

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Curso de Pós Graduação em Engenharia Química
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PLANTAS COMO BIORREACTORES: RECUPERAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE APROTININA RECOMBINANTE A PARTIR
DE SEMENTE DE MILHO TRANSGÊNICO**

Adriano Rodrigues Azzoni, M.S.
Autor

Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Orientador

Prof. Dr. Zivko L. Nikolov
Co-orientador

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

Campinas – São Paulo

Maio de 2002

i
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 32
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Az98p
V EX
TOMBO BCI 50155
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 31/07/02
Nº CPD _____

CM00171157-1

18 ID 249913

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

Az98p Azzoni, Adriano Rodrigues
Plantas como biorreatores: recuperação e purificação de aprotinina recombinante a partir de semente de milho transgênico / Adriano Rodrigues Azzoni. --Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Everson Alves Miranda e Zivko L. Nikolov.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Plantas transgênicas. 2. Biotecnologia. 3. Engenharia bioquímica. 4. Inibidores enzimáticos. 5. Inibidores da tripsina. 6. Proteínas – Separação. I. Miranda, Everson Alves. II. Nikolov, Zivko L. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

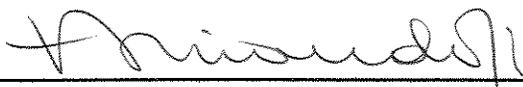
Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

TESE DE DOUTORADO:

Plantas como Biorreatores: Recuperação e Purificação de Aprotinina Recombinante a Partir de Semente de Milho Transgênico, defendida por Adriano Rodrigues Azzoni e aprovada em 27 de Maio de 2002 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

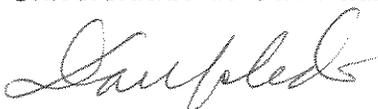
Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda



Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Universidade Estadual de Campinas – FEQ



Profa. Dra. Maria Cândida Reginato Facciotti
Universidade de São Paulo – Escola Politécnica



Dr. David Toledo Velarde
Fundação Ezequiel Dias – MG



Prof. Dr. Adilson Leite
Universidade Estadual de Campinas – IB/CBMEG



Profa. Dra. Ângela Maria Moraes
Universidade Estadual de Campinas – FEQ

002.3.509.3

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Adriano Rodrigues Azzoni, M.S., e aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de Maio de 2002.



Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Aos meus pais, Adair e Aniderci, a quem sempre dedicarei o meu amor e os melhores frutos do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso Pai, fonte de todo amor e sabedoria.

Ao Professor Everson Alves Miranda pela amizade, confiança, paciência, presença constante e orientação segura.

Ao Professor Zivko L. Nikolov, pela orientação, amizade e pelo acolhimento nos EUA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, CAPES, pela bolsa de estudos utilizada no estágio no exterior (doutorado sanduíche).

A todos os profissionais da ProdiGene Inc., EUA, pelo apoio e oportunidade de aprendizado no estágio que fiz em suas instalações.

À Iowa State University, EUA, onde realizei parte dos trabalhos experimentais. Muito obrigado a todos.

À Dra. Susan Woodward, Prodigene Inc., pela enorme paciência e carinho em ensinar e por todo o apoio incondicional que sempre recebi.

À Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno, FEQ – UNICAMP, pelo apoio e discussões que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, além da confiança e orientação durante o estágio docente (PED).

À Dra. Ann Kusnadi, Iowa State University, pelo auxílio, confiança e amizade.

A todos os professores do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pelo auxílio sempre que preciso e, especialmente, ao Prof. Dr. César Costapinto Santana e Profa. Dra. Ângela Maria Moraes por permitirem a utilização de seus laboratórios.

Ao Instituto Agronômico de Campinas, IAC, pela doação do milho não transgênico.

À querida Sindelia por ser essa pessoa LINDA, por todo o carinho, apoio, paciência e por estar ao meu lado nos momentos alegres e também nos difíceis.

Ao Roberto da Silva, Célia e família pelo acolhimento, amizade e apoio.

À Kátia Takahashi pela grande ajuda nos experimentos de laboratório.

Aos amigos de laboratório: Adriana, André, Antenor, Bai Yun, Chrissana, Cristiane, Eduardo, Elcimar, Fábio, Gisele, Helen, Isa, José Antônio, Líbia, Lucas, Luciana, Marisa, Oselys, Paula, Phil, Romi, Rosana, Salah, Sandra, Sérgio, Yelena, Víctor e Vinícios. Valeu!

A todos do Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e especialmente ao Thiago, pela ajuda com o desengorduramento da farinha de milho.

A todos os profissionais da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UNICAMP, PRPG, pelo profissionalismo e boa vontade com que sempre fui tratado em meu pedido de bolsa para estágio no exterior.

À comunidade de brasileiros em Iowa, pelo apoio.

Ao Sr. Dalcir Froidi, pelo profissionalismo e confiança, sempre que precisamos comprar reagentes e equipamentos.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e a Pesquisa, FAEP, UNICAMP, pelo apoio financeiro na aquisição de aprotinina.

A todos os queridos irmãos da Casinha.

A todos, e foram muitos, que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se efetivasse,

Muito Obrigado

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
NOMENCLATURA.....	xiii
CAPÍTULO 1 – Introdução	
1.1. <i>Escopo</i>	01
1.2. <i>A Aprotinina e Suas Aplicações</i>	01
1.3. <i>Produção de Proteínas Recombinantes em Plantas Transgênicas</i>	03
1.4. <i>Colocação do Problema</i>	05
1.5. <i>Objetivo e Relevância</i>	06
1.6. <i>Apresentação do Trabalho</i>	07
CAPÍTULO 2 – Revisão da Literatura	
2.1. <i>Plantas Transgênicas: Aspectos Legais e de Segurança</i>	09
2.2. <i>Estratégias para a Utilização de Plantas como Biorreatores</i>	11
2.3. <i>Produção de Aprotinina Recombinante em Semente de Milho</i>	13
2.4. <i>A Semente de Milho e seus Principais Componentes</i>	14
2.4.1. <i>Proteínas</i>	15
2.4.2. <i>Inibidores de Proteases</i>	16
2.4.3. <i>Carboidratos</i>	17
2.4.4. <i>Lipídeos</i>	18
2.5. <i>Purificação de Proteínas: Adsorção em Matrizes Sólidas</i>	19
2.5.1. <i>Conceitos Básicos de Cromatografia de Afinidade</i>	20
2.5.2. <i>Conceitos Básicos de Cromatografia de Afinidade em Íon Metálico Imobilizado</i>	22
2.5.3. <i>Conceitos Básicos de Cromatografia de Troca Iônica</i>	24
2.5.4. <i>Análise da Adsorção de Proteínas: Isotermas de Adsorção</i>	26
2.6. <i>Recuperação e Purificação de Proteínas de Plantas Transgênicas</i>	28
2.7. <i>Recuperação e Purificação de Aprotinina</i>	30
2.8. <i>Recuperação e Purificação de ITM</i>	31
2.9. <i>Cinsiderações Gerais</i>	33

CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos

<i>3.1. Materiais</i>	35
<i>3.2. Métodos</i>	36
3.2.1. Métodos Analíticos.....	36
3.2.2. Estudos de Estabilidade e Localização da Aprotinina e do ITM.....	39
3.2.3. Estudos de Extração.....	41
3.2.4. Estudos de Adsorção em Tanques Agitados.....	45
3.2.5. Estudos de Purificação Cromatográfica.....	47

CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussões I

Estudos de Estabilidade e Localização da Aprotinina e ITM	53
4.1. <i>Estudos de Estabilidade da Aprotinina e ITM</i>	53
4.2. <i>Localização da Aprotinina Recombinante e do ITM na Semente de Milho</i>	58

CAPÍTULO 5 – Resultados e Discussões II

Estudos de Extração	63
5.1. <i>Cinética de Extração da Aprotinina, ITM e Proteínas Solúveis</i>	63
5.2. <i>Influência de pH e Força Iônica sobre a Extração de Proteínas</i>	66
5.3. <i>Influência de pH e Força Iônica na Extração de Carboidratos, Polifenóis e Lipídeos</i>	72
5.4. <i>Influência do Tamanho de Partícula sobre a Extração de Aprotinina</i>	81
5.5. <i>Escalonamento da Etapa de Extração e Preparação para Cromatografia – Ensaio em Planta Piloto</i>	82
5.6. <i>Conclusão dos Ensaio de Extração</i>	86

CAPÍTULO 6 – Resultados e Discussões III

Estudos de Adsorção em Tanques Agitados	89
6.1. <i>Determinação das Curvas Cinéticas</i>	89
6.2. <i>Determinação das Isotermas de Adsorção</i>	92

CAPÍTULO 7 – Resultados e Discussões IV

Purificação Cromatográfica da Aprotinina Recombinante	103
7.1. <i>Definição das Etapas de Purificação</i>	103
7.2. <i>Primeira Etapa: Recuperação Através de Adsorção por Afinidade</i>	104

7.3. Segunda Etapa: Separação entre Aprotinina e ITM Através de Adsorção em Metal Imobilizado (IMAC) e Adsorção em Resina Trocadora de Íons.....	98
7.4. Estudos de Processos Alternativos para Recuperação da Aprotinina.....	119
7.5. Conclusão dos Estudos de Purificação da Aprotinina Recombinante.....	126
CAPÍTULO 8 – Conclusão.....	129
CAPÍTULO 9 – Sugestões para Próximos Trabalhos.....	133
CAPÍTULO 10 – Referências Bibliográficas.....	135

RESUMO

A expressão em plantas transgênicas é potencialmente uma das formas mais econômicas de produção em larga escala de peptídeos e proteínas de emprego farmacêutico. Dentre as vantagens estão a capacidade de estocagem da biomolécula por longo período em sementes, o baixo custo de produção e escalonamento (basta aumentar a área plantada) e o pequeno risco de contaminação por agentes patogênicos aos humanos. Contudo, existem poucos trabalhos visando a avaliar o potencial das plantas transgênicas do ponto de vista da recuperação e purificação de biomoléculas (RPB) em larga escala. Neste trabalho foi estudada a recuperação e purificação de aprotinina recombinante, um inibidor de proteases utilizado como fármaco, produzida em sementes de milho transgênico. Mais do que desenvolver metodologias de purificação de uma proteína específica, este trabalho objetivou contribuir com novos conhecimentos sobre a utilização da planta de milho como biorreator. Condições de extração visando a maximização da eficiência de extração da aprotinina recombinante e minimização da extração de impurezas foram estudadas. Destes estudos, a condição de extração a pH 3,0 e força iônica de 200 mM foi a que se mostrou mais adequada. A aprotinina recombinante, juntamente com um inibidor de tripsina naturalmente encontrado em sementes de milho (inibidor de tripsina do milho – ITM) foi capturada do extrato aquoso da semente através do uso de cromatografia em resina de agarose com tripsina imobilizada. Duas diferentes rotas cromatográficas foram empregadas para a separação entre os inibidores e purificação final da aprotinina: cromatografia em resina agarose-IDA-Cu²⁺ e cromatografia em resina SP Sepharose. A confirmação da purificação da aprotinina recombinante foi realizada através de seqüenciamento N-terminal, SDS-PAGE e HPLC, sendo que este último método de análise indicou que purezas tão elevadas quanto 97% foram alcançadas. Uma vez que o ITM também foi purificado, o processo aqui estudado tem como vantagem a possibilidade de sua co-produção. Finalmente, os resultados deste trabalho vem corroborar com pesquisas anteriores que indicam o potencial do uso de plantas como biorreatores.

ABSTRACT

Expression in transgenic plants is potentially one of the most economical systems for large-scale production of valuable peptide and protein products. Advantages of the use of plants as bioreactors include the low cost of growing a large amount of biomass, easy scale-up (increase of plant acreage), natural storage organs (seeds and tubers), and the reduced risk on propagating human or animal pathogens. However, the downstream processing of recombinant proteins produced in plants has not been extensively studied. In this work, we studied the extraction and purification of recombinant aprotinin, a protease inhibitor used as a therapeutic compound, produced in transgenic corn seed. More than just studying the recovery and purification of a recombinant protein, the aim of this work was to add new information about the use of transgenic corn as bioreactor. Conditions for extraction from transgenic corn meal that maximize aprotinin concentration and its fraction of the total soluble protein in the extract were determined as pH 3.0 and 200 mM NaCl. Aprotinin in this extract, together with a native corn trypsin inhibitor (CTI) was captured using a trypsin-agarose column. These two inhibitors were separated by using two different approaches: immobilized metal ion affinity chromatography – IMAC (agarose-IDA-Cu²⁺ resin) and cation-exchange chromatography (SP Sepharose resin). The high purity of the recombinant aprotinin was verified by SDS-PAGE and N-terminal sequencing. Reverse phase HPLC analysis of the recombinant aprotinin purified by IMAC suggested a purity as greater as 97%. Since CTI was also purified, the recovery and purification process studied has the advantage of possible CTI coproduction. Finally, the work presented here introduces additional information on the recovery and purification of recombinant proteins produced in plants and corroborates with past research on the potential use of plants as bioreactors.

NOMENCLATURA

BapNA – benzoil arginina p-nitroanilina;

c^* – concentração de soluto na fase líquida em equilíbrio com a fase sólida;

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança;

DPA – adenosina difosfato

DPU – uridina difosfato

EIA-Rima – relatório de estudo de impacto ambiental;

HPLC – cromatografia líquida de alta performance;

IDA – ácido iminodiacético;

IDEC – Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor;

IMAC – cromatografia por íon metálico imobilizado;

ITM – inibidor de tripsina de milho;

K_d – constante de dissociação efetiva que descreve o equilíbrio da reação de adsorção (em unidade de concentração);

NTA – ácido nitrilotriacético;

OGM – organismo geneticamente modificado;

ONG – Organização Não Governamental;

PMSF – fluoreto de fenilmetanosulfonila;

q^* – quantidade de soluto adsorvido no equilíbrio por unidade de massa ou volume de adsorvente;

q_m – capacidade máxima do adsorvente em adsorver o soluto expressa em massa de soluto por unidade de massa ou volume de adsorvente;

RPB – recuperação e purificação de bioprodutos;

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

TED – tris carboximetil etilenodiamina;

TEPA – tetraetilenopentamina;

TPCK – fenil-tosil-cetona.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Escopo

O escopo deste trabalho é a aplicação de princípios de Engenharia Química para o desenvolvimento de um processo de produção em larga escala de um bioproduto, após a síntese do mesmo em um sistema específico, através do uso de operações unitárias específicas de Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB, ou “downstream processing”). Insere-se em área de ponta dentro da Biotecnologia que é a utilização de plantas geneticamente modificadas para a produção de proteínas de uso farmacêutico, agrícola ou industrial, ou seja, plantas como biorreatores. Trata-se de trabalho pioneiro no Brasil na área de RPB de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas, componente de uma linha de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – LEBp – da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, coordenado pelo Prof. Dr. Everson Alves Miranda. Esta pesquisa foi desenvolvida no LEBp com a co-orientação do Prof. Dr. Zivko L. Nikolov da Iowa State University, Ames, Iowa, e ProdiGene Inc., College Station, Texas, EUA, onde parte dos estudos foram realizados. Novos trabalhos nesta linha de pesquisa estão sendo desenvolvidos no LEBp, desta vez com a colaboração do Prof. Dr. Adilson Leite do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp.

1.2. A Aprotinina e Suas Aplicações

A aprotinina é um inibidor específico de serino-proteases que foi isolado pela primeira vez por Kunitz e Northrop (1936) a partir de extratos de tecido pancreático bovino. Chamado de “basic” ou “bovine pancreatic trypsin inhibitor” (BPTI), a

Constatou-se que a sua aplicação durante a cirurgia é capaz de diminuir sensivelmente as perdas sanguíneas no pós-operatório e, conseqüentemente, o consumo de hemoderivados (Carrera e colaboradores, 1993), sendo atualmente utilizada rotineiramente por muitos centros de tratamento a doenças cardíacas na Europa (Baufreton e colaboradores, 1996). Estudos ainda mais recentes (Capdevila e colaboradores, 1998; Beath e colaboradores, 2000) apontam vantagens na utilização de aprotinina também em cirurgias ortopédicas de grande porte, pelas mesmas razões apresentadas por Carrera e colaboradores. Em uma pesquisa realizada em Novembro de 2001, em uma única base de dados da área médica (PubMed), foram apontadas 90 publicações nos anos de 2000 e 2001 envolvendo estudos de utilização da aprotinina como fármaco.

1.3. Produção de Proteínas Recombinantes em Plantas Transgênicas

Plantas capazes de expressar genes transferidos de outros organismos são chamadas de plantas transgênicas e as proteínas, produtos destes genes, são chamadas de proteínas recombinantes ou heterólogas. A expressão de peptídeos e proteínas em plantas transgênicas é potencialmente um dos meios economicamente mais atraentes para produção destas moléculas em larga escala, seja para finalidades industriais ou farmacêuticas. As vantagens deste sistema incluem baixo custo de produção (pelo plantio em larga escala), facilidade de aumento de escala (através do aumento da área plantada), existência de órgãos naturais de estoque de proteínas (sementes), e procedimentos de colheita e estocagem estabelecidos (Whitelam e colaboradores, 1993; Kusnadi e colaboradores, 1997). Ao contrário de outros sistemas de expressão, como cultura de células animais ou animais transgênicos, não se conhece patógenos de plantas capazes de infectar animais, de modo que a utilização de plantas para a produção de proteínas de uso farmacêutico apresenta baixo risco de contaminação para humanos (Leite, 2001). Além disso, ao serem utilizadas plantas como biorreatores, existe a possibilidade de “co-produção” de componentes naturais da planta, o que pode auxiliar a viabilidade econômica do processo e a minimização de rejeitos (Kusnadi e colaboradores, 1997; Giddings e

colaboradores, 2000). Como desvantagens, estão a complexidade dos mecanismos de expressão e acúmulo das proteínas recombinantes, o relativo baixo nível de expressão e o pequeno número de trabalhos visando a avaliar o potencial do emprego deste sistema para a produção em larga escala de proteínas recombinantes, principalmente do ponto de vista da complexidade ou não das etapas de recuperação e purificação.

Desde o primeiro estudo onde uma primeira planta, tabaco, foi modificada geneticamente (Fraleigh e colaboradores, 1983), um considerável esforço tem sido direcionado para o desenvolvimento de sistemas confiáveis de transformação e vetores de expressão a fim de atingir-se altos níveis de expressão gênica e concentração da proteína recombinante em tecidos específicos de plantas. Proteínas recombinantes, incluindo anticorpos monoclonais, neuropeptídeos, albumina de soro humano, peptídeos antibacterianos e enzimas industriais como a α -amilase têm sido produzidas em diversas espécies de plantas transgênicas como tabaco, batata, milho, alfafa, canola e soja (Kusnadi e colaboradores, 1997; Peeters, 2001). Agora que a transformação de tubérculos, leguminosas e cereais está se tornando rotineira, a escolha da espécie para a produção de proteínas heterólogas pode ser baseado na capacidade que a planta possua para acumular as proteínas recombinantes de interesse, processamento pós-tradução apropriado e estabilidade da proteína recombinante, além da disponibilidade de métodos para a extração e purificação desta proteína (Peeters, 2001).

Existem muitos exemplos do sucesso das técnicas de expressão e processamento pós-tradução de proteínas recombinantes resultando em moléculas em sua forma ativa, demonstrando que proteínas recombinantes podem ser produzidas em uma variedade de espécies de plantas apesar de os mecanismos de processamento, acúmulo direcionado a tecidos específicos e estabilidade não estarem ainda completamente compreendidos ou otimizados (Kusnadi e colaboradores, 1997). Nestes estudos, os níveis de acúmulo da proteína recombinante variaram bastante: de níveis baixos como 0,0003% da proteína solúvel da semente de tabaco até níveis tão altos quanto 6% da proteína solúvel da semente

de milho (Kusnadi e colaboradores, 1997). São, atualmente, considerados “adequados”, níveis de expressão da ordem de 1%.

A primeira enzima de uso industrial produzida por esta tecnologia foi uma α -amilase, a partir de folhas e sementes de tabaco transgênico. A enzima foi acumulada em espaço extra-celular, atingindo níveis entre 0,2 e 0,3% da proteína total da semente e folha, respectivamente (Pen e colaboradores, 1992). Diferentemente da α -amilase produzida em microorganismos, a enzima recombinante foi glicosilada mantendo, contudo, sua atividade. Esta mesma enzima foi também expressada em alfafa, mas o nível de produção não foi reportado (Austin e colaboradores, 1994). No Brasil, Leite e colaboradores (2000) expressaram, com sucesso, hormônio do crescimento humano em sementes de tabaco. O nível de expressão alcançado foi de aproximadamente 0,16% da proteína solúvel. Este mesmo grupo vem atualmente conduzindo pesquisa para a produção do hormônio em sementes de milho transgênico (Leite e colaboradores, 2001).

No que diz respeito à produção comercial de proteínas recombinantes, as empresas Bristol Myers e Agracetus (Winsconsin, EUA) foram das primeiras a unir esforços no sentido de produzir anticorpos monoclonais (anticorpo BR-96 acoplado à droga doxorubicina) em sementes de soja (Chemical Engineering News, 1994). O trabalho conjunto de pesquisa entre a Universidade Estadual de Iowa (com a participação do Prof. Dr. Zivko L. Nikolov), e as empresas ProdiGene Inc. e Sigma Chemicals Co. (EUA) levou ao desenvolvimento de processos de recuperação e purificação das proteínas avidina e β -glicoronidase recombinantes produzidas em sementes de milho transgênico (Hood e colaboradores, 1997; Kusnadi e colaboradores, 1996). Ambas as enzimas foram produzidas e purificadas em larga escala e são atualmente comercializadas pela Sigma como reagentes para pesquisa. Muitas empresas de biotecnologia estão atualmente patenteando sistemas de expressão e desenvolvendo testes clínicos para colocar no mercado os primeiros produtos de emprego farmacêutico produzidos em plantas transgênicas, sendo que já existe no mercado um produto de emprego farmacêutico deste tipo, a hirudina, disponível comercialmente no Canadá (Giddings e colaboradores, 2000).

1.4. Colocação do Problema

A capacidade de recuperar e purificar proteínas recombinantes e o custo envolvido neste processo foram problemas subestimados por aqueles que avaliaram o potencial destes bioprodutos primeiramente produzidos utilizando culturas de células. O mesmo cenário está se desenvolvendo para a produção de proteínas em plantas transgênicas, pois considerável esforço vem sendo realizado no sentido de compreender e otimizar mecanismos de expressão e aumento de rendimento, mas não existe esforço correspondente no sentido de identificar e resolver problemas relativos à recuperação e purificação do produto (Kusnadi e colaboradores, 1998). Percebe-se, a partir de uma análise dos trabalhos existentes na literatura, que não há estudos sistemáticos de recuperação e purificação de proteínas produzidas em plantas transgênicas, e esta falta de estudos na área ainda torna incerta a análise do potencial econômico deste sistema, apesar de alguns exemplos comerciais de sucesso. Pouco se estudou da etapa de extração (cinética, tamanho da partícula, pH, força iônica, entre outros fatores) e da etapa de purificação, principalmente no que se refere à utilização de processos passíveis de serem empregados em larga escala. No caso da aprotinina recombinante produzida em semente de milho, os estudos realizados até o momento (Zhong e colaboradores, 1999) foram centrados na transformação da planta e viabilidade do cassete de expressão utilizado. Muito pouco se estudou da recuperação e purificação, sendo que esta foi realizada apenas visando a caracterização da aprotinina recombinante.

1.5. Objetivo e Relevância

A pesquisa realizada teve por objetivo o estudo da recuperação e purificação da aprotinina recombinante produzida em sementes de milho transgênico. Por ser uma etapa crítica do processo de recuperação e purificação, a extração foi estudada em detalhes. Avaliou-se o efeito de variáveis de extração como tempo, pH e força iônica sobre a qualidade do extrato, no que diz respeito à extração da molécula recombinante e de impurezas na forma de outras proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e lipídeos, avaliando-se condições mais adequadas para a extração

preferencial da aprotinina recombinante. Uma vez conhecido o comportamento da semente de milho frente às diferentes condições de extração, propôs-se ainda avaliar a possibilidade do estabelecimento de diferentes rotas de purificação a partir do extrato da semente, passíveis de utilização em escala comercial, avaliando-se a pureza do produto a cada etapa. Neste sentido, avaliou-se o emprego da técnica de cromatografia de afinidade, explorando sua alta especificidade de separação. As técnicas de cromatografia em íon metálico imobilizado (IMAC) e troca iônica também foram estudadas, devido ao amplo potencial de emprego, em pequena e larga escala, e relativo baixo custo destas resinas. Com isso, mais do que desenvolver metodologias de purificação de uma proteína específica, o que se justifica, pois esta é uma proteína de alto valor (US\$ 3.700,00 por grama, preço FOB da aprotinina grau reagente, EUA) e utilização nobre, pretendeu-se contribuir para a avaliação de plantas como biorreatores em geral e, mais especificamente, pretendeu-se acrescentar conhecimentos sobre a semente de milho como fonte de matéria prima de um trem de operações de RPB.

1.6. Apresentação do Trabalho

A apresentação deste trabalho segue o modelo de apresentação formal de teses e dissertações indicado pela Universidade Estadual de Campinas, que se compõe, basicamente, de capítulos destinados à introdução, revisão da literatura contendo informações atualizadas relativas ao tema do trabalho, materiais e metodologias utilizados, resultados e discussões, conclusões, sugestões para próximos trabalhos e referências bibliográficas. Visando a maior clareza na apresentação dos resultados e discussões, decidiu-se por dividir este tópico em quatro diferentes capítulos, em função dos vários assuntos tratados e da extensão do texto: I) Estudos de Estabilidade e Distribuição da Aprotinina e ITM (inibidor de tripsina de milho), II) Estudos de Extração, III) Estudos de Adsorção em Tanques Agitados e IV) Estudos de Purificação Cromatográfica da Aprotinina Recombinante.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

O presente capítulo tem o intuito de apresentar uma revisão sobre a produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas e, mais especificamente, trazer informações sobre a recuperação e purificação de aprotinina de fontes naturais e transgênicas. O capítulo também apresenta informações sobre a semente de milho, quanto à presença de proteínas, inibidores de protease e outros compostos cuja presença pode, de alguma forma, influenciar os estudos em andamento. Finalmente, apresenta-se uma breve descrição sobre a adsorção de proteínas em matrizes sólidas, princípio básico das mais variadas técnicas de cromatografia em coluna, operação unitária empregada neste trabalho. Esta revisão não tem a intenção de explorar de maneira exaustiva e completa os tópicos aqui abordados, mas sim fornecer ou apontar os conhecimentos básicos necessários à compreensão e elaboração deste trabalho.

2.1. Plantas Transgênicas: Aspectos Legais e de Segurança

Os recentes avanços da tecnologia de DNA recombinante têm revolucionado o cultivo de plantas e possibilitado a recombinação genética com a introdução de genes das mais variadas origens visando, principalmente, a melhoria do desempenho agrônomo. Entre as modificações já desenvolvidas utilizando-se técnicas de biologia molecular encontram-se a resistência a vírus, bactérias, fungos, insetos, tolerância a várias formas de estresse, e mais recentemente, a utilização de

plantas como biorreatores para a produção de proteínas de emprego industrial ou farmacêutico (Leite, 2001). A liberação, em alguns países, do plantio e consumo animal e humano de plantas geneticamente modificadas têm suscitado debates acirrados por parte da sociedade. O principal ponto dessa discussão diz respeito às evidências científicas – ou a ausência – de eventuais impactos dos produtos transgênicos à saúde humana e animal, e também ao meio ambiente. Neste contexto, tem ficado clara a necessidade do estabelecimento, por parte da sociedade, de órgãos reguladores responsáveis por garantir sua segurança. A biossegurança visa precisamente ao estabelecimento de mecanismos de proteção da sociedade quanto ao uso da moderna biotecnologia, seja em escala laboratorial ou testes de campo em larga escala, que possam implicar em risco biológico, provocar impactos ambientais indesejáveis ou conseqüências negativas para a saúde humana (Scholze, 2002). A aprovação, por exemplo, de um plantio em escala comercial de uma nova linhagem transgênica é resultado de vários anos de pesquisa e testes de laboratório e de campo visando à avaliação de seu desempenho. Todo esse processo deve ser realizado dentro de normas estabelecidas de biossegurança, que dependem do sistema regulatório de cada país.

No Brasil, o órgão federal responsável por assegurar a adequação das pesquisas envolvendo a biotecnologia moderna e regular a liberação de organismos geneticamente modificados (OGM's) é a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Criada com a aprovação da chamada "Lei de Biossegurança" de 1995 (Lei nº 8.974/95), a CTNBio é composta por 18 membros titulares e seus suplentes, entre os quais especialistas indicados pela comunidade acadêmica. A comissão analisa caso a caso os pedidos de certificação em biossegurança de laboratórios, de testes em campo ou ainda a liberação de OGM's. No caso de liberação para testes ou plantio comercial, cabe ao solicitante o ônus de demonstrar a biossegurança do OGM em questão. Uma vez aprovado, a fiscalização da atividade é de responsabilidade dos Ministérios da Agricultura, Saúde, Meio Ambiente e Ciência e Tecnologia.

Até o momento, a CTNBio aprovou o plantio para comercialização, inclusive para consumo humano, de um único OGM: a soja “Roundup Ready” da Monsanto (Escobar, 2002). Contudo, a liberação foi suspensa na Justiça por ação do Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC) e da Organização Não Governamental Greenpeace, movida contra o governo federal. A ação condiciona a liberação de qualquer OGM à realização de um estudo de impacto ambiental (EIA-Rima) e à elaboração de normas para a avaliação de riscos à saúde e a rotulagem desses produtos (Escobar, 2002). Pelas normas atuais, a CTNBio pode ou não exigir o EIA-Rima para a liberação de um determinado OGM. No caso da soja da Monsanto, o órgão julgou que o EIA-Rima não era necessário, com base nas extensas pesquisas internacionais e nacionais envolvendo o referido OGM.

2.2. Estratégias para a Utilização de Plantas como Biorreatores

Segundo Leite (2001), a produção de proteínas recombinantes em plantas pode ser feita por duas diferentes estratégias. A primeira delas baseia-se na utilização de vírus de RNA fita simples, que ocorrem naturalmente em plantas. Neste caso, o gene que codifica a proteína recombinante de interesse é primeiramente integrado ao genoma do vírus que, ao infectar a planta de interesse, promove sua auto-replicação e expressão de seus genes, incluindo o gene que codifica a proteína recombinante. A expressão da proteína é transitória, pois não existe integração estável do gene estrangeiro ao genoma da planta e a recuperação e purificação da proteína recombinante pode ser feita a partir de extratos dos tecidos infectados.

Na segunda estratégia, o gene que codifica a proteína de interesse é integrado ao genoma da planta, o que permite a expressão permanente e a transferência desta característica à progênie da planta transformada. Neste caso, o gene que codifica a proteína de interesse é incluído em um cassete de expressão, que contém entre outras seqüências, um promotor e um gene de seleção, codificador de uma proteína que confere resistência a um antibiótico ou a um herbicida. O “cassete de expressão” é, então, transferido a um vetor apropriado, que

depende do método de transformação utilizado (ex., agrobactéria) que integrará as seqüências estrangeiras ao genoma da planta. A utilização de um meio de cultura contendo o agente seletivo (antibiótico ou herbicida) limitará o crescimento de células não transformadas. O tecido selecionado é, então, regenerado na forma de plantas, que são avaliadas quanto à presença do gene e da proteína de interesse, o primeiro através de técnicas como PCR ("polymerase chain reaction") e hibridação (*Southern blot*), e o segundo através de testes bioquímicos e imunoenaios específicos (Leite, 2001). A Figura 2.1 apresenta as diversas etapas envolvidas nesta estratégia.

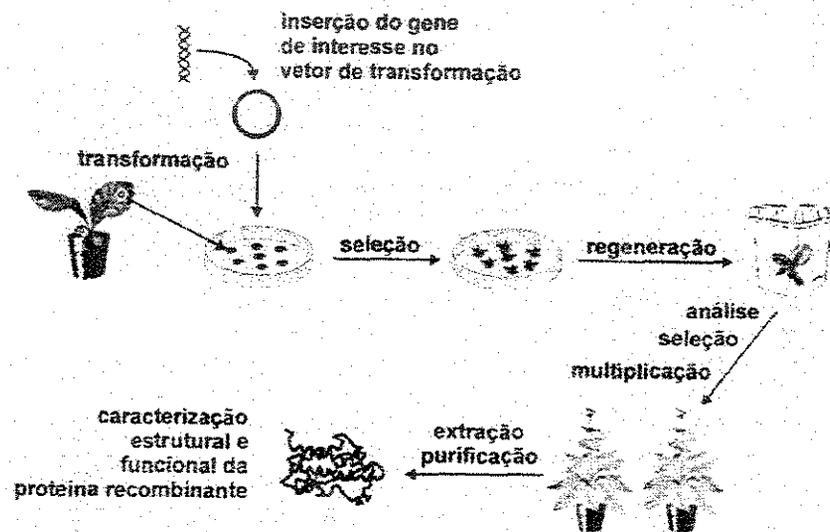


Figura 2.1 – Produção de proteínas recombinantes em plantas através da expressão de genes integrados ao genoma. Fonte: Leite (2001).

Esta estratégia é geralmente mais trabalhosa e demorada que a mediada por vírus, contudo, apresenta maior versatilidade, uma vez que a expressão da proteína de interesse pode ser dirigida para tecidos específicos das plantas (ex., sementes) enquanto que nos sistemas virais a proteína recombinante será acumulada obrigatoriamente nas folhas (Leite, 2001). Por apresentarem alta concentração de água e atividade hidrolítica, prejudiciais à estabilidade de proteínas, as folhas não constituem órgãos adequados ao acúmulo de proteínas recombinantes. As

sementes, pelo contrário, possuem baixa concentração de água e geralmente não requerem condições especiais de estocagem, sendo mais adequadas a este acúmulo.

Outro ponto importante relacionado à técnica de integração gênica, principalmente no caso de produção em larga escala de proteína recombinantes, é o desempenho agrônômico das plantas transformadas. Como a linhagem da planta modificada geneticamente, capaz de expressar a proteína de interesse, pode não apresentar necessariamente boas características agrônômicas em termos de produtividade de sementes por área plantada, faz-se necessário à utilização de técnicas de melhoramento, por exemplo, retro-cruzamento, com linhagens cujos desempenhos em campo sejam mais adequados.

2.3. Produção de Aprotinina Recombinante em Semente de Milho

O milho (*Zea mays*) é uma planta de cultivo versátil, que já passou por inúmeros melhoramentos genéticos ao longo da história. Por ser extensivamente estudada, inclusive com relação a técnicas de manipulação genética, e proporcionar bom desempenho agrônômico e baixos custos de produção, a expressão de proteínas recombinantes em semente de milho surge como uma ótima alternativa para produção comercial de fármacos (Kusnadi e colaboradores, 1997).

A transformação do milho para a produção da semente contendo a aprotinina recombinante utilizada neste trabalho foi realizada de forma semelhante à ilustrada na Figura 2.1, sendo o procedimento detalhadamente descrito por Zhong e colaboradores (1999). A expressão da seqüência que codifica a aprotinina foi dirigida pelo promotor do gene constitutivo que codifica a ubiquitina em milho, o mesmo promotor que resultou no acúmulo de altos níveis de β -glicoronidase (Kusnadi e colaboradores, 1996) e avidina (Hood e colaboradores, 1997) em gérmen de milho. A linhagem de milho utilizada foi a "Hi-II" e a transformação foi efetuada utilizando-se bombardeamento por micro-partículas. Como esperado, o acúmulo da aprotinina recombinante ocorreu principalmente no gérmen, alcançando níveis próximos de 0,07% da proteína solúvel da semente extraída a pH 7,0 (Zhong e

colaboradores, 1999). Informações recentes dizem que o nível de expressão da aptotina na semente de milho já alcançou valores 20 vezes maiores (Zivko L. Nikolov, comunicação pessoal).

2.4. A Semente de Milho e seus Principais Componentes

A planta de milho (*Zea mays*) é uma monocotiledônea de ciclo de cultivo anual, sendo cultivada em todo o mundo, movimentando um valor global anual estimado em US\$ 40 bilhões (Carneiro e colaboradores, 2000). É utilizada como alimento para consumo humano, animal e como matéria-prima de inúmeros produtos industrializados.

A semente do milho é uma cariopse, que consiste de pericarpo, endosperma, embrião e pedúnculo (Figura 2.3). O pericarpo constitui a camada externa da semente e é derivado da parede do ovário, sendo geralmente incolor. O embrião da semente é também conhecido como gérmen, que alguns autores consideram a soma do embrião com o escutelo (Watson, 1987).

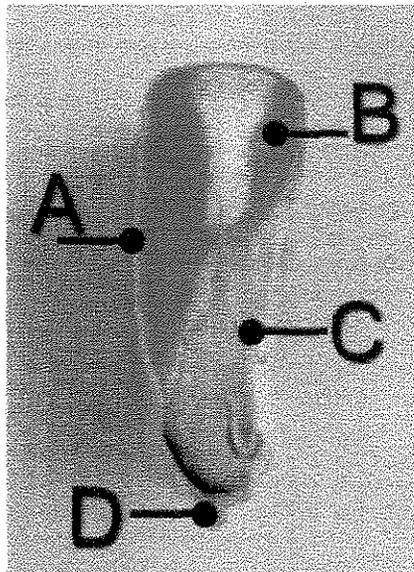


Figura 2.3 – Estrutura da semente de milho. (A) Pericarpo; (B) Endosperma; (C) Embrião; (D) Pedúnculo. Fonte: Carneiro e colaboradores (2000).

Os embriões do milho não armazenam reservas durante o desenvolvimento

da semente, a não ser uma pequena quantidade de lipídeos no escutelo (Carneiro e colaboradores 2000). O endosperma é o tecido responsável pelo acúmulo de proteínas, armazenadas na forma de corpos protéicos por todo o tecido, e também pela polimerização e acúmulo dos carboidratos na forma de amido. É nele que se encontram 98% do amido, 80% da proteína e 15% dos lipídeos presentes na semente (Carneiro e colaboradores, 2000).

A seguir, apresenta-se uma breve discussão sobre algumas das principais biomoléculas presentes na semente de milho, de extrema relevância para o desenvolvimento de estudos de recuperação e purificação a partir desta fonte.

2.4.1. Proteínas

As proteínas da semente do milho podem ser divididas em quatro classes, de acordo com sua solubilidade: albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas. Albuminas são proteínas solúveis em água enquanto que as globulinas são solúveis em soluções salinas diluídas. Estas duas classes de proteínas contribuem com aproximadamente 9% da proteína total estocada na semente, sendo que muitas são sintetizadas durante o desenvolvimento do embrião. As glutelinas são proteínas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas e contribuem com aproximadamente 30% das proteínas totais do grão. Finalmente, as prolaminas são solúveis em soluções alcoólicas, respondendo por aproximadamente 60% das proteínas da semente. As prolaminas não possuem atividade enzimática e são, basicamente, fonte de aminoácidos, nitrogênio e esqueleto carbônico para o desenvolvimento inicial da planta.

