

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Soja como biorreator:
estudo de extração e purificação de proteína
recombinante utilizando β -glucuronidase**

Eng^o Químico Goran Robić
Mestrando

Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química

Campinas, outubro de 2005

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

R55s Robic, Goran
Soja como biorreator: estudo de extração e purificação de
proteína recombinante utilizando β -glucuronidase. / Goran
Robic.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Everson Alves Miranda
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Proteína recombinante. 2. Proteína recombinante-
Purificação. 3. Proteínas de soja. 4. Plantas transgenicas. 5.
Glucuronidase. I. Miranda, Everson Alves. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.
III. Título.

Título em Inglês: Soybean as bioreactor: extraction and purification study
of recombinat protein β -glucuronidase

Palavras-chave em Inglês: Recombiant protein, β -glucuronidase,
Transgenic soybean, extraction, Purification,
Downstream processing

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Elíbio Leopoldo Rech, Sônia Maria Alves Bueno,
José Andrés Yunes

Data da defesa: 19/11/2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

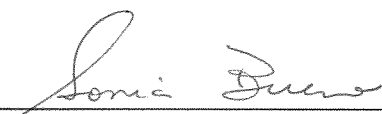
Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Soja como biorreator: estudo de extração e purificação de proteína recombinante
utilizando β -glucuronidase**

Dissertação de mestrado defendida por Goran Robić e aprovada em 19 de outubro de 2005
pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda – Orientador



Prof. Drª. Sônia Maria Alves Bueno (titular)



Dr. Elíbio Leopoldo Rech (titular)



Dr. José Andrés Yunes (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Goran Robić em 19 de outubro de 2005.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

Resumo

Os trabalhos realizados utilizando plantas transgênicas como biorreatores para produção de proteínas recombinantes indicam que a canola, o milho e a soja são candidatos de grande potencial. Apesar da semente de soja e suas proteínas serem sistemas bem estudados, não existem estudos sistemáticos e comparativos sobre a utilização da soja como um biorreator, no tocante à extração e purificação de proteínas recombinantes. Até hoje, segundo a literatura consultada, só existe uma tentativa de usar soja como biorreator (Russel et al., 2005), mas por causa da baixa expressão da proteína recombinante (hormônio de crescimento humano), este estudo aparentemente não teve continuidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar, sob o ponto de vista de recuperação (extração) e purificação, sementes de soja como biorreatores para produção de proteínas recombinantes, usando β -glucuronidase recombinante (rGUS) como proteína modelo.

Abstract

The work done on the field of using transgenic plants as bioreactors indicates the soybean, canola and corn as a plants of choice. Although the extraction and purification of soybean seed proteins is well studied and the plant is relatively easy to transform, there is practically no study done with transgenic soybean seeds expressing recombinant proteins in terms of downstream processing. To our knowledge, soybean was used to produce human growth hormone (Russel et al., 2005), but the study of purification was not done due to the low expression level of that recombinant protein. The objective of this work to evaluate the soybean seeds, in terms of recuperation (extraction) and purification, as a bioreactor for production of recombinant proteins using b-glucuronidase (rGUS) as a model protein.

