.E.; Witcher, D.R.; Howard, J.A. e Nikolov, Z.L. (1998b). Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, **14**: 149-155.
49. Kusnadi, A.R.; Nikolov, Z.L. e Howard, J.A. (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**: 473-484.
50. Ladisch, M.R. (2001). Bioseparations engineering: principles, practice, and economics, Editora Wiley Interscience, New York.
51. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
52. Landry, J. e Moreaux, T. (1981). Physicochemical properties of maize glutelins as influenced by their isolation conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **29**: 1205-1212.
53. Larrick, J.W.; Yu L.; Naftzger C.; Jaiswal S. e Wycoff K. (2001). Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering*, **18**: 87-94.
54. Lásztity, R. (1984). The chemistry of cereal proteins. CRC Press Inc, Florida.
55. Leite, A. (2001). Expressão de proteínas heterólogas em plantas. In: Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas. Eds. Nass, L.L.; Valois, A.C.C.; Melo, I.S. e Valadares-Ingles, M.C. Editora Fundação MT, Rondonópolis, pp 1057-1083.
56. Leite, A.; Kemper, E.L.; Da Silva, M.J.; Luchessi, A.D.; Siloto, R.M.P.; Bonaccorsi, E.D.; El-Dorry, H.F. e Arruda, P. (2000). Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding*, **6**: 47-53.
57. Lending, C.R. e Larkins, B.A. (1989). Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell*, **1**: 1011-1023.
58. Liadakis, G.N.; Tzia, C.; Oreopoulou, V.; Thomopoulos, C.D. (1995). Protein isolation from tomato seed meal, extraction optimization. *Journal of Food Science*, **60**: 477-482.
59. Lopes, M.A. e Larkins, B. A. (1993). Endosperm origin, development, and function. *The Plant Cell*, **5**: 1383-1399.

60. Ma, J.K.; Drake, P.M.W.; Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, **4**: 794-805.
61. Maa, Y.F. e Hsu, C.C. (1996). Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, **140**: 155-168.
62. Magalhães, P.C.; Rodrigues, W.A. e Durães, F.O.M. (2001). Tanino no grão de sorgo: bases fisiológicas e métodos de determinação. Embrapa Milho e Sorgo. (<http://www.cnpms.embrapa.br/circu27.html>) acessado em 30/10/2001.
63. Manley, R.H. e Evans, C.D. (1943). Binary solvents for zein. *Industrial and Engineering Chemistry*, **35**: 661-665.
64. Matsumoto, S.; Ikura, K.; Ueda, M. e Sasaki, R. (1995). Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produce in cultured tobacco cells. *Plant Molecular Biology*, **27**: 1163-1172.
65. Mazen, A.; Murcia, J.M.; Molinete, M.; Simonin, F.; Gradwohl, G; Poirier, G. e De Murcia, G. (1989). Poly (ADP-ribose) polymerase: a novel zinc-finger protein. *Nucleic Acids Research*, **17**: 4689-4698.
66. McCabe, W.L.; Smith, J.C. e Harriott, P. (1993). Unit Operations of Chemical Engineering. Editora McGraw-Hill, Inc., New York.
67. Mejare, M.; Lilius, G. e Bulow, L. (1998). Evaluation of genetically attached histidine affinity tails for purification of lactate dehydrogenase from transgenic tobacco. *Plant Science*, **134**: 103-114.
68. Menkhaus, T.J.; Bai, Y.; Zhang, C.; Nikolov, Z.L. e Glatz, C.E. (2004a). Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnology Progress*, in press.
69. Menkhaus, T.J.; Eriksson, S.U.; Whitson, P.B. e Glatz, C.E. (2002). Host selection as a Downstream Strategy: polyelectrolyte precipitation of β -glucuronidase from plant extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, **77**: 148-154.
70. Menkhaus, T.J.; Pate, C.; Krech, A. e Glatz, C.E. (2004b). Recombinant protein purification from pea. *Biotechnology and Bioengineering*, **86**: 108-114.
71. Mertz, E.T.; Bates, L.S. e Nelson, O.E. (1964). Mutant genes that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, **145**: 279-280.
72. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**: 426-428.
73. Mison, D. e Curling, J. (2000). The industrial production cost of recombinant therapeutic proteins expressed in transgenic corn. *BioPharm May*, 48-54.
74. Morrysey, J.H. (1981). Silver strain for proteins in polyacrylamine gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, **117**: 307-310.
75. Nielsen, H.C.; Paulis, J.W.; James, C. e Wall, J.S. (1970). Extraction and structure studies on corn glutelin proteins. *Cereal Chemistry*, **47**: 501-512.