As prolaminas do milho são também conhecidas como zeínas e são principalmente estocadas no endosperma da semente. As zeínas são classificadas em quatro tipos distintos segundo sua estrutura primária e solubilidade: alfa zeína (massa molecular entre 19 e 22 kDa), beta zeína (massa molecular de 14 kDa), gamma zeína (massa molecular entre 16 e 27 kDa) e delta zeína (massa molecular de 10 kDa) (Larkins e colaboradores, 1989). Por serem as proteínas mais abundantes na semente de milho (50%), as zeínas também são as principais

responsáveis pela conhecida má qualidade nutricional do milho, especialmente no que se refere à baixa concentração de importantes aminoácidos essenciais. Em suas estruturas, as zeínas não possuem resíduos de lisina e triptofano, possuindo ainda pequenas quantidades de resíduos de treonina, valina e aminoácidos sulfurados. Estas proteínas são estocadas no interior do endosperma da semente na forma de corpos protéicos (diâmetro entre 0,1 a 1,8 μm), empacotados juntamente com os grânulos de amido, e também na forma de uma matriz protéica que envolve estes grânulos (Wilson, 1987).

2.4.2. Inibidores de Proteases

Proteínas com a capacidade de inibir a ação de proteases ou amilases estão amplamente distribuídas em tecidos vegetais. Estes inibidores são produzidos e estocados, normalmente em grandes quantidades, em tecidos especializados para o armazenamento de proteínas e carboidratos como sementes e tubérculos. Podem ser produzidos naturalmente durante o desenvolvimento da planta, com a função de proteção contra a hidrólise de proteínas ou amido por parte de enzimas endógenas, ou podem ter sua produção induzida em resposta a um ataque externo (microrganismos patogênicos, insetos, mamíferos, etc). Esta inativação de enzimas exógenas presentes em outros organismos parece ser a principal função destes inibidores visto que, em sua maioria, são específicos contra enzimas não encontradas no interior da planta (Masoud e colaboradores, 1996).

Sementes de milho contêm uma pequena proteína que é um potente inibidor de tripsinas de mamíferos, sendo também conhecido como inibidor de tripsina de milho (ITM). Por razões ainda não totalmente compreendidas, sementes de uma variedade de milho que possui alta concentração de lisina (variedade opaco-2) possuem também altos níveis deste inibidor (Swarts e colaboradores, 1977; Mahoney e colaboradores, 1984). Trata-se de uma proteína formada por 112 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 14,0 kDa (determinação por SDS-PAGE). De muitas proteases testadas, apenas tripsina e Fator XIIa (fator ativado de Hageman) são inibidas por esta proteína do milho, cuja constante de associação em

sua interação com a tripsina suína é da ordem de 10^7 M^{-1} (Burkhard e colaboradores, 1979). Mahoney e colaboradores (1984) foram os primeiros a determinar a seqüência de aminoácidos deste inibidor purificado da variedade opaco-2, indicando como peculiaridade o fato dele conter em sua estrutura primária um resíduo de histidina e três de triptofano, aminoácido normalmente ausente em inibidores de protease presentes em plantas. Possui ainda dez resíduos de cisteína, todos eles envolvidos em pontes de dissulfeto, o que garante grande rigidez à estrutura tridimensional da molécula.

O trabalho de Hojima e colaboradores (1980) reporta a existência de três sub-variantes do inibidor de tripsina do milho com pI's de 5,1, 6,3 e 7,7 e massas moleculares de 11,0 ou 14,0 kDa, segundo o método de determinação (permeação em gel ou SDS-PAGE, respectivamente). Estes mesmos autores apontam estes inibidores como os mesmos isolados por Swartz e colaboradores (1977). Em um levantamento bibliográfico realizado, não foram encontradas informações relativas à presença ou não, em sementes de milho, de proteínas capazes de inibir outras serino-proteases, como a quimotripsina.

2.4.3. Carboidratos

Os carboidratos são os maiores constituintes da semente de milho, estando amplamente distribuídos pelos seus tecidos. Compõem-se de uma enorme variedade de moléculas exercendo funções estruturais, energéticas, de controle e reserva. Em média, 72% da massa seca da semente deve-se à presença destes compostos, sendo o endosperma responsável pela maior parte do acúmulo.

O principal carboidrato de reserva da semente é o amido, representando 86% da massa seca do endosperma, enquanto que açúcares simples representam aproximadamente 1% desta massa (Boyer e Shannon, 1987). O amido (constituído basicamente de dois polímeros de glicose, a amilose, essencialmente linear, e a amilopectina, altamente ramificado) é estocado no interior do esperma na forma de grânulos insolúveis envolvidos por uma matriz protéica que chegam a atingir diâmetros de até 25 μm .

A quantidade de polissacarídeos solúveis em água varia consideravelmente de acordo com a variedade de milho, chegando em alguns casos a atingir 35% da massa seca da semente (Boyer e Shannon, 1987). Muitos estudos têm apontado para a presença de um polissacarídeo altamente ramificado chamado de fitoglicogênio, similar em estrutura ao glicogênio animal (Wilson, 1987). Quanto aos carboidratos simples, estes compõem aproximadamente 2% da massa seca da semente. Os monossacarídeos são formados basicamente de D-glicose e D-frutose em iguais proporções. Pequenas quantidades de açúcares nucleotídicos (DPA-glicose, DPU-glicose, DPU-xilose, DPU-arabinose, etc.) também são encontrados, sendo continuamente utilizados na síntese de biopolímeros (amido, glicoproteínas, paredes celulares) durante o crescimento da semente. A sacarose é o principal dissacarídeo da semente de milho, chegando a atingir valores entre 4 e 8% da massa seca. De maneira geral, a concentração de carboidratos no interior da semente varia consideravelmente ao longo do processo de crescimento e maturação.

2.4.4. Lipídeos

Apesar de representar uma fração relativamente pequena da massa da semente (aproximadamente 4%) o óleo presente na semente de milho é de grande importância para a planta, sendo também extraído e refinado em todo mundo em quantidades importantes. Os lipídeos formam um grupo quimicamente heterogêneo de substâncias que possuem em comum a propriedade de serem solubilizados em solventes orgânicos como éter de petróleo, hexano, entre outros. Os triacilgliceróis respondem por aproximadamente 99% do óleo refinado de milho comercial e são os lipídeos de reserva principais da semente (Weber, 1987). A porcentagem relativa aos triacilgliceróis com relação aos lipídios totais da semente varia consideravelmente segundo a variedade do milho, representando geralmente valores entre 75 e 88%. Assim, fosfolipídeos, glicolipídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, carotenóides (precursores da vitamina A), tocóis (vitamina E), entre outros, também são encontrados na semente de milho em pequenas concentrações (Weber,

1987). Ainda segundo Weber (1987), os lipídeos se distribuem nos diferentes tecidos da semente da seguinte forma: no embrião, de 76 a 83%; no endosperma, de 14 a 23%; no pericarpo, de 1 a 2% e no pedúnculo, menos de 1%.

2.5. Purificação de Proteínas: Adsorção em Matrizes Sólidas

Técnicas cromatográficas que fazem uso da adsorção em colunas são largamente utilizadas como processo de recuperação e purificação de proteínas, principalmente como etapa onde alta concentração e alta pureza são necessários. Apesar de o emprego de colunas cromatográficas fornecer altas resoluções nas operações de separação, técnicas de adsorção em tanques agitados também são valiosas, principalmente quando a rapidez na operação é prioridade (Scopes, 1994).

A cromatografia, como os demais métodos de recuperação e purificação de bioprodutos, aproveita-se de determinadas características físico-químicas dos componentes de interesse em uma mistura a fim de efetuar a separação. A operação é realizada através da distribuição dos componentes da mistura entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, dependendo de suas características. Os processos cromatográficos mais utilizados na recuperação e purificação de bioprodutos são o de troca iônica, hidrofóbico, pseudoafinidade, afinidade e permeação em gel, sendo este último o único a não utilizar como princípio básico da separação o fenômeno da adsorção, pois se baseia fundamentalmente na diferença do tempo de residência das biomoléculas no interior de uma coluna preenchida por uma matriz macroporosa, segundo seus diâmetros moleculares.

A adsorção é essencialmente um fenômeno de superfície, em que moléculas (adsorvato) presentes em um fluido concentram-se na superfície de um sólido (adsorvente) devido a forças de interação molecular. A energia de adsorção determina a intensidade da interação entre adsorvato e adsorvente, sendo

conseqüência do tipo de interação envolvida (van der Waals, ponte de hidrogênio, iônica, entre outras). Os principais adsorventes para proteínas são matrizes trocadoras de íons, matrizes hidrofóbicas e outras matrizes onde ligantes de interesse (proteínas, aminoácidos, metais, etc) são quimicamente acoplados. Neste caso, as matrizes mais utilizadas têm sido as de celulose, agarose ou outros polímeros de carboidratos, além de polímeros sintéticos, estes últimos mais recentemente.

A determinação da capacidade máxima e da intensidade de interação entre adsorvato e adsorvente baseia-se no estudo do equilíbrio deste entre as fases (fluida e sólida). Este equilíbrio é estudado na forma de isotermas de adsorção, sendo o modelo de Langmuir (Langmuir, 1916) freqüentemente utilizado para correlacionar dados de adsorção de proteínas. Uma apresentação mais detalhada do modelo de Langmuir será feita mais adiante.

2.5.1. Conceitos Básicos de Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade distingue-se de outros métodos cromatográficos adsorptivos por basear-se, principalmente, em propriedades biológicas ou funcionais específicas das espécies que interagem: a biomolécula que se deseja separar e a fase estacionária. Seu princípio é o isolamento seletivo de biomoléculas aproveitando-se das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos (Collins e colaboradores, 1993). Como exemplo de alguns sistemas biomolécula-ligante utilizados em cromatografia de afinidade, temos: enzimas-substratos, enzimas-cofatores, enzimas-inibidores, anticorpos-antígenos e ácidos nucléicos-sequência de bases complementares. Como principal vantagem, o método permite a obtenção de alta concentração e pureza da biomolécula de interesse, uma vez que a adsorção é seletiva as constantes de dissociações são baixas (altas forças de interação). Como principal desvantagem, o método apresenta normalmente altos custos operacional e fixo, pelo relativo alto preço dos ligantes, preço de ativação da resina, da imobilização de ligantes na resina e pela especificidade do processo, que não permite o uso de uma coluna para a

recuperação de mais que um tipo de bioproduto.

A metodologia da cromatografia de afinidade envolve a preparação de uma fase estacionária específica, normalmente através da imobilização covalente de ligantes específicos na matriz previamente ativada. Uma coluna é, então, preenchida com a matriz contendo o ligante imobilizado (fase estacionária), sendo equilibrada com um tampão adequado. A Figura 2.4 apresenta as quatro etapas básicas de uma cromatografia de afinidade.

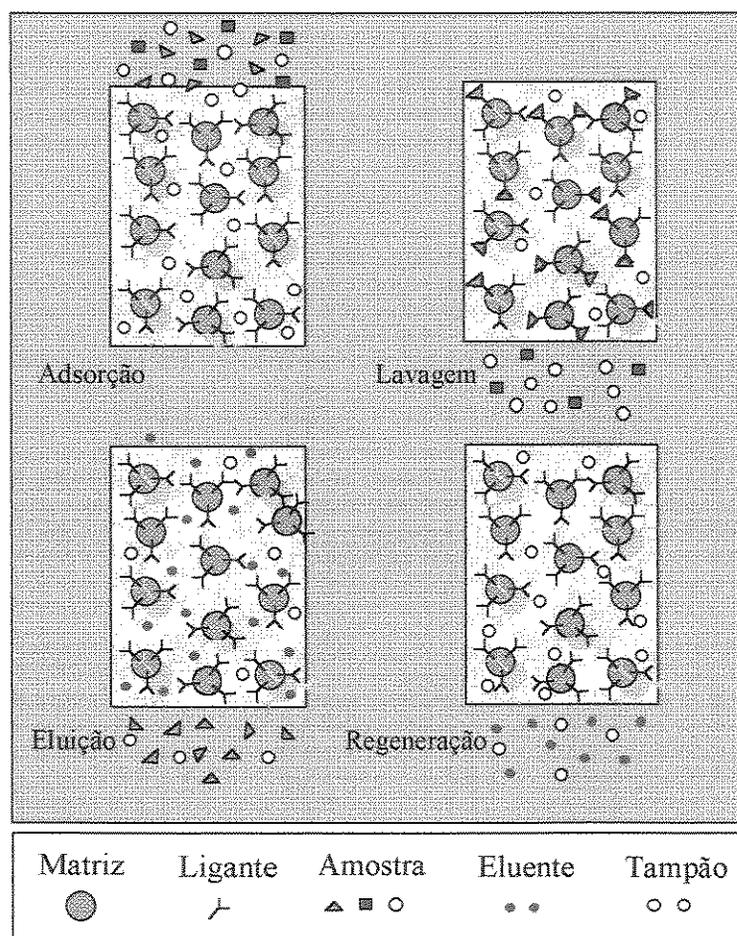


Figura 2.4 - Etapas básicas da cromatografia de afinidade: adsorção, lavagem, eluição e regeneração.

Na etapa de adsorção, a amostra, contendo o bioproduto de interesse, é injetada na coluna. As moléculas que não possuem afinidade pelo ligante passam

pela coluna sem se ligarem, enquanto que as moléculas capazes de unirem-se a este são retidas. O próximo passo é a lavagem da coluna com um segundo tampão, eliminando-se assim contaminantes ligados fracamente à matriz por interações não específicas. A eluição das moléculas ligadas especificamente pode ser feita por alteração do pH ou força iônica do meio, que tornam o complexo molécula-ligante menos estável, levando à dissociação do mesmo. Pode ainda ser realizada pelo emprego de substâncias com maior afinidade pelo ligante ou pela molécula de interesse. A regeneração da coluna é realizada através da passagem de eluentes, que restauram a coluna à sua condição inicial (tampão inicial de equilíbrio).

2.5.2. Conceitos Básicos de Cromatografia de Afinidade por Íon Metálico Imobilizado

A cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado foi primeiramente estudada por Porath e colaboradores (1975) que observaram que moléculas de proteína eram capazes de se ligar a íons metálicos, podendo-se utilizar o conceito para promover a adsorção de proteínas em íons metálicos imobilizados em matrizes sólidas, técnica que ficou conhecida como IMAC - "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography". Os autores constataram que o uso de agente quelante para imobilizar um íon metálico num suporte sólido restringe o grau de liberdade do complexo proteína-metal, evitando a desnaturação da proteína e mantendo a sua atividade enquanto promove a separação e purificação (Wong e colaboradores, 1991).

Os resíduos de aminoácido das proteínas que participam das interações com o íon metálico são a histidina, devido ao par de elétrons do átomo de nitrogênio do anel imidazol presente em sua estrutura, a cisteína, devido ao grupamento tiol, e o triptofano, devido ao anel indol. No entanto, o triptofano promove uma interação fraca da proteína com o metal e sua contribuição é considerada pequena quando comparada com a da histidina. Atualmente existem técnicas em que a seqüência de aminoácidos da proteína é modificada ou aumentada (proteínas recombinantes) a fim de tornar a interação com o metal não apenas possível, mas intensificada,

inserindo-se, por exemplo, caudas de histidina com seis ou mais resíduos nas extremidades terminais das proteínas (Beitle e Atai, 1992). Esses resíduos de aminoácido interagem devido a uma coordenação entre um par de elétrons do grupamento do aminoácido e o metal, porém sabe-se que há outros tipos de interação presentes no sistema. Normalmente, o quelato metálico imobilizado se encontra bastante solvatado por moléculas de água, possuindo assim elevado número de grupos hidroxila ao seu redor. No caso de matrizes com o quelante ácido iminodiacético (IDA) e íon cobre como ligante, o quelato apresenta uma rede de cargas negativas, sugerindo a participação de interações eletrostáticas ou indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos carregados positivamente na associação da proteína com o quelato (Vijayalaksmi, 1989). A interação proteína-metal também pode ser afetada por uma variedade de variáveis como pH, temperatura, tipo e concentração de sal, natureza do metal imobilizado, densidade do ligante e tamanho da proteína (Wong e colaboradores. 1991).

Os íons metálicos mais utilizados são Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+} . Quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os quelatos formados entre o suporte e os íons metálicos, porém mais fraca é a interação do metal com a proteína. Portanto, o agente quelante deve ser tal que proporcione uma estabilidade do complexo com o metal, mas também disponibilize sítios livres de coordenação para viabilizar a ligação com a proteína. Os agente quelantes mais utilizados são o ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), tetraetilenopentamina (TEPA) e tris carboximetil etilenodiamina (TED). Uma representação esquemática do complexo formado entre o agente quelante, metal e proteína é mostrada na Figura 2.5.

A etapa de adsorção em cromatografias IMAC geralmente é realizada na faixa de valores de pH entre 6,0 e 8,0, intervalo em que o grupo doador de elétrons da proteína apresenta-se desprotonado, permitindo a interação com o metal. Uma variável importante na adsorção é a força iônica, sendo que altas concentrações de sal são utilizadas para se evitar interações não-específicas do tipo eletrostática.

A eluição das biomoléculas complexadas com o metal pode ser feita pela

variação de pH, adição de um agente competidor pelo metal que possibilite o deslocamento da proteína, ou pela adição de um agente quelante mais forte do que o utilizado inicialmente. Neste terceiro método, a proteína não é liberada sozinha, mas sim na forma de um complexo proteína-metal-agente quelante, sendo necessária uma etapa adicional para a separação da proteína do íon metálico e agente quelante.

Mesmo sendo regida por interações pseudoespecíficas, a cromatografia IMAC pode promover altos índices de purificação quando o íon metálico e o agente quelante são selecionados apropriadamente. Além disso, o baixo custo dos metais e a facilidade da regeneração da fase estacionária tornam esta técnica bastante atraente.

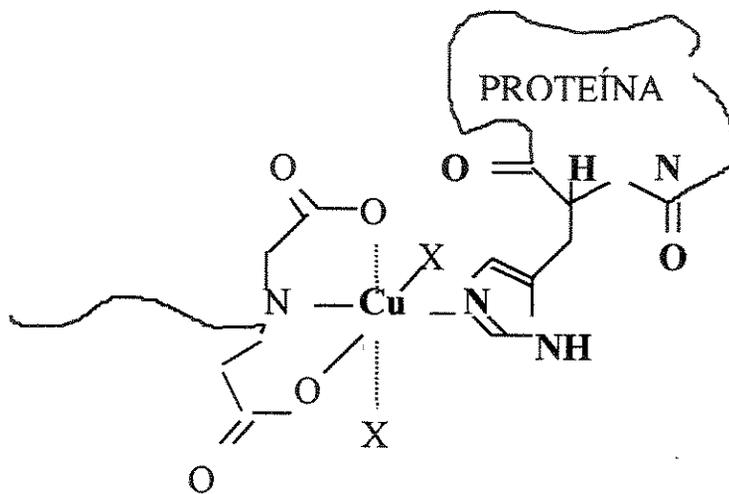


Figura 2.5 – Representação esquemática da interação proteína-IDA-Cu²⁺. As letras X indicam sítios de coordenação do metal, susceptíveis de ligação com a proteína.

2.5.3. Conceitos Básicos de Cromatografia de Troca Iônica

Dentro da área de recuperação e purificação de proteínas, a cromatografia de troca iônica é uma das mais difundidas técnicas em uso na atualidade. A técnica baseia-se na interação iônica entre grupos ionizáveis presentes na superfície das proteínas em solução com grupos de carga oposta presentes em uma fase

estacionária (resina). A carga líquida da proteína varia com o pH do meio onde se encontra diluída e depende do número e tipos de resíduos de aminoácido ionizáveis contidos na molécula. A escolha da resina mais adequada (trocadora de cátions ou trocadora de ânions) dependerá, de forma geral, do ponto isoelétrico da proteína alvo e do pH em que se deseja efetuar a adsorção (Figura 2.6).

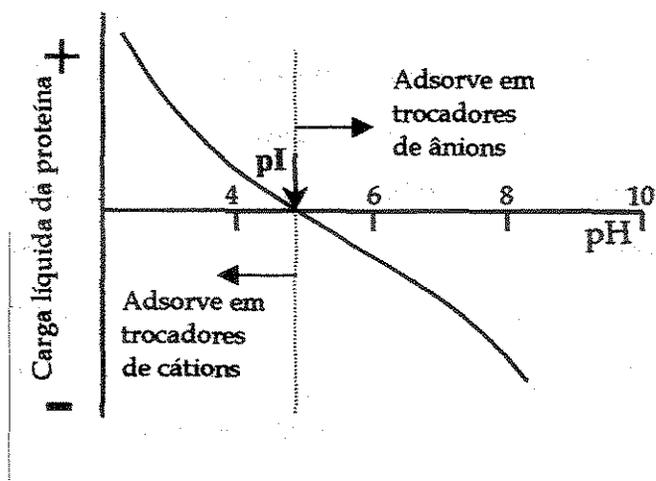


Figura 2.6 – Representação esquemática, de acordo com a carga líquida de uma proteína modelo, do comportamento da adsorção em resinas trocadoras de íons como função do pH. O pI corresponde ao ponto isoelétrico da proteína.

Em geral, proteínas ácidas (pI menor que 7,0) são separadas com resinas trocadoras de ânions e proteínas básicas (pI maior que 7,0), com resinas trocadoras de cátions. Assim, resinas trocadoras de ânions (grupos funcionais carregados positivamente) adsorverão proteínas dissolvidas em soluções com pH acima do valor de seu pI. A separação de outras proteínas ou impurezas ocorre pela diferença de carga de cada composto. A dessorção pode ser feita aumentando-se a concentração de íons salinos (ex., NaCl) ou alterando-se o pH do meio. O aumento da concentração de íons salinos provoca um aumento na competição pelos grupos funcionais carregados do trocador de íons e, por conseqüência, diminui a disponibilidade destes grupos para interação com as proteínas. Após a completa dessorção, a resina é regenerada de tal forma que os contra-íons originais sejam

recuperados e a mesma se encontra pronta para repetir o processo (Yamamoto e colaboradores, 1988). A dessorção por alteração do pH baseia-se na mudança da carga líquida da proteína que resulta da alteração do pH do meio, com a conseqüente perda da capacidade de interação com a resina por forças eletrostáticas.

A capacidade iônica da resina (número de cargas por unidade de volume) de um trocador de íons depende da concentração dos grupos funcionais, bem como do seu estado de ionização. Os trocadores de íons podem ser classificados como “fortes” ou “fracos”, dependendo da amplitude da faixa de pH com que mantêm sua carga iônica característica. O estado de ionização de grupos considerados “fracos” tende a variar significativamente em uma faixa estreita de valores de pH, ampliando ou reduzindo significativamente a capacidade de adsorção da resina.

2.5.4. Análise da Adsorção de Proteínas: Isotermas de Adsorção

A análise da adsorção de proteínas baseia-se no estudo do equilíbrio entre as fases envolvidas, usualmente estudado na forma de isotermas de adsorção. No caso de adsorções em bateladas (frascos agitados), o contato entre as fases é realizado de modo que se tenha um estágio de equilíbrio. O equilíbrio é alcançado quando não existem mais variações significativas de concentração nas fases líquida e sólida. A isoterma de adsorção pode ser construída plotando-se, na abscissa, valores de concentração de soluto ou adsorvato em equilíbrio na solução e, na ordenada, valores de concentração de soluto em equilíbrio na superfície do adsorvente.

No estudo do equilíbrio para a adsorção de um componente, o modelo matemático mais difundido, inclusive para correlacionar dados de adsorção de proteínas, é a isoterma de Langmuir (Langmuir, 1916), que pode ser escrita na forma:

$$q^* = \frac{q_m \cdot c^*}{K_d + c^*} \quad \text{Equação 1}$$

e pode assumir a forma linearizada (semi-recíproca):

$$\frac{c^*}{q^*} = \frac{1}{q_m} \cdot c^* + \frac{K_d}{q_m} \quad \text{Equação 2}$$

onde c^* é a concentração de soluto na fase líquida em equilíbrio com a fase sólida, q^* é a quantidade de soluto adsorvido no equilíbrio por unidade de massa ou volume de adsorvente, q_m é a capacidade máxima do adsorvente em adsorver o soluto expressa em massa de soluto por unidade de massa ou volume de adsorvente e K_d é a constante de dissociação efetiva que descreve o equilíbrio da reação de adsorção (em unidade de concentração).

O modelo de Langmuir se baseia em algumas hipóteses, a saber: a adsorção limita-se a uma camada (monocamada); as moléculas envolvidas não interagem entre si; a superfície interna do adsorvente é homogênea e apresenta um número de sítios finito; e no caso de adsorção competitiva de compostos diversos, a entalpia de adsorção é a mesma para todas as espécies.

No caso de adsorção em colunas, a construção de isotermas pode ser realizada com o auxílio de curvas de ruptura (curvas de "breakthrough"). Estas curvas são obtidas quando, em colunas, o fluido contendo o soluto a ser adsorvido escoar ao longo de seu interior. Inicialmente, a quase totalidade do soluto é adsorvida, de modo que a concentração de soluto na solução que deixa a coluna é praticamente nula. Esta situação persiste até que a saturação do adsorvente seja atingida, quando a concentração de soluto na solução que deixa a coluna aumenta bruscamente até atingir o valor da solução de alimentação. A capacidade da coluna é obtida calculando-se a massa de soluto adsorvida (até que a saturação seja atingida) por volume de adsorvente empacotado. Uma isoterma pode ser construída plotando-se os valores de concentração inicial e capacidade da coluna, obtidos em várias curvas de ruptura.

2.6. Recuperação e Purificação de Proteínas de Plantas Transgênicas

Apenas um pequeno número de trabalhos voltados para a recuperação e purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas pode ser encontrado na literatura. Existem poucos exemplos onde a extração e purificação da proteína recombinante produzida em plantas foi quantificada. Geralmente, as proteínas recombinantes foram extraídas juntamente com outras proteínas presentes nos tecidos vegetais a fim de determinar o nível de acumulação 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 foram utilizadas. Além do controle da força iônica e do pH, extrações podem ser realizadas com o auxílio de detergentes e agentes redutores, e a degradação proteolítica tem sido contida com adições de inibidores como o fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) (Kusnadi e colaboradores, 1997).

Grande parte dos trabalhos envolvendo fracionamento e purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas foi desenvolvida apenas em escala de bancada utilizando métodos que não diferem muito daqueles tradicionalmente utilizados para isolamento de proteínas de plantas (Kusnadi e colaboradores, 1997). Até 1994, nenhum estudo havia sido realizado no sentido de isolar uma proteína recombinante proveniente de um cereal ou leguminosa produzido em larga escala. Muitos dos métodos de recuperação e purificação utilizados em laboratório não podem ser empregados em larga escala devido ao alto custo dos produtos químicos envolvidos, seu efeito prejudicial ao meio ambiente ou contaminação dos co-produtos viáveis de serem aproveitados para a indústria alimentícia ou de ração animal.

Austin e colaboradores (1994) estudaram a recuperação em larga escala de α -amilase produzida em alfafa transgênica, abordando os processos de colheita, extração do suco protéico, clarificação, concentração e estabilização do concentrado de proteína solúvel. Os equipamentos de maceração avaliados eram adaptáveis ao processamento de até 25 ton/h de alfafa. Neste estudo, avaliou-se também o efeito

de diferentes técnicas de maceração sobre o rendimento da recuperação das enzimas endógenas e na estabilidade das enzimas β -glicoronidase e peroxidase quando adicionadas ao extrato de folhas de alfafa. Estas enzimas não se mantiveram estáveis, perdendo 80 e 50% de suas atividades, respectivamente, enquanto que a α -amilase manteve plenamente sua atividade. As perdas de atividade enzimática foram atribuídas à degradação proteolítica ou interações das enzimas com compostos fenólicos. A purificação destas enzimas não foi reportada.

Kusnadi e colaboradores (1996) e Hood e colaboradores (1997) desenvolveram processos em bancada (voltados para larga escala) de recuperação e purificação de proteínas recombinantes produzidas em sementes de milho transgênico. As proteínas recombinantes estudadas foram a β -glicoronidase e a avidina. Em ambos os trabalhos, verificou-se que a maior parte da proteína recombinante foi acumulada preferencialmente no gérmen da semente (93 e 55% para a β -glicoronidase e avidina, respectivamente). O procedimento de extração utilizado nos trabalhos foi semelhante: moagem das sementes, extração das proteínas em tampão, centrifugação e filtração da solução de extração. Kusnadi e colaboradores (1996) mostraram que a utilização de uma etapa de extração com solvente (hexano) para a retirada do óleo da semente não afetou significativamente o rendimento de extração e a atividade da enzima recombinante. A purificação final foi obtida através de cromatografias de troca iônica e fase reversa, no caso da β -glicoronidase, e cromatografia de afinidade, no caso da avidina.

O primeiro e único trabalho, até o momento, de transformação e purificação de aprotinina recombinante em plantas foi o de Zhong e colaboradores (1999), cuja semente de milho é a mesma utilizada em nosso trabalho. Naquele caso, a aprotinina recombinante foi extraída em tampão fosfato salino (PBS) 50 mM pH 8,5 e, após centrifugação e filtração do extrato, a purificação foi efetuada por uma seqüência de cromatografias: troca-iônica, afinidade em anticorpos imobilizados e, finalmente, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em resina de fase reversa. O intuito dos autores não foi o de estudar o processo de purificação, mas apenas obter a proteína recombinante em quantidades mínimas para sua

caracterização.

2.7. Recuperação e Purificação de Aprotinina

A literatura traz relatos de recuperação e purificação de aprotinina em escala de bancada por diversos métodos cromatográficos. No entanto, métodos de adsorção por afinidade são os mais utilizados, devido à sua especificidade e existência de ligantes de relativo baixo custo, além de propiciarem significativa concentração do produto. Os ligantes utilizados nestas separações são as enzimas inibidas pela aprotinina (serino-proteases), em especial, tripsina e quimotripsina.

Kassel (1970) e Fiorucci e colaboradores (1995) descrevem métodos de recuperação de aprotinina a partir de órgãos bovinos, pulmão e fígado, respectivamente. Ambos utilizaram adsorção por afinidade onde tripsina e quimotripsina foram os ligantes imobilizados. A extração de aprotinina iniciou-se com a cominuição dos órgãos congelados em solução tampão, seguido da clarificação dos extratos por centrifugação e precipitação das proteínas com ácido tricloroacético. As condições de adsorção reportadas nestes dois trabalhos são muito semelhantes: tampão tris a pH entre 7,8 e 8,5. A dessorção foi realizada com abaixamento de pH, sendo que Kassel (1970) eluiu a aprotinina com HCl-KCl 0,25 M, pH 1,7 a 2,0, enquanto Fiorucci e colaboradores (1995) utilizaram HCl 10 mM.

Um procedimento semelhante ao de Fiorucci e colaboradores (1995) foi utilizado por Barthel e Kula (1995) para a recuperação de aprotinina recombinante expressada em *Saccharomyces cerevisiae*. A matéria-prima utilizada foi o filtrado do meio de cultura contendo a aprotinina recombinante, sendo empregada, como primeira etapa de purificação, quimotripsina imobilizada em agarose. A etapa de purificação foi completada utilizando resina de troca iônica (S-Sepharose). A adsorção da aprotinina na resina trocadora de íons ocorreu a pH 3,5 (tampão citrato 30 mM), seguindo-se lavagens a pH 9,0 (tampão bicina-NaOH 20 mM) e novamente a pH 3,5. A dessorção ocorreu nesse mesmo pH, utilizando-se NaCl em um gradiente linear de 0 a 1 M.

Um estudo sistemático, através de planejamento experimental, das condições de adsorção e dessorção de aprotinina de alta pureza em resinas de afinidade

(tripsina e quimotripsina imobilizadas) foi reportado por Azzoni e Miranda (1999). Neste trabalho, aprotinina foi recuperada de um efluente do processamento industrial de insulina através de adsorção em coluna de agarose-tripsina. O efluente foi carregado na coluna diluído em tampão tris 50 mM pH 8,7 e contendo NaCl a 0,018 M. A segunda etapa de purificação foi feita utilizando adsorção em coluna de agarose-quimotripsina. Nesta etapa, a adsorção ocorreu em tampão tris 50 mM pH 8,0 contendo 0,582 M de NaCl.

Alguns autores utilizaram resinas trocadoras de íons para a recuperação e purificação de aprotinina recombinante expressada em leveduras. Norris e colaboradores (1990) utilizaram uma coluna de S-Sepharose como o primeiro estágio de recuperação e purificação de aprotinina recombinante excretada no meio de cultura por *S. cerevisiae*. Como diferença de procedimento com relação aos métodos utilizados por outros autores, todas as etapas da cromatografia ocorreram a pH elevado (tampão bicina-NaOH 20 mM, pH 8,7). A purificação até a homogeneidade foi obtida utilizando HPLC em coluna de fase reversa. Zurek e colaboradores (1996) utilizaram um procedimento semelhante para a recuperação de aprotinina expressada em outra espécie de levedura, *Hansenula polymorpha*.

Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo recuperação e purificação de aprotinina recombinante produzida em plantas transgênicas, além do trabalho apresentado por Zhong e colaboradores (1999), já discutido anteriormente.

2.8. Recuperação e Purificação de ITM

O inibidor de tripsina presente em sementes de milho (variedade opaco-2) foi primeiramente isolado por Swartz e colaboradores (1977). As proteínas foram extraídas a partir de sementes cominuídas (cujo óleo foi previamente removido com acetona) utilizando solução aquosa de NaCl a 0,2 M. Após uma série de centrifugações, ajustou-se o extrato aquoso para pH 8,2 e concentrações finais de tris de 0,05 M, NaCl de 1,0 M e CaCl₂ de 0,02 M. O inibidor foi recuperado da solução através de adsorção em tripsina imobilizada em gel de agarose. A dessorção foi realizada com solução de ácido acético a 1,0 M, contendo CaCl₂ a

0,02 M, e as frações contendo inibição foram combinadas, dialisadas e aplicadas em uma coluna de DEAE-celulose para purificação final. A quantificação do inibidor nas diversas etapas foi realizada através da diminuição da atividade de tripsina para a hidrólise do substrato sintético BApNA. Análises por eletroforese SDS-PAGE e composição de aminoácidos revelaram que parte do inibidor foi recuperado parcialmente hidrolisado (duas cadeias polipeptídicas unidas apenas por pontes de dissulfeto) devido à ação da tripsina no interior da coluna.

Buscando minimizar a perda do inibidor por hidrólise durante o processo de recuperação e purificação, Corfman e Reeck (1982) propuseram a utilização de imunoabsorção. O anticorpo específico contra o inibidor foi produzido em coelhos, purificado com o uso de uma coluna contendo o próprio inibidor (cromatografia de afinidade) e finalmente imobilizado em matriz de agarose. O extrato aquoso de sementes, obtido como descrito por Swartz e colaboradores (1977), foi aplicado na coluna contendo o imunoabsorvente. O inibidor pôde ser recuperado com alto grau de pureza e, em grande parte, na forma nativa. Contudo, parte do inibidor recuperado ainda possuía sinais de hidrólise, aparentemente devido à presença de proteases do milho ou produzidas por microrganismos contaminantes. A ausência completa de hidrólise do inibidor só foi atingida com a adição de outros inibidores de protease (PMSF e inibidor de tripsina de soja) ao extrato aquoso de sementes.

Outro processo desenvolvido visando a recuperação e purificação do inibidor em sua forma nativa foi o apresentado por Lei e Reeck (1986). O processo de extração e início da purificação foi o mesmo já apresentado por Swartz e colaboradores (1977), inclusive com a utilização de adsorção em coluna com tripsina imobilizada. Nessa etapa, o método de eluição da coluna foi modificado, sendo utilizado tampão glicina a 1,0 M e pH 2,1. Constatou-se que a brusca diminuição do pH no interior da coluna favorecia a dissociação do complexo inibidor-tripsina com o inibidor sendo recuperado, principalmente, em sua forma nativa. A purificação final foi obtida com a utilização de HPLC de fase reversa.

Se as etapas de purificação foram sendo modificadas ao longo do tempo, a etapa inicial de extração do inibidor presente nas sementes pouco variou, sendo

utilizado, basicamente, o método apresentado por Swartz e colaboradores (1977). Mais recentemente alguns autores desenvolveram modificações no processo de extração, sendo a principal a utilização de uma etapa a alta temperatura. Chen e colaboradores (1992) extraíram as proteínas do milho cominuído utilizando solução de NaCl 0,15 M e aquecimento a 60°C por 5 min. Ao sobrenadante resultante da centrifugação do extrato, foi adicionado sulfato de amônio até 20% de saturação, resultando na precipitação de proteínas. Tais proteínas foram dissolvidas em água e aplicadas em uma coluna de HPLC de fase reversa segundo o protocolo apresentado por Lei e Reeck (1986), resultando na purificação do inibidor. Outro processo diferenciado foi desenvolvido por Masoud e colaboradores (1996). Este autor realizou a extração do inibidor de milho expresso em folhas de tabaco utilizando tampão tris a 0,1 M pH 7,0, contendo NaCl a 0,15 M. Neste caso, o extrato foi aquecido até 65°C, resfriado a temperatura ambiente, centrifugado e as proteínas do sobrenadante foram precipitadas através de adição de sulfato de amônio até 95% de saturação. Não foi realizada purificação do inibidor recuperado.

2.9. Considerações Gerais

Neste capítulo foram apresentadas informações básicas importantes para a compreensão e elaboração deste trabalho. Informações relativas ao uso de plantas, e mais especificamente o milho, como biorreator foram coletadas na literatura. Especial atenção foi dada na busca de conhecimentos atualizados sobre a presença de proteínas e outras biomoléculas naturalmente encontradas em semente de milho, matéria-prima utilizada neste trabalho, e cujo conhecimento da estrutura e composição é de importância fundamental para o eficiente desenvolvimento de processos de RPB. Muitas informações que julgamos relevantes não foram encontradas na literatura, sendo então selecionados alguns experimentos que foram desenvolvidos visando a elucidação, tanto quanto possível, destes pontos, que são apresentados nos capítulos seguintes. Finalmente, foram também descritos alguns dos principais métodos de purificação cromatográfica de proteínas, métodos estes utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos os materiais e metodologias utilizados no desenvolvimento deste trabalho. A seção de metodologia foi subdividida em cinco tópicos, procurando-se agrupar as metodologias comuns referentes a cada capítulo de resultados. Os tópicos são: I) Métodos Analíticos, II) Estudos de Estabilidade e Localização da Aprotinina e ITM, III) Estudos de Extração, IV) Estudos de Adsorção em Tanques Agitados, e V) Estudos de Purificação Cromatográfica.

3.1. Materiais

O milho recombinante utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela ProdiGene, EUA, sendo o mesmo cuja transformação é descrita por Zhong e colaboradores (1999). Também foram realizados estudos utilizando sementes de milho não transgênico, em experimentos cuja utilização da semente transgênica não era de importância determinante. Neste caso, duas variedades de sementes foram utilizadas, sementes provenientes da variedade "maia-opaco", doadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas, e sementes da variedade "yellow dent", doada pela Iowa State University. Aprotinina, tripsina bovina tratada com tosil-fenil-cetona (TPCK), tripsina bovina tipo II e o reagente analítico benzoil-arginina-p-nitranilina (BApNA) foram adquiridas da Sigma, EUA. O inibidor de tripsina de milho (ITM) utilizado foi gentilmente doado pela Dra. Ann Kusnadi (Iowa State University, EUA) ou purificado em nosso laboratório segundo a metodologia descrita neste trabalho. As resinas Sepharose Fast Flow e SP-Sepharose Fast Flow (resina trocadora de cátions) foram adquiridas da Amersham-Pharmacia, EUA. Os estudos de adsorção IMAC foram

conduzidos utilizando-se a resina de agarose-IDA (His•Bind) adquirida da Novagen, EUA. As colunas cromatográficas, modelos XK 16 (16 x 200 mm) e XK 26 (26 x 200 mm), bem como o sistema cromatográfico AKTA Explorer, foram adquiridos da Amersham-Pharmacia, EUA. Qualquer outro reagente utilizado no desenvolvimento dos experimentos apresentava, no mínimo, grau analítico.