Índice

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O uso de plantas transgênicas como biorreatores.....	1
1.2 Colocação do problema.....	4
1.3 Objetivo do projeto.....	5
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Composição e estrutura da semente da soja.....	6
2.2 Composição e estrutura de sementes de milho e canola.....	9
2.3 Extração de proteínas nativas de soja.....	10
2.4 Purificação de proteínas de soja.....	11
2.5 Produção de plantas transgênicas.....	12
2.6 A enzima β -glucuronidase (GUS).....	12
2.6.1 Propriedades da GUS.....	12
2.6.2 Extração de GUS de <i>Escherichia coli</i> e de GUS recombinante (rGUS) de milho e canola transgênicos.....	13
2.6.3 Purificação de GUS de fontes naturais e de rGUS de canola e milho transgênicos.....	14
2.6.3.1 <i>Escherichia coli</i>	14
2.6.3.2 Fígado bovino.....	15
2.6.3.3 Milho transgênico.....	15
2.6.3.4 Canola transgênica.....	17
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Materiais.....	19
3.1.1 Reagentes.....	19
3.1.2 Soja transgênica e não-transgênica.....	19
3.2 Métodos.....	22
3.2.1 Moagem das sementes.....	22
3.2.2 Desengorduramento da farinha de soja.....	22
3.2.3 Extração aquosa com variação de pH e força iônica.....	22
3.2.4 Planejamento experimental.....	23
3.2.5 Concentração de proteína total.....	24
3.2.6 Electroforese SDS-PAGE.....	24
3.2.7 Concentração de carboidratos.....	25
3.2.8 Conteúdo de óleo.....	25
3.2.9 Concentração de compostos fenólicos.....	26
3.2.10 Análise de atividade de GUS.....	26
3.2.11 Ensaios de cromatografia de troca aniônica usando resina DEAE-Sephadex.....	27
3.2.12 Ensaios de cromatografia de interação hidrofóbica usando Streamline-Phenyl.....	29
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30

4.1 Extração e análise dos extratos de sementes de soja BR-16.....	30
4.1.1 Estudo de cinética para definir o tempo de extração.....	31
4.1.2 Extração das proteínas da semente de soja BR-16	31
4.1.3 Extração dos polifenóis de semente de soja BR-16.....	34
4.1.4 Extração dos açúcares redutores de semente de soja BR-16.....	35
4.1.5 Extração dos açúcares totais da soja BR-16.....	37
4.1.6 Análise do perfil das proteínas extraídas por SDS-PAGE.....	38
4.2 Extração e análise dos extratos de semente da soja BR-16tg.....	39
4.2.1 Estudo de cinética da extração de rGUS.....	40
4.2.2 Extração de rGUS da semente de soja BR-16tg.....	41
4.2.3 Extração de proteínas da semente de soja BR-16tg	42
4.2.4 Extração dos polifenóis da semente de soja BR-16tg.....	44
4.2.5 Extração dos açúcares redutores da semente de soja BR-16tg.....	45
4.2.6 Extração de açúcares totais de semente de soja BR-16tg.....	47
4.2.7 Análise do perfil das proteínas extraídas por SDS-PAGE.....	48
4.3 Extração de rGUS de semente de soja BR-16tg em função de pH sem NaCl no tampão de extração.....	48
4.4 Estudos cromatográficos de purificação da rGUS de semente de soja BR-16tg... 52	
4.4.1 Cromatografia de troca-iônica em trocador de ânions DEAE-Sephadex.....	53
4.4.2 Otimização do volume de injeção de extrato usando DEAE-Sephadex.....	58
4.4.3 Análise de fração contendo rGUS através de SDS-PAGE.....	59
4.4.4 Cromatografia de interação hidrofóbica com resina Streamline-Phenyl.....	61
4.5.3 Análise de fração contendo rGUS com SDS-PAGE.....	63
4.6 Comparação da purificação de rGUS a partir de soja, canola e milho.....	64
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 65	
5.1 Conclusões.....	66
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68	
ANEXO 1..... 74	
Planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.....	74
ANEXO 2..... 76	
Tabelas de análises de variância dos extratos para soja BR-16 e Br-16tg.....	76
ANEXO 3..... 78	
Resultados dos ensaios de extração para a semente da soja BR-16tg usando: tampão de citrato de sódio 50 mmol/L, temperatura 20 °C e razão massa:volume 1:20	78
ANEXO 4..... 79	
Otimização de volume de injeção de extrato para cromatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex.....	79