76. Nikolov, Z.L. e Hames, D. (2002). Production of recombinant proteins from transgenic crops. In: *Plants as Factories for Protein Production*. Eds. Hood, E.E. e Howard, J. A. Editora Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 159-174.
77. Oh, H.I.; Hoff, J.E.; Armstrong, G.S. e Haff, L.A. (1980). Hydrofobic interaction in tannin-protein complexes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **28**: 394-398.
78. Osborne, T.B. e Mendel, B. (1914). Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *Journal of Biological Chemistry*, **18**: 1-16.
79. Prasanna, B.M.; Vasal, S.K.; Kassahun, B. e Singh, N.N. (2001). Quality protein maize. *Current Science*, **81**: 1308-1319.
80. Price, M.L. e Butler, L.G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **25**: 1268-1273.
81. Rees, E.D. e Singer, S.J. (1956). A preliminary study of the properties of proteins in some nonaqueous solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **63**: 144-159.
82. Rosenthal, A.; Pyle, D.L. e Niranjan, K. (1996). Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**: 402-420.
83. Russel, M.H. e Tsao, G.T. (1982). Protein removal from corn endosperm by solvent extraction. *AIChE Symposium Series*, **78**: 83-89.
84. Schwartzberg, H.G. e Chao, R.Y., (1982). Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technology*, **2**: 73-86.
85. Sen, A.; Bergvison, D.; Miller, S.S.; Atkinson, J.; Fulcher, R.G. e Arnason, J.T. (1994). Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**: 1879-1883.
86. Shimidt, M.; Babu, K.R.; Khanna, N.; Marten, S. e Rinas, U. (1999). Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, **68**: 71-83.
87. Shukla, R. e Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, **13**: 171-192.
88. Shukla, R.; Cheryan, M. e De Vor, R.E. (2000). Solvent extraction of zein from dry-milled corn. *Cereal chemistry*, **77**: 724-730.
89. Sijmons, P. C.; Dekker, B. M. M.; Schrammeijer, B.; Verwoerd, T. C.; van den Elzen, P. J. M. e Hoekema, A. (1990). Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology*, **8**: 217-221.
90. Sosulski, F.; Krygier, K. e Hogge, L. (1982). Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 3. Composition of Phenolic Acids in Cereal and Potato Flours. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **30**: 337-340.
91. Spencer, C.M.; Cai, Y.; Martin, R.; Gafney, S.H.; Goulding, P.N.; Magnolato, D.; Lilley, T.H. e Haslam, E. (1988). Polyphenol complexation- some thoughts and observations. *Phytochemistry*, **27**: 2397-2409.
92. Stoger, E.; Sack, M.; Perrin, Y.; Vaquero, C.; Torres, E.; Twyman, R.M.; Christou, P. e Fischer, R. (2002). Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding*, **9**: 149-158.

93. Stoger, E.; Vaquero, C.; Torres, E.; Sack, M.; Nicholson, L.; Drossard, J. e Williams, S. (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*, **42**: 583-590.
94. Teixeira, F.F.; Souza, I.R.P.; Gama, E.E.G.; Pacheco, C.A.P.; Parentoni, S.N.; Santos, M.X.; Meirelles, W.F. (2001). Avaliação da capacidade de combinação entre linhagens de milho doce. *Ciências Agronômicas*, **25**: 483-488.
95. Tunes, H. (2003). Comunicação pessoal.
96. Twyman, R.M.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P. e Fisher, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, **21**: 570-578.
97. Valdés, R.; Gomes, L.; Padilla, S.; Brito, J.; Reyes, B.; Alvarez, T.; Mendoza, H.; Herrera, O.; Ferro, W.; Pujol, M.; Leal, V.; Linares, M.; Hevia, Y.; Garcia, C.; Milá, L.; Garcia, O.; Sanchez, R.; Acosta, A.; Geada, D.; Paez, R.; Veja, J.L. e Borroto, C. (2003). Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **308**: 94-100.
98. Wall, J.S. e Paulis, J.W. (1978). Corn and sorghum grain proteins. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, Ed. Pomeranz, Y. by American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul.
99. Wallace, J.C.; Lopes, M.A.; Paiva, E. e Larkins, B.A. (1990). New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2 maize. *Plant Physiology*, **92**: 191-196.
100. Walsh, G. e Headon, D.R. (1994). *Protein Biotechnology*, Editora J. Wiley & Sons, New York.
101. Weber, E.J. (1987). Lipides of the kernel. In: *Corn chemistry and technology*. Watson, S.A. e Ramstad, P.E. Editora: AACCC, St. Paul, pp 311-349.
102. Wilson, C.M. (1987). Protein of the kernel. In: *Corn chemistry and technology*. Watson, S.A. e Ramstad, P.E. Editora: AACCC, St. Paul, pp 273-310.
103. Woodard, S.L.; Mayor, J.M.; Bailey, M.R.; Barker, D.K.; Love, R.T.; Lane, J.R.; Delaney, D.E.; McComas-Wagner, J.M.; Mallubhotla, H.D.; Hood, E.E.; Dangott, L.J.; Tichy, S.E. e Howard, J.A. (2003) Maize (*Zea Mays*) derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **38**: 123-130.
104. Xu, L. e Diosady, L.L. (2003). Proteins from plant materials. In: *Extraction Optimization in Food Engineering*. Eds. Tzia, C. e Liadakis, G. Editora Marcel Dekker, Inc., New York, pp 217-233.
105. Young, M.W.; Okita, W.B.; Brown, E.M. e Curling, J.M. (1997a). Production of biopharmaceutical proteins in the milk of transgenic animals. *BioPharm*, **10**: 34-38.
106. Young, T.E.; Juvik, J.A. e DeMason, D.A. (1997b). Changes in carbohydrate composition and α -amylase expression during germination and seedling growth of starch-deficient endosperm mutants of maize. *Plant Science*, **129**: 175-189.
107. Zaman, F.; Kusnadi, A.R. e Glatz, C.E. (1999). Strategies for recombinant protein recovery from canola by precipitation. *Biotechnology Progress*, **15**: 488-492.

108. Zhang, C. e Glatz, C.E. (1999). Process engineering strategy for recombinant protein recovery from canola by cation exchange chromatography, *Biotechnology Progress*, **15**: 12-18.
109. Zhong, G.Y.; Peterson, D.; Delaney, D.E.; Bailey, M.; Wicher, D.R.; Register, J.C.; Bond, D.; Li, C.P.; Marshall, L.; Kulisek, E.; Ritland, D.; Meyer, T.; Hood, E.E. e Howard, J.A. (1999). Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. *Molecular Breeding*, **5**: 345-356.