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos Analíticos

Determinação de inibidores: As análises de determinação de inibição de tripsina foram realizadas segundo o método de ensaio enzimático para determinação de aprotinina apresentado pela Sigma, EUA, e baseado no trabalho de Kassel (1970). Os ensaios foram realizados a 25°C utilizando um espectrofotômetro U 2000 da Beckman, EUA, cujo sistema de cubetas tinha sua temperatura mantida constante através de circulação de água proveniente de um banho termostatizado. Em uma cubeta de polipropileno de 1 mL, adicionava-se 66,6 µL de solução de tripsina 120 µg/mL em solução HCl 0,001N, 66,6 µL de amostra em tampão Trietanolamina-HCl 0,2 M a pH 7,8 contendo inibidor e 533 µL de tampão Trietanolamina-HCl 0,2 M a pH 7,8. Esta mistura era agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionava-se 333 µL de solução de BApNA 0,1% (m/v) em água deionizada e, após rápida homogeneização, a variação da absorbância a 405 nm com o tempo era registrada. O ensaio era também repetido sem a presença de inibidor. Uma unidade de inibição reduz em 50% a atividade de duas unidades de atividade de tripsina, onde uma unidade de tripsina é responsável pela hidrólise de 1,0 µmol de BApNA por minuto a pH 7,8 e 25 °C.

Determinação de proteína total: As análises de proteína total foram efetuadas segundo o protocolo do reagente "Pierce Coomassie Plus Protein Assay Kit" (Pierce, EUA), baseado no método de azul de coomassie apresentado por Bradford (1976). 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 em 595 nm. A metodologia utilizada possui sensibilidade para determinar concentrações de proteínas em amostras na faixa de 1 a 25 µg/mL, baseada na concentração de soluções padronizadas de albumina de soro bovino (BSA). A metodologia consistiu em misturar 0,5 mL de solução de azul de coomassie a 0,5 mL de solução de amostra ou tampão (solução de referência – branco) utilizando frascos Eppendorf. Agitou-se bem as soluções e, após 10 min, realizou-se a leitura da absorbância das soluções a 595 nm.

Determinação de aprotinina por ELISA: ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) “tipo sanduíche” para a determinação de aprotinina foi realizado segundo o método descrito por Zhong e colaboradores (1999). O ensaio foi realizado com o uso de microplacas tipo “ELISA” de 96 poços, que foram primeiramente recobertas por 12 horas a 4°C com o anticorpo anti-aprotinina (anticorpo primário) purificado do soro de sangue de coelho. A etapa de captura da aprotinina (antígeno) foi feita a 4°C por 12 horas e a detecção realizada por 1 hora a 37°C utilizando-se anticorpo de cabra biotilado (“biotinilated”) contra a aprotinina. A visualização do imuno-complexo foi feita com o uso da enzima fosfatase alcalina conjugada com streptoavidina. A absorbância final a 405 nm dos poços da placa foi realizada em um leitor de microplacas Modelo SpectraMax 250, EUA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a concentração final de aprotinina de cada amostra foi calculada a partir da média das três replicatas. É importante salientar que o ensaio não apresentou interferência pela presença de ITM nas amostras analisadas.

Determinação de açúcares redutores e açúcares redutores totais: As análises de determinação de açúcares redutores (AR) foram realizadas segundo o método de Miller (1959). O método possui a sensibilidade de detectar entre 0,1 e 1,0 mg/mL de açúcares redutores presentes em amostras, quantificados segundo uma curva padrão de glicose. Consistiu em adicionar 0,5 mL de amostra (diluída convenientemente utilizando água) a 0,5 mL de solução do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS), levando a solução ao banho com água em ebulição por 5

minutos. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 8,0 mL de solução de tartarato de sódio e potássio a 54 mM. A absorbância final da solução a 540 nm foi, então, medida.

A quantificação de açúcares redutores totais foi realizada diluindo-se 2,0 mL da amostra de extrato a ser quantificada em 2,0 mL de solução HCl 2 N. A solução foi mantida em banho com água em ebulição por 5 minutos e, após resfriamento em banho de gelo, 2,0 mL de solução de NaOH 2,0 N foram adicionados. O teor de açúcares redutores da amostra foi então determinado seguindo o método já descrito acima. Uma curva de calibração para este método foi construída utilizando-se sacarose como padrão.

Determinação de taninos e outros polifenóis: A determinação de polifenóis foi realizada segundo o método azul da prússia descrito por Price e Butler (1977). A 200 μ L de amostra (diluída na proporção adequada) foram adicionados 1,4 mL de água deionizada, 80 μ L de solução de FeCl_3 0,1 M (preparada em solução HCl 0,1 N) e, finalmente, 80 μ L de solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,1 M. Após 10 minutos da adição desta última solução, foi efetuada a leitura da absorbância da amostra a 720 nm. A quantificação de polifenóis foi efetuada tomando-se por base uma curva de calibração utilizando D-catequina como composto padrão (massa molecular de 290,3 kDa).

Determinação do conteúdo de óleo na farinha de milho: A quantificação da concentração de óleo da farinha de milho, submetida ou não à extração aquosa anterior ao experimento, foi realizada por extração com hexano em aparelho do tipo Soxhlet (Determinador de lipídeos Q-308G22, Químis, Brasil). O procedimento utilizado consistiu em pesar 5,0 g da farinha de milho, envolver o material 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 35 minutos. Decorrido o tempo de gotejamento, o cilindro foi levantado, e o gotejamento permaneceu por mais 15 minutos para a lavagem.

Depois da recuperação do solvente, o copo de fervura contendo o óleo foi levado para a secagem em placa aquecedora a 70°C durante 20 minutos. Após o resfriamento, o copo de fervura, previamente tarado, foi pesado e o conteúdo de óleo determinado.

Eletroforese SDS-PAGE: Foram utilizados géis comerciais tris/HCl e tris/tricina (Ready-Gels, Bio-Rad, EUA) com concentrações de acrilamida na forma de gradiente de 4 – 20% (gel tris/HCl) e de 10 – 20% (gel tris/tricina). Os ensaios foram realizados segundo a metodologia descrita por Zhong e colaboradores (1999), a voltagem constante de 150 V para o gel tris/HCl e 125 V para o gel tris/tricina. A coloração dos géis foi realizada utilizando-se soluções pré-preparadas Gelcode da Pierce, EUA.

3.2.2. Estudos de Estabilidade e Localização da Aprotinina e do ITM

Estudo da estabilidade térmica da aprotinina pura em solução tampão: Em frascos Eppendorf, soluções de 20 µg/mL de aprotinina em tampão tris 50 mM pH 8,0 contendo NaCl a 150 mM foram expostas a temperatura de 80 °C por tempos determinados e imediatamente resfriadas a 4 °C tendo, após isso, sua inibição determinada por ensaios de inibição de atividade de tripsina. Comparando-se as inibições iniciais e finais das soluções pode-se determinar a perda relativa a desnaturação térmica sofrida pela aprotinina.

Estudo da estabilidade térmica do inibidor de tripsina do milho (ITM) em extrato aquoso de semente de milho: Em um béquer de 100 mL, 10 g de sementes de milho transgênico cominuída não desengordurada (tamanho de partícula menor que 0,5 mm) foram adicionadas a 100 mL de água deionizada cujo pH foi previamente ajustado para 8,0. Após a adição do milho, a suspensão foi imediatamente agitada com a utilização de barra magnética e o pH foi continuamente monitorado e mantido em 8,0 através de pequenas adições de solução NaOH 1,0 M. Após 30 minutos de agitação, a suspensão foi filtrada

utilizando-se quatro camadas de pano de filtragem ("Cheesecloth"). Finalmente, o filtrado foi centrifugado a 14500 x g (11000 rpm) por 20 min a 6°C em uma centrífuga modelo RC 5B PLUS da Sorvall, EUA. Aliquotas de 1,0 mL de solução de extração (proveniente de semente transgênica e contendo inibidor de tripsina de milho) foram transferidas para diversos frascos Eppendorf e foram expostas à temperatura de 80°C por tempos determinados, sendo imediatamente resfriadas a 4°C tendo, após isso, sua inibição determinada por ensaios de inibição de atividade de tripsina. Comparando-se as inibições iniciais e finais das soluções, pôde-se determinar a perda relativa à desnaturação térmica sofrida pelos inibidores presentes na solução.

Estudo da solubilidade e estabilidade da aprotinina em contato com solvente orgânico: Soluções de aprotinina a uma concentração de 40 µg/ml foram preparadas utilizando-se três diferentes soluções tampão a diferentes valores de pH: acetato 50 mM a pH 5,0; trietanolamina-HCl 50 mM a pH 7,0 e tris 50 mM a pH 9,0. Em tubos para centrífuga com 30 mL de volume, pipetou-se 5,0 mL de soluções de aprotinina nos diferentes tampões e 10,0 mL de hexano. Os tubos foram colocados sob agitação circular vertical (10 rpm) por 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 6000 rpm por 15 min em uma centrífuga Hitachi modelo CF 15 D, Japão. Após a centrifugação, parte das soluções de aprotinina (fase aquosa) foi retirada dos tubos com o auxílio de pipetas automáticas e armazenadas em frascos Eppendorf a 4°C. As soluções foram analisadas quanto à concentração total de proteínas e poder de inibição, sendo comparadas com as respectivas soluções de aprotinina nos diferentes tampões que não foram expostas ao solvente orgânico.

Estudo da localização da aprotinina recombinante na semente de milho: Sementes de milho recombinante foram fracionadas a seco ("dry-milling process") nas dependências da empresa Cresco Inc. (Iowa, EUA). Pequenas porções destas frações ricas em gérmen ou endosperma foram moídas utilizando-se um moedor de café portátil até um tamanho de partícula menor que 1,7 mm. Em tubos de

polipropileno de 1,2 mL, 100 mg das amostras foram suspensas em 500 μ L de tampão PBS a pH 7,0, contendo 0,05% de Tween-20. Uma pequena bola de aço de 0,4 cm de diâmetro (5/32 polegadas) foi adicionada em cada tubo para auxiliar a homogeneização da amostra, sendo então realizada a agitação por 20 segundos em um sistema Bohdan (agitação circular e vertical rápida a aproximadamente 600 rpm). Os tubos foram então centrifugados a 12000 x g e 4°C por 10 minutos em uma centrífuga Beckman (EUA) modelo 5417R (rotor F3602). Após a coleta do sobrenadante, a concentração de aprotinina em solução foi determinada. O mesmo protocolo foi seguido utilizando farinha de semente não fracionada como controle.

Estudo da localização do ITM na semente de milho: Cento e cinquenta gramas de sementes de milho não recombinante (variedade “yellow dent”) foram manualmente descascadas e tiveram o embrião separado, tomando-se cuidado para que todo resquício de endosperma fosse retirado do embrião. Amostras de semente, casca, endosperma e gérmen foram posteriormente secas em estufa (6 horas a 130°C) e tiveram suas massas determinadas visando o cálculo do teor de umidade. Em tubos de centrifuga, massas de aproximadamente 2,3 g dos componentes da semente foram suspensas em solução NaCl 0,2 M (razão 1:5 m/v) e homogeneizadas com auxílio de aparelho homogeneizador (Hand-Held Homogenizer, Handishear, EUA). Após homogeneização, as suspensões foram centrifugadas a 9000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante das amostras foi retirado e analisado quanto à concentração de proteína total e capacidade de inibição de tripsina. Como controle, esse procedimento também foi repetido utilizando-se sementes inteiras.

3.2.3. Estudos de Extração

São apresentadas neste tópico as metodologias utilizadas nos estudos cuja finalidade última foi o estudo da etapa de extração da aprotinina recombinante e de impurezas, sejam elas proteínas ou não. Convém salientar que tópicos apresentados adiante também possuem metodologias de extração, mas cuja finalidade foi a realização de outros estudos, por exemplo, purificações

cromatográficas, onde a extração é apenas mais uma etapa do processo. Finalmente, pode ser observado que em todos os estudos de extração realizados, a proporção massa de semente por volume de solução de extração utilizada foi de 1:5, proporção esta determinada como a mais adequada em estudos preliminares realizados pela equipe do Prof. Dr. Zivko L. Nikolov, na Iowa State University (Anderson, 1999).

Estudo da cinética de extração de aprotinina, ITM e proteínas solúveis: O estudo de cinética de extração foi feito suspendendo-se 20 g de farinha de milho transgênico (partículas com diâmetro inferior a 1,7 mm) em 100 mL de tampão glicina 200 mM pH 3,0 em um béquer, sendo a suspensão agitada com o uso de barra magnética. Amostras com volume de 1,5 mL foram retiradas após 0,5, 1, 2, 5, 10, 30 e 60 minutos do início da extração. As amostras foram imediatamente colocadas em frascos Eppendorf e centrifugadas a 5500 x g por 30 segundos em uma centrífuga de microtubos marca Eppendorf, EUA, e, após a coleta da solução sobrenadante, esta foi novamente centrifugada a 9000 x g por mais 4 minutos para completar clarificação da amostra. Finalmente, os sobrenadantes foram estocados a 4 °C (por no máximo 24 horas) e analisados quanto à concentração de aprotinina, proteína total e inibição de tripsina.

Influência de pH e força iônica sobre a extração de aprotinina recombinante, proteínas solúveis e ITM: Massas de 5 g de farinha de milho transgênico com tamanho de partícula menor que 1,7 mm foram suspensas em 25 mL de tampão de extração ou 25 mL de solução de NaCl para os ensaios de influência de pH e força iônica, respectivamente. Segundo o pH requerido, os tampões utilizados foram: pH 3,0, glicina 200 mM; pH 4,0, acetato de sódio 200 mM; pH 6,0 e 8,0, fosfato de sódio 200 mM; e pH 10,0, carbonato de sódio 200 mM. As concentrações de NaCl utilizadas no estudo da influência da força iônica foram: 0, 50, 100, 200, e 300 mM em água deionizada. As suspensões foram agitadas com barra magnética em um béquer de 80 mL por 60 minutos a temperatura ambiente e, então, filtradas em papel de filtro Tipo 10. Amostras dos filtrados foram coletas em diversas alíquotas e

estocadas a temperatura de -10 °C para análise posterior. As amostras foram analisadas para a determinação de concentração de aprotinina recombinante, inibição de tripsina e concentração de proteínas solúveis. O pH e a condutividade iniciais e finais de todos os extratos foram monitorados. Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

Influência de pH e força iônica sobre a extração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART) e polifenóis: Massas de 20 g de farinha de milho transgênico com tamanho de partícula de menor que 1,7 mm foram suspensas em 100 mL de tampão de extração ou 100 mL de solução de NaCl para os ensaios de influência de pH e força iônica, respectivamente. Segundo o pH requerido, os tampões utilizados foram: pH 3,0, glicina 200 mM; pH 4,0, acetato de sódio 200 mM; pH 6,0 e 8,0, fosfato de sódio 200 mM; e pH 10,0, carbonato de sódio 200 mM. As concentrações de NaCl utilizadas no estudo da influência da força iônica foram: 0, 50, 100, 200, e 300 mM em água deionizada. As suspensões foram agitadas com barra magnética em um béquer de 250 mL por 60 minutos a temperatura ambiente e, então, centrifugadas a 9000 x g por 15 minutos. Amostras dos sobrenadantes foram coletas e estocadas a 4°C para análise. As amostras foram analisadas para a determinação da concentração de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART) e polifenóis. A condutividade e pH inicial e final de todos os extratos foram monitorados. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Influência do pH e força iônica da extração aquosa sobre a remoção de lipídeos da farinha de milho: Massas (5 g) de farinha de milho transgênico que sofreram extrações aquosas a diferentes pH e forças iônicas (ver procedimento descrito acima) foram secas a temperatura ambiente por 48 horas e tiveram seu conteúdo de óleo determinado segundo o procedimento já descrito na seção “**Métodos Analíticos**”. Como controle, utilizou-se farinha de milho transgênico que não sofreu processo de extração aquosa anterior à determinação do conteúdo de

óleo. Os experimentos foram realizados em duplicata para as farinhas que sofreram extração aquosa prévia e em quadruplicata para o controle.

Influência do tamanho de partícula sobre a extração da aprotinina: Sementes de milho recombinante foram moídas por um moinho de facas nas dependências da empresa Cresco Inc. (Iowa, EUA) até um tamanho de partícula menor que 1,7 mm. Parte desta farinha de milho foi novamente submetida à moagem em um moedor portátil de café modelo Mini-Mart Plus da Cuisinart, EUA, feita em 4 séries de 10 segundos de moagem. A distribuição de tamanho de partículas das farinhas foi realizada utilizando-se peneiras de aço para análise granulométrica da marca Granutest, Brasil. Foram utilizadas aberturas de 1,7 mm, 1,0 mm, 0,5 mm e 0,212 mm. Extrações de proteínas com tampão glicina 200 mM pH 3,0 foram realizadas com as farinhas contendo as duas diferentes distribuições de tamanho de partícula, segundo o protocolo já descrito utilizado no estudo da influência do pH e força iônica sobre a extração de aprotinina recombinante. Os extratos resultantes das extrações foram analisados quanto à concentração de aprotinina recombinante. As extrações foram realizadas em triplicata.

Estudo de extração de aprotinina em planta piloto: A extração de aprotinina em escala piloto foi realizada nas instalações do "Food Protein Research and Development Center" da Texas A & M University, College Station, Texas, EUA. Em um tanque de extração de 1000 L de capacidade, uma massa de 22,5 kg de milho cominuído foi suspensa em 113 L de água deionizada. A suspensão foi mantida sob agitação de 60 rpm e teve seu pH ajustado e mantido em 3,0 através da adição de solução 8,5% de H_3PO_4 (v/v). Após 30 minutos, a suspensão foi centrifugada a 3000 x g em uma centrífuga de decantação (Sharples, EUA), sendo então filtrada utilizando cartucho de filtração de 20 μ m (Osmonics, EUA). A clarificação final e remoção de proteínas de elevada massa molecular foi efetuada através de ultrafiltração em membrana de 10 kDa (Romicon, EUA). Finalmente, a solução filtrada foi concentrada (10x) através de nanofiltração em membrana de 200 Da

(Filmtec Corporation, EUA). Amostras coletadas nas várias etapas do processo foram posteriormente analisadas quanto à inibição de tripsina e concentração de aprotinina e proteína total.

3.2.4. Estudos de Adsorção em Tanques Agitados

Determinação das curvas de cinética de adsorção: Os dados de cinética de adsorção a 25°C de aprotinina e ITM em resina de agarose-tripsina e também para a adsorção de ITM em resina de agarose-IDA-Cu²⁺ foram feitos utilizando frascos Eppendorf de 1,5 mL como tanques agitados. A aprotinina de alta pureza utilizada foi comprada da Sigma, EUA, enquanto o ITM foi purificado por cromatografia de afinidade a partir de milho não transgênico segundo o protocolo apresentado por Swartz e colaboradores (1977). As resinas foram preparadas para os experimentos equilibrando-as no tampão de adsorção apropriado. A resina de agarose-tripsina foi equilibrada em tampão fosfato de sódio (NaPi) 50 mM pH 7,8. A resina agarose-IDA foi primeiramente saturada com ions Cu²⁺ lavando-a extensivamente com solução de sulfato de cobre 50 mM em um funil de vidro sinterizado. O metal não imobilizado foi retirado por lavagem com água deionizada e também com solução de imidazol 100 mM em tampão de adsorção (NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M). Finalmente, a resina foi equilibrada em tampão de adsorção.

Em frascos Eppendorf de 1,5 mL, 10 mg de resina (agarose-tripsina ou agarose-IDA-Cu²⁺) foram suspensas em 1,0 mL de soluções de aprotinina ou ITM a diferentes concentrações iniciais. As concentrações iniciais das soluções de aprotinina e ITM utilizadas nos experimentos de adsorção em resina de agarose-tripsina foram: 16,0 e 16,5 µg/mL de aprotinina e ITM, respectivamente, em tampão NaPi 50 mM pH 7,8. No experimento de adsorção de ITM em resina agarose-IDA-Cu²⁺, a concentração inicial do inibidor foi de 130 µg/mL em tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M. Os frascos contendo as suspensões foram agitados em agitador rotativo a 25°C e, em intervalos de tempo definidos, um frasco era retirado da agitação, era então centrifugado a 6500 x g por 3 minutos e a concentração de proteína no sobrenadante era determinada.

O mesmo procedimento foi ainda seguido para a determinação da cinética de adsorção de aprotinina na resina de troca iônica SP Sepharose Fast Flow. Nesse caso, massas de 5,0 mg de resina foram suspensas em 1,0 mL de solução de aprotinina com concentração de 0,8 mg/mL em tampão tris 20 mM pH 8,5. Em períodos de tempo determinados (4, 12, 30, 60, 105 e 180 minutos), um dos frascos foi retirado e centrifugado, tendo a concentração de aprotinina no sobrenadante determinada por absorvância em 280 nm e através do método de azul de coomassie.

Determinação das isotermas de adsorção: As isotermas para a adsorção a 25°C de aprotinina e ITM em resina de agarose-tripsina e também para a adsorção de ITM em resina de agarose-IDA-Cu²⁺ foram feitos utilizando frascos Eppendorf de 1,5 mL como tanques agitados. As resinas foram preparadas para os experimentos equilibrando-as no tampão de adsorção apropriado. As resinas de agarose-tripsina e agarose-IDA foram preparadas da mesma forma como descritas anteriormente para os experimentos de determinação das cinéticas de adsorção.

Em frascos Eppendorf de 1,5 mL, 10 mg de resina (agarose-tripsina ou agarose-IDA-Cu²⁺) foram suspensas em 1,0 mL de soluções de aprotinina ou ITM a diferentes concentrações iniciais, preparadas em tampão NaPi 50 mM pH 7,8 (agarose-tripsina) ou tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M (agarose-IDA-Cu²⁺). Os frascos foram agitados em agitador rotativo a 25°C por 3,0 h (agarose-tripsina) ou 3,5 h (agarose-IDA-Cu²⁺), período longo o suficiente para garantir que a condição de equilíbrio fosse atingida. Os frascos foram então centrifugados a 6500 x g por 10 minutos e as concentrações de proteína em equilíbrio no sobrenadante foram determinadas.

Os experimentos de adsorção de aprotinina na presença de ITM foram desenvolvidos de forma semelhante aos anteriores. Massas de 10 mg de resina de agarose-tripsina foram suspensas em soluções de aprotinina-ITM (a diferentes concentrações iniciais) sempre preparadas de forma a manterem a proporção 1:1 em termos de concentração mássica (ou uma proporção de 1,9:1,0 em termos de

concentração molar). Após o tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido, as concentrações de equilíbrio de aprotinina e ITM nos sobrenadantes foram determinadas. As concentrações de aprotinina foram determinadas por ELISA, enquanto as concentrações de ITM foram determinadas pela diferença entre as concentrações de aprotinina e proteína total (determinada pelo método de azul de coomassie).

Procedimento muito semelhante foi adotado para a determinação das isotermas de adsorção de aprotinina e ITM em resina trocadora de íons. Em frascos Eppendorf, massas de 5,0 mg de resina SP Sepharose Fast Flow foram suspensas em 1,0 mL de solução de aprotinina ou ITM (a diferentes concentrações iniciais) em tampão tris 20 mM ou fosfato de sódio 30 mM em valores de pH 7,5 ou 8,5. Os frascos foram agitados durante duas horas, a uma temperatura de 25°C. Após este tempo previamente definido como suficiente para se alcançar o equilíbrio da adsorção, as soluções foram centrifugadas e a concentração de proteína restante no sobrenadante foi quantificada através de absorbância em 280 nm e do método de azul de coomassie.

Em todos os casos, as isotermas de adsorção foram construídas plotando-se as concentrações calculadas de aprotinina ou ITM em equilíbrio nas fases líquida *versus* a concentração de aprotinina ou ITM em equilíbrio na fase sólida.

3.2.5. Estudos de Purificação Cromatográfica

Extração e purificação do inibidor de tripsina de milho (ITM): Em um béquer de 500 mL, foi preparada uma suspensão de 80 g de farinha de milho não-transgênico desengordurada e 400 mL de água deionizada. A suspensão foi agitada por 30 minutos, tendo o seu pH mantido em 7,8 com a adição de algumas gotas de solução NaOH 1,0 M. Em seguida, a solução foi centrifugada e filtrada. A centrifugação foi efetuada a 7000 x g por 15 minutos a 4°C. Tomou-se o cuidado de evitar a retirada da camada superior do sobrenadante, por conter resquícios de óleo. O sobrenadante foi finalmente filtrado a vácuo utilizando-se dois diferentes filtros de éster de celulose (Millipore, EUA) com diâmetros de poro de 1,2 e 0,45 µm,

respectivamente. O filtrado foi purificado através de cromatografia líquida em coluna de afinidade. Primeiramente, a coluna foi empacotada com 12 mL de gel de agarose contendo tripsina imobilizada. A coluna foi então equilibrada utilizando-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 (8 volumes de coluna). Em seguida, foram injetados 130 mL de extrato de milho na coluna. A lavagem que seguiu foi realizada com o uso de tampão fosfato 50 mM contendo NaCl 0,6 M a pH 7,8, sendo coletadas 16 amostras de 9,0 mL cada uma. A eluição foi realizada com 96 mL de tampão KCl-HCl 50 mM pH 2,0. A vazão utilizada em todas as etapas foi de 1,5 mL/min. As amostras coletadas (9,0 mL) foram analisadas através de medida de absorbância em 280 nm e ensaio de inibição de tripsina.

Extração de proteínas da semente de milho recombinante visando ensaios cromatográficos: Em um béquer de 2,0 L, 200 g de sementes de milho transgênico cominuído (tamanho de partícula menor que 0,85 mm) foram adicionados a 1,0 L de água deionizada. Após a adição do milho cominuído, a suspensão foi imediatamente agitada com a utilização de barra magnética e o pH foi continuamente monitorado e mantido em 3,0 através de pequenas adições de solução HCl 1,0 M. Após 30 minutos de agitação, a suspensão foi filtrada em funil de Buchner utilizando papel de filtro tipo NA600KP da FPI, EUA. O pH da solução filtrada foi ajustado para 7,8 ou 8,5, dependendo do tipo de cromatografia utilizada como primeira etapa de purificação, afinidade ou troca-iônica, respectivamente. O ajuste de pH foi feito através da adição de solução NaOH 1,0 M. A solução foi estocada em repouso a 4°C por 16 horas, sendo então filtrada para a remoção de material precipitado durante a etapa de ajuste do pH. Para os estudos de recuperação da aprotinina utilizando resina de troca-iônica como primeira etapa, esta solução foi posteriormente diluída na proporção de 25:1 em tampão tris 0,5 M pH 8,5. Isto foi feito de forma a ter-se uma concentração final de tampão tris na amostra injetada de 20 mM, evitando-se, assim, variações de pH durante a etapa de adsorção.

Cromatografia de afinidade: Dez mililitros de resina de afinidade tripsina-Sepharose Fast Flow foram empacotados em uma coluna XK 16 (16 x 200 mm). O procedimento de imobilização da tripsina tratada com TPCK foi o recomendado pelo fabricante da resina. Anteriormente a etapa de adsorção, a coluna foi equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 7,8 contendo 0,25 M de NaCl. Um volume de 775 mL de solução proveniente da extração de proteínas do milho foi adicionado a coluna. A etapa de lavagem foi realizada com a utilização de tampão fosfato 50 mM pH 7,8 contendo 0,6 M de NaCl. Finalmente, eluíu-se as proteínas adsorvidas utilizando-se tampão KCl/HCl 50 mM pH 2,0. As frações coletas na etapa de dessorção tiveram seu volume imediatamente diluído em 25% através da adição de tampão fosfato 200 mM pH 7,6 contendo 2,0 M NaCl com o objetivo de prepará-las para a etapa posterior de adsorção em coluna IMAC. Estas amostras foram posteriormente analisadas quanto à concentração de proteínas e inibição.

Cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC): Os estudos iniciais utilizando-se aprotinina comercial e CTI em uma mistura foram realizados utilizando-se uma coluna POROS MC 220 (4,6 x 100 mm) da Poros Inc., EUA, com 1,7 mL de volume de leito (resina de poli-estireno-divinil-benzeno contendo grupos funcionais imidodiacetato). O metal utilizado foi cobre e o tampão de adsorção utilizado foi fosfato 50 mM pH 7,0 contendo 0,5 M NaCl e 0,5 mM de imidazol. A eluição das proteínas adsorvidas foi efetuada utilizando-se gradiente de imidazol no tampão de adsorção (0,5 a 100 mM em 10 volumes de coluna). Nos estudos com aprotinina recombinante, utilizou-se uma coluna XK 16 da Amersham-Pharmacia, EUA, empacotada com 13 mL de resina agarose-IDA. A imobilização do íon metálico foi feita carregando-se a coluna com solução 50 mM de sulfato de cobre. O metal não imobilizado foi retirado por lavagem com água deionizada e também com solução de imidazol 100 mM em tampão de adsorção (NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M). A amostra de injeção, composta das frações de eluição #20 a #26 da eluição da coluna de agarose-tripsina, foi injetada por meio de um Superloop de 50 mL. A lavagem das proteínas não adsorvidas foi feita com o próprio tampão de adsorção. A

eluição foi efetuada utilizando-se gradiente de imidazol (0 a 100 mM) no tampão de adsorção. Na regeneração da coluna, utilizou-se solução de EDTA 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 1,0 M. Frações de 8,0 mL foram coletadas nas etapas de injeção e lavagem de proteínas não adsorvidas, enquanto que frações de 9,0 mL foram coletadas nas etapas de eluição e regeneração da coluna. A vazão na etapa de injeção e lavagem foi de 1,0 mL/min. Em todas as demais etapas, utilizou-se a vazão de 2,0 mL/min. As frações coletadas foram analisadas quanto à inibição de tripsina e concentração total de proteínas e aprotinina.

Os estudos de adsorção das proteínas do extrato de milho não recombinante (IMAC como primeira etapa) foram realizados utilizando-se a resina agarose-IDA empacotada em uma coluna C 10/10 da Amersham-Pharmacia, EUA, com volume de leito de 3,2 mL. A coluna foi carregada com íons metálicos pela adição de 10 volumes de coluna (VC) de solução de sulfato de cobre 50 mM. A coluna foi então lavada extensivamente com água deionizada, seguido de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,1 M. Finalmente, a coluna foi equilibrada para a injeção da amostra utilizando o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo 0,5 M NaCl (tampão de adsorção). Após a injeção da amostra (30 mL de extrato de milho não transgênico cuja extração foi realizada a pH 3,0), foi efetuada a lavagem das proteínas não adsorvidas utilizando-se tampão de adsorção (18 VC). Em uma das cromatografias, a eluição foi realizada utilizando-se 100 mM de imidazol no tampão de adsorção. Em uma segunda cromatografia, a eluição das proteínas adsorvidas foi efetuada utilizando-se três diferentes concentrações de imidazol no tampão de adsorção: 10, 30 e 100 mM. A coluna foi regenerada com solução de EDTA 50 mM pH 8,0 contendo 1,0 M de NaCl. Frações com volume de 6,0 mL foram coletadas durante as etapas de injeção e lavagem, sendo que nas etapas de eluição e regeneração foram coletadas frações de 4,0 mL. Todas as frações foram analisadas quanto à inibição de tripsina e concentração total de proteínas.

Cromatografia de troca iônica: Utilizou-se para os estudos de purificação da aprotinina recombinante e sua separação do ITM a resina SP Sepharose Fast Flow

em uma coluna pré-empacotada HiTrap de 1,0 mL da Amersham-Pharmacia, EUA. Anteriormente a etapa de adsorção, a coluna foi equilibrada com tampão tris 20 mM pH 8,5 (tampão de adsorção). Frações de eluição (#20 a #30) coletadas na etapa de cromatografia de afinidade foram diluídas na proporção de 25:1 em tampão tris 0,5 M pH 8,5 de modo que a concentração final de tampão fosse de 20 mM. As frações foram combinadas e tiveram o pH ajustado para 8,5 utilizando-se solução NaOH 1,0 M. Aplicou-se um volume de amostra de 52 mL na coluna e a etapa de lavagem foi realizada utilizando-se tampão de adsorção. Finalmente, a dessorção das proteínas foi feita utilizando-se um gradiente de cloreto de sódio de 0 a 1,5 M neste mesmo tampão. Utilizou-se a vazão de 1,0 mL/min em todas as etapas do experimento. Os volumes de solução coletados durante as etapas de injeção e lavagem não foram coletados na forma de frações, mas foram analisados separadamente, juntamente com as frações coletadas durante a etapa de eluição (1,5 mL cada). Estas frações foram analisadas quanto à concentração de aprotinina, proteína total e inibição de tripsina.

No caso do uso da cromatografia de troca-iônica como primeira etapa de recuperação da aprotinina recombinante presente no extrato da semente do milho (ver preparação do extrato no item anterior), utilizou-se uma coluna de SP Sepharose (HiTrap) contendo 5,0 mL de volume de resina. O extrato da semente de milho foi concentrado 7,6 vezes (de 1200 para 157 mL) através do uso de ultrafiltração em membrana de 1 kDa (cartucho de ultrafiltração Prep/Scale de 0,09 m² de membrana da Millipore, EUA). Os procedimentos de lavagem e eluição utilizados foram os mesmos reportados acima utilizando a troca-iônica como segunda etapa de purificação. Utilizou-se a vazão de 5,0 mL/min em todas as etapas do experimento. Frações de 20 e 10 mL foram coletadas durante as etapas de injeção e lavagem, respectivamente, enquanto que frações de 3,0 mL foram coletadas na etapa de eluição. Todas as frações foram analisadas quanto à concentração de aprotinina, proteína total e inibição de tripsina.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES I

ESTUDOS DE ESTABILIDADE E LOCALIZAÇÃO DA APROTININA E ITM

No presente capítulo são apresentados estudos de estabilidade da aprotinina e do inibidor de tripsina do milho (ITM) a altas temperaturas e também de estabilidade da aprotinina quando em contato com solvente orgânico. São apresentados ainda resultados de estudos de determinação da localização da aprotinina recombinante e ITM nos tecidos de sementes de milho. Pode ser notado, em todo o trabalho, que muitos estudos desenvolvidos com a aprotinina também o são com o ITM. Essa preocupação de levantar conhecimentos, não apenas da molécula alvo (aprotinina), mas também do ITM, deve-se ao fato deste inibidor do milho ser um “competidor” natural no processo de recuperação e purificação da aprotinina recombinante, sendo separado juntamente com a aprotinina em diversas etapas de purificação. Isso se deve, principalmente, ao fato do ITM ser um inibidor de proteases, característica que o torna também, um possível co-produto de interesse a ser explorado em uma eventual produção comercial da aprotinina recombinante.

4.1. Estudos de Estabilidade da Aprotinina e ITM

4.1.1. Estabilidade da Aprotinina e ITM a Altas Temperaturas

A literatura aponta a aprotinina como uma molécula bastante resistente a altas temperaturas e valores extremos de pH, devido à sua estrutura tridimensional compacta estabilizada por três pontes de dissulfeto. Por este motivo, foi estudada a possibilidade de utilização de tratamento térmico do extrato de milho transgênico

visando à desnaturação de impurezas protéicas. Buscou-se avaliar a possibilidade de utilização da desnaturação térmica como forma de eliminação parcial destas impurezas ou até mesmo de efetuar a separação entre a aprotinina recombinante e o inibidor de tripsina de milho (ITM).

Como não foi possível encontrar na literatura dados de estabilidade da aprotinina a altas temperaturas, experimentos foram realizados nesse sentido (Figura 4.1). Os resultados destes experimentos confirmaram a grande estabilidade da molécula. Aproximadamente 91% da aprotinina presente em solução manteve sua capacidade de inibição quando submetida a 110 minutos de exposição a 80°C, reduzindo-se para 74% quando o tempo de exposição foi de 8 horas. Já a Figura 4.2 apresenta a inibição relativa ao longo do tempo presente na solução resultante da extração das proteínas do milho transgênico, quando submetida à temperatura de 80°C. Constatou-se que a capacidade de inibição de tripsina no extrato (basicamente devido ao ITM, como comprovado mais a frente através da determinação da concentração de aprotinina por ELISA) é bastante estável a esta temperatura, com perda próxima de apenas 23% após 5,0 horas de exposição. Contudo, esta perda ocorreu quase que completamente nos primeiros 30 minutos de exposição, mantendo-se então praticamente constante ao longo do período estudado. Isto pode não significar que parte do inibidor presente tenha sido desnaturado, mas que houve degradação ou solubilização de algum componente da solução que pode vir a causar pequena interferência no ensaio de inibição de tripsina. É provável que a elevada estabilidade térmica do inibidor de tripsina do milho se deva à presença das cinco pontes dissulfeto de sua estrutura terciária, número alto, considerando-se a pequena massa molecular do inibidor (14,0 kDa).

Estes resultados indicam como inviável a utilização de desnaturação térmica como forma de separação entre aprotinina e ITM uma vez que ambos os inibidores são bastante estáveis em alta temperatura.

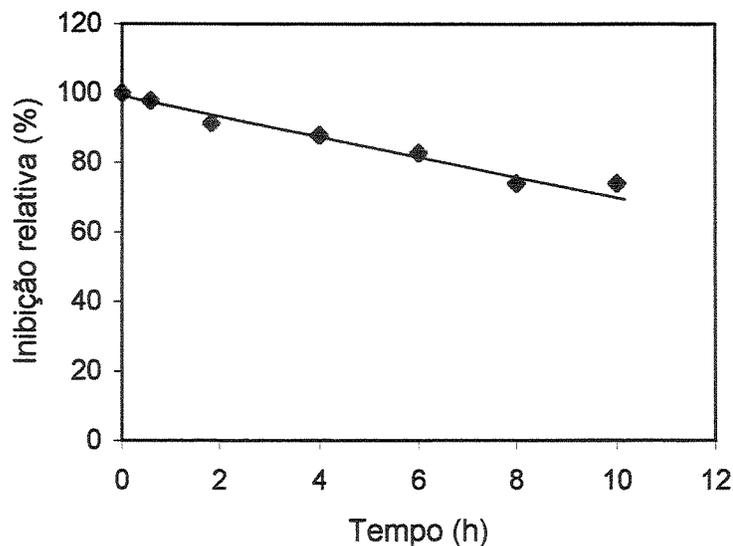


Figura 4.1 – Estabilidade ao longo do tempo da aprotinina em solução a 80°C. Inibição relativa refere-se a porcentagem de inibição de tripsina remanescente na solução de aprotinina exposta a alta temperatura, quando comparada a inibição da solução não exposta a alta temperatura. Concentração de aprotinina de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão tris 50 mM contendo NaCl a 150 mM. A amplitude entre duplicatas não foi superior a 7% do valor médio.