Nomenclatura

A_{GUS}	=	atividade de GUS
AE_{GUS}	=	atividade específica de GUS
AR	=	açúcares redutores
AT	=	açúcares totais
AT_{GUS}	=	atividade total de GUS
C_{AR}	=	concentração de açúcares redutores
C_{AT}	=	concentração de açúcares totais
C_F	=	concentração dos polifenóis
C_{NaCl}	=	concentração de NaCl
C_P	=	concentração de proteína total
CET	=	cromatografia de exclusão pelo tamanho
CIH	=	cromatografia de interação hidrofóbica
CTI	=	cromatografia de troca iônica
FP	=	fator de purificação
GUS	=	β -glucuronidase
m_p	=	massa total de proteína
$m:v$	=	massa de farinha de soja : volume de tampão
R	=	recuperação de atividade de GUS
rGUS	=	β -glucuronidase recombinante

Capítulo 1 – Introdução

1.1 O uso de plantas transgênicas como biorreatores

O uso de plantas como biorreatores deixou de ser apenas um potencial atrativo para produção comercial de proteínas recombinantes. O número de proteínas recombinantes produzidas com sucesso em cereais (milho, arroz e trigo) e sementes usadas para produção de óleo (soja, canola e girassol) aumentaram nos últimos tempos (Giddings *et al.*, 2000). Como exemplo, a empresa ProdiGene desenvolveu recentemente métodos para produção, purificação e caracterização das proteínas avidina e β -glucuronidase produzidas em plantas transgênicas (Menkhaus *et al.*, 2004). Recentemente a tripsina recombinante produzida no milho (TrypZean) foi colocada no mercado, sendo a primeira proteína recombinante produzida em grande escala (Woodard *et al.*, 2003).

As proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas têm vantagens em comparação com as proteínas recombinantes produzidas em bactérias, células animais ou animais transgênicos que incluem: (1) custo de produção mais baixo em comparação com outros sistemas; (2) já existe a infraestrutura e tecnologia para produção e processamento de plantas; (3) as plantas não têm patógenos humanos que podem contaminar o produto final; (4) as plantas podem produzir as proteínas com a glicosilação exata (que não é possível usando bactéria como biorreator) e na forma ativa; e (5) a proteína pode ser produzida dentro de um órgão específico, por exemplo, semente, onde ela está protegida contra degradação e, portanto, a estabilidade da proteína aumenta (Horn *et al.*, 2004). Recentemente, quatro áreas de pesquisa com plantas transgênicas como biorreatores têm se destacado (Teli e Timko, 2004):

- a) Produção dos peptídeos, proteínas e enzimas de importância farmacêutica e industrial;
- b) Produção de anticorpos e seus fragmentos em plantas;

- c) Produção de vacinas e
- d) Manipulação do metabolismo de plantas para produção de metabólitos secundários usados em medicina ou na indústria.

Nos últimos três anos as pesquisas com plantas transgênicas se tornaram tão abundantes quanto as com animais transgênicos (Nikolov e Woodard, 2004). Já fazem dez anos que estudos detalhados vem sendo realizados com canola, milho e tabaco. Por outro lado, com as plantas como alfafa, trigo, arroz e cevada somente avaliações limitadas foram feitas. O resumo dos trabalhos feitos nos últimos três anos na área de recuperação e purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas está apresentado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Estudos de “downstream processing” feitos com plantas transgênicas (adaptado de Nikolov e Woodard, 2004).

Planta transgênica	Proteína recombinante	Etapas de purificação	Comentários	Refêrencia
Milho (semente)	Aprotinina	Clarificação - filtração (3 µm) Purificação - cromatografia de afinidade com tripsina - IMAC com Cu ²⁺	FR = 0,49 Pureza = 79%	Azzoni <i>et al.</i> , 2002
Milho (semente)	Tripsina	Clarificação -centrifugação Purificação -cromatografia de afinidade com inibidor de tripsina -troca catiônica	FR = 0,65 Pureza > 98%	Woodard <i>et al.</i> , 2003
Canola (semente)	GUS	Clarificação -centrifugação -filtração (0,22 µm) em gel Purificação -troca aniônica em leito fixo e expandido	Comparando as cromatografias com leito fixo e expandido: FR > 0,65 FP > 30	Bai e Glatz, 2003

Batata (tubérculo)	IgG	Clarificação -centrifugação (2x) Purificação -cromatografia de afinidade com proteína G	FR = 0,1 Bandas