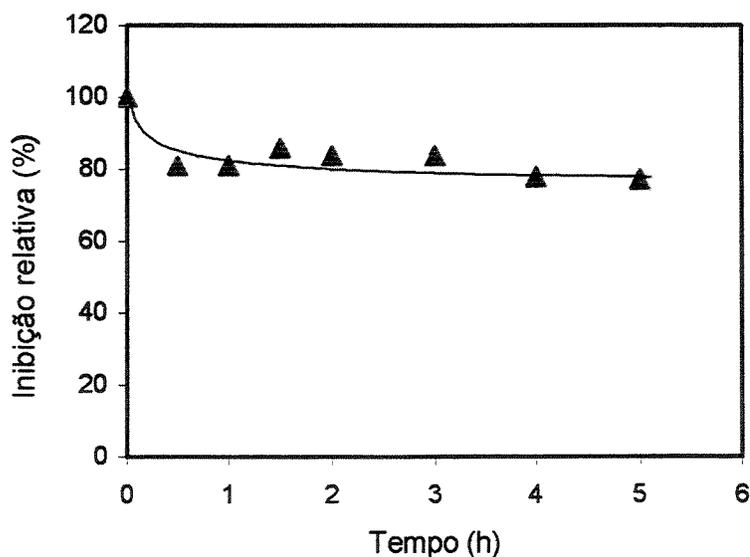


Figura 4.2 – Estabilidade ao longo do tempo do ITM em solução a 80°C. Inibição relativa refere-se a porcentagem de inibição de tripsina remanescente na solução de extração a pH 8,0 (milho transgênico) exposta a alta temperatura, quando comparada a inibição da solução não exposta a alta temperatura. A amplitude entre duplicatas não foi superior a 10% do valor médio.

O fato de neste estudo ter sido utilizado milho transgênico, o que implica na presença de aprotinina recombinante em solução juntamente com o ITM, não deve alterar significativamente a conclusão obtida, uma vez que a concentração da aprotinina recombinante na solução é inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$, próximo de 35 vezes menor que a de ITM, e portanto, abaixo da sensibilidade de detecção do método de análise de inibição.

4.1.2. Estabilidade da Aprotinina em Contato com Solvente Orgânico

Solventes orgânicos como o hexano e o éter de petróleo são comumente utilizados na remoção do óleo de matérias primas que são submetidas a processos de extração e purificação de proteínas. No processo de recuperação e purificação de β -glicoronidase recombinante a partir de sementes de milho transgênico, Kusnadi e colaboradores (1996) utilizaram hexano para a extração do óleo de milho. Estes estudos mostraram que esta etapa de desengorduramento não afetou significativamente a eficiência de recuperação da proteína recombinante. Contudo, sendo a aprotinina uma molécula significativamente diferente da enzima estudada anteriormente, decidiu-se verificar a possibilidade de a aprotinina ser significativamente particionada para a fase orgânica ou desnaturada na presença de hexano, o que seria um indício de elevadas perdas devido ao processo de desengorduramento.

Foram efetuados experimentos onde soluções de aprotinina, a três diferentes valores de pH, foram expostas ao hexano por um período de 3 horas (Figura 4.3). Após o contato com o solvente, a diminuição na concentração de proteína nas fases aquosas foi de 2, 11 e 9% para as soluções a pH 5,0, 7,0 e 9,0, respectivamente. Constatou-se ainda que não houve perda significativa da capacidade de inibição das soluções de aprotinina a pH 5,0 e 7,0 após exposição ao solvente orgânico. No caso da solução a pH 9,0, constatou-se uma perda de 28% da capacidade de inibição da aprotinina em solução. A redução da concentração protéica nesse mesmo pH foi de 9%, o que é uma indicação de que houve desnaturação, possivelmente por rompimento de pontes de dissulfeto em pH alcalino.

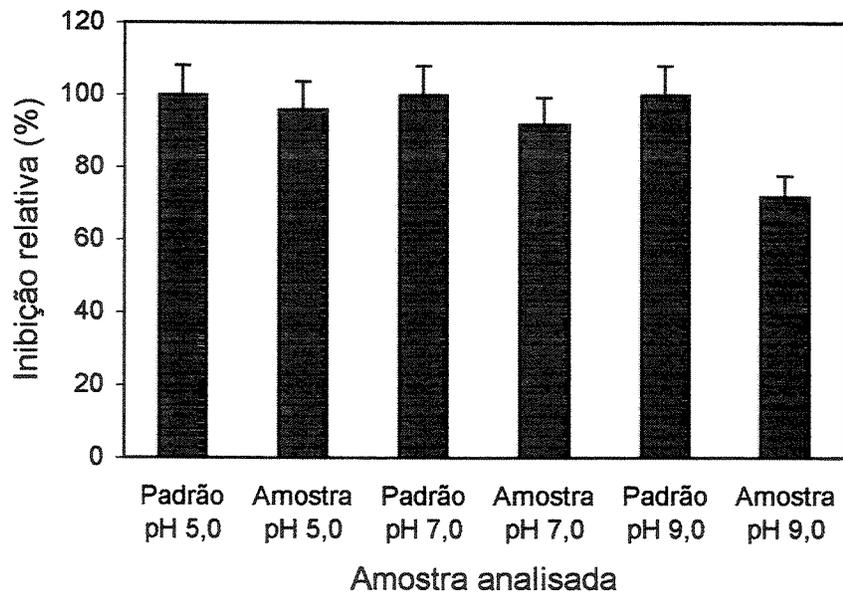


Figura 4.3 – Estabilidade e extratividade da aprotinina em contato com hexano sob diferentes condições de pH. Os valores representam as inibições relativas apresentadas pelas amostras, quando comparadas aos respectivos padrões (soluções controle de mesma concentração não expostas ao hexano). As barras de erro indicam a amplitude máxima apresentada entre as duplicatas.

Foram também realizados ensaios de extração da aprotinina recombinante a partir da farinha de semente transgênica, antes e após esta passar pelo processo de desengorduramento em equipamento sohxlet utilizando hexano, de forma a verificar o impacto deste processo sobre a extração da proteína recombinante. Os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração da aprotinina recombinante no extrato, determinada por ELISA, foi de $0,66 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ e $0,57 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ para os extratos provenientes de farinha não desengordurada e desengordurada, respectivamente. A diferença de 14% é pequena indicando que a perda de aprotinina no processo de desengorduramento é pouco significativa, sendo próxima do erro relativo ao próprio experimento. Tal resultado indica que a aprotinina recombinante, da mesma forma que a β -glicoronidase recombinante produzida em semente de milho (Kusnadi e colaboradores, 1998), é resistente ao processo de desengorduramento com hexano.

4.2. Localização da Aprotinina Recombinante e do ITM na Semente de Milho

4.2.1. Estudo de Localização da Aprotinina Recombinante na Semente de Milho

Uma das vantagens do uso de plantas como biorreatores é a possibilidade de direcionar a proteína recombinante produzida para um órgão (semente, por exemplo) ou tecido (gérmen ou endosperma) específico, com a finalidade de aumentar a estabilidade, eficiência de produção da proteína e seu acúmulo, ou ainda reduzir a complexidade e custos da etapa de purificação.

Neste caso em estudo, a expressão do gene responsável pela produção da aprotinina recombinante é dirigida pelo promotor constitutivo “ubiquitina” que em trabalhos anteriores apresentou tendência de endereçar a proteína recombinante para o gérmen da semente de milho (Zhong e colaboradores, 1999). Trabalhos anteriores, onde este promotor foi utilizado na produção em sementes de milho das proteínas recombinantes avidina e β -glicoronidase, constataram níveis de acumulação no gérmen de 55% e 90%, respectivamente (Hood e Howard, 1999). Neste trabalho, sementes de milho contendo aprotinina recombinante tiveram seu gérmen e endosperma fracionados (fracionamento a seco) e o nível de acúmulo da proteína recombinante foi então determinado nestas frações (Tabela I). As concentrações médias de aprotinina recombinante nos extratos preparados a partir das frações ricas em gérmen, endosperma e da semente toda (controle) foram de 1,16, 0,52 e 0,71 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Este resultado vai ao encontro daquele apresentado por Zhong e colaboradores (1999), realizado pelo método de “tissue print”, que indicava maior acúmulo no gérmen que em outros tecidos da semente. Contudo, apesar do menor nível de acúmulo da proteína recombinante no endosperma, este tecido corresponde a aproximadamente 82% da massa da semente, o que pode tornar economicamente inviável seu descarte em caso de produção da aprotinina recombinante em larga escala. A fração rica em endosperma testada contribuiu com 77% da massa total de aprotinina recombinante acumulada na semente, de forma que os estudos que se seguiram foram, portanto, realizados com a farinha do grão integral.

Tabela I – Distribuição da aprotinina recombinante no embrião e endosperma da semente de milho transgênico

Tecido	Fração da massa seca da semente (%)	Distribuição da massa de aprotinina por tipo de tecido (%)	Massa de aprotinina por massa seca de tecido ($\mu\text{g/g}$)
Endosperma	82	77	3,0
Embrião	11	33	6,6
Semente (controle)	100	100	4,1
Diferença*	-	-	22%

* Diferença entre a massa de aprotinina na semente calculada a partir da soma ponderada dos valores obtidos para o endosperma e embrião e a semente toda.

4.2.2. Estudo de Localização do ITM na Semente de Milho

Um dos maiores desafios na purificação da aprotinina recombinante a partir de sementes de milho deve-se à presença do inibidor de tripsina de milho (ITM) que possui massa molecular e propriedades de interação com proteases semelhantes à da aprotinina, tornando difícil a sua separação. Formas de reduzir a presença do ITM na solução resultante da extração das proteínas da semente são interessantes como fator de redução de custos e complexidade da etapa de purificação. Realizou-se um estudo visando a localização dos tecidos de maior concentração do ITM na semente de milho. A análise dos tecidos da semente recombinante indicaram que a aprotinina recombinante foi acumulada em maior quantidade no interior do embrião estando, contudo, em menor concentração presente também no endosperma. O conhecimento da localização do ITM pode ser importante pela possibilidade de orientar pesquisadores no futuro quanto a melhor região a se direcionar a acumulação de determinada proteína recombinante, se o processo de recuperação desta sofrer interferência significativa pela presença do inibidor.

Os resultados para o estudo de localização do inibidor de tripsina de milho não transgênico e proteína total solúvel em solução salina são apresentados nas Tabelas II e III, respectivamente. A semente não modificada geneticamente foi utilizada pela maior disponibilidade e também por não haver interferência da aprotinina. A Tabela II apresenta a quantidade de inibidor encontrada em cada uma das partes da semente, bem como da semente como um todo, utilizada como controle.

Tabela II – Inibição de tripsina presente nos extratos dos diversos tecidos da semente de milho não transgênico, comparando com a inibição total da semente

Tecido	Fração da massa seca da semente (%)	Distribuição da Inibição por tipo de tecido (%)	Inibição por massa seca (UI/g)
Endosperma	82	82	0,48
Embrião	11	16	0,72
Pericarpo e pedúnculo	7	2	0,14
Média para a semente*	100	100	0,49
Semente (controle)	100	100	0,61
Diferença**	-	-	21%

* Inibição média para a semente como um todo, calculada a partir dos resultados encontrados para as partes.

** Diferença entre a inibição média calculada e a experimental (controle).

Tabela III – Proteínas de sementes de milho não transgênico solúveis em solução salina*

Tecido	Literatura ** (%)	Resultado encontrado (%)
Endosperma	0,05	0,04
Embrião	9,80	8,60
Semente	1,09	1,75

* Calculado em termos de massa de proteína por massa seca de semente (ou componente da semente).

** Dado apresentado em termos de porcentagem de nitrogênio total (Watson, 1994).

Estes resultados indicam que, para o milho não recombinante estudado, a concentração de inibidor de tripsina no embrião foi maior que no endosperma (0,72 *versus* 0,48 UI/g). Entretanto, quando toda a semente é levada em consideração, o endosperma contribui com 82% da inibição, cabendo 16% ao embrião e 2% ao pericarpo. Estes valores sugerem a utilização do embrião como tecido de acumulação de proteínas recombinantes que possam ter no ITM um competidor para a etapa de recuperação e purificação (como a aprotinina).

A presença de inibidores de tripsina no endosperma e embrião de sementes de milho também foi pesquisada por Halim e colaboradores (1973). Contudo, a concentração de inibidor encontrada pelos autores foi de 2 a 4 vezes maior no endosperma que no embrião, dependendo da variedade de milho estudada. Não está claro se esta diferença se deve à variedade de milho estudada ou a diferenças nos métodos empregados para a extração dos inibidores, como desengorduramento das amostras, pH de extração e homogeneização, dentre outros. Tais fatores podem ser determinantes em estudos desta natureza, pois, por exemplo, um aumento de até 5 vezes na eficiência de extração do ITM pode ser alcançado aumentando-se o pH de extração de 3,0 para 10,0 (resultados apresentados mais adiante neste trabalho). Contudo, a diferença entre os resultados obtidos e os apresentados na literatura não invalida a sugestão apresentada acima quanto ao direcionamento no acúmulo das proteínas recombinantes no embrião, uma vez que este tecido contém apenas 16% da inibição total da semente. Uma desvantagem deste procedimento deve-se à maior complexidade deste tecido quanto ao número de outras proteínas solúveis quando comparado ao endosperma, o que pode aumentar a complexidade do processo de purificação. Uma análise cuidadosa das características funcionais e estruturais de cada proteína recombinante e de impurezas presentes em cada tecido será sempre, em última análise, o procedimento mais seguro para a decisão de para onde direcionar a expressão da proteína de interesse.

Também foram realizados experimentos visando a determinação da proteína solúvel contida nos extratos dos diversos tecidos da semente utilizada neste estudo, comparando estes resultados com dados da literatura (Tabela III). Os valores

encontrados não diferem significativamente do valor médio para sementes de milho apresentados na literatura.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÕES II

ESTUDOS DE EXTRAÇÃO

A extração é uma etapa chave dos processos de RPB. A escolha correta do meio de extração (tampão, sais, solventes, inibidores de proteases, etc.) e condições (pH, força iônica, temperatura, tempo, nível de agitação, etc) são geralmente cruciais para o aumento da eficiência e seletividade de extração com conseqüente redução da complexidade e custo das etapas posteriores de purificação. Neste capítulo, são apresentados os resultados dos estudos de extração, onde foram estudados os efeitos de fatores como tempo de extração, pH e força iônica sobre a eficiência de extração de aprotinina recombinante, ITM e outros compostos da semente do milho, como açúcares, compostos fenólicos e lipídeos. São também apresentados estudos de extração e recuperação da aprotinina recombinante em planta piloto, avaliando-se, desta forma, algumas das principais vantagens e dificuldades da utilização de sementes de milho como fonte de proteínas recombinantes.

5.1. Cinética de Extração de Aprotinina Recombinante, ITM e Proteínas Solúveis

O estudo da cinética de extração tem a finalidade de determinar o tempo necessário à máxima extração da molécula de interesse nas condições utilizadas. O estudo permite ainda avaliar a extração de outros compostos e assim determinar o tempo ótimo, visando à mínima extração de contaminantes. Em nosso caso, as cinéticas de extração da aprotinina recombinante, proteína solúvel total e ITM

(acompanhada em termos de inibição total de tripsina) foram estudadas e são apresentadas nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente.

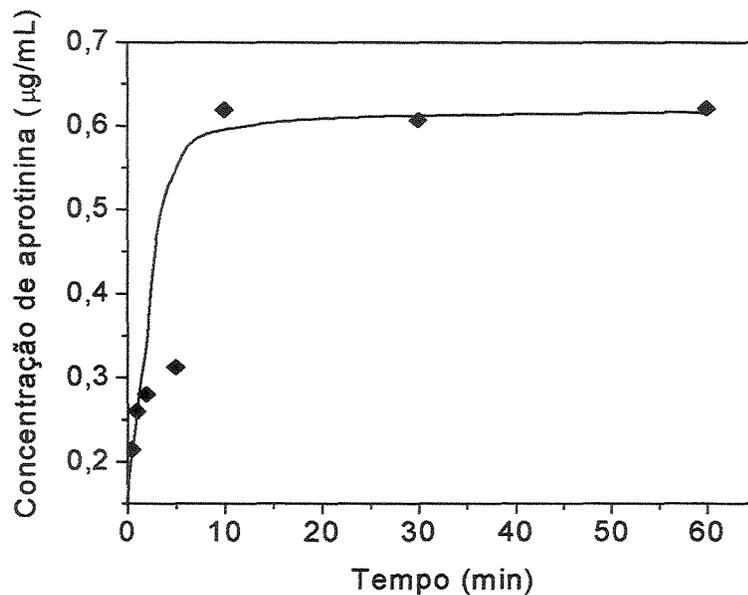


Figura 5.1 – Cinética de extração da aprotinina realizada a 25°C, suspendendo-se a farinha de milho na razão 1:5 (massa por volume) em tampão glicina 200 mM, pH 3,0. A farinha de milho utilizada contém partículas com diâmetro inferior a 1,7 mm.

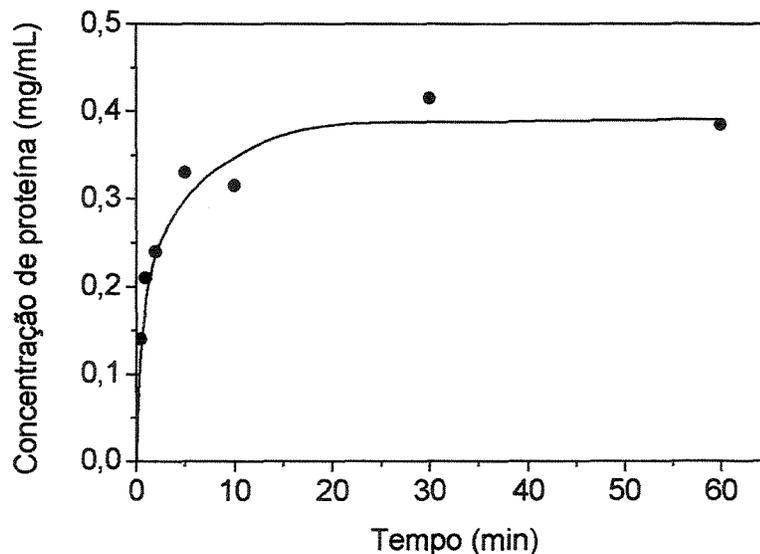


Figura 5.2 – Cinética de extração das proteínas de semente de milho (em termos de proteína solúvel total) realizada a 25°C, suspendendo-se a farinha de milho na razão 1:5 (massa por volume) em tampão glicina 200 mM, pH 3,0.

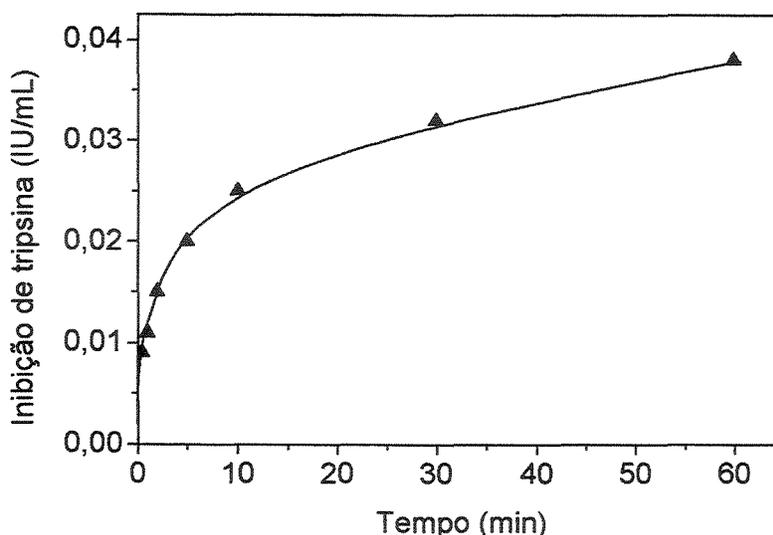


Figura 5.3 – Cinética de extração de ITM realizada a 25°C, suspendendo-se a farinha de milho na razão 1:5 (massa por volume) em tampão glicina 200 mM, pH 3,0. Devido à baixa concentração de aprotinina recombinante, assume-se que a inibição de tripsina na amostra deve-se à presença do ITM.

Os resultados indicam que a aprotinina recombinante possui uma cinética de extração mais rápida que outras proteínas da semente do milho, resultado este que confirmou resultados preliminares realizados pela equipe do Dr. Nikolov nos Estados Unidos (Anderson, 1999). A extração da aprotinina foi completada após 10 minutos de extração, enquanto a extração de proteínas em geral só se completou após 30 minutos.

Possíveis explicações para a mais rápida cinética de extração da aprotinina, quando comparada a outras proteínas do milho, incluem o pequeno tamanho e a alta solubilidade da aprotinina e também o local onde a proteína recombinante se acumula no interior da semente: matriz extracelular, segundo Zhong e colaboradores (1999). A extração do inibidor de tripsina de milho parece seguir a cinética de extração de outras proteínas do milho, apesar da pequena diferença encontrada entre as concentrações tomadas em 30 e 60 minutos de extração indicar que este inibidor continua a ser extraído por um período mais longo. Estes resultados permitem concluir que, desde que o ITM não seja um co-produto de interesse, o tempo de 10 minutos é suficiente para uma eficiente extração da aprotinina recombinante evitando-se, assim, o aumento

da concentração de impurezas no extrato, que podem vir a dificultar a etapa de purificação.

5.2. Influência de pH e Força Iônica Sobre a Extração de Proteínas

Os efeitos da força iônica e pH sobre a extração de aprotinina, ITM e proteína solúvel total foram estudados objetivando a otimização da extração da aprotinina recombinante e minimização da presença de outras proteínas no extrato (Figuras 5.4 e 5.5). A concentração de ITM no extrato foi acompanhada a partir da determinação da inibição total de tripsina, uma vez que o ITM corresponde a mais de 90% dos inibidores de tripsina presentes no extrato da semente transgênica. O estudo da influência da força iônica foi conduzido extraíndo-se as proteínas presentes na semente cominuída, usando-se soluções de NaCl a diferentes concentrações (0, 50, 100, 200 e 300 mM). Tampões não foram utilizados, evitando-se assim a influência de seus diferentes sais, mesmo porque altas concentrações iônicas são necessárias aos tampões para que o efeito tamponante seja forte o suficiente para manter o pH desejado. Usando-se soluções de NaCl em água deionizada pôde-se explorar o efeito tamponante natural das moléculas presentes na semente e que tendem a manter o valor do pH do extrato entre 6,2 e 6,4. O tempo de extração foi de 1 hora, longo o suficiente para garantir a completa extração dos componentes estudados.

A presença de sal exerceu grande influência sobre a extração da aprotinina recombinante (Figura 5.4a). Provavelmente isso ocorre devido ao efeito de "salting in" de outras proteínas (presentes na matriz extracelular onde a aprotinina está sendo acumulada) com as quais a aprotinina pode estar interagindo, uma vez que a aprotinina é solúvel em água. A solubilização destas proteínas que circundam a aprotinina pode promover uma mais fácil solubilização desta. Íons salinos podem também reduzir a interação eletrostática de proteínas (no caso a aprotinina) com componentes não protéicos da farinha de milho (ex., pectinas) durante a extração.

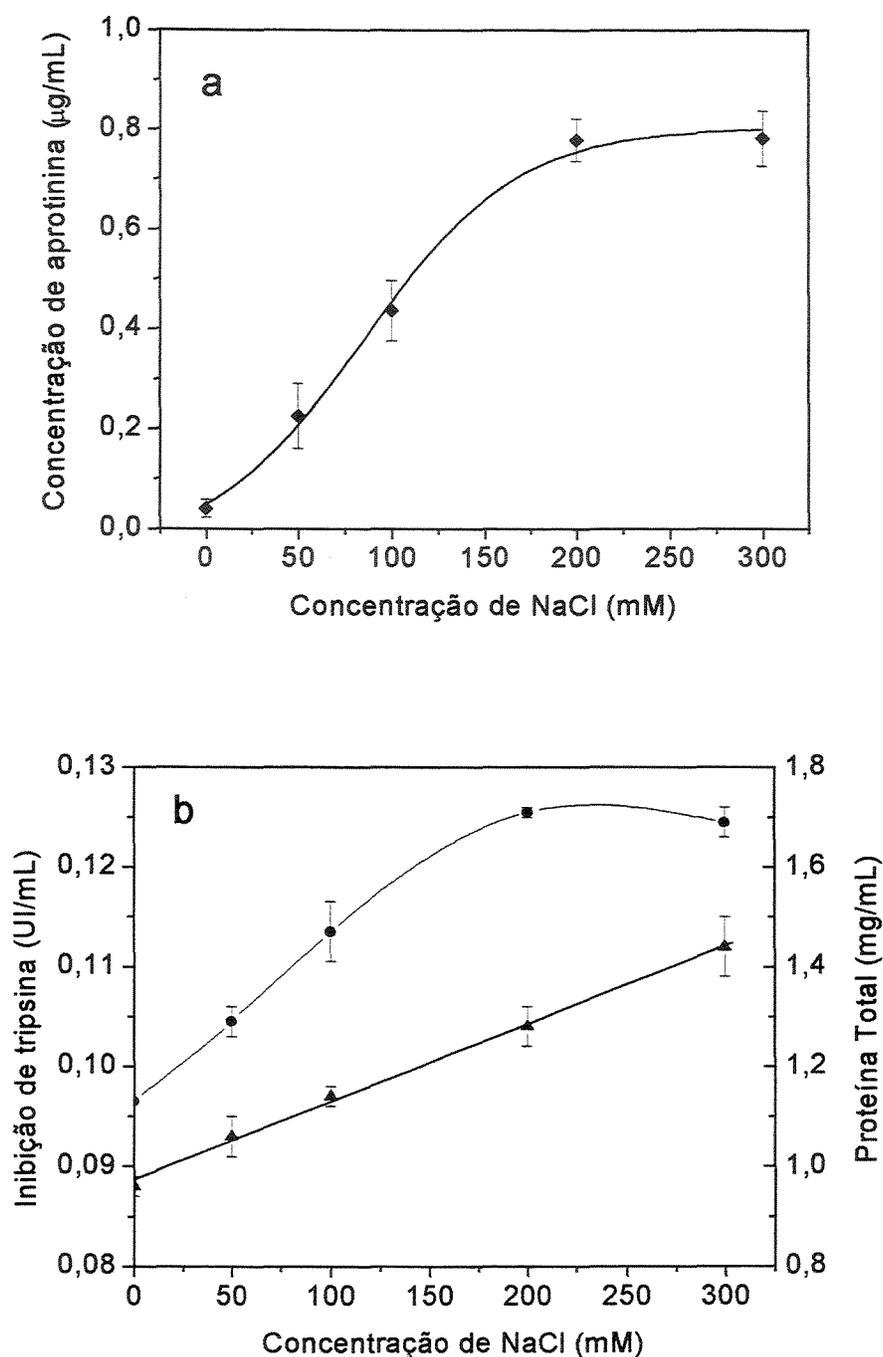


Figura 5.4 – Efeito da força iônica (em termos de concentração de NaCl) sobre a extração de proteínas de semente de milho recombinante. **a)** extração de aprotinina recombinante; **b)** extração de inibição de tripsina (▲) e proteína total (●). As extrações foram efetuadas em soluções aquosas de NaCl. O pH manteve-se entre 6,2 e 6,4 durante os experimentos. As barras de erro indicam o desvio padrão de cinco replicatas (fig. 5.4a) e o desvio entre duplicatas (fig. 5.4b).

A concentração final de aprotinina recombinante no extrato teve um aumento de 12 vezes (1200%) quando a molaridade de 300 mM de NaCl foi usada ao invés de água deionizada (concentração final de aprotinina de 0,06 para 0,78 $\mu\text{g/mL}$). O efeito da concentração de sal sobre a extração de ITM e outras proteínas da semente não foi tão forte quanto sobre a aprotinina recombinante (Figura 5.4b). Um aumento de eficiência de extração de 25% e 50% foi detectado para o ITM e proteína solúvel total, respectivamente, quando a concentração de sal foi aumentada de zero para 300 mM.

O estudo do efeito do pH sobre a extração da aprotinina recombinante indicou que a extração desta foi menos eficiente a pH 8,0 (Figura 5.5a). Acreditamos que a extração da aprotinina não foi significativamente diferente em valores de pH entre 3,0 e 6,0. As diferenças obtidas na extração, nos valores de pH 3,0, 4,0 e 6,0 foram provavelmente devido às diferentes soluções tampão utilizadas. Entretanto, o valor de mínima eficiência de extração encontrado a pH 8,0 foi significativo e não pode ser explicado por diferença no sistema tamponante, uma vez que o mesmo tampão (NaPi) foi utilizado nas extrações a pH 6,0 e 8,0. Uma concentração final média de aprotinina no extrato de 0,09 $\mu\text{g/mL}$ foi encontrada a pH 8,0 contra o valor médio de 0,76 $\mu\text{g/mL}$ a pH 6,0.

Esses resultados confirmam os resultados encontrados por Anderson (1999) onde estudos de extração de aprotinina a pH 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 e 11,0 indicaram um mínimo de eficiência de extração a pH 9,0. Isto foi primeiramente entendido como resultado da proximidade do valor de pH onde a aprotinina tem seu ponto isoelétrico (pI de 10,0) apresentando, conseqüentemente, baixa solubilidade. Entretanto, estes novos resultados indicam que a eficiência de extração da aprotinina recombinante é menor a pH 8,0 que a pH 10,0. Desde que o pI da aprotinina recombinante é o mesmo da aprotinina bovina (Zhong e colaboradores, 1999), a baixa solubilização a pH 8,0 pode ser devido às propriedades do microambiente onde a maior parte da aprotinina recombinante está sendo estocada no interior da semente (diferentes solubilidades, cargas, etc, de moléculas presentes no interior da semente e envolvendo a aprotinina).

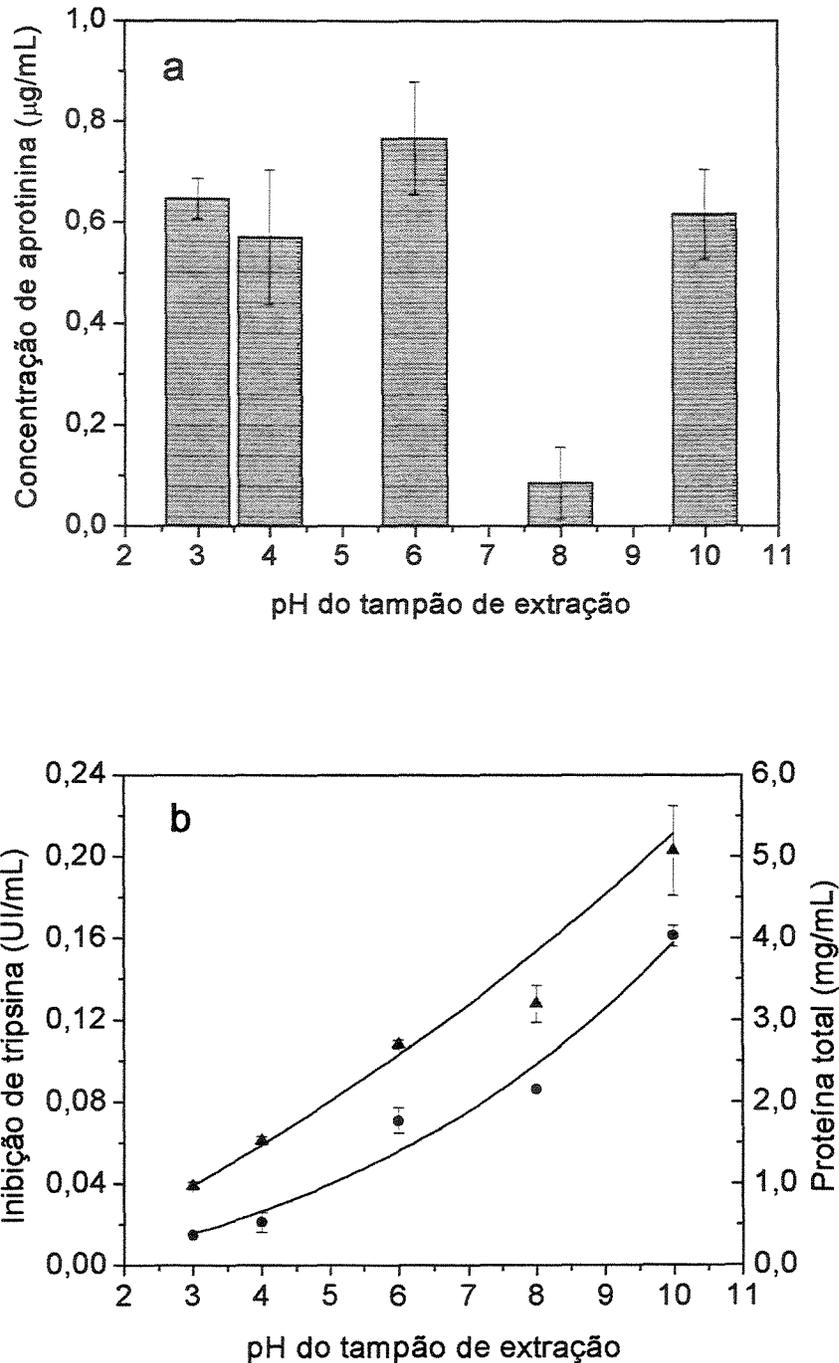


Figura 5.5 – Efeito do pH sobre a extração de proteínas de sementes de milho transgênico. **a)** extração de aprotinina recombinante; **b)** extração de inibidor de tripsina (▲) e proteína total (●). Os tampões utilizados foram: glicina 200 mM pH 3,0; acetato 200 mM pH 4,0; fosfato 200 mM pH 6,0 e 8,0; e carbonato 200 mM pH 10,0. As barras de erro indicam o desvio padrão de cinco replicatas (fig. 5.5a) e o desvio entre duplicatas (fig. 5.5b).

A extração do ITM parece seguir o comportamento de outras proteínas nativas da semente no que diz respeito à influência do pH (Figura 5.5b). A concentração final de ITM no extrato foi aumentada em 5,2 vezes quando o pH de extração aumentou de 3,0 para 10,0. A concentração de proteínas em geral no extrato também aumentou continuamente com o aumento do valor de pH utilizado na extração, provavelmente como consequência do baixo valor de *pI* da maioria das proteínas da semente de milho (*pI* em torno de 5, segundo Wilson, 1987). Amido e outros polissacarídeos também tendem a possuir maior solubilidade a altos valores de pH, o que pode facilitar a solubilização de proteínas solúveis em água envolvidas por estas moléculas no interior das estruturas da semente. Uma das vantagens da extração a pH 3,0 foi o aumento da fração mássica de aprotinina no extrato (porcentagem de aprotinina em relação à proteína solúvel total extraída). Isto pode ser melhor visualizado na Figura 5.6.

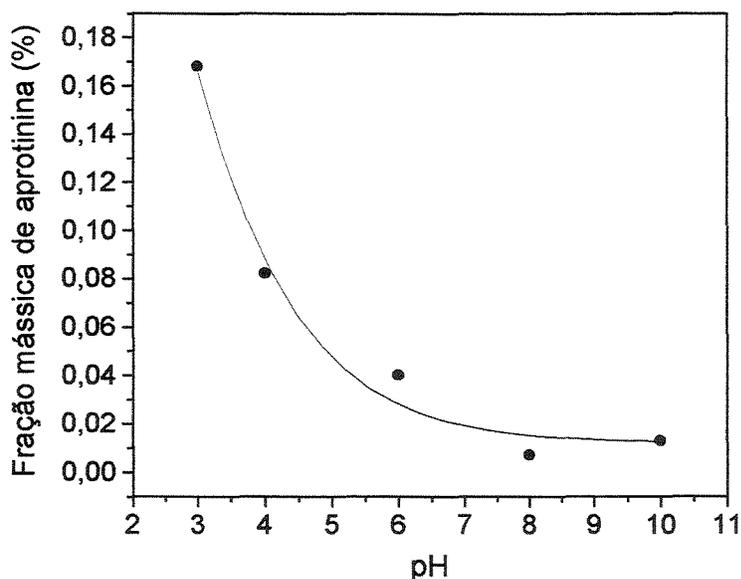


Figura 5.6 – Efeito do pH sobre a fração mássica de aprotinina recombinante extraída de sementes de milho transgênico. Os valores foram calculados a partir dos valores de concentração de aprotinina e proteína total apresentados nas Figuras 5.5 a e b.

Um aumento de 4,2 vezes na fração mássica da aprotinina ocorreu quando a semente cominuída foi extraída a pH 3,0, se comparada à extração a pH 6,0 (de 0,04%

para 0,17% da proteína total solúvel). A extração a pH 3,0 mostrou-se também importante para a redução da extração de ITM, um potencial competidor da aprotinina na etapa de purificação. Além disso, resulta desta extração um extrato de coloração clara e de mais fácil filtração, provavelmente pela menor extração de sólidos em geral (proteínas, amido e outros compostos). Como desvantagem, o ajuste do valor de pH do extrato de 3,0 para 7,8, necessário para a etapa de purificação (cromatografia de afinidade) leva a uma precipitação inesperada, sendo necessária nova etapa de filtração. O referido precipitado não foi identificado não sendo, entretanto, proteína e também não foi constatada perda significativa de aprotinina no extrato após esta precipitação.

Finalmente, o diferente comportamento de extração da aprotinina quando comparada com o ITM e outras proteínas da semente proporciona a escolha de diferentes condições visando a maximizar a recuperação ou pureza da aprotinina extraída. Os resultados também indicam que a extração de aprotinina é mais eficiente a baixos valores de pH (entre 3,0 e 6,0) e altas forças iônicas. O pH e a força iônica da extração podem ser modificados visando a assegurar baixa ou alta extração de ITM, dependendo do processo de purificação utilizado e se é desejada ou não a recuperação e purificação do ITM como um co-produto. Extração a pH 6,0 e 300 mM de NaCl pode ser feita se a etapa de purificação não é afetada pela presença de maiores concentrações de ITM ou se este for considerado um co-produto de valor para ser também purificado. Pelo contrário, se a aprotinina é o único produto desejado ou se o ITM interferir nas etapas de purificação subseqüentes, a extração deve ser efetuada a pH 3,0 e 200 mM de NaCl.

5.2.1. Extração Seqüencial da Aprotinina Recombinante

Constatado que a extração da aprotinina recombinante foi muito pouco eficiente a pH 8,0, ao contrário do ITM e demais proteínas solúveis da semente, decidiu-se avaliar a possibilidade de realizar-se duas extrações: uma primeira a pH 8,0, onde a maior parte do ITM e proteínas em geral seria extraída, e uma segunda extração aquosa com a mesma farinha de milho, desta vez a pH 3,0, condição em que a maior

parte da aprotinina seria extraída. O experimento foi realizado e, ao contrário do esperado, não houve aumento da fração mássica da aprotinina no extrato após a realização da segunda extração. O mesmo foi notado quanto à relação aprotinina/ITM, que se manteve a mesma de quando a farinha foi submetida a uma só extração a pH 3,0. Os resultados indicam que a extração a diferentes valores de pH promove a solubilização de diferentes tipos de proteínas, segundo seu pI, ou mesmo proteínas acumuladas em diferentes tecidos da semente. Observou-se que extrações a altos valores de pH propiciam extração de proteínas de maior massa molecular, quando compara às extrações a baixos valores de pH. Decidiu-se, portanto, que a uma única extração a baixo valor de pH é mais vantajosa para a extração seletiva da aprotinina.

5.3. Influência do pH e Força Iônica Sobre a Extração de Carboidratos, Compostos Fenólicos e Lipídeos

Dando continuidade aos estudos sobre os efeitos da força iônica e pH sobre a extração de aprotinina recombinante, ITM e proteína solúvel total, foram realizados estudos relativos à influência destes fatores sobre a extração de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), além da extração de polifenóis e lipídeos. Estes estudos se justificam na medida em que a presença excessiva de compostos no extrato pode acarretar inúmeros inconvenientes ao processo de RPB de proteínas, como redução da taxa de filtração, tempo de utilização de membranas de ultrafiltração, interações não específicas ou inativação de resinas cromatográficas (por polissacarídeos aniônicos e polifenóis) e, no caso específico de compostos fenólicos, interação com proteínas e possível redução da eficiência de recuperação destas por inativação, precipitação, etc (Fernandez-Lahore e colaboradores, 1998).

5.3.1. Extração de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais

Sabe-se da literatura que os açúcares redutores presentes na semente de milho consistem basicamente de D-glicose e D-frutose (Boyer e Shannon, 1987). Sabe-se também da literatura, que a maior quantidade de dissacarídeos consiste de sacarose,

presente no endosperma da semente em quantidades próximas de 2 ou 3 mg por grão, quantidade que pode depender muito da variedade em estudo (Boyer e Shannon, 1987). No caso de polissacarídeos solúveis em água, o tipo mais comum é chamado de fitoglicogênio, um polissacarídeo ramificado com estrutura parecida à do glicogênio animal, com cadeias formadas de até 30 unidades de glicose. Constatamos em nosso estudo que a presença de sal exerceu alguma influência sobre a extração de açúcares redutores, com valores mais altos para maiores concentrações de sal (Figura 5.7). Contudo, não houve influência significativa quando a concentração de açúcares redutores totais destas mesmas amostras foi determinada (Figura 5.8).

No caso do estudo da influência do pH sobre a extração de açúcares redutores e açúcares redutores totais, novamente observou-se que diferenças significativas entre as amostras ocorreram apenas para a concentração de AR, e não para a concentração de ART (Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente). Desta forma, os valores de pH e força iônica sugeridos neste trabalho para extração da aprotinina recombinante continuam a ser as mesmas já descritas anteriormente: extração com água deionizada a pH 3,0, contendo NaCl a 200 mM.

Um inconveniente da extração a baixo pH provém do precipitado formado após o ajuste do pH para valores mais altos (por exemplo, pH 7,8 na preparação para a etapa de cromatografia de afinidade), exigindo nova etapa de filtração para a clarificação do extrato. Análises de concentração de AR, ART e polifenóis (vide a frente resultados de extração de polifenóis) feitas com o extrato antes e após a etapa de ajuste de pH, e conseqüente precipitação, não mostraram qualquer alteração na presença destes compostos.

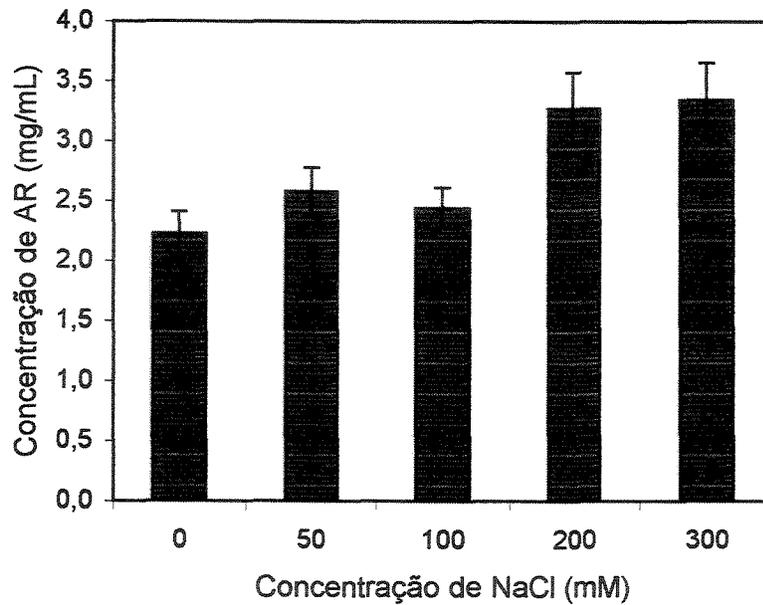


Figura 5.7 – Influência da força iônica (em termos de concentração de NaCl) sobre a extração de açúcares redutores (AR). As extrações foram efetuadas em soluções aquosas de NaCl. O pH manteve-se entre 6,2 e 6,4 durante os experimentos. As barras de erro indicam desvio padrão entre triplicatas.

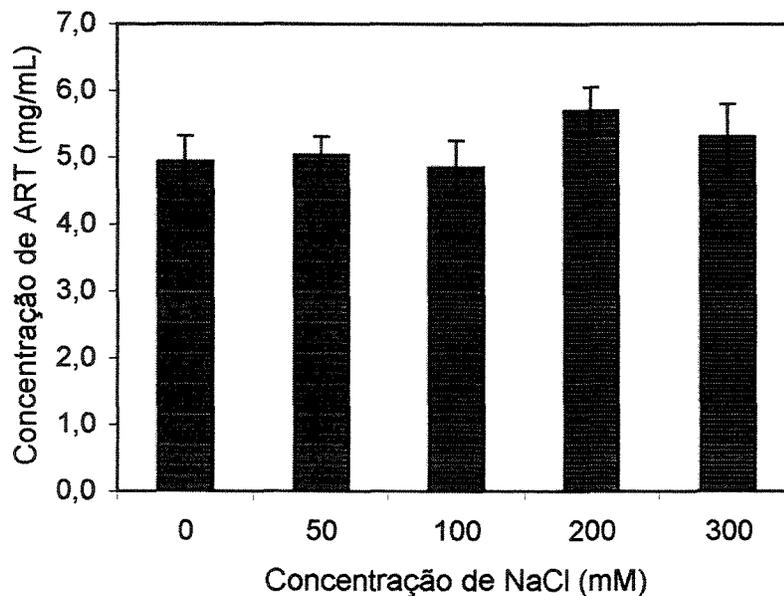


Figura 5.8 – Influência da força iônica (em termos de concentração de NaCl) sobre a extração de açúcares redutores totais (ART). As extrações foram efetuadas em soluções aquosas de NaCl. O pH manteve-se entre 6,2 e 6,4 durante os experimentos. As barras de erro indicam desvio padrão entre triplicatas.

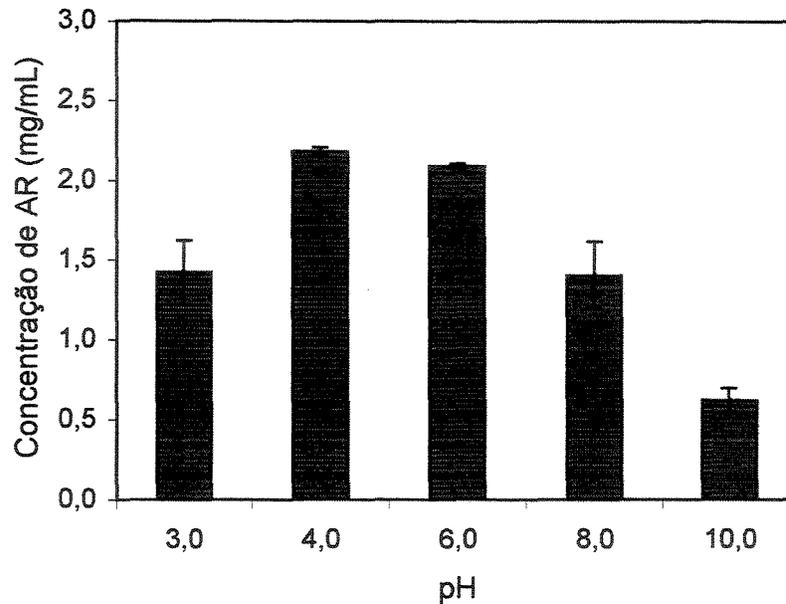


Figura 5.9 – Influência do pH de extração sobre a solubilização de açúcares redutores (AR). Os tampões utilizados foram: glicina 200 mM pH 3,0; acetato 200 mM pH 4,0; fosfato 200 mM pH 6,0 e 8,0; e carbonato 200 mM pH 10,0. As barras de erro indicam desvio padrão entre triplicatas.

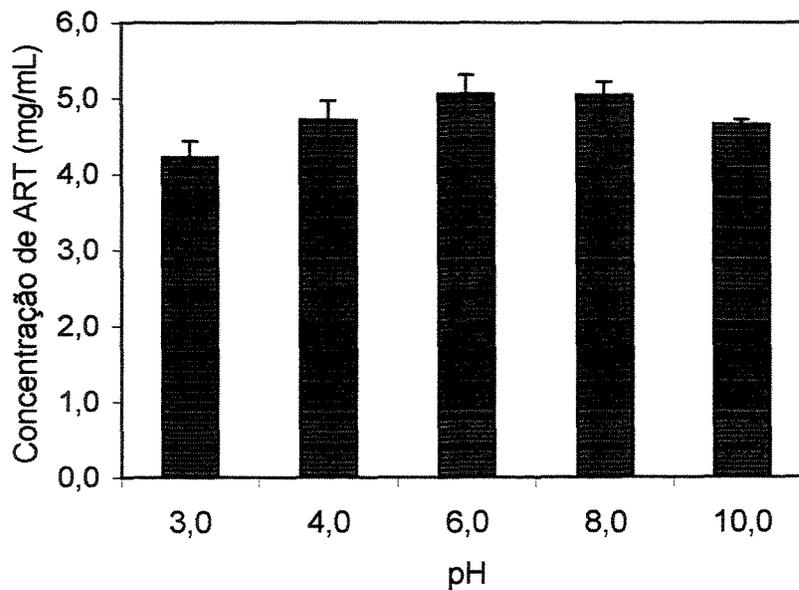


Figura 5.10 – Influência do pH de extração sobre a solubilização de açúcares redutores totais (ART). Os tampões utilizados foram: glicina 200 mM pH 3,0; acetato 200 mM pH 4,0; fosfato 200 mM pH 6,0 e 8,0; e carbonato 200 mM pH 10,0. As barras de erro indicam desvio padrão entre triplicatas.

5.3.2. Extração de Taninos e Outros Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonóides e taninos podem ser encontrados em uma grande variedade de tecidos vegetais, inclusive nas sementes. Tais compostos podem reagir com proteínas e inativá-las através da simples interação por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals ou mesmo modificação covalente de grupos tióis, hidroxilas e aminos primários (Gegenheimer, 1990). Como exemplo, foi observado que compostos fenólicos podem causar a agregação de hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) durante o processo de liofilização, e outro importante hormônio, a insulina, pode sofrer polimerização na presença destes compostos (Maa e Hsu, 1996).

No caso da semente de milho, não foram encontradas na literatura informações sobre a presença, qualidade e concentração de compostos fenólicos. No entanto, Price e Butler (1977) desenvolveram um método para sua determinação em extratos de semente de sorgo. Por serem milho e sorgo plantas da mesma família, assumimos que estes compostos também estão presentes em quantidades apreciáveis em sementes de milho. Foram então desenvolvidos estudos visando à quantificação e avaliação da influência da força iônica e pH sobre a extração destes compostos.

Na faixa de valores estudados (zero a 300 mM) a força iônica em termos de concentração de NaCl apresentou pouca influência sobre a extração de compostos fenólicos (Figura 5.11). Sabe-se da literatura que a solubilização de polifenóis de elevada massa molecular é dificultada pela presença de sal. Contudo, compostos fenólicos de baixa massa molecular não são afetados pela presença de sal, como é o caso das antocianidinas, comuns em sementes de sorgo (Price e Butler, 1977). É possível que a concentração de sal utilizada em nosso estudo não tenha sido alta o suficiente para que uma diferença significativa na extração de taninos e outros polifenóis fosse detectada. Pode ainda significar que compostos de alta massa molecular encontram-se em baixas concentrações na semente de milho, se comparados aos compostos fenólicos de baixa massa molecular.

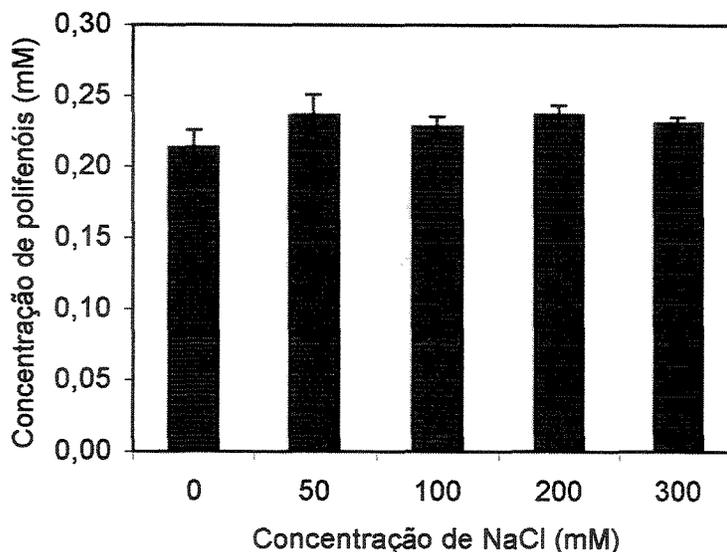


Figura 5.11 – Efeito da força iônica sobre a extração de taninos e outros polifenóis (em termos de D-catequina) presentes em semente de milho recombinante. As extrações foram efetuadas em soluções aquosas de NaCl na razão massa:volume de 1:5. O pH manteve-se entre 6,2 e 6,4 durante os experimentos. As barras de erro indicam desvio padrão entre triplicatas.

Em termos de concentração de compostos fenólicos, os resultados obtidos indicam uma concentração média próxima de 0,23 mM (0,07 mg/mL, em termos de D-catequina). Esta concentração pode ser considerada baixa, se comparada aos valores de concentração de compostos fenólicos estudados por Maa e Hsu (1996) necessários à formação de agregados de rhGH, que foi de 1,5 a 15 mg/mL de diversos compostos fenólicos. Contudo, a concentração de proteínas no extrato de milho é aproximadamente 4 vezes menor que a de rhGH na solução estudada por aqueles autores. Além disso, o método utilizado para a detecção de compostos fenólicos baseia-se na D-catequina como padrão, podendo-se assim subestimar a concentração de compostos mais complexos e menos reativos que aquela. A falta de dados e informações na literatura dificulta nossas análises, devendo-se, sempre atentar para o fato de que trabalhamos com misturas complexas onde seguramente estão presentes uma variedade de compostos fenólicos com diferentes padrões de hidroxilação e graus

de polimerização.

A Figura 5.12 representa as concentrações de polifenóis extraídos em função de diferentes valores de pH. Os resultados indicam um aumento significativo na concentração de compostos fenólicos no extrato obtido a pH 10,0. O valor foi aproximadamente 3 vezes maior que aqueles obtidos a pH 3,0 e 4,0 (0,654 mM contra 0,204 e 0,229 mM) e igualmente mais elevado quando comparado aos resultados de extração com soluções de NaCl (valores de pH entre 6,2 e 6,4).

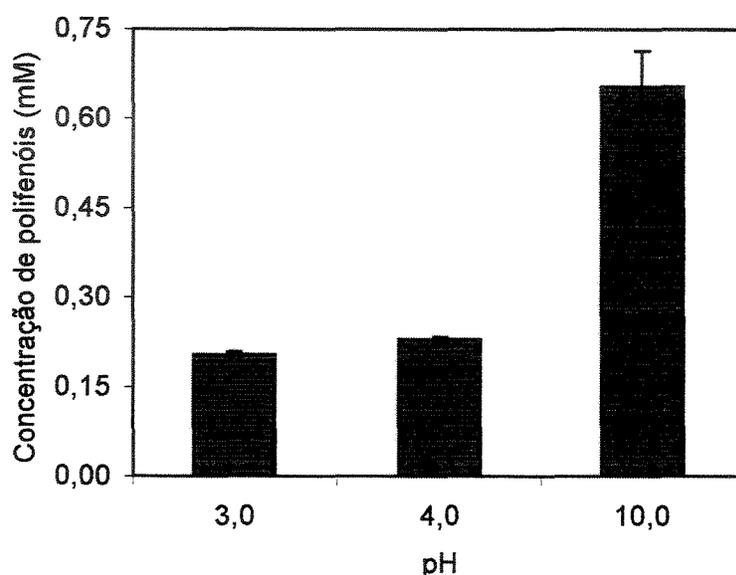


Figura 5.12 – Efeito do pH sobre a extração de taninos e outros polifenóis (em termos de D-catequina) presentes em sementes de milho transgênico. Os tampões utilizados na razão 5:1 com a farinha de milho foram: glicina 200 mM pH 3,0; acetato 200 mM pH 4,0; e carbonato 200 mM pH 10,0. As barras de erro indicam desvio padrão entre triplicatas.

Análises de concentração de polifenóis feitas com o extrato antes e após a etapa de ajuste de pH de 3,0 para 7,8 (necessária para a purificação por cromatografia descrita à frente) não mostraram qualquer alteração na presença destes compostos, indicando que o precipitado formado não se compõe e não é resultado da ação de polifenóis. Finalmente, baseando-se em dados disponíveis na literatura (Maa e Hsu, 1996), os resultados obtidos indicam que a quantidade de compostos fenólicos

extraídos a baixos valores de pH não deve ser suficientemente alta para ocasionar perdas expressivas de aprotinina recombinante durante o processo de recuperação e purificação.

5.3.3. Extração de Lipídeos

É prática geral entre aqueles que pesquisam ou trabalham com recuperação e purificação de proteínas o desgorduramento de matérias primas contendo alto teor de lipídeos, como etapa prévia à extração de proteínas. Membranas e resinas cromatográficas são, em maior ou menor grau dependendo de sua natureza, sensíveis à presença de óleo. A semente de milho contém quantidade relativamente pequena de lipídeos (em sua maioria triacilgliceróis), aproximadamente 4% de sua massa, se comparada com outras sementes, como a de soja, que chega a atingir valores próximos de 20% (Weber, 1987). A relativa baixa concentração de lipídeos na semente parece indicar que o desgorduramento destas não é uma etapa obrigatória do processo de recuperação e purificação de proteínas recombinantes dali extraídas, principalmente quando a operação é efetuada em escala de bancada. Contudo, nada se pode dizer até o momento sobre o efeito continuado da presença de lipídeos extraídos da farinha de milho não desgordurada sobre o desempenho e a durabilidade de membranas de ultrafiltração e resinas cromatográficas de um processo em larga escala, onde as resinas cromatográficas devem ser utilizadas por um grande número de vezes.

Não é objetivo deste trabalho a resposta completa a esta questão, que exigiria testes exaustivos de desempenho de diversas membranas e resinas ao longo de um tempo relativamente longo. Contudo, apresenta-se a seguir um estudo sobre o efeito de duas variáveis de extração (pH e força iônica) sobre a remoção de lipídeos da farinha de milho (Figuras 5.13 e 5.14). Pode-se, assim, avaliar em que condições de extração o óleo presente na farinha não desgordurada será extraído em maior ou menor grau para a fase aquosa juntamente com as proteínas de interesse. A Figura 5.13 apresenta os valores de teor de lipídeos remanescentes na farinha de milho após estas terem sofrido processo de extração aquosa de proteínas em soluções contendo ou não cloreto de sódio (300 mM). Como controle, utilizou-se a farinha de milho que

não passou por qualquer extração aquosa. Apesar de os resultados indicarem que parte do óleo da semente foi extraído pelas soluções aquosas (11% do óleo total), não houve contribuição significativa da presença de sal neste processo.

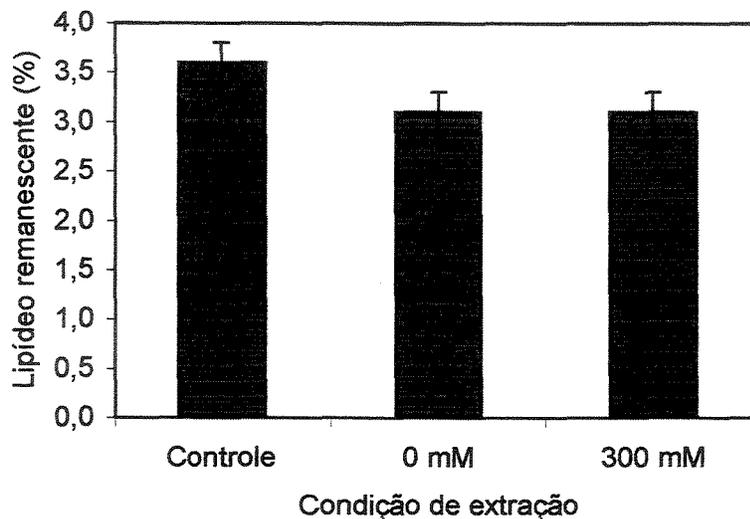


Figura 5.13 – Efeito da concentração de NaCl sobre a extração de lipídeos da farinha de semente transgênica. Os valores são relativos à quantidade de lipídeo remanescente na farinha após extração com água deionizada (0 mM) ou solução de NaCl 300 mM em termos de massa de óleo por massa de farinha seca. O pH manteve-se entre 6,2 e 6,4 durante os experimentos. O controle representa o teor de óleo na farinha que não sofreu extração aquosa. A barra de erro referente ao controle indica o desvio padrão de quatro replicatas. As demais barras de erro indicam desvio entre duplicatas.

Já a Figura 5.14 apresenta a contribuição do pH de extração sobre a remoção de óleo da farinha. Os resultados indicam que quanto maior o pH da extração maior a quantidade de óleo extraída. Apenas 3% do óleo total da semente foi removido quando a extração foi efetuada a pH 3,0, enquanto que 80% deste foi removido quando a extração foi feita a pH 10,0. Tais resultados vão ao encontro daqueles já apresentados anteriormente, indicando que a extração da aprotinina a pH 3,0 é mais seletiva, supostamente evitando-se a co-extração de variados tipos de componentes da semente, inclusive óleo. Estes resultados também indicam que o desengorduramento

da farinha de milho em um processo em larga escala de produção de aprotinina não é necessário se a extração for efetuada a baixo valor de pH.

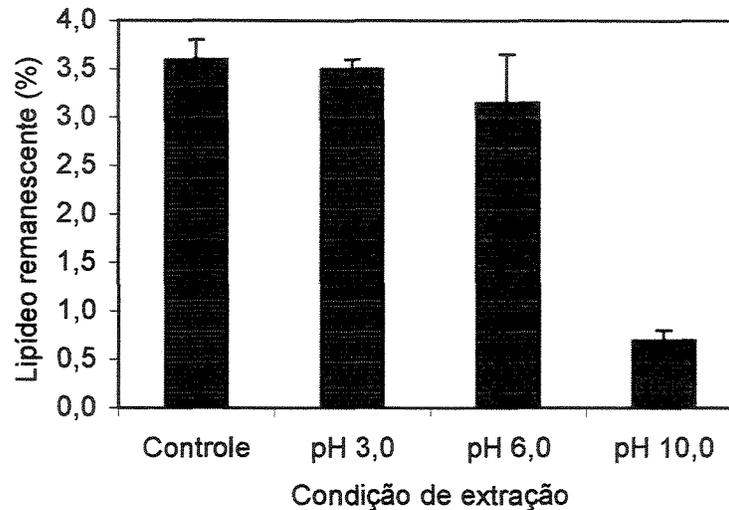


Figura 5.14 – Efeito do pH do tampão sobre a extração de lipídeos da farinha de semente transgênica. Os valores são relativos a quantidade de lipídeo remanescente na farinha após extração no referido valor de pH em termos de massa de óleo por massa de farinha seca. Os tampões utilizados na extração foram: glicina 200 mM pH 3,0; NaPi 200 mM pH 6,0 e carbonato 200 mM pH 10,0. O controle representa o teor de óleo na farinha que não sofreu extração aquosa. A barra de erro referente ao controle indica o desvio padrão de quatro replicatas. As demais barras de erro indicam o desvio entre duplicatas.

5.4. Influência do Tamanho de Partícula Sobre a Extração da Aprotinina

Por ser uma proteína pequena (6,5 kDa) e estar sendo principalmente acumulada na matriz extracelular das células do embrião da semente, é de se esperar que a aprotinina recombinante possua menor resistência à transferência de massa durante sua solubilização na etapa de extração aquosa, quando comparada com outras proteínas da semente que se localizam dentro das células. Um estudo foi efetuado onde duas farinhas de milho transgênico (F1 e F2) contendo diferentes distribuições de tamanho de partícula (Tabela IV) foram submetidas à extração em solução tampão a pH 3,0 e a concentração final de aprotinina recombinante no extrato foi determinada.

Os experimentos foram realizados em triplicata e as concentrações finais de aprotinina nos extratos com tamanhos de partícula maior (F1) e menor (F2) foram 0,66 +- 0,04 µg/mL e 0,54 +- 0,05 µg/mL, respectivamente. Apesar de esperar-se maior eficiência de extração quando utilizando farinha com menor tamanho de partículas, verificou-se queda de aproximadamente 18% na concentração final de aprotinina quando esta farinha foi utilizada. Apesar do pequeno número de condições estudadas, tal resultado parece indicar que, ao menos na faixa de distribuição estudada, a diferença de tamanho de partícula pode não influenciar a extração da aprotinina de maneira significativa. Sendo este o caso, as condições mais drásticas de moagem para a obtenção de menores tamanhos de partícula, como longos períodos a alta temperatura, podem elevar as perdas da aprotinina por desnaturação.

Tabela IV – Distribuição do tamanho de partículas das farinhas estudadas em porcentagem mássica

Tamanho de Partícula*	F1 (%)	F2 (%)
X >1,0 mm	0	0
0,5 mm < X < 1,0 mm	52	9
0,2 mm < X < 0,5 mm	43	66
X < 0,2 mm	5	25

* Por tamanho se indica as aberturas das peneiras nas quais as partículas foram ou não retidas.

5.5. Escalonamento da Etapa de Extração e Preparação para Cromatografia – Ensaio em Planta Piloto

Estudos de escalonamento do processo de extração e recuperação da aprotinina recombinante foram desenvolvidos através do uso da planta piloto pertencente ao “Food Protein Research and Development Center” da Texas A & M University, EUA. As etapas estudadas foram a extração das proteínas nas condições determinadas em laboratório, centrifugação e filtração da suspensão para a remoção da maior parte dos

sólidos e, finalmente, separação e concentração de proteínas utilizando ultrafiltração e nanofiltração. A Figura 5.15 apresenta um fluxograma com as principais etapas do processo e a Tabela V apresenta os valores de proteína total e aprotinina durante as várias etapas.

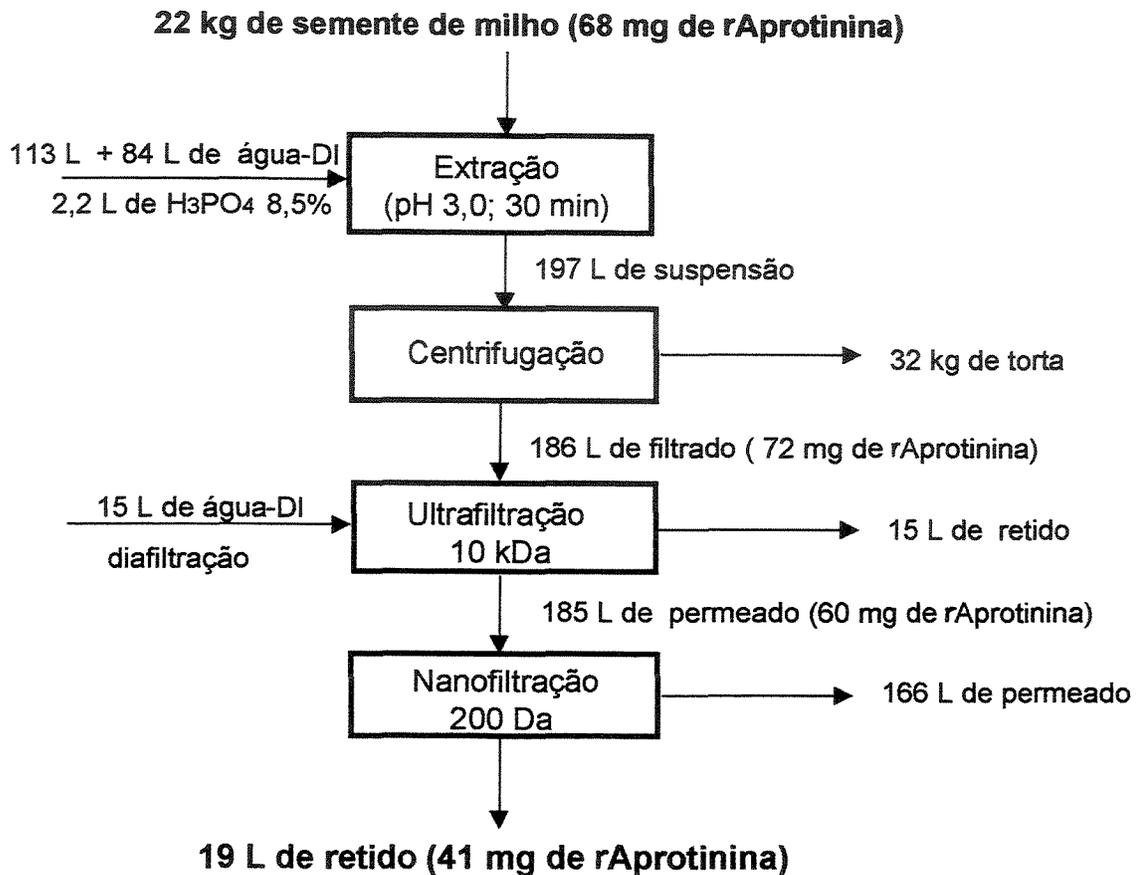


Figura 5.15 – Fluxograma com as principais etapas do processo de extração da aprotinina recombinante em planta piloto a partir de sementes de milho transgênico cominuído.

Neste estudo, uma massa de 22,5 kg de milho cominuído foi utilizada, suspensa em 113 L de água deionizada (razão massa:volume de 1:5) a pH 3,0, condições definidas pelos ensaios em bancada. Após 30 minutos de agitação, a suspensão foi centrifugada utilizando-se uma centrífuga de decantação. O bombeamento da solução mostrou-se difícil, dada a facilidade de obstrução da tubulação pela sedimentação de

sólidos. O problema foi resolvido aumentando-se a agitação da suspensão, a vazão de bombeamento de modo a evitar a sedimentação de partículas e a diluição com a adição de 84 L de água deionizada. A etapa de centrifugação dos sólidos mostrou-se bastante eficiente, reduzindo a concentração de sólidos suspensos de 20% (m/v) para 2,6%, sendo que o teor de umidade nos sólidos removidos foi de apenas 36%. Uma filtração final foi realizada utilizando cartucho de filtração de 20 μm visando a etapa de ultrafiltração. A clarificação final da solução e remoção de proteínas de elevada massa molecular foi efetuada através de ultrafiltração em membrana de 10 kDa. Estudou-se assim a possibilidade de remoção de parte do ITM que possui massa molecular de 14 kDa. Finalmente, a solução filtrada foi concentrada (10x) através de nanofiltração em membrana de 200 Da. Esta solução estaria preparada para injeção em uma coluna de afinidade, após ajuste do pH para o valor 7,8.

Tabela V – Balanço de massa da extração de aprotinina recombinante em planta piloto.

Etapa	Volume (L)	Proteína total (g)	Proteína recuperada (%)	Aprotinina (mg)	Aprotinina Recuperada (%)
Extração (pH 3.0)	113	26,1	100	67,7	100
Centrifugação	197	28,4	109	72,1	106
Filtração (20 μm)	186	27,8	107	63,5	94
Ultrafiltração (10 kDa)	185	17,1	66	59,8	88
Nanofiltração (200 Da)	19	10,6	41	41,2	61

A etapa de ultrafiltração em membrana de 10 kDa mostrou-se eficiente do ponto de vista de recuperação da aprotinina, sendo que apenas 6% da aprotinina total foi retida pela membrana. A etapa mostrou-se ainda capaz de reduzir a concentração de

ITM entre 40% e 60% . A etapa de nanofiltração em membrana cerâmica apresentou o inconveniente de reter em sua superfície aproximadamente 38% da proteína total e 31% da aprotinina. Contribuiu para isso a elevada área superficial da membrana utilizada: 7,5 m² comparado com 2,5 m² para a membrana de 10 kDa. Contudo, a relativa elevada pressão de operação deste tipo de membranas eleva consideravelmente a vazão do filtrado, o que se mostrou particularmente importante para reduzir o tempo da operação.

Finalmente, como resultado direto do estudo em planta piloto, algumas observações importantes puderam ser feitas. A primeira delas foi que devido à baixa concentração de aprotinina recombinante, é necessária a inclusão de uma etapa de concentração do extrato obtido a partir da semente. Aumenta-se, assim, a facilidade de manuseio e estocagem do extrato, devido ao menor volume e, principalmente, reduz-se o tempo de operação da primeira etapa cromatográfica. Como exemplo, seriam necessários vários dias para carregar um volume de extrato de 113 litros (volume inicial do extrato) em uma coluna cromatográfica de agarose-tripsina com apenas algumas centenas de mililitros, volume de resina com capacidade suficiente para a adsorção de toda a aprotinina ali presente. Um tempo demasiado longo como este seguramente inviabilizaria o processo, pois acarretaria alto custo, degradação protéica, contaminação microbiana, etc. A utilização de membranas de ultrafiltração mostrou-se adequada para esta tarefa de concentração, mesmo considerando a baixa concentração de aprotinina recombinante no extrato, o que poderia elevar as perdas durante o processo. A escolha correta do tipo e área da membrana é importante para a redução das perdas de proteínas por adsorções não específicas na membrana.

Outra observação importante diz respeito à etapa de extração realizada a pH 3,0, que promoveu baixa solubilização de proteínas em geral, como havia sido constatado em escala de bancada, permitindo maior concentração do extrato e, conseqüentemente, maior concentração final da aprotinina recombinante, sem que fosse detectada a formação de agregados e precipitados resultantes do aumento de concentração de proteínas e outros sólidos solúveis.

Finalmente, observou-se que atenção especial deve ser dada para a proteção

do extrato durante seu manuseio e estocagem contra o crescimento de microrganismos, pelo fato de o extrato de milho ser um meio bastante propício ao seu crescimento. Neste estudo, o extrato foi mantido a pH 4,0 durante o tempo de transporte e estocagem, verificando-se, entretanto, o crescimento de microrganismos após alguns dias de estocagem, mesmo à temperatura de 4°C. Tal problema poderia ser contornado ou reduzido através de manipulação asséptica ou ainda uso de agentes inibidores de crescimento microbiano.

5.6. Conclusão dos Ensaio de Extração

Os estudos de extração mostraram que a aprotinina recombinante possui uma rápida cinética de extração, quando comparada a outras proteínas do milho. O valor de pH e a força iônica utilizados na extração influenciaram significativamente a extração da aprotinina recombinante e outras proteínas, inclusive o ITM. A extração a baixo valor de pH e força iônica moderada promoveu uma extração seletiva da aprotinina, reduzindo a presença no extrato de outras proteínas da semente, além de outras impurezas, como açúcares, compostos fenólicos e lipídeos, resultado importante em se pensando em processos em larga escala. Reduzindo-se a extração de proteínas em geral e principalmente ITM, reduz-se a necessidade do uso de grandes volumes de resinas cromatográficas no processo de purificação. A menor quantidade no extrato de açúcares, compostos fenólicos e lipídeos tende a aumentar a eficiência de recuperação e purificação da aprotinina na medida que minimiza problemas relativos à inativação de resinas cromatográficas, vida útil de membranas de ultrafiltração, baixas taxas de filtração, necessidade de etapa de desengorduramento da farinha da semente, etc., reduzindo-se assim custos de manutenção do processo e aumentando-se a viabilidade do processo como um todo.

O ensaio de extração em planta piloto mostrou a viabilidade e confirmou as vantagens do uso das condições determinadas em escala de bancada. Observações importantes que não haviam sido detectadas nos estudos de laboratório foram feitas, como a importância da etapa de clarificação do extrato, concentração através de

ultrafiltração em membranas, e necessidade de cuidados com a estabilidade e manuseio do extrato quanto à questão de crescimento microbiano.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÕES III

ESTUDOS DE ADSORÇÃO EM TANQUES AGITADOS

Estudadas as condições de extração da aprotinina recombinante, o próximo passo foi o estudo da etapa de purificação desta molécula através do uso de adsorção em resinas cromatográficas. Este processo inicia-se com estudos de adsorção, em tanques agitados, para determinação das cinéticas e isothermas de adsorção das moléculas alvo (aprotinina e ITM) nas resinas propostas para a etapa de purificação. Levantam-se, desta forma, importantes informações de engenharia que indicam a viabilidade do uso destas resinas para o fim proposto. Neste capítulo, são apresentados os resultados dos estudos de determinação da cinética de adsorção e isothermas de adsorção da aprotinina e ITM nas resinas de afinidade bioespecífica (agarose-tripsina), pseudo-bioespecífica (agarose-IDA-Cu⁺²) e trocadora de cátions (SP Sepharose). Estes estudos foram realizados utilizando-se aprotinina comercial de alta pureza que, ao contrário da aprotinina recombinante, pôde ser obtida em quantidades suficientes para a realização dos experimentos.

6.1. Determinação das Curvas Cinéticas

Estudos de determinação da cinética de adsorção da aprotinina e ITM nas resinas de afinidade bioespecífica (agarose-tripsina), pseudo-bioespecífica (agarose-IDA-Cu⁺²) e trocadora de cátions (SP Sepharose) foram realizados utilizando o sistema de tanques agitados. Pôde-se determinar assim os tempos necessários para que os sistemas entrassem em equilíbrio e pudessem ser determinados os parâmetros de

equilíbrio através de isotermas de adsorção. As Figuras 6.1, 6.2, 6.3 e 6.4 apresentam as curvas cinéticas obtidas.

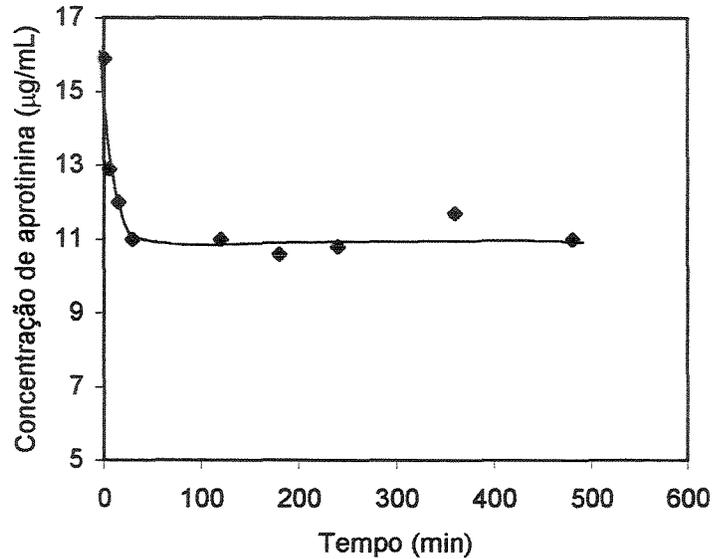


Figura 6.1 - Cinética de adsorção de aprotinina em resina de agarose-tripsina. Concentração inicial de 17 µg/mL de aprotinina em tampão NaPi 50 mM pH 7,8. Temperatura 25 °C.

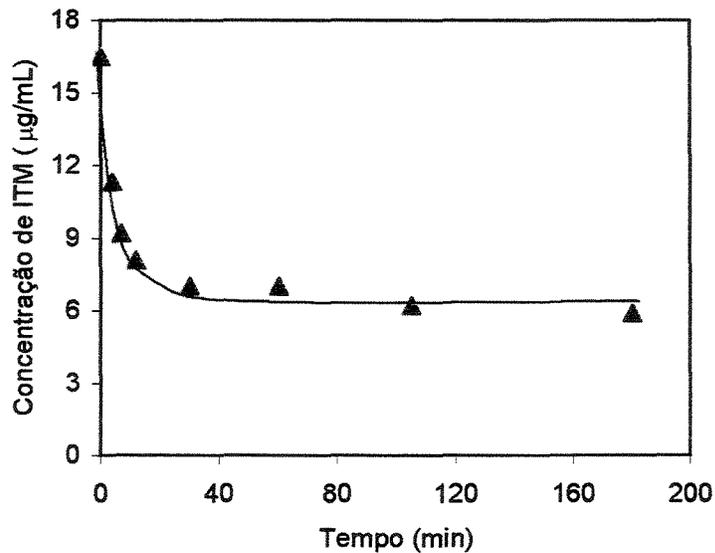


Figura 6.2 - Cinética de adsorção de ITM em resina de agarose-tripsina. Concentração inicial de 16,5 µg/mL de ITM em tampão NaPi 50 mM pH 7,8. Temperatura 25 °C.

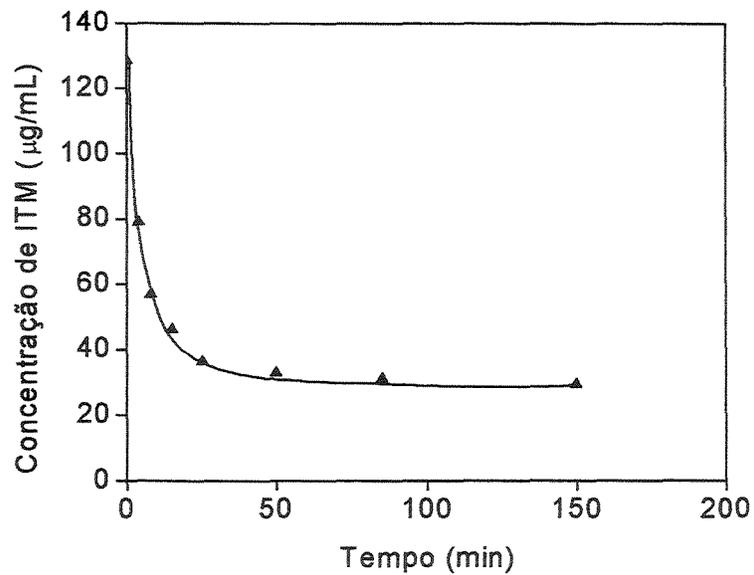


Figura 6.3 – Cinética de adsorção de ITM a 25 °C em resina de agarose-IDA-Cu²⁺. Concentração inicial de 129 µg/mL de ITM em tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M.

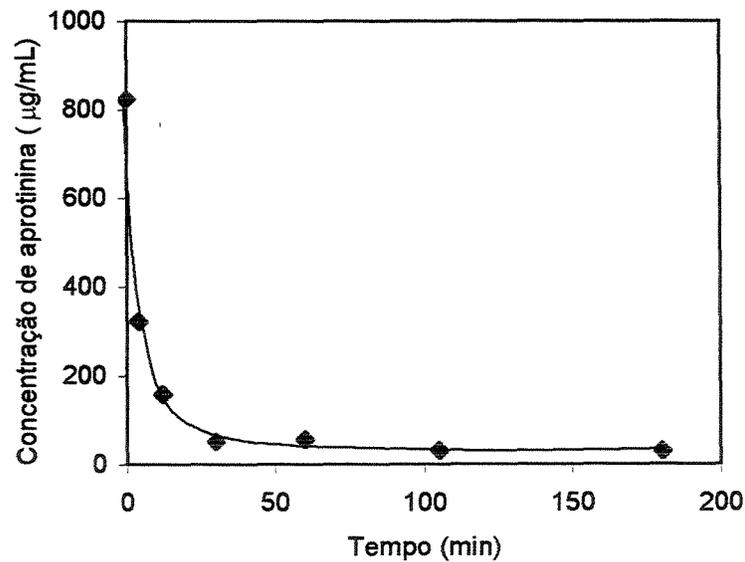


Figura 6.4 – Cinética de adsorção de aprotinina em resina de troca iônica SP Sepharose Fast Flow. Concentração inicial de 0,82 mg/mL de aprotinina em tampão tris 20 mM pH 7,5. Temperatura 25 °C.

Os resultados indicam que a adsorção ocorre quase que totalmente durante a primeira hora de contato entre as fases. Contudo, foram assumidos tempos de adsorção acima de 2 horas para a determinação das isotermas de adsorção visando garantir que o sistema em estudo havia entrado em equilíbrio.

6.2. Determinação das Isotermas de Adsorção

Isotermas de adsorção foram determinadas, procurando-se avaliar a viabilidade das etapas cromatográficas propostas e também para a determinação de parâmetros de equilíbrio importantes para um eventual escalonamento do processo. Os experimentos foram realizados utilizando um sistema de tanques agitados visando a estudar o fenômeno da adsorção de aprotinina e ITM de alta pureza nas resinas de afinidade bioespecífica (agarose-tripsina) e pseudobioespecífica (agarose-IDA-Cu⁺²), além da adsorção em resina trocadora de cátions (SP Sepharose).

Na análise das isotermas obtidas, os parâmetros capacidade máxima (q_m) e constante de dissociação efetiva (K_d), que descrevem as relações de equilíbrio da adsorção foram calculados através de regressão não linear (adsorções em agarose-tripsina e agarose-IDA-Cu⁺²) e regressão linear (adsorções em SP Sepharose) utilizando o modelo de adsorção de Langmuir (Langmuir, 1916). As regressões foram feitas utilizando-se o software gráfico Origin (Microcal, EUA).

6.2.1. Adsorção em agarose-tripsina

As isotermas de adsorção de aprotinina e ITM em resina de agarose-tripsina indicaram que os parâmetros q_m e K_d na adsorção de ambos são similares (Figura 6.5). Os valores de q_m encontrados para ambos foram virtualmente os mesmos (1,55 +- 0,04 mg/mL e 1,55 +- 0,08 mg/mL para a adsorção de aprotinina e ITM, respectivamente). Este resultado não era esperado uma vez que a associação entre essas moléculas e a tripsina ocorre na base molar 1:1, o que, devido à diferença entre as massas moleculares, leva a uma base mássica de 1:3,8 e 1:2,0 para aprotinina e ITM, respectivamente. Seria, portanto, de se esperar uma maior capacidade, em base mássica, para a adsorção de ITM o que pode não estar ocorrendo devido a

impedimentos estéricos. Nesse caso, a escolha de diferentes métodos de imobilização da tripsina na resina de agarose (uso de espaçadores, por exemplo) poderia reduzir este efeito. Os valores de K_d encontrados foram de $1,94 \times 10^{-8}$ M e $3,27 \times 10^{-8}$ M, para a adsorção de aprotinina e ITM, respectivamente. A dispersão nos dados e a dificuldade de obtenção de pontos na parte inicial (inclinada) da curva, devido principalmente às baixas concentrações de equilíbrio, impedem que os valores de K_d sejam calculados com precisão. Pode-se, entretanto assumir que estes valores são da ordem ou menores que 10^{-8} M, suficientemente baixos para indicar que a aprotinina recombinante e o ITM podem ser eficientemente capturados e recuperados por meio de uma coluna de agarose-tripsina, mesmo considerando a baixa concentração da aprotinina recombinante no extrato da semente (abaixo de $1 \mu\text{g/mL}$).

Também foram realizados experimentos visando o estudo da adsorção de aprotinina na presença de ITM nesta resina de agarose-tripsina. Pode-se, a partir deste estudo, avaliar a influência do ITM na adsorção da aprotinina na resina de tripsina imobilizada e averiguar a hipótese de que a aprotinina, se realmente possuir maior afinidade pela tripsina que o ITM, tenderá a deslocar este último dos sítios de ligação. Neste caso, a aprotinina seria adsorvida preferencialmente pela resina, fator importante pelo fato de a semente de milho possuir alta concentração de ITM quando comparada à aprotinina recombinante. Como os anteriores, o experimento foi desenvolvido com o uso de tanques agitados, onde massas de resina de agarose-tripsina foram suspensas em soluções a diferentes concentrações de aprotinina e ITM, sempre se mantendo a proporção 1:1 em termos de concentração mássica. Após determinar-se as concentrações finais (em equilíbrio) de aprotinina e ITM, as isotermas foram construídas (Figura 6.6). Apesar da dificuldade de quantificação, com exatidão, das concentrações de aprotinina e ITM, o que levou a certa dispersão dos pontos, os resultados indicam que a adsorção da aprotinina não foi significativamente afetada pela presença do ITM. Entretanto, a capacidade da resina para a adsorção do ITM parece diminuir significativamente com o aumento da concentração de aprotinina em solução.

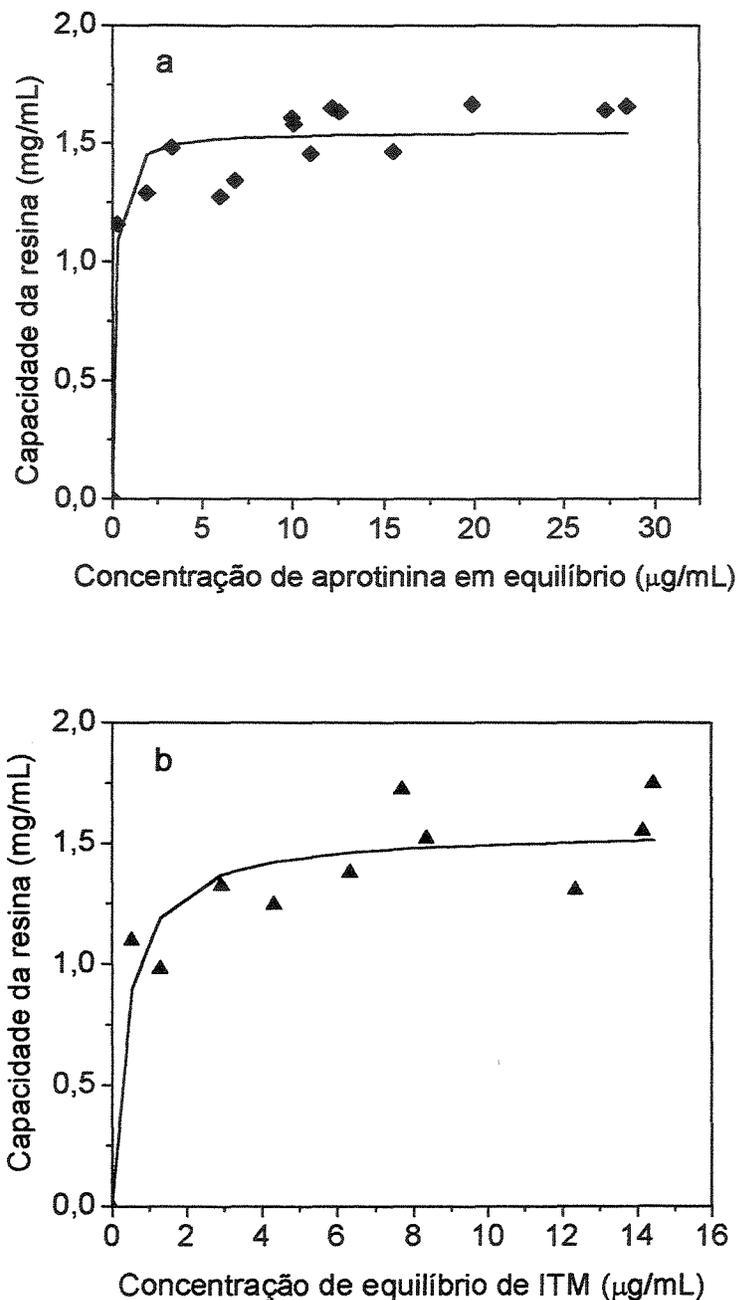


Figura 6.5 – Isothermas de adsorção a 25°C de aprotinina e ITM em agarose-tripsina. A adsorção foi feita em tanques agitados utilizando o tampão NaPi 50 mM pH 7,8. **a)** isoterma de adsorção de aprotinina: a capacidade máxima (q_m) e constante de dissociação (K_d) calculados foram 1,55 mg/mL e $1,94 \times 10^{-8}$ M, respectivamente. O R^2 da regressão foi de 0,917; **b)** isoterma de adsorção de ITM: q_m e K_d calculados foram 1,55 mg/mL e $3,27 \times 10^{-8}$ M, respectivamente, e R^2 de 0,878. Os parâmetros foram calculados por regressão não linear utilizando o modelo de adsorção de Langmuir.

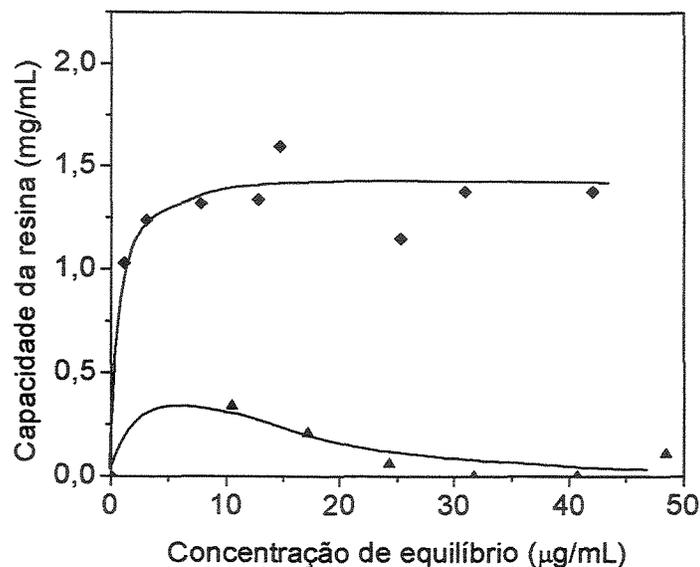


Figura 6.6 – Isotermas de adsorção de aprotinina, na presença de ITM (razão 1:1 em termos de concentração mássica), em resina de agarose-tripsina. ◆ indica aprotinina e ▲ indica ITM. Temperatura, 25°C. Tampão de adsorção, NaPi 50 mM pH 7,8.

Este resultado vai ao encontro dos resultados anteriores, no sentido de a aprotinina possuir maior afinidade pela tripsina imobilizada que o ITM (indicado pelos resultados das isotermas para as duas proteínas puras, Figura 6.5), e indica também que este é deslocado por aquela na disputa pelo sítio de ligação.

6.2.2. Adsorção em agarose-IDA-Cu⁺²

A isoterma de adsorção de ITM em resina de agarose-IDA-Cu⁺² é mostrada na Figura 6.7. A capacidade máxima da resina e a constante de dissociação encontrados foram de 32,8 ± 0,7 mg/mL e 5,05 × 10⁻⁶ ± 0,30 × 10⁻⁶ M, respectivamente, mostrando que o resíduo de histidina do ITM encontra-se disponível para interação com o íon metálico imobilizado. O relativamente baixo valor da constante de dissociação também indica que o ITM pode ser eficientemente capturado utilizando-se uma coluna IMAC podendo esta ser uma etapa de separação da aprotinina recombinante. Não foi feita

uma isoterma de adsorção de aprotinina em resina agarose-IDA-Cu²⁺, pois se sabe de trabalhos na literatura e de nosso grupo de pesquisa que a aprotinina não se liga a este adsorvente (Tamagawa, 1999).

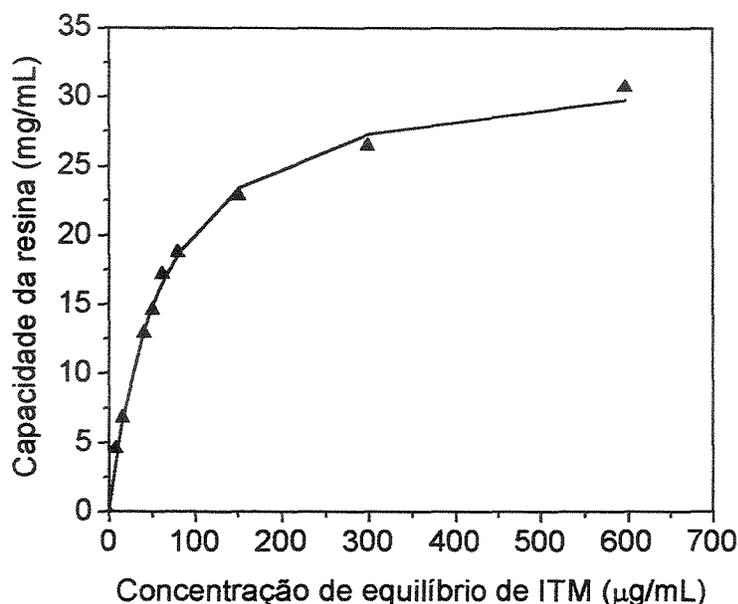


Figura 6.7 – Isoterma de adsorção a 25°C de ITM em resina de agarose-IDA-Cu²⁺. O tampão de adsorção utilizado foi o NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M. A capacidade máxima da resina (q_m) e a constante de dissociação (K_d) calculadas foram 32,8 mg/mL e $5,05 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. O R^2 da regressão foi de 0,996.

6.2.3. Adsorção em SP Sepharose

A adsorção de aprotinina em resina trocadora de íons foi também estudada com o objetivo de avaliar o método como forma de concentrar e possivelmente separar a aprotinina recombinante do ITM presente na semente do milho.

Ao contrário da resina agarose-IDA-Cu²⁺, estudos preliminares mostraram que, dependendo do pH utilizado, tanto aprotinina como ITM são adsorvidos pela resina SP Sepharose (resultados não apresentados). Neste caso, a escolha do pH ótimo para o processo deverá então ser um compromisso entre as maiores capacidades (valores de pH mais baixos) e menor adsorção de impurezas. No caso da separação entre aprotinina e ITM, deve-se fazer valer de um valor de pH específico de forma a garantir

a adsorção de aprotinina (pH abaixo do pI da aprotinina), evitando que o ITM adsorva na resina (pH acima do pI do ITM). Isso pode ser feito por sabermos que o ITM possui valores de pI menores que a aprotinina. Decidiu-se, portanto, pela realização de experimentos visando, além de um estudo básico, a uma otimização ainda que limitada da adsorção de aprotinina e ITM em SP Sepharose.

Foram levantadas as isotermas das duas proteínas utilizando dois diferentes tampões (tris e NaPi) em dois diferentes valores de pH (7,5 e 8,5) e também utilizando três soluções com diferentes forças iônicas em NaCl (zero, 0,1 e 0,2 M). Os dois tampões foram escolhidos pela ampla aplicação e relativo baixo custo e também pelo fato de possuírem cargas opostas quando em solução (o tampão tris possui cargas positivas enquanto o fosfato possui cargas negativas). Esperava-se, assim, avaliar o efeito de uma possível “competição” entre o tampão e as proteínas pelos sítios de adsorção. Isto poderia reduzir a afinidade das proteínas pela resina, redução essa que tende a ser mais pronunciada sobre a espécie que possui menor afinidade pela resina, no caso o ITM, o que reduziria sua adsorção e aumentaria a pureza da aprotinina purificada nesta etapa. Quanto ao pH, os valores 7,5 e 8,5 foram estudados por representarem valores intermediários entre os pontos isoelétricos da aprotinina (pI 10,0) e do ITM (pI 7,3 para a variante de ponto isoelétrico mais elevado) de forma que as duas proteínas apresentassem cargas opostas entre si.

As Figuras 6.8 e 6.9 apresentam as isotermas de adsorção em SP Sepharose Fast Flow de aprotinina e ITM em valores de pH 7,5 e 8,5, em tampão tris 20 mM e NaPi 30 mM, respectivamente. A grande diferença entre as curvas de aprotinina e ITM parece confirmar a viabilidade da separação entre estas proteínas através da troca iônica. A partir das isotermas, o modelo de Langmuir (Langmuir, 1916) foi utilizado para obtenção dos valores de capacidade máxima (Q_m) e constante de dissociação efetiva (K_d) dos dados relativos a adsorção da aprotinina (Tabela VI). Provavelmente pela fraca interação entre o ITM e a resina, não foi possível a utilização do modelo de Langmuir para a obtenção de parâmetros relativos a sua adsorção. Independentemente do tipo de tampão utilizado, valores mais altos de Q_m para a adsorção de aprotinina foram obtidos em pH 7,5 quando comparados aos valores a pH 8,5.

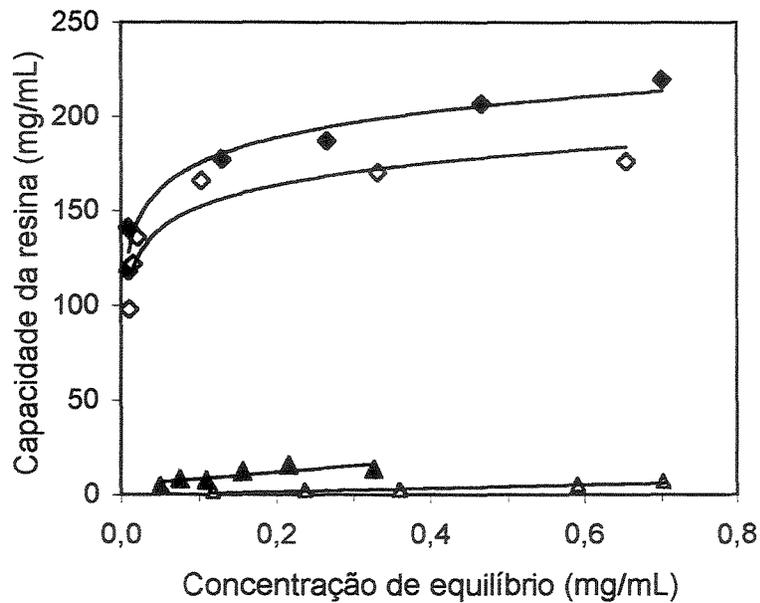


Figura 6.8 – Isotermas de adsorção de aprotinina (♦) e ITM (▲) em resina SP Sepharose Fast Flow utilizando tampão tris 20 mM; pH 7,5 (símbolos cheios) e 8,5 (símbolos vazios). Temperatura, 25°C.

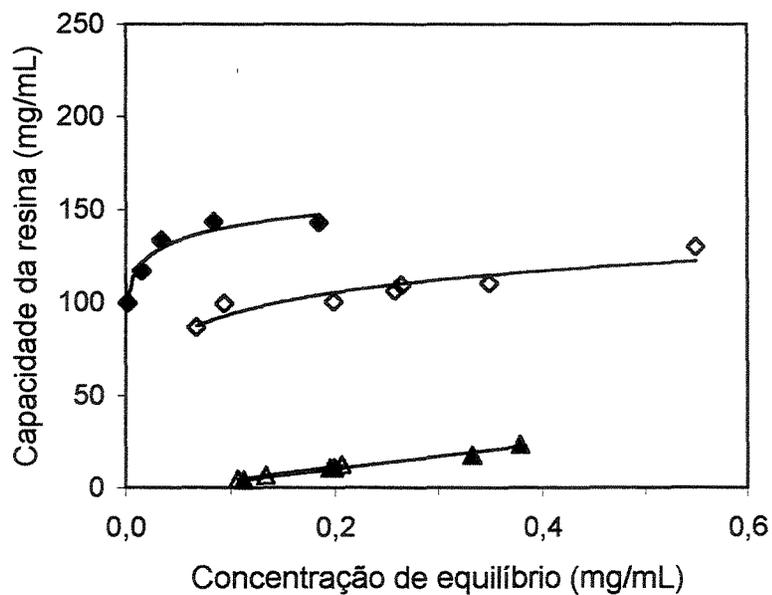


Figura 6.9 – Isotermas de adsorção de aprotinina (♦) e ITM (▲) em resina SP Sepharose Fast Flow utilizando tampão fosfato de sódio 30 mM; pH 7,5 (símbolos cheios) e 8,5 (símbolos vazios). Temperatura, 25°C.

O resultado obtido é coerente com a teoria da adsorção de proteínas em resinas trocadoras de íons, pois quanto mais alto o pH, menor a disponibilidade de grupos carregados positivamente na molécula para interagir com os grupamentos carregados negativamente da resina (sulfopropil). A mesma explicação é válida para os valores de K_d obtidos, que foram mais baixos (indicando maior intensidade na interação proteína-resina) para o valor de pH 7,5 em ambos os tampões.

Resultado semelhante ocorreu na adsorção do ITM utilizando tampão tris, cujos valores de q_m estimados (Tabela VI) foram menores quando a adsorção ocorreu a valores mais altos de pH (15 e 10 mg/mL de resina para pH 7,5 e 8,5, respectivamente). Para o tampão NaPi, não foi constatada diferença significativa na capacidade da resina em adsorver o ITM nos dois valores de pH estudados (q_m próximos de 25 mg/mL de resina).

Com relação ao tipo de tampão, valores mais altos de q_m para a adsorção de aprotinina foram obtidos para o tampão tris, em ambos os valores pH, quando comparados aos obtidos em tampão NaPi. Já os valores de K_d foram mais baixos (maior intensidade na interação proteína-resina) quando a adsorção ocorreu na presença de NaPi. No caso do ITM, valores mais baixos de adsorção foram obtidos utilizando-se o tampão tris, como já reportado acima. Aparentemente o tampão tris compete pelos sítios de interação, o que vem a reduzir a capacidade de adsorção para o ITM, mas não para a aprotinina, cuja carga líquida positiva é muito maior e, portanto, maior é a intensidade de interação, nas condições estudadas.

Outro fator estudado na adsorção de aprotinina em SP Sepharose Fast Flow foi a influência da concentração de NaCl na adsorção (Figura 6.10). Nestes estudos utilizou-se o apenas tampão tris pelo fato de ter apresentado maior potencial para a separação entre os dois inibidores. Como esperado a partir do princípio da adsorção de proteínas em resina de trocadora de íons, o aumento da concentração de sal na determinação de isothermas implica em uma diminuição na capacidade do gel.

Tabela VI – Parâmetros de equilíbrio obtidos para a adsorção de aprotinina (ap) e ITM em resina SP Sepharose Fast Flow

Parâmetro de equilíbrio	Tampão tris pH 7,5	Tampão tris pH 8,5	Tampão NaPi pH 7,5	Tampão NaPi pH 8,5
$q_{m_{ap}}$ (mg/mL)	215	177	145	136
$q_{m_{ITM}}$ (mg/mL)	15	10	25	25
$K_{d_{ap}}$ (M)	$1,8 * 10^{-6}$	$1,1 * 10^{-5}$	$3,3 * 10^{-7}$	$8,6 * 10^{-6}$

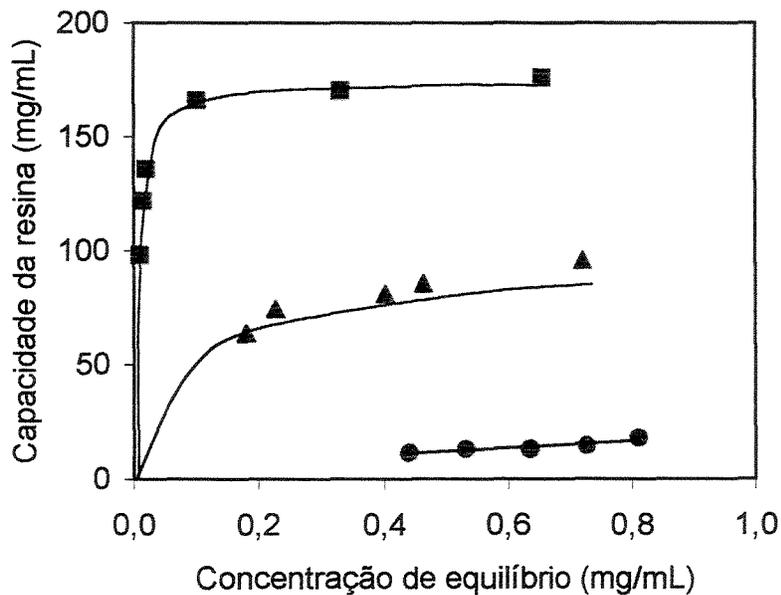


Figura 6.10 – Isotermas de adsorção de aprotinina em resina SP Sepharose Fast Flow, utilizando tampão tris 20 mM pH 8,5 e concentrações de NaCl de zero (■), 0,1 M (▲) e 0,2 M (●). Temperatura, 25°C.

As capacidades máximas de adsorção de aprotinina foram estimadas em 180, 100 e 30 mg/mL de resina para concentrações de sal de zero, 0,1 e 0,2 M, respectivamente. Tais resultados indicam que a condição mais adequada para a separação entre aprotinina e ITM provém do uso do tampão tris 20 mM a pH 8,5, sem a presença de NaCl, uma vez que esta condição favorece suficientemente a adsorção de aprotinina e reduz a adsorção de ITM.

6.2.4. Conclusão dos Estudos de Isotherma de Adsorção

Os estudos de determinação das isothermas de adsorção indicaram que a resina de afinidade, apesar de possuir baixa capacidade de adsorção, pode proporcionar forte interação com as moléculas de aprotinina e ITM. Dada a baixa concentração de aprotinina recombinante no extrato da semente de milho, tal propriedade é interessante na medida que proporciona alta eficiência de recuperação. A maior concentração de ITM no extrato, quando comparada a concentração de aprotinina, não deve interferir na adsorção desta última. Quanto as demais resinas estudadas, tanto a resina IMAC como a de troca iônica apresentaram potencial para serem utilizadas como etapas de separação final entre a aprotinina recombinante e o ITM. A Tabela VII apresenta, de forma resumida, os principais resultados encontrados.

Tabela VII – Parâmetros de equilíbrio obtidos para a adsorção de aprotinina (ap) e ITM nas resinas estudadas.

Parâmetro	Resina	Agarose-tripsina	Agarose-IDA-Cu ²⁺	SP Sepharose
qm _{ap} (mg/mL)		1,55	-	177
qm _{ITM} (mg/mL)		1,55	32,8	10,0
K _{d ap} (M)		1,9 * 10 ⁻⁸	-	1,1 * 10 ⁻⁵
K _{d ITM} (M)		3,3 * 10 ⁻⁸	5,1 * 10 ⁻⁶	-

CAPÍTULO 7

RESULTADOS E DISCUSSÕES IV

PURIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA APROTININA RECOMBINANTE

Neste capítulo, são apresentados os resultados dos estudos de purificação cromatográfica da aprotinina recombinante. Foram estudadas duas diferentes rotas de purificação baseadas nas cromatografias de afinidade bioespecífica (resina agarose-tripsina), pseudo-bioespecífica (resina agarose-IDA-Cu⁺²) e na cromatografia de troca iônica (resina SP Sepharose). Em cada rota foram empregadas duas etapas cromatográficas, uma primeira de captura e concentração da aprotinina recombinante e uma segunda de separação e polimento. Além dos perfis cromatográficos referentes a cada tipo de cromatografia utilizada, são também apresentados ao final de cada rota de purificação os balanços de massa e purificação obtidos, bem como géis de eletroforese ou outras informações destinadas a melhor avaliar os processos em estudo. Finalmente, também são apresentados estudos onde são avaliadas propostas alternativas às rotas de purificação estudadas visando, principalmente, a maior eficiência da RPB nos processos em larga escala.

7.1. Definição das Etapas de Purificação

Os resultados dos estudos de adsorção em tanques agitados indicaram o potencial da adsorção por afinidade em tripsina imobilizada de efetuar a recuperação de ambos os inibidores presentes na semente de milho transgênico (aprotinina e ITM) sendo então escolhida como primeira etapa do processo de purificação. Como próxima etapa de purificação, fez-se necessário o estudo de um método eficiente de separação

entre os inibidores. Para isso, desenvolveu-se uma análise das propriedades físico-químicas das duas moléculas, buscando-se diferenças capazes de serem exploradas na escolha adequada da metodologia de separação.

Percebeu-se que, ao contrário da aprotinina, o ITM possui um resíduo de histidina em sua cadeia de aminoácidos sendo, portanto, passível de interação com metais imobilizados caso esse resíduo encontre-se exposto na cadeia da molécula. IMAC teria então o potencial de separar aprotinina de ITM, com a aprotinina sendo coletada no “flowthrough”. Em nosso estudo, o metal escolhido para imobilização foi o cobre, por ser conhecidamente o que interage mais fortemente com proteínas contendo poucos resíduos de histidina, como é o caso do ITM.

Outra diferença entre aprotinina e ITM que foi explorada visando ao emprego de métodos de separação, diz respeito ao ponto isoelétrico das proteínas. A aprotinina possui um pI de 10,5 enquanto o ITM apresenta pI 's variando entre 5,1 e 7,7 segundo a isoforma do inibidor (três ao todo, segundo Hojima e colaboradores, 1980). Esta diferença entre os pontos isoelétricos da aprotinina e ITM levou-nos ao estudo de adsorção em resina trocadora de íons visando à separação entre os inibidores.

O potencial de sucesso no emprego de ambas as cromatografias escolhidas para a separação entre aprotinina e ITM (IMAC e troca iônica) já foi indicado pelos estudos de determinação das isotermas de adsorção, como apresentado no Capítulo 6. A Figura 7.1 apresenta as etapas do processo de recuperação e purificação da aprotinina recombinante estudado (duas rotas de purificação).

7.2. Primeira Etapa: Recuperação Através de Adsorção por Afinidade

Dada a baixa concentração da aprotinina recombinante no interior da semente de milho (máximo de 0,07% da proteína total solúvel extraída a pH 7,0), levando a concentrações iniciais na solução de extração menores que 0,85 $\mu\text{g/mL}$, faz-se necessária a utilização de um método eficiente de recuperação e concentração desta proteína. O método escolhido foi a adsorção por afinidade utilizando-se a protease tripsina como ligante específico, imobilizada em resina de agarose reticulada.

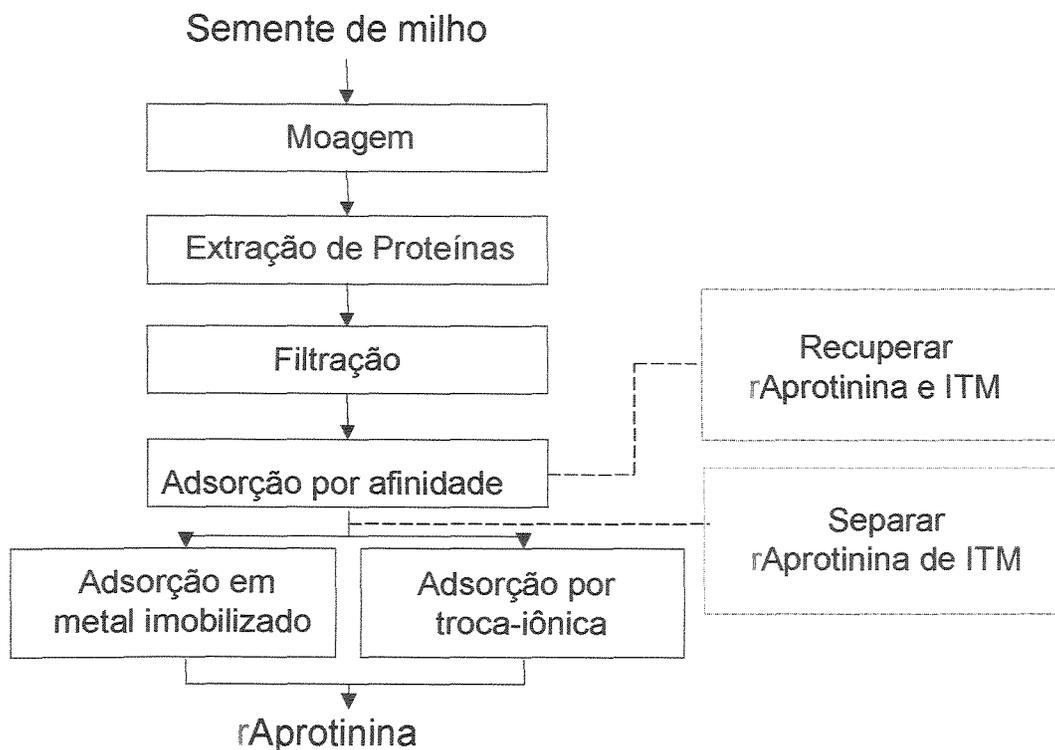


Figura 7.1 – Etapas do processo de recuperação e purificação da aprotinina recombinante proposto após os resultados de isotermas de adsorção.

A concentração média de aprotinina recombinante na solução resultante da etapa de extração e aplicada na coluna de afinidade foi de $0,83 \mu\text{g/mL}$, correspondendo a 0,3% da proteína total extraída a pH 3,0. A coluna de tripsina imobilizada proporcionou elevada concentração e eliminação da quase totalidade de proteínas do milho, com exceção do inibidor de tripsina do milho (ITM) que também foi adsorvido. A Figura 7.2 apresenta os perfis de inibição de tripsina, concentração de proteína e concentração de aprotinina obtidos durante a cromatografia de afinidade. Nesta etapa, 82% da inibição inicial e 71% da aprotinina foram recuperados no pico de eluição, indicando que ambos, aprotinina recombinante e ITM foram adsorvidos e posteriormente eluídos da coluna a pH 2,0.

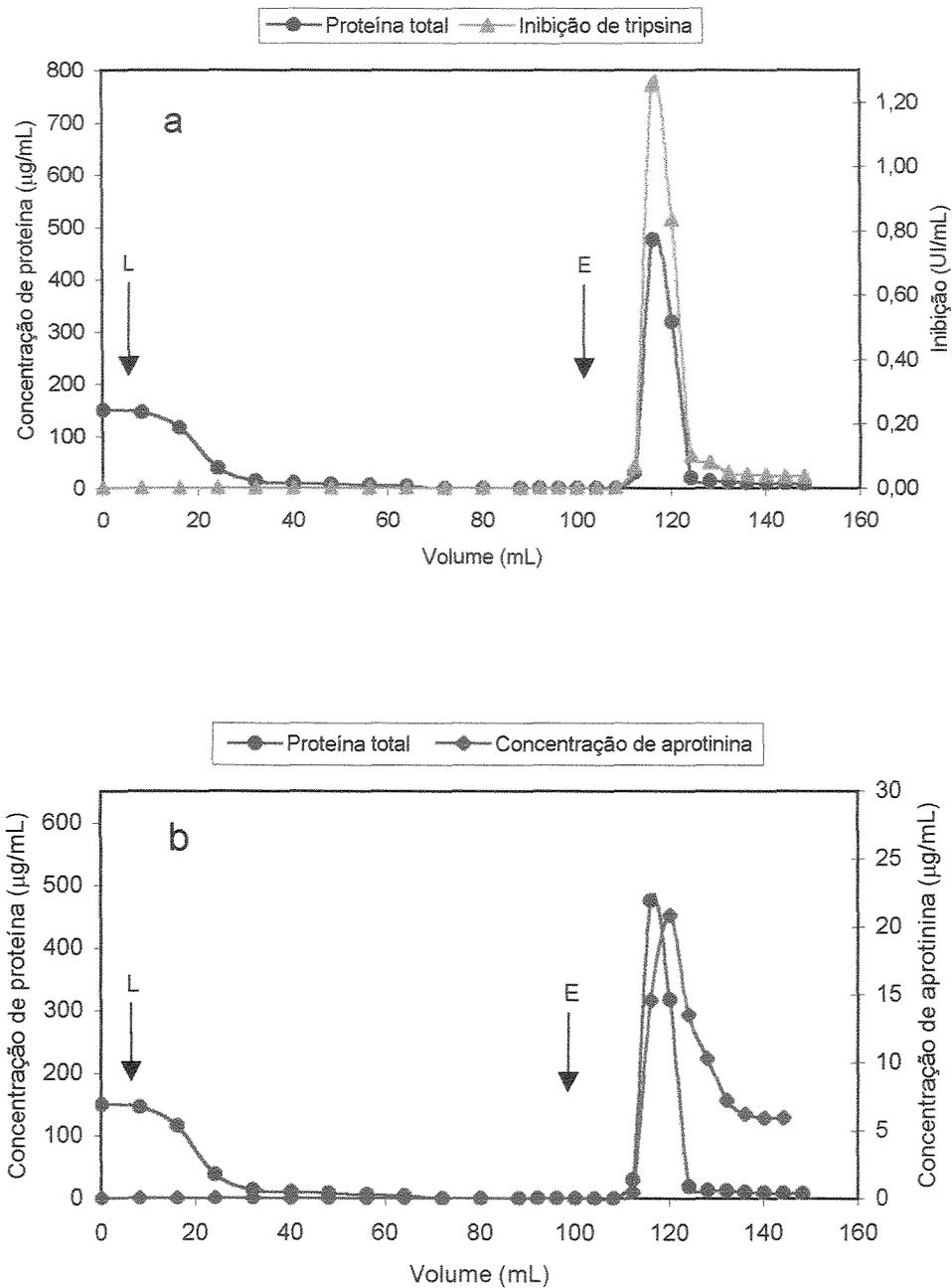


Figura 7.2 – Captura e concentração da aprotinina recombinante através de cromatografia de afinidade; **a)** Perfis de proteína total e inibição de tripsina obtidos para a cromatografia de afinidade; **b)** Perfis de concentração de proteína total e de aprotinina encontrados para a mesma cromatografia. Após a injeção de 775 mL de extrato de milho transgênico, a coluna foi lavada com tampão NaPi 50 mM pH 7,8 contendo NaCl 0,6 M. A eluição foi efetuada utilizando-se tampão KCl-HCl 50 mM a pH 2.0. L e E indicam o início das etapas de lavagem e eluição, respectivamente.

Comparando-se os picos de proteína total, inibição de tripsina e aprotinina, um pequeno “atraso” na eluição da aprotinina foi detectado. Esse resultado parece indicar que a aprotinina possui uma maior afinidade (menor constante de dissociação - K_d) pela tripsina que o ITM, tendendo a ser eluída da coluna a menores valores de pH (condições mais drásticas de eluição). Provavelmente, a mistura entre o tampão de eluição (pH 2,0) e o tampão de lavagem (pH 7,8) no interior da coluna durante a etapa inicial da eluição promove um gradiente de pH suficiente para promover certa separação entre aprotinina e ITM.

7.3. Segunda Etapa: Separação Entre Aprotinina e ITM Através de Adsorção em Metal Imobilizado (IMAC) e Adsorção em Resina Trocadora de Íons

7.3.1. Separação de Aprotinina e ITM Através de Adsorção em Resina IMAC

O fato de o ITM possuir um resíduo de histidina não significa certeza de adsorção em metais imobilizados, uma vez que este resíduo tem que estar localizado em local acessível na molécula para a interação com o metal (Vijayalakshmi, 1989). Contudo, as isotermas de adsorção mostraram que o ITM purificado foi eficientemente adsorvido pela resina IMAC, apontando para a viabilidade de utilização desta técnica como etapa final de separação e purificação da aprotinina recombinante.

Para verificar se a aprotinina poderia ser eficientemente separada do ITM em condições dinâmicas através da adsorção em íon metálico imobilizado, uma amostra contendo inibidor de tripsina de milho purificado a partir de sementes de milho não recombinante foi injetada em uma coluna IMAC. A Figura 7.3 apresenta o cromatograma obtido, em termos das análises de proteína total e inibição de tripsina das frações coletadas. O estudo indica que o ITM foi adsorvido pela coluna nas condições de pH e força iônica utilizadas e a eluição ocorreu a baixas concentrações de imidazol, indicando interação fraca com o metal. Provavelmente, o resíduo de histidina presente na estrutura do ITM foi o responsável pela interação com o metal imobilizado. Não foi detectada a presença de proteína ou inibição nas frações coletadas na etapa de regeneração da coluna com EDTA, indicando que houve completa eluição do ITM.

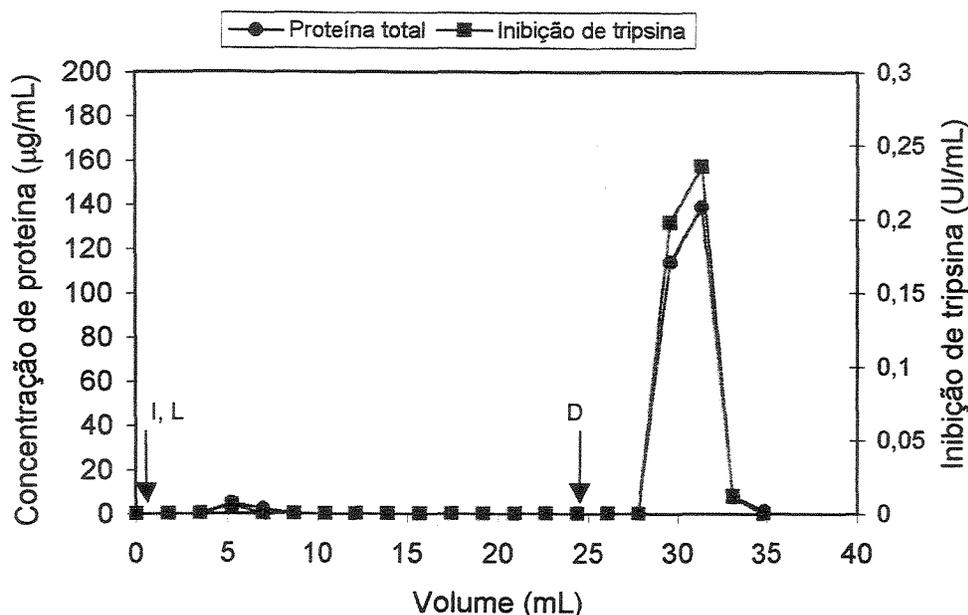


Figura 7.3 – Cromatograma obtido após injeção de ITM em coluna IMAC contendo cobre imobilizado utilizando tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 mM. I, L e D indicam as etapas de injeção da amostra, lavagem e dessorção, respectivamente.

O próximo passo do estudo foi a injeção de aprotinina comercial nas mesmas condições de pH e força iônica utilizadas para o ITM. A Figura 7.4 apresenta o cromatograma obtido. Nesta cromatografia, 94% da inibição e 87% da proteína total injetadas foram recuperadas no pico das proteínas que passaram diretamente pela coluna sem interação com a resina. Novamente, não foi detectada presença de proteína ou inibição nas frações coletadas na etapa de regeneração da coluna utilizando solução de EDTA. Este ensaio tratou-se apenas de uma confirmação da não retenção de aprotinina em resinas IMAC, uma vez que outros autores já haviam constatado este fato (Boden, 1992; Tamagawa, 1999 e Genaro e colaboradores, 2002). Constatado que, ao contrário do ITM, a aprotinina não foi adsorvida pela coluna, o passo subsequente foi realizar uma cromatografia com uma mistura “artificial” contendo aprotinina comercial e ITM. O cromatograma pode ser visto na Figura 7.5.

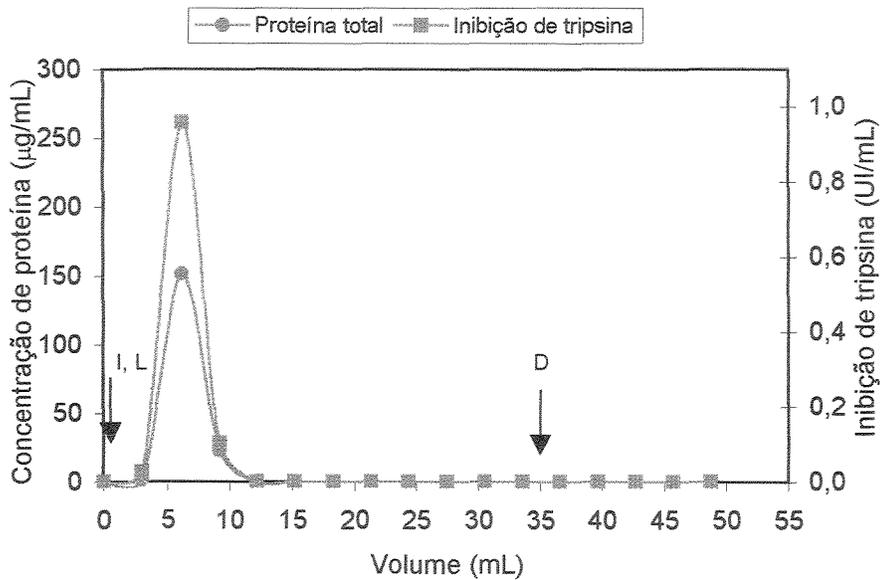


Figura 7.4 – Cromatograma obtido após injeção de aprotinina de alta pureza em coluna IMAC contendo cobre imobilizado, utilizando tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 mM. O pico indica a aprotinina injetada não e adsorvida pela coluna. I, L e D indicam as etapas de injeção da amostra, lavagem e dessorção, respectivamente.

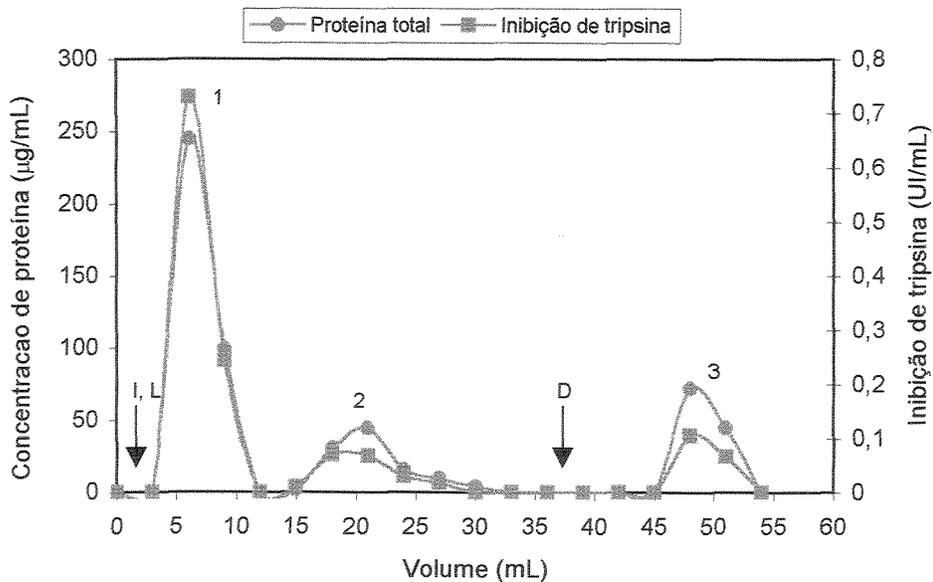


Figura 7.5 – Cromatograma obtido após injeção de mistura artificial de aprotinina e ITM em coluna IMAC. O pico 1 e 2 indicam, respectivamente, as proteínas que não foram adsorvidas pela coluna e as que a deixaram durante a lavagem. O pico 3 indica as proteínas dessorvidas com gradiente de imidazol. I, L e D indicam as etapas de injeção da amostra, lavagem e dessorção, respectivamente.

Esta cromatografia apresentou uma modificação no perfil cromatográfico anteriormente encontrado, com o aparecimento de um pico intermediário de proteína e inibição, na etapa de lavagem das proteínas não adsorvidas. As frações contendo proteína (referentes aos três picos) foram analisadas em SDS-PAGE. O resultado é apresentado na Figura 7.6. Apesar de o gel utilizado não se mostrar adequado à visualização de proteínas de baixa massa molecular, as pistas indicam a separação entre aprotinina e inibidor de tripsina, com a aprotinina saindo basicamente no primeiro pico (pista 3), revelada pela banda intensa em 6,5 kDa. A diferença no perfil de eletroforese das bandas relativas aos picos 2 e 3 (pistas 4 e 5, respectivamente) indicam ainda que os inibidores de tripsina na forma “intacta” e “hidrolisada” interagem diferentemente com a resina no interior da coluna.

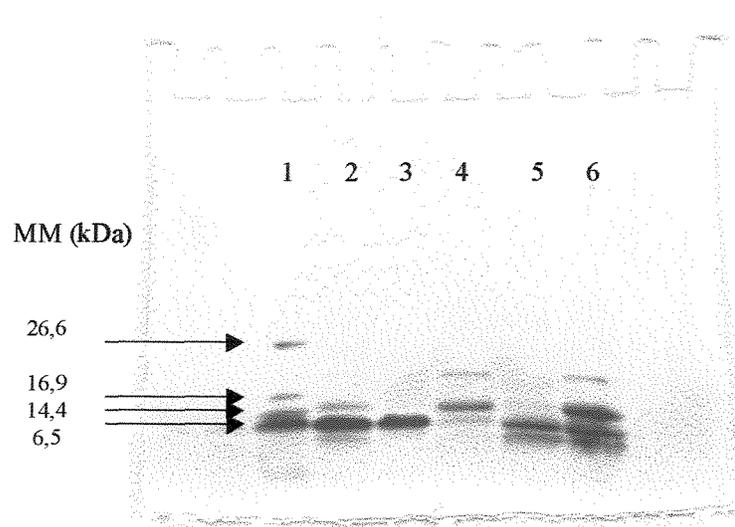


Figura 7.6 – Eletroforese SDS-PAGE da cromatografia IMAC da solução artificial de aprotinina e ITM. **Pista 1** – marcador de massa molecular; **Pista 2** – solução de inibidores injetada (15 μg de proteína); **Pista 3** – proteínas contidas no primeiro pico (7 μg de proteína); **Pista 4** – proteínas contidas no segundo pico (lavagem) (7 μg de proteína); **Pista 5** – proteínas contidas no terceiro pico (eluição) (10 μg de proteína) e **Pista 6** – inibidor de tripsina do milho (16 μg de proteína). Gel com gradiente de acrilamida de 4 a 20% em tampão tris/HCl.

Estudos apresentados na literatura (Mahoney e colaboradores, 1983) mostraram que parte do ITM recuperado na coluna de tripsina é hidrolisado pela enzima,

mantendo contudo a capacidade de inibição. O ITM que sofre este processo apresenta-se como duas bandas nos ensaios de SDS-PAGE em meio redutor devido ao rompimento das pontes de dissulfeto que mantinham as duas cadeias da molécula unidas. Contudo, a causa desta diferença de interação com o aparecimento do pico intermediário quando da presença de aprotinina na solução não foi determinada.

Para a superação do problema de baixa intensidade de interação do ITM com a resina IMAC, decidiu-se pela substituição da resina de poli-estireno-divinil-benzeno, com grupos funcionais imidodiacetato, pela resina de agarose reticulada cujo grupo funcional responsável pela interação com o metal é o ácido iminodiacético (IDA). Além da possibilidade de interação mais forte do metal com a proteína, esta resina apresenta vantagens com relação ao baixo custo e disponibilidade no mercado para larga escala.

Uma vez que as isotermas de adsorção e os ensaios cromatográficos com mistura binária contendo aprotinina e ITM indicaram ser viável a separação destes dois inibidores via IMAC, partiu-se para o estudo da separação entre aprotinina recombinante e ITM provenientes de extrato de milho transgênico. Para tanto, um combinado de frações coletadas na etapa de eluição da cromatografia de afinidade contendo a aprotinina recombinante e o ITM foi injetado na coluna de agarose-IDA contendo íons cobre imobilizados. Neste combinado, as duas primeiras frações contendo proteínas coletadas durante a eluição da coluna de afinidade foram descartadas, pois o ensaio ELISA mostrou que continham baixa concentração de aprotinina recombinante. A Figura 7.7 apresenta os resultados das análises de proteína total, inibição de tripsina e concentração de aprotinina recombinante obtidos. Inibição de tripsina foi encontrada tanto nas frações correspondentes às proteínas não adsorvidas como nas frações correspondentes às proteínas adsorvidas e posteriormente eluídas da coluna (Figura 7.7a). Contudo, a aprotinina recombinante foi praticamente toda recuperada nas frações contendo as proteínas não adsorvidas (Figura 7.7b). Menos de 1% da aprotinina injetada foi detectada nas frações de eluição. Os balanços de inibição de tripsina e de massa de aprotinina nesta etapa de purificação foram de 97% e 81%, respectivamente.

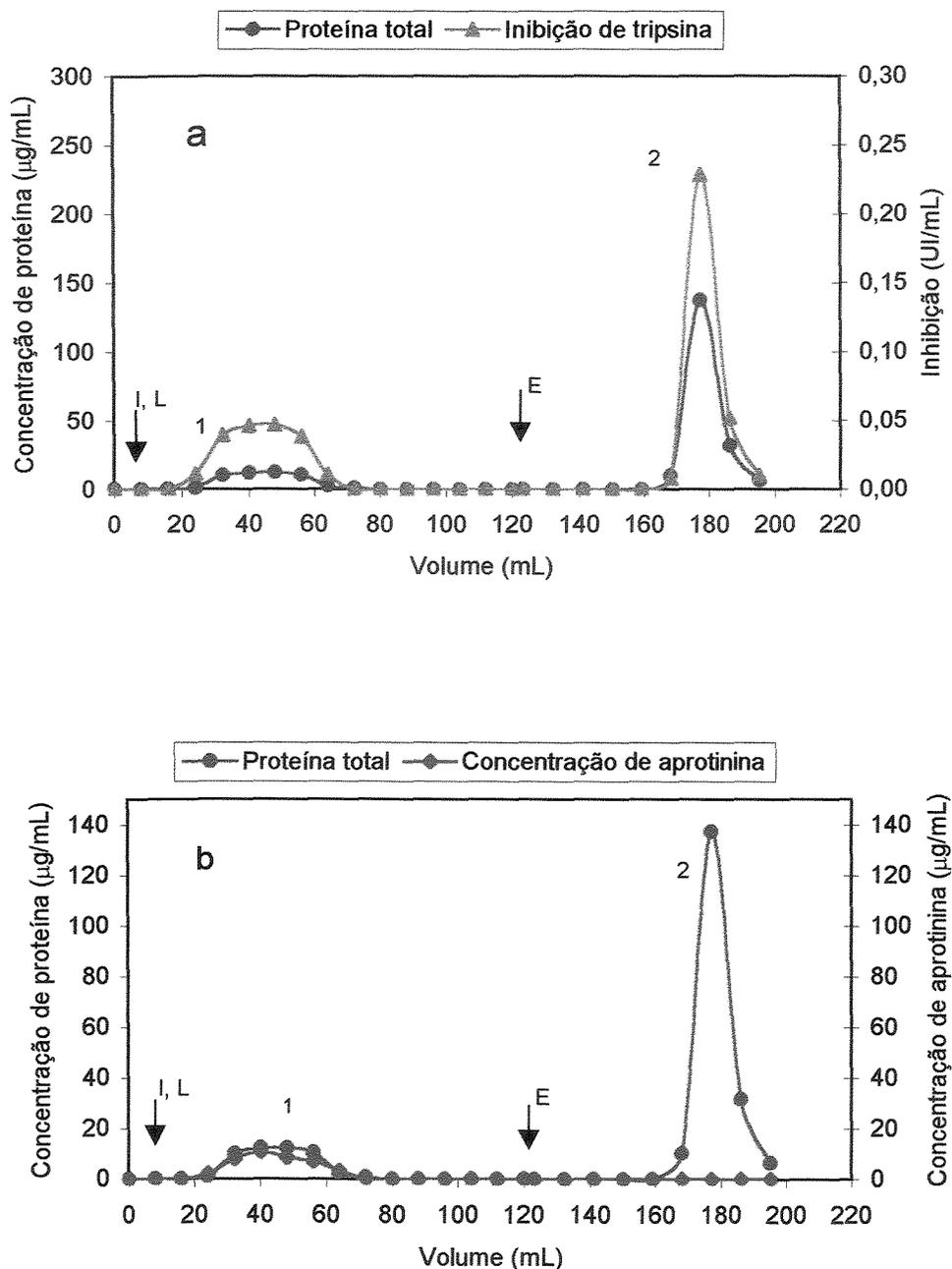


Figura 7.7 – a) Perfis de proteína total e inibição de tripsina das frações coletadas durante a cromatografia em metal imobilizado; e **b)**– Perfis de proteína total e concentração de aprotinina obtidos na mesma cromatografia. Uma amostra de 34 mL foi injetada e a coluna foi lavada com tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M. A eluição foi feita através de gradiente de imidazol no mesmo tampão. I, L e E indicam o início das etapas de injeção, lavagem e eluição, respectivamente.

No que diz respeito ao processo como um todo, envolvendo as cromatografias de afinidade e IMAC, a recuperação e o fator de purificação do processo foram de 49% e 280, respectivamente (Tabela VIII).

As amostras das cromatografias de afinidade e IMAC foram analisadas através de SDS-PAGE e a imagem do gel obtido é apresentada na Figura 7.8. Nesta figura, a pista 4 mostra a aprotinina recombinante purificada. A pista 5 indica que as frações coletadas durante o procedimento de eluição da coluna IMAC contém basicamente ITM em suas formas intacta e hidrolisada (resultado da interação com a tripsina na etapa de adsorção por afinidade; Mahoney e colaboradores, 1984). Uma fraca banda correspondendo a uma proteína de aproximadamente 24 kDa também pode ser vista no gel SDS-PAGE (pista 5). Esta banda parece corresponder a pequenas frações de tripsina liberada pela coluna de afinidade (desprendimento de ligante), como já foi reportado anteriormente por Lei e Reeck (1986). Já que a tripsina é adsorvida por cobre imobilizado (Tamagawa, 1999), o uso do IMAC após a etapa de adsorção em tripsina imobilizada pode resolver este inconveniente no processo de purificação da aprotinina recombinante.

Tabela VIII – Balanços de massa e inibição de tripsina para a purificação da aprotinina recombinante (rAprotinina), a partir do extrato da semente de milho, através das cromatografias de afinidade e IMAC.

Etapa	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Inibição total (IU)	rAprotinina (mg)	rAprotinina (%)	Fator de purificação
Extração	775	225	17	0,64	100	1
Afinidade						
Eluição	48	4,8	14	0,46	71	33
IMAC						
Injeção	34	2,2	4,3	0,39	61	62
Lavagem	48	0,39	1,5	0,31	49	280
Eluição	39	1,7	2,7	0,002	0,30	-

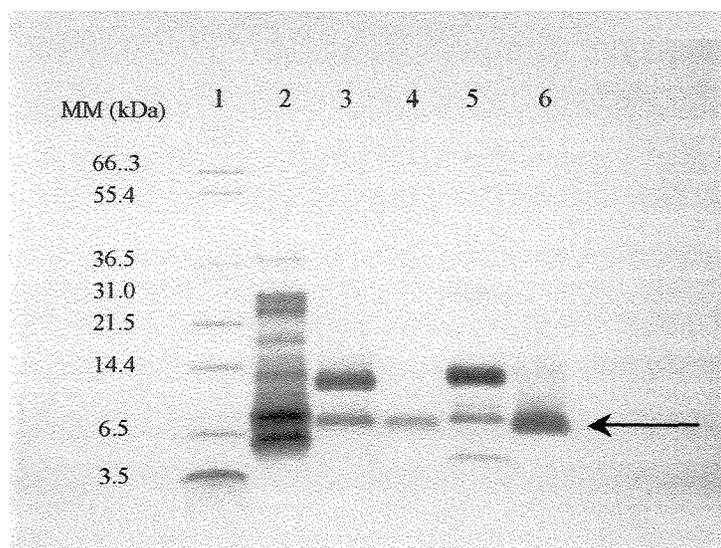


Figura 7.8 – Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas durante as cromatografias de afinidade e IMAC. **Pista 1** – marcador de massa molecular; **Pista 2** – proteínas extraídas do milho e injetas na coluna de afinidade (22 μg de proteínas); **Pista 3** – proteínas eluídas da coluna de afinidade e injetadas na coluna IMAC (10 μg de proteínas); **Pista 4** – proteínas não adsorvidas pela coluna IMAC – aprotinina recombinante (pico 1) (3 μg de proteínas); **Pista 5** – proteínas contidas no pico de dessorção da coluna IMAC (14 μg de proteínas); e **Pista 6** – aprotinina comercial (seta) (6,5 μg de proteínas). Gel com gradiente de acrilamida de 10 a 20% em tampão tris/tricina.

As frações contendo aprotinina recombinante purificada foram combinadas e uma amostra foi enviada para seqüenciamento dos aminoácidos N-terminais (10 ciclos) e análise por HPLC no Departamento de Química da Texas A & M University. O resultado encontrado para a aprotinina recombinante e a seqüência de aminoácidos da aprotinina bovina (não recombinante) são apresentados na Tabela IX. O seqüenciamento indica que a aprotinina recombinante purificada apresenta seqüência idêntica à da aprotinina bovina não recombinante. A letra X correspondendo ao 5º aminoácido da seqüência denota a não detecção de um aminoácido no referido ciclo. Uma vez que a amostra de aprotinina enviada não foi alquilada, este provavelmente corresponde ao aminoácido cisteína (alquilação é necessária para a detecção de cisteínas pelo método de Edman). Já a análise por HPLC (fase reversa em coluna C18) indicou uma pureza da aprotinina recombinante de 97%.

Tabela IX – Seqüência de aminoácidos (N-terminal) da aprotinina bovina e recombinante.

Proteína	Seqüência do N-terminal
Aprotinina bovina	RPDFCLEPPY
Aprotinina recombinante	RPDFXLEPPY

'X' denota a não detecção de um aminoácido no referido ciclo.

7.2.2. Separação de Aprotinina e ITM Através de Adsorção em Resina de Troca Iônica

O próximo passo para se desenvolver um segundo possível processo de purificação da aprotinina recombinante foi o estudo da separação entre aprotinina e ITM através do uso de adsorção em resina trocadora de cátions. Estudos preliminares utilizando mistura artificial de aprotinina e ITM efetuados na ProdiGene Inc., EUA, apontaram para a viabilidade desta separação (Zivko L. Nikolov, comunicação pessoal), indicação confirmada através da construção das isotermas de adsorção. No caso da adsorção em resina trocadora de cátions, ao contrário da adsorção em metal imobilizado, buscou-se adsorver a aprotinina na resina, sendo assim separada do ITM, que não adsorve nas condições estabelecidas. Procurou-se para tanto a utilização na etapa de adsorção de um valor de pH intermediário entre o pI mais elevado das variantes de ITM (7,7) e o pI da aprotinina (10,0). As condições e tipo de tampão utilizados, tampão tris 20 mM pH 8,5, foram os determinados através dos estudos das isotermas de adsorção (Capítulo 6, item 6.2.3.).

Como no caso anterior, a amostra contendo ITM e aprotinina recombinante consistiu de um combinado de frações da etapa de eluição da cromatografia de afinidade no qual as duas primeiras frações contendo proteína foram descartadas, pois continham baixa concentração de aprotinina recombinante. Como o mesmo procedimento foi realizado nos estudos com IMAC, mantém-se assim a similaridade entre as amostras utilizadas na segunda etapa cromatográfica estudada, seja por IMAC ou troca-iônica.

A Figura 7.9 apresenta o cromatograma obtido para a cromatografia de troca iônica (etapas de lavagem e eluição). Novamente, as frações coletadas foram analisadas quanto à concentração de proteína, inibição de tripsina e concentração de aprotinina. As análises das frações coletadas mostraram que, apesar de 68% da inibição de tripsina injetada passar diretamente pela coluna sem adsorver, apenas 2% da aprotinina injetada foi encontrada nestas frações. Um único pico de proteína contendo a aprotinina purificada foi obtido na etapa de eluição (Figura 7.9b).

Frações coletadas nas diversas etapas deste segundo processo de purificação foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE (Figura 7.10). O típico “padrão” eletroforético de três bandas do ITM pode ser visto na pista 3, correspondendo às proteínas recuperadas na etapa de cromatografia de afinidade. As três bandas correspondem ao inibidor em suas formas “íntacta” e “hidrolisada”. Os polipeptídios da cadeia do ITM, que foi hidrolisado pela tripsina da etapa cromatográfica anterior, possuem massas moleculares estimadas em 5,5 e 7,5 kDa, e são separados por efeito do meio redutor do SDS-PAGE. Nesta pista 3, a aprotinina recombinante apresenta-se como uma banda bem fraca, não diferenciada do fragmento maior do ITM, devido a baixa concentração no extrato. A pista 4, com as proteínas não adsorvidas pela resina de troca-iônica, apresenta basicamente as bandas do ITM, enquanto a banda da aprotinina recombinante purificada pode ser vista na pista 5 (eluição). Amostras de aprotinina recombinante purificada por IMAC e aprotinina comercial também foram carregadas (pistas 6 e 7, respectivamente). O resultado indica um nível de pureza semelhante entre as amostras de aprotinina recombinante purificadas pelos dois diferentes métodos: IMAC e troca-iônica. A Tabela X apresenta os resultados da purificação (balanços de inibição de tripsina e de massa, além de fatores de purificação) obtidos neste segundo processo desenvolvido (cromatografia de afinidade seguida de cromatografia de troca iônica).

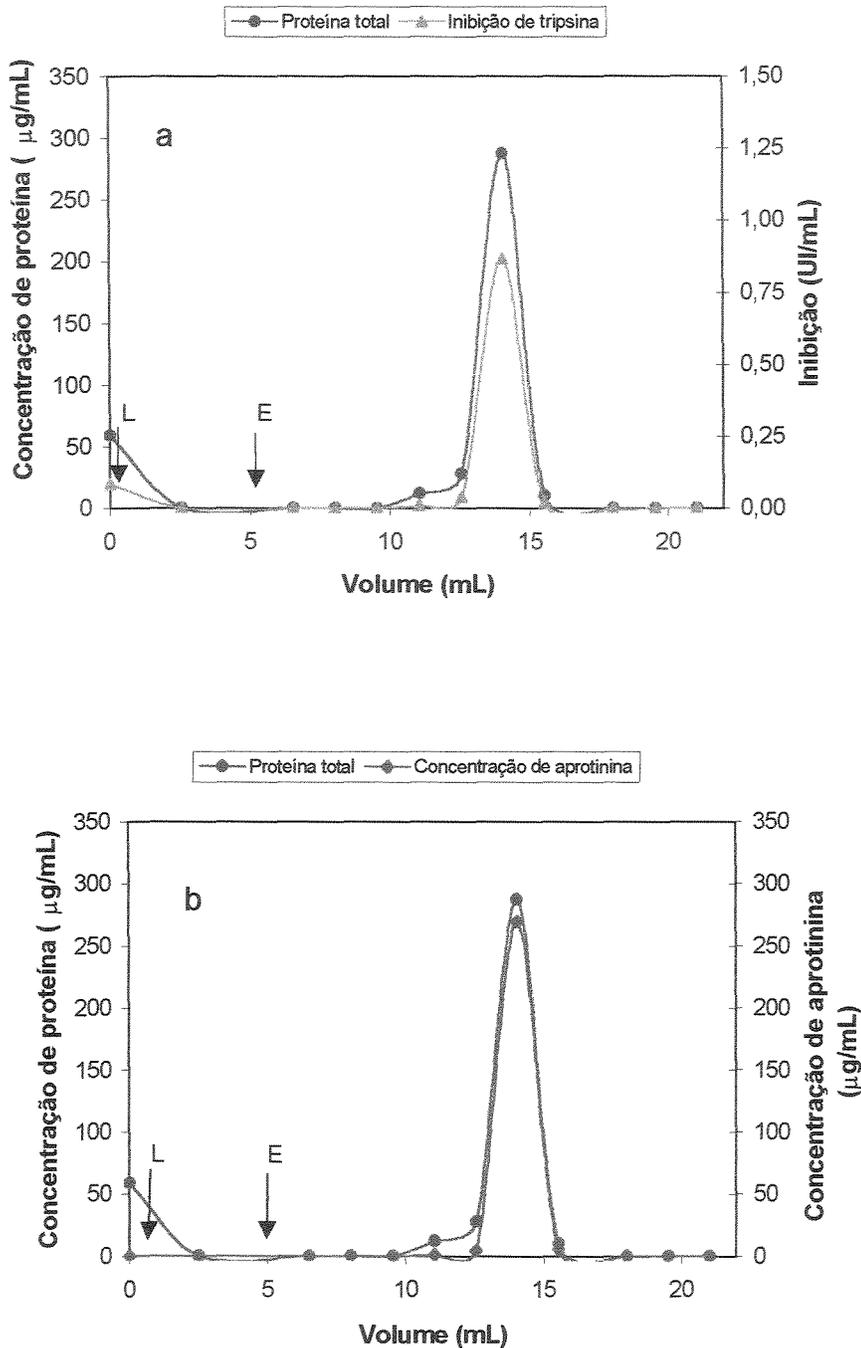


Figura 7.9 – Cromatogramas da cromatografia de troca-iônica. **a)** Perfis de proteína total e inibição de tripsina nas etapas de lavagem (L) e eluição (E); **b)** perfis de proteína total e concentração de aprotinina para a mesma cromatografia. Um combinado de frações de 34 mL, coletadas durante a etapa de eluição da cromatografia de afinidade, foi injetada. A lavagem foi efetuada com tampão tris 20 mM pH 8,5 e a eluição foi feita através de gradiente de NaCl no mesmo tampão.

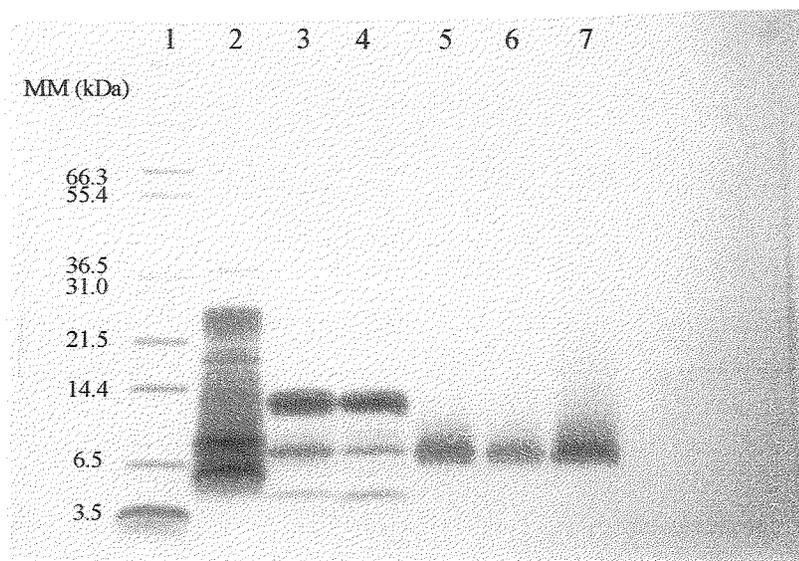


Figura 7.10 – Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas durante as cromatografias de afinidade e troca-iônica. **Pista 1** - marcador de massa molecular; **Pista 2** – proteínas extraídas do milho e injetas na coluna de afinidade (20 μg de proteínas); **Pista 3** – proteínas eluídas da coluna de afinidade e injetadas na coluna de troca-iônica (10 μg de proteínas); **Pista 4** – proteínas não adsorvidas pela coluna de troca iônica (10 μg de proteínas); **Pista 5** – proteínas contidas no pico de eluição da coluna de troca-iônica (aprotinina recombinante) (4 μg de proteínas); **Pista 6** – aprotinina recombinante purificada por IMAC (3 μg de proteínas); e **Pista 7** – aprotinina comercial (6,5 μg de proteínas). Gel com gradiente de acrilamida de 10 a 20% em tampão tris/tricina.

No experimento apresentado, a eficiência de recuperação da aprotinina recombinante na primeira etapa (cromatografia de afinidade) foi baixa (40%), resultado inferior à média de recuperação desta etapa (60%), calculada a partir de 5 experimentos. Contudo, a eficiência de recuperação da aprotinina na segunda etapa (troca iônica) foi alta, como também o foi na cromatografia IMAC, apresentada anteriormente. A recuperação calculada em 125% está claramente superestimada, muito provavelmente como resultado de imprecisões no ensaio ELISA utilizado na quantificação da aprotinina recombinante. No entanto, os resultados apresentados na Tabela X juntamente com resultados de eletroforese SDS-PAGE permitem supor que

as eficiências de recuperação e os fatores de purificação, em ambos os processos (rotas) de recuperação e purificação da aprotinina recombinante estudados, foram semelhantes. Neste caso, a escolha do método mais adequado de purificação final a ser utilizado em um processo em larga escala (IMAC ou troca iônica) será baseada em fatores econômicos, ou ainda se a co-purificação do ITM é de interesse ou não. Vale ressaltar que uma forte vantagem da troca iônica como segunda etapa está no fato de promover captura e concentração da proteína alvo, ao contrário do IMAC, que promove certa diluição daquela proteína.

Tabela X – Balanços de massa e inibição de tripsina para a purificação da aprotinina recombinante (rAprotinina), a partir do extrato da semente de milho, através das cromatografias de afinidade e troca iônica.

Etapa	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Inibição total (IU)	rAprotinina (mg)	rAprotinina (%)	Fator de purificação
Extração	1500	632	27	1,12	100	1
Afinidade						
Eluição	39	7,7	15	0,44	40	32
Troca iônica						
Injeção	52*	3,9	6,5	0,34	30	49
Lavagem	52	3,1	4,4	0,01	1	-
Eluição	6	0,5	1,4	0,42	37	465

* Frações #20 a #30 da etapa de eluição da cromatografia de afinidade foram diluídas na proporção 1:1 em tampão tris 40 mM pH 8,5 para injeção na coluna de troca iônica.

7.4. Estudos de Processos Alternativos para a Recuperação da Aprotinina

As duas rotas cromatográficas apresentadas anteriormente mostraram ser possível recuperar e purificar a aprotinina recombinante a partir do extrato da semente transgênica. Contudo, a desvantagem principal dos processos estudados deve-se à utilização da cromatografia de afinidade (resina de agarose-tripsina) na primeira etapa de ambos os processos. A presença do ITM, juntamente com a aprotinina, no extrato

de semente transgênica faz com que volumes grandes de resina sejam necessários para a captura e concentração dos inibidores nesta primeira etapa, desvantagem considerável devido ao alto custo da resina de afinidade. Neste tópico, apresentam-se estudos que visaram a avaliar a utilização da cromatografia de troca iônica e do IMAC como primeira etapa de processo, na função de captura e concentração da aprotinina recombinante ou eliminação de ITM e outras impurezas do extrato.

7.4.1. Estudo de Recuperação de Aprotinina Utilizando Resina Trocadora de Íons

Como consequência da eficiente separação entre aprotinina e ITM obtida nos estudos utilizando resina trocadora de cátions, decidiu-se avaliar a utilização da troca iônica como etapa inicial de recuperação da aprotinina recombinante diretamente do extrato de proteínas do milho. Dada a baixa concentração de aprotinina e proteínas em geral no extrato da semente, utilizou-se uma etapa de concentração da solução através de ultrafiltração em membrana de 1 kDa. No que diz respeito à produção em larga escala da aprotinina recombinante, uma etapa de concentração do inibidor como esta dificilmente poderá ser evitada. A baixa concentração e grande volume de extrato a ser injetado na primeira etapa cromatográfica tornariam o tempo de injeção demasiado longo, além de dificultar fatores como estocagem e manipulação entre as etapas. O fator de concentração alcançado foi de 7,6 vezes, obtendo-se concentrações finais de aprotinina e proteína total de 2,7 $\mu\text{g/mL}$ e 1,5 mg/mL , respectivamente.

O extrato concentrado foi carregado na coluna e os perfis de proteína total, inibição de tripsina e concentração de aprotinina recombinante obtidos podem ser vistos na Figura 7.11. Como esperado, o inibidor de tripsina do milho não foi adsorvido pela coluna, sendo que grande parte da inibição de tripsina manteve-se junto às proteínas que passaram diretamente pela coluna (Figura 7.11a). A eluição da coluna, efetuada através de gradiente de NaCl indicou que grande parte das proteínas adsorvidas na resina foi eluída a baixa concentração de sal, tendo, portanto, interagido fracamente com a resina.

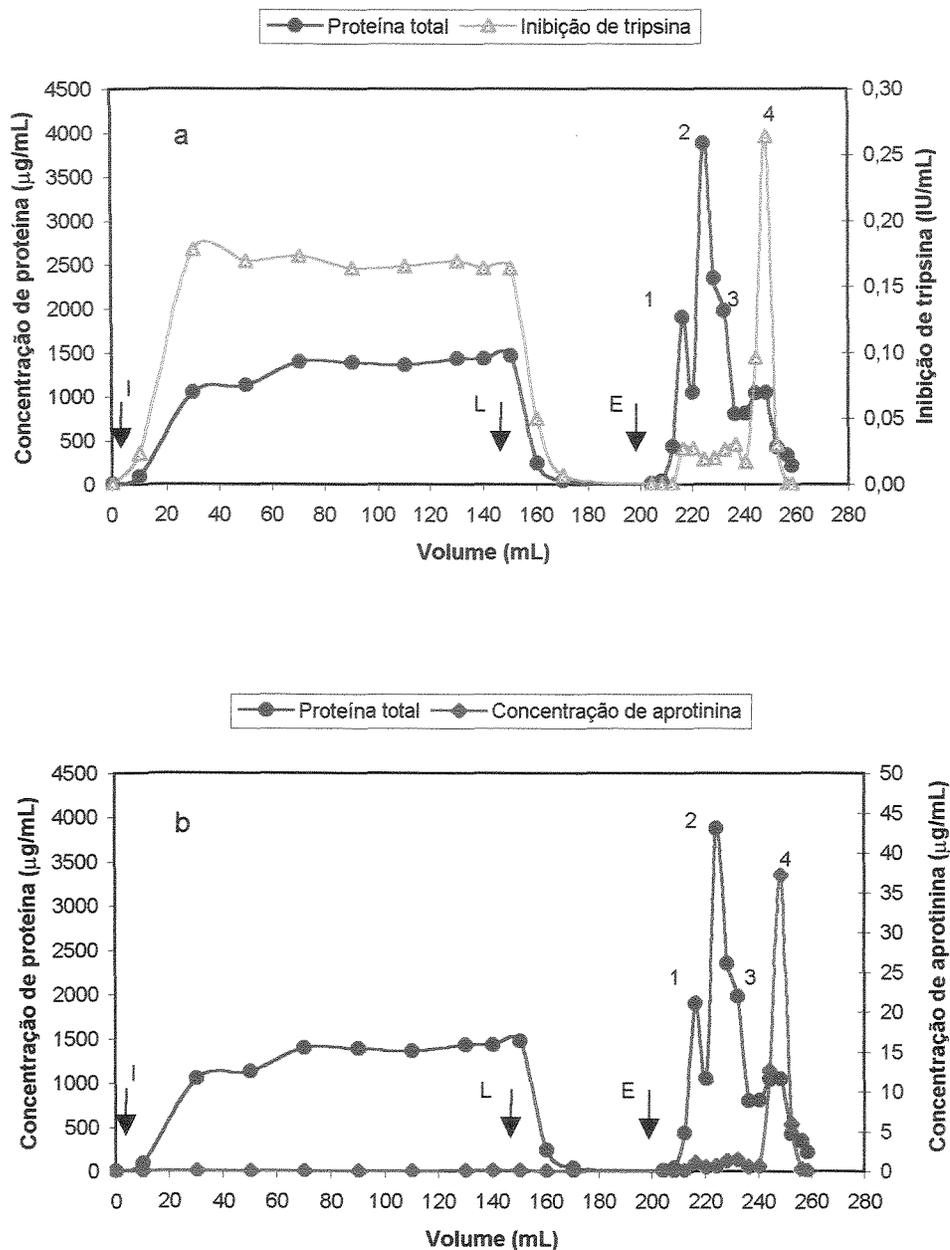


Figura 7.11 – Cromatografia de troca-iônica do extrato de semente (concentrado) em resina SP Sepharose Fast Flow; **a)** perfis de proteína total e inibição de tripsina nas etapas de injeção (I), lavagem (L) e eluição (E); e **b)** Perfis de proteína total e concentração de aprotinina para a mesma cromatografia. Um volume de 145 mL de extrato de proteínas concentrado 7,6 vezes através de ultrafiltração em membrana de 1 kDa foi carregado na coluna. A lavagem foi efetuada com tampão tris 20 mM pH 8,5 e a eluição foi feita através de gradiente de cloreto de sódio no mesmo tampão.

Quatro picos contendo proteína (não completamente resolvidos) foram observados na etapa de eluição, correspondendo a 30% da proteína total injetada. O ensaio de determinação de aprotinina mostrou que esta foi recuperada com uma eficiência de 64% (pico 4, Figura 7.11b), sendo eluída da coluna a altas concentrações de NaCl. Se consideradas as três frações de eluição contendo aprotinina em maior concentração e correspondendo a 57% da aprotinina inicial, o fator de purificação da aprotinina obtido na etapa foi de 12 vezes (aumento de 0,18 % para 2,2 % da fração mássica de aprotinina em relação à proteína total).

A Figura 7.12 apresenta o perfil das proteínas obtidas nos diversos picos da etapa de eluição da cromatografia quando analisados através de SDS-PAGE. Como a eluição foi efetuada através de gradiente de cloreto de sódio, o gel indica a intensidade de interação entre as diversas proteínas do milho com a resina catiônica, sendo que os primeiros picos da eluição dizem respeito às proteínas que interagem mais fracamente com a resina. A aprotinina recombinante foi recuperada em conjunto com, ao menos, uma outra proteína do milho, de massa molecular próxima de 5 kDa (pista 7). Por terem sido eluídas em altas concentrações de NaCl, estas proteínas foram as que interagiram mais fortemente com a resina no interior da coluna. A banda da aprotinina não pode ser claramente visualizada na pista 7 do gel, devido a sua baixa concentração nesta amostra.

No caso da cromatografia aqui apresentada, a resina não chegou a ser saturada, não sendo, portanto, determinada a capacidade da resina. Contudo, ensaios preliminares de adsorção indicaram que a aprotinina pode ser deslocada da coluna caso esta venha a ser saturada (dados não apresentados). É possível que a proteína de pequena massa molecular observada na Figura 7.12 (pista 7) interaja mais fortemente com a resina do que a aprotinina, passando a deslocá-la a partir do ponto em que a coluna seja saturada. Nesse caso, o conhecimento da capacidade máxima da coluna tendo o extrato como alimentação é muito importante para a eficiência da recuperação. Quanto à purificação final da aprotinina recombinante, esta poderia ser obtida através do uso de cromatografia de afinidade em tripsina imobilizada, já que o

ITM aparentemente não está presente na solução. A principal vantagem deste processo seria a diminuição do volume de resina de afinidade e, portanto do custo do processo já que o ITM, presente na semente em concentrações maiores que a aprotinina, seria eliminado na etapa de troca iônica.

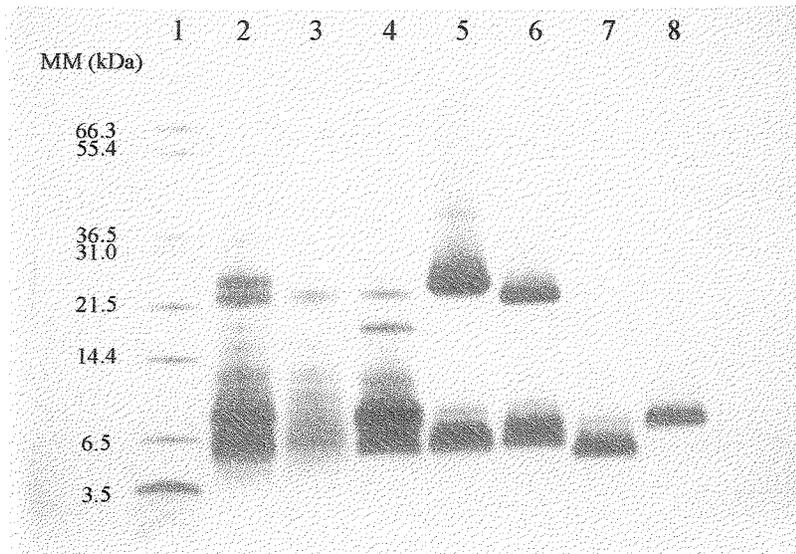


Figura 7.12 – Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas durante a cromatografia de troca-iônica utilizando extrato da semente. **Pista 1** - marcador de massa molecular; **Pista 2** – proteínas extraídas do milho e injetas na coluna de troca-iônica (20 μ g de proteínas); **Pista 3** – proteínas que passaram diretamente pela coluna sem adsorver (12 μ g de proteínas); **Pista 4** – proteínas eluídas no pico 1 (Figura 7.11) (20 μ g de proteínas); **Pista 5** – proteínas eluídas no pico 2 (20 μ g de proteínas); **Pista 6** – proteínas eluídas no pico 3 (14 μ g de proteínas); **Pista 7** – proteínas eluídas no pico 4 (6 μ g de proteínas); e **Pista 8** – aprotinina comercial (5 μ g de proteínas). Gel com gradiente de acrilamida de 10 a 20% em tampão tris/tricina.

7.4.2. Estudo de Adsorção de ITM e Proteínas da Sementes em Resina IMAC

Experimentos utilizando a cromatografia em íon metálico imobilizado (IMAC) como primeira etapa de um processo de purificação da aprotinina recombinante foram realizados visando a remoção do inibidor de tripsina do milho (ITM) e outras impurezas logo na primeira etapa do processo. Neste caso, buscou-se avaliar a adsorção do ITM e outras proteínas na resina IMAC, sendo a aprotinina coletada no “flowthrough”,

conceito conhecido como cromatografia negativa. A principal vantagem desta abordagem seria a redução dos custos de um processo em larga escala pela substituição da etapa inicial de cromatografia de afinidade em resina de agarose-tripsina. Além disso, este estudo vem gerar conhecimento sobre a adsorção de proteínas provenientes da semente de milho em um íon metálico imobilizado (Cu^{2+}). Esta técnica tem sido apontada como de grande potencial na recuperação e purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas, especialmente as proteínas recombinantes com caudas de histidina (Zhang, 1999). Informações sobre sua utilização para a recuperação de proteínas do extrato de sementes de milho não foram encontradas por nós na literatura. Assim, uma amostra proveniente de extração a pH 3,0, utilizando farinha de milho não recombinante, foi carregada na coluna contendo íons cobre imobilizados (Figura 7.13).

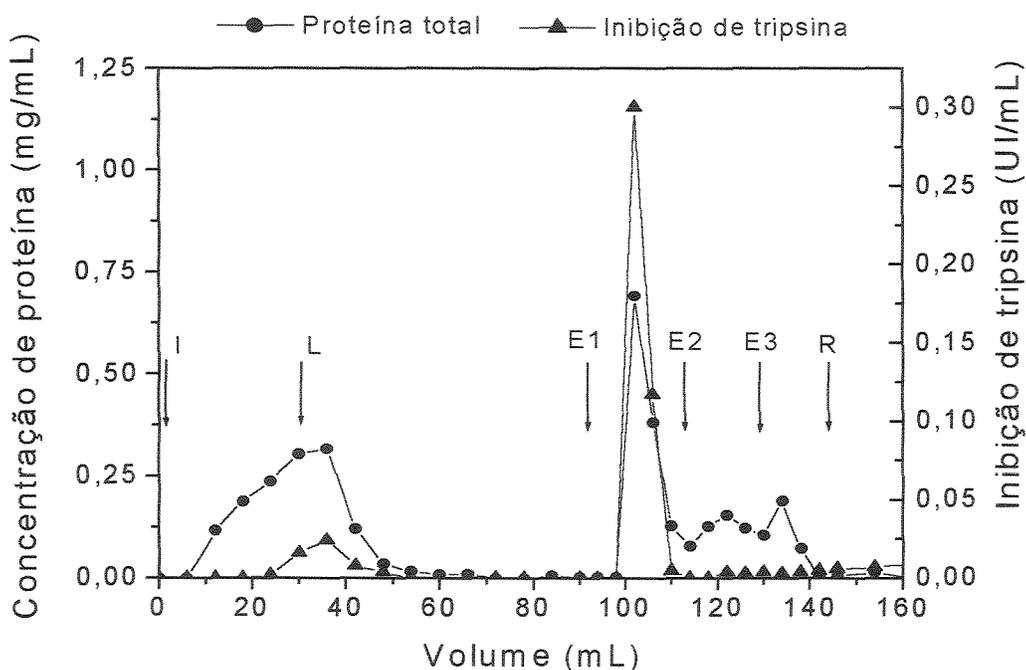


Figura 7.13 – Cromatografia em metal imobilizado da amostra de extração da semente de milho. Um volume de amostra de 30 mL foi injetado e a coluna foi lavada com tampão NaPi 50 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M. A eluição foi feita através de degraus de imidazol no mesmo tampão. I, L e E e R indicam o início das etapas de injeção, lavagem, eluição e regeneração, respectivamente. Na etapa de eluição, E1 E2 e E3 correspondem a concentrações de imidazol de 10, 30 e 100 mM, respectivamente.

A massa de proteínas da amostra injetada foi próxima daquela esperada para se atingir a saturação da coluna, baseada na capacidade da coluna para a adsorção de ITM (32,8 mg/mL de resina, Figura 6.7). O perfil cromatográfico resultante da análise de proteína total e inibição de tripsina das frações coletadas em todas as etapas indica que o ITM e algumas outras proteínas do extrato foram adsorvidos na resina.

Pode-se observar no gel de eletroforese (Figura 7.14) que a banda relativa ao ITM (entre 14 e 15 kDa) não aparece na amostra do p combinado de frações que passou pela coluna sem adsorver. Contudo as cromatografias também indicaram que capacidade máxima de adsorção da resina foi bastante reduzida quando da utilização do extrato se comparada com a capacidade da mesma para o ITM puro. Foi observada a perda de ligantes (íons cobre) durante os processos de injeção da amostra e a massa de proteínas adsorvida foi apenas em torno de 10% daquela esperada (32,8 mg/mL). É provável que compostos não identificados presentes no extrato estejam deslocando os íons metálicos adsorvidos e também dificultando a interação das proteínas.

Apesar das dificuldades encontradas na etapa de adsorção, dois tipos de perfis de eluição foram estudados, um utilizando uma única etapa (realizada com 100 mM de imidazol) e outro utilizando três etapas, em concentrações crescentes de imidazol (gradiente em “degrau”). O objetivo foi avaliar a viabilidade de eluir o ITM adsorvido na maior pureza possível. Algum sucesso foi alcançado quando gradiente em degrau foi utilizado (Figura 7.13), uma vez que o tampão contendo 10 mM de imidazol foi suficiente para eluir todo o ITM (concentrações mais altas de imidazol eluíram proteínas sem capacidade de inibição), mas o fator de purificação obtido ainda assim foi baixo (2,3). Tais resultados indicam que estudos mais detalhados precisariam ser desenvolvidos para avaliar os problemas de perda de ligantes e baixa capacidade da resina IMAC quando utilizada como adsorvente na primeira etapa de um processo de RPB a partir de sementes de milho. Vale salientar que tais dificuldades não foram encontradas quando a resina foi utilizada como etapa final, ou de “polimento”, do processo, como apresentado anteriormente.

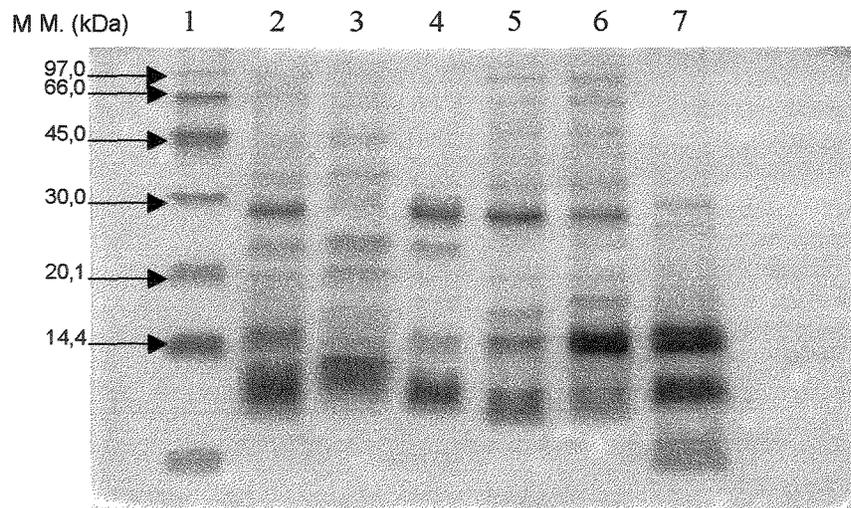


Figura 7.14 – Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas durante a cromatografia IMAC. **Pista 1** - marcador de massa molecular; **Pista 2** – proteínas extraídas do milho e injetas na coluna; **Pista 3** – proteínas que passaram diretamente pela coluna sem adsorver; **Pista 4** – proteínas que deixaram a coluna na etapa de lavagem; **Pista 5** – proteínas eluídas a 100 mM imidazol sem o uso de gradiente; **Pista 6** – proteínas eluídas no pico principal quando utilizando gradiente de imidazol (Figura 7.13); **Pista 7** – ITM purificado por cromatografia de afinidade (agarose-tripsina). Gel com concentração de acrilamida de 15% em tampão tris/HCl.

7.5. Conclusão dos Estudos de Purificação Cromatográfica da Aprotinina Recombinante

Os estudos aqui apresentados, mostraram que a aprotinina recombinante pode ser recuperada e purificada a partir do extrato de milho transgênico utilizando-se duas diferentes rotas ou processos cromatográficos: 1) cromatografia em coluna de agarose-tripsina seguida de cromatografia IMAC e; 2) cromatografia em coluna de agarose-tripsina seguida de cromatografia em coluna de troca iônica. Em ambas as rotas, a aprotinina foi capturada e concentrada na primeira etapa, sendo em seguida separada do ITM na segunda etapa. Altos índices de pureza da aprotinina foram alcançados em ambas as rotas como indicado pelos géis de eletroforese SDS-PAGE, análise de HPLC e atividade de inibição específica. Os resultados do seqüenciamento N-terminal da aprotinina recombinante também indicam a elevada pureza final. Uma desvantagem de

ambas as rotas citadas diz respeito ao uso da cromatografia de afinidade em resina de agarose-tripsina. É de conhecimento geral que tais resinas são frágeis e possuem um relativo alto custo. Os resultados de utilização da resina de troca iônica (SP Sepharose) indicam que esta pode substituir a resina de afinidade na etapa de captura e concentração da aprotinina recombinante.

No que diz respeito à viabilidade do processo para a produção comercial da aprotinina recombinante, um estudo de viabilidade econômica precisaria ser desenvolvido. Contudo, fomos informados que a empresa detentora dos direitos de produção do milho transgênico utilizado neste trabalho (ProdiGene Inc., EUA) já conseguiu aumentar o nível de expressão da aprotinina recombinante em mais de 20 vezes e planeja lançar o produto no mercado ainda em 2002 (Zivko L. Nikolov, comunicação pessoal).

Pode-se concluir deste estudo que a aprotinina pode ser eficientemente recuperada e purificada a partir de sua fonte – semente de milho transgênico – utilizando-se diferentes processos cromatográficos. Tais processos são aqueles já utilizados na produção comercial de inúmeras proteínas, o que indica que o uso da semente de milho como biorreator é viável e não implica, necessariamente, no emprego ou desenvolvimento de técnicas complexas de purificação.

CAPÍTULO 8

CONCLUSÃO

Informações sobre a utilização de sementes de milho como biorreatores para a produção de proteínas recombinantes são raras na literatura. Este trabalho objetivou estudar diversos fatores importantes à recuperação e purificação de uma proteína recombinante – aprotinina – produzida em semente de milho, paralelamente levantando-se importantes informações gerais relativas ao tema.

Mostrou-se, primeiramente, que a aprotinina recombinante é acumulada em maior concentração no embrião da semente. Contudo, pelo fato de também ser estocada no endosperma e este tecido contribuir com aproximadamente 80% da massa da semente, faz-se necessário o processamento e utilização da semente toda, e não apenas o embrião, como matéria prima do processo de recuperação e purificação. Os mesmos estudos realizados para o ITM, principal competidor da aprotinina no processo de purificação, indicaram resultados semelhantes aos encontrados para a aprotinina.

A extração das proteínas da semente de milho a baixo pH (3,0) proporcionou um extrato de coloração clara e de mais fácil filtração quando comparado com aquele obtido a altos valores de pH. Também provou ser mais seletiva para a extração da aprotinina recombinante, reduzindo-se a presença no extrato de compostos fenólicos, lipídeos, açúcares, proteínas em geral e ITM. É importante notar que o pH e a força iônica utilizados na etapa de extração podem ser escolhidos de forma a assegurar baixa ou alta extração de ITM, dependendo do processo de purificação adotado ou se é desejável ou não a purificação do ITM como um co-produto.

Os estudos de extração da aprotinina recombinante em planta piloto apontaram algumas das principais dificuldades no que se refere à sua produção em larga escala. Os pontos principais dizem respeito às dificuldades de clarificação do extrato, concentração através de ultrafiltração, e problemas relativos à estabilidade do extrato concentrado, principalmente devido ao crescimento de microrganismos.

Os estudos de cinética e isotermas de adsorção indicaram a viabilidade do uso da adsorção por afinidade para a recuperação da aprotinina e ITM e o uso da adsorção em íon metálico imobilizado como etapa de separação entre os dois inibidores. Indicou-se também a viabilidade do uso da adsorção de aprotinina em resina trocadora de cátions, como etapa de captura e concentração, ou mesmo como forma de separar a aprotinina recombinante do ITM, uma vez que a adsorção ocorreu a elevados valores de pH, condição em que o ITM não adsorve significativamente.

Ensaio de cromatografia em coluna por adsorção por afinidade utilizando extrato de milho transgênico mostraram que a aprotinina, juntamente com o ITM, foi recuperada e concentrada eficientemente, mesmo estando presente na solução de extração a concentrações muito baixas. Os estudos de adsorção em íon metálico imobilizado indicam ser este um método eficiente de separação entre a aprotinina recombinante e o ITM, uma vez que a primeira não interage com o adsorvente IMAC, enquanto o último interage e é retido por adsorção. A análise dos aminoácidos N-terminais, SDS-PAGE e HPLC fase reversa indicaram que a aprotinina recombinante foi purificada a um nível de até 97%, pureza certamente suficiente para aplicação em cultura de células, onde a aprotinina é amplamente utilizada como inibidor de proteases.

A adsorção em resina trocadora de cátions também se mostrou eficiente, tanto na separação entre aprotinina e ITM (purificação final da aprotinina), como também na captura e concentração da aprotinina a partir do extrato das sementes de milho (utilização como primeira etapa de purificação).

Por último, acreditamos que os estudos aqui apresentados vêm acrescentar novos conhecimentos relativos à utilização do milho transgênico como biorreator

para a produção de proteínas recombinantes, e corroboram no sentido de confirmar o potencial desta tecnologia, tanto que está previsto o lançamento da aprotinina recombinante como mais um produto comercial ainda no ano de 2002 (Zivko L. Nikolov, comunicação pessoal).

CAPÍTULO 9

SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Apesar dos sucessos obtidos neste trabalho, o estudo sistematizado e completo da recuperação e purificação de uma proteína recombinante presente em tão baixas concentrações em uma fonte complexa como a semente de milho, não é tarefa simples. Em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho, problemas surgiram necessitando de respostas urgentes que possibilitassem sua continuidade. Não poucas foram as vezes em que mais de uma possível solução surgiu, fazendo-se necessária a opção por aquela que, no momento, mostrava-se mais adequada. Além disso, por questão de tempo e disponibilidade de recursos, alguns pontos importantes relativos ao tema não puderam ser estudados. São algumas destas “possibilidades”, “respostas não aproveitadas” e “questões complementares” que surgem aqui como sugestões àqueles que continuarão estudando a semente de milho como biorreator para a produção de proteínas recombinantes.

Uma sugestão para estudos visando a se obter maior compreensão dos fenômenos envolvidos na extração de biomoléculas presentes na semente de milho, diz respeito à influência do tamanho de partícula e condições de extração (por exemplo, pH e força iônica) sobre a filtrabilidade do extrato. Os estudos deste trabalho mostraram que uma das principais dificuldades no uso da semente cominuída como matéria prima deve-se à dificuldade de filtração e clarificação do extrato. Tal estudo é importante em se pensando em processos em larga escala.

No tocante aos processos de purificação cromatográficas de aprotinina aqui estudados, sugere-se a otimização da etapa de eluição da aprotinina da coluna de agarose-tripsina (diferentes soluções tampão e valores de pH). Tal etapa mostrou ser a que proporciona maiores perdas no processo, principalmente devido à

dificuldade de eluição da aprotinina, que interage muito fortemente com a enzima imobilizada e cuja separação necessita de valores de pH bastante baixos (ao menos 2,0, no tampão estudado). Além disso, o estudo do uso de gradiente de pH visando a separação entre aprotinina e ITM deve ser estudado, já que os resultados obtidos nas isotermas e cromatografias sugerem essa possibilidade.

Finalmente, a técnica de cromatografia em íon metálico imobilizado tem apresentado grande potencial de aplicação na purificação de proteínas recombinantes, principalmente aquelas que incorporam caudas de histidinas em suas estruturas. No sentido de avaliar a potencialidade do método para aplicações com extratos provenientes de sementes de milho, estudos mais detalhados precisariam ser desenvolvidos para identificar as causas dos problemas de perda de ligantes e baixa capacidade da resina, detectados neste trabalho, quando a resina IMAC foi utilizada como adsorvente na primeira etapa do processo de RPB.

CAPÍTULO 10

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, J. Recovery of Recombinant Aprotinin from Transgenic Corn. Tese Diploma. Department of Biotechnology, The Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suécia (1999).
- Azzoni, A. R. e Miranda, E, A. Recovery of Aprotinin from Insulin Industrial Process Effluent by Affinity Adsorption. Bioprocess Engineering. **21** (1999) 553-560.
- Austin, S.; Bingham, E. T.; Koegel, R. G.; Mathews, D. E.; Shahan, M. N.; Straub, R.J. e Burgess, R. R. An Overview of a Feasibility Study for the Production of Industrial Enzymes in Transgenic Alfalfa. Annals of New York Academic Sciency. **721** (1994) 235-244.
- Barthel, T. e Kula, M.-R. Rapid Purification of DesPro(2)-Val15-Leu17-Aprotinin from Culture Broth of a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. **42** (1995) 1331-1336.
- Baufreton, C.; Velthuis, H.; Jansen, P.; Besnerais, P.; Wildevuur, R. e Loysance, D. Reduction of Blood Activation in Patients Receiving Aprotinin During Cardiopulmonary Bypass for Coronary Artery Surgery. ASAIO Journal. **42** (1996) M417-M423.
- Beath, S. M.; Nuttall, G. A.; Fass, D. N.; Oliver Jr, W. C.; Ereth, M. H.; and Oyen, L. J. Plasma Aprotinin Concentrations During Cardiac Surgery: Full-dose Versus Half-dose Regimens. Anesthesia and Analgesia. **91** (2000) 257-264.

- Beitle, R. R. e Atai, M. M. Immobilized Metal Affinity Chromatography and Related Techniques. AIChE Symposium Series. **88** (1992) 34-44.
- Boden, V. Etude de la Separation Fine de Sous-Especies de La Trypsine et L'Influence D'Inhibiteurs Sur L'Accessibilite de Leurs Residus Histidine Par Chromatographie D'Affinite Sur Ions Metalliques Immobilises. Tese de DEA, Université Technologie de Compiègne, Compiègne, França (1992).
- Boyer, C. D. e Shannon, J. C. Carbohydrates of the Kernel. Em: Corn: Chemistry and Technology. Editores: Watson, S. A. e Ramstad, P. E. American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul. (1987) 273-305.
- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for a Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Analytical Biochemistry. **72** (1976) 248-254.
- Burkhard, R. K.; Adams, S.; Corfman, R. S. e Reeck, G. R. Thermodynamic Measurements on the Interaction of Porcine Trypsin with Single- and Two-Chain Trypsin Inhibitors from Corn Seeds. Journal of Agriculture and Food Chemistry. **27** (2) (1979) 452-454.
- Capdevila, X.; Calvet, Y.; Biboulet, P.; Biron, C.; Rubenovitch, J. e d'Athis, F. Aprotinin Decreases Blood Loss and Homologous Transfusions in Patients Undergoing Major Orthopedic Surgery. Anesthesiology. **88** (1) (1998).
- Carneiro, A. A.; Carneiro, N. P.; Carvalho, C. H. S.; Vasconcelos, M. J. V.; Paiva, E. e Lopes, M. A. Milho Transgênico. Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento. Ano III, **15** (2000) 42-46.
- Carrera, A.; Fernandez, P.; Garcia del Vale, S.; Quintana, B. e Martinez, M. V. Propriedades Farmacológicas de la Aprotinina y Empleo Terapéutico. Revista Espanhola de Anestesiología e Reanimación. **40** (1993) 292-299.
- Chemical Engineering News. **October 3** (1994) p.11.

- Chen, M. S.; Feng, G.; Zen, K. C.; Richardson, M.; Valdez-Rodriguez, S.; Reeck, G.R. e Kramer, K. J. α -Amilases from Three Species of Stored Grain Coleoptera and their Inhibition by Wheat and Corn Inhibitors. *Insect Biochemical Molecular Biology*. **22** (3) (1992) 261-268.
- Collins, C. H.; Braga, G. L. e Bonato, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Editora da Unicamp, Campinas (1993).
- Corfman, R. S. e Reeck, G. R. Immunoabsorbent Isolation of Trypsin Inhibitors from Corn and Teosinte Seeds. *Biochemistry et Biophysica Acta*. **715** (1982) 170-174.
- Escobar, H. Transgênicos: bons ou ruins para consumo? *Jornal O Estado de São Paulo*. 17-02-2002, p. A8.
- Fernandez-Lahore, H. M.; Fraile, E. R. e Cascone, O. Acid Protease Recovery from a Solid-state Fermentation System. *Journal of Biotechnology*. **62** (1998) 83-93.
- Fiorucci, L.; Erba, F.; Falasca, L.; Dini, L. e Ascoli, F. Localization and Interaction of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Tryptase of Bovine Mast Cells *Biochimica et Biophysica Acta*. **1243** (1995) 407-413.
- Fraley, R. T.; Rogers, S. G.; Hoersch, R. B.; Sanders, P. R. e Flick, J. S. Expression of Bacterial Genes in Plant Cells. *Proceedings of National Academy of Science, EUA*. **80** (1983) 4803-4807.
- Gegenheimer, P. Preparation of Extracts from Plants. Em: *Methods in Enzimology*. Academic Press, **182** (1990) 174-193.
- Genaro, A. C. B.; Tamagawa, R. E.; Azzoni, A. R.; Bueno, S. M. A. e Miranda, E. A. Recovery and Purification of Aprotinin from Industrial Insulin-processing Effluent by Immobilized Chymotrypsin and Negative IMAC Chromatographies. *Process Biochemistry*. v. 37, **12** (2002) 1413-1420.

- Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D. e Carter, A. Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals. Nature Biotechnology. **18** (2000) 1151-1155.
- Halim, A. H.; Wassom, C. E.; and Mitchell, H. L. Trypsin Inhibitor in Corn (*Zea mays* L.) as Influenced by Genotype and Moisture Stress. Crop Science. **13** (1973) 405-407.
- Hojima, Y.; Pierce, J. V. e Pisano, J. J. Hageman Factor Fragment Inhibitor in Corn Seeds. Purification and Characterization. Thrombosis Research. **20** (1980) 149-162.
- 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. Commercial Production of Avidin from Transgenic Maize: Characterization of Transformant, Production, Processing, Extraction and Purification. Molecular Breeding. **3** (1997) 291-306.
- Hood, E. E. e Howard, J. A. Protein Products from Transgenic Plants. Agro-Food-Industry Hi-Tech. May/June (1999) 35-36.
- Kassel, B. Bovine Trypsin-Kallikrein Inhibitor (Kunitz Inhibitor, Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor, Polyvalent Inhibitor from Bovine Organs). Methods in Enzymology. **19** (1970) 844-852.
- Kunitz, M. e Northrop, J. H. Isolation from Beef Pancreas Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitors and an Inhibitors Trypsin Compound. Journal of General Physiology. **19** (1936) 991-1001 *apud* Carrera, A.; Fernández, P.; Quintana, B. e Martinez, M. V. Propiedades Farmacológicas de la Aprotinina y Empleo Terapéutico en Cirugía Cardíaca. Revista Espanhola de Anestesiología e Reanimación. **40** (1993) 292-299.

- Kusnadi, A. R.; Evangelista, R.; Nikolov, Z. e Howard, J. Recovery of Recombinant β -Glucuronidase from Transgenic Corn. Proceedings of 26th Annual Biochemical Engineering Symposium. (1996) 143-152.
- Kusnadi, A. R.; Nikolov, Z. L. e Howard, J. A. Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. Biotechnology and Bioengineering. **56** (5) (1997) 473-484.
- Kusnadi, A. R.; Evangelista, R.; Hood, E. E.; Howard, J. e Nikolov, Z. L. Processing of Transgenic Corn and Its Effects on the Recovery of Recombinant β -Glucuronidase. Biotechnology and Bioengineering. **60** 1 (1998) 143-152.
- Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. Journal of American Chemical Society. **38** (1916) 2263-2295.
- Larkins, B. A.; Lending, C. R.; Wallace, J. C.; Galili, G.; Kawata, E. E.; Geetha, K. B.; Kris, K. L.; Martin, D. N. e Bracker, C. E. Em: The Molecular Basis of Plant Development. Editor: Goldberg, R. B. Allan R. Liss. New York. (1989) 109-120.
- Lei, M. G. e Reeck, G. R. Combined Use of Trypsin-Agarose Affinity Chromatography and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography for the Purification of Single-Chain Protease Inhibitor from Corn Seeds. Journal of Chromatography. **363** (1986) 315-321.
- 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.. Expression of Correctly Processed Human Growth Hormone in Seeds of Transgenic Tobacco Plants. Molecular Breeding. **6** (2000) 47-53.
- Leite, A.; Parizotto, E. A.; De Lucca, P.C.; Jungmann, L.; Kemper, E. L. e Silva, A. C. Plantas como Biorreatores. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. **17** (2001) 12-17.

- Leite, A. Expressão de Proteínas Heterólogas em Plantas. Em: Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas. Editores: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S. e Iglis, M. C. V. Fundação MT, Rondonópolis, MT. (2001) 1057-1084.
- Maa, Y. F. e Hsu, C. C. Aggregation of Recombinant Human Growth Hormone Induced by Phenolic Compounds. International Journal of Pharmaceutics. **140** (1996) 155-168.
- Mahoney, W. C.; Hermodson, M. A.; Jones, B.; Powers, D. D.; Corfman, R. S. e Reeck, G. R. Amino Acid Sequence and Secondary Structural Analysis of the Corn Inhibitor of Trypsin and Activated Hageman Factor. Journal of Biological Chemistry. **259** (13) (1984) 8412-8416.
- Masoud, S. A.; Ding, X.; Johnson, L. B.; White, F. F. e Reeck, G. R. Expression of a Corn Bifunctional Inhibitor of Serine Proteinases and α -Amilases in Transgenic Tobacco Plants. Plant Science. **115** (1996) 59-69.
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. **31** (3) (1959) 426-428.
- Norris, K.; Norris, F.; Bjorn, S.A.; Diers, I. e Petersen, L. C. Aprotinin and Aprotinin Analogues Expressed in Yeast. Biological Chemistry Hoppe-Seyler. **371** (1990) 37-42.
- Peeters, K.; Wilde, C. D.; Jaeger, G. D.; Angenon, G. e Depicker, A. Production of Antibody and Antibody Fragments in Plants. Vaccine. **19** (2001) 2756-2761.
- Pen, J.; Molendijk, L.; Quax, W. J.; Sijmons, P. C.; van Albert, J. J.; van den Elzen, P. J. M.; Rietveld, K. e Hoekema, A. Production of Active *Bacillus licheniformis* Alfa-Amilase in Tobacco and its Application in Starch Liquefaction. Biotechnology. **10** (1992) 292-296.

- Porath, J.; Carlsson, J; Olsson, L. e Belfrage, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. Nature. **258** (1975) 589-599.
- Price, M. L. e Butler, L. G. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. Journal of Agriculture and Food Chemistry. **25** (6) (1977) 1268-1273.
- Scholze, S. H. Biossegurança e Produtos Transgênicos. Disponível em: <http://www.CTNBio.gov.br/ctnbio/bio/artigos/004.htm>. Acessado em: 25 de Março de 2002.
- Scopes, R. K. Protein Purification, Principles and Practices. Springer Verlag, New York. (1994). 30-36.
- Swartz, M. J.; Mitchell, H. L.; Cox, D. J. e Reeck, G. R. Isolation and Characterization of Trypsin Inhibitor from Opaque-2 Corn Seeds. Journal of Biological Chemistry. **252** (22) (1977) 8105-8107.
- Tamagawa, R. E. Desenvolvimento de Processo de Recuperação de Aprotinina Através de Afinidade por Quelato Metálico. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil (1999).
- Watson, S. A. Structure and composition. Em: S.A. Watson, Ramstad P.E., editores. Corn: Chemistry and Technology. St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc. (1987) 53-82.
- Whitelam, G. C.; Cockburn, B.; Gandecha, A. R. e Owen, M. R. L. Heterologous Protein Production in Transgenic Plants. *In*: Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Ed. M. P. Tombs, Andover. **11** (1993) 1-29.

- Weber, E. J. Lipides of the Kernel. Em: S.A. Watson, Ramstad P.E., editores. Corn: Chemistry and Technology. St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc. (1987) 311-349.
- Wilson, C. M. Proteins of the Kernel. Em: S.A. Watson, Ramstad P.E., editores. Corn: Chemistry and Technology. St. Paul: American Association of Cereal Chemists Inc. (1987) 273-305.
- Wong, J. W.; Albrigh, R. L. e Wang, N. L. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) Chemistry and Bioseparation Applications. Separation and Purification Methods. **20**, nº 1 (1991) 49-101.
- Vijayalakshmi, M. A. Pseudobiospecific Ligand Affinity Chromatography. Trends in Biotechnology. **7**, 3 (1989) 71-76.
- Yamamoto, S.; Nakanishi, K. e Matsuno, R. Íon-exchange Chromatography of Proteins. Chromatographic Science Series. Marcel Dekker Inc. New York (1988) p. 43.
- Zhang, C. Enhancing Chromatographic Separations of Recombinant Proteins from Canola Extracts by Genetic Design and Characterization of Protein Binding Regions. Tese de Doutorado. Chemical Engineering Department, Iowa State University. Ames, Iowa, Estados Unidos (1999).
- Zurek, C.; Kubis, E.; Keup, P.; Hörlen, D.; Beunink, J.; Thömmes, J.; Kula, M-R.; Hollenberg, C. e Gellissen, G. Production of Two Aprotinin Variants in *Hansenula polymorpha*. Process Biochemistry. **7** (1996) 679-689.
- Zhong, G.Y.; Peterson, D.; Delaney, D.E.; Bailey, M.; Wicher, D.R.; Register, J.C.; Bond, D.; Li, C.P.; Marshall, L.; Kyllisek, E.; Ritland, D.; Meyer, T.; Hood, E.E. e Howard, J.A. Commercial Production of Aprotinin in Transgenic Maize Seeds. Molecular Breeding. **5** (1999) 345-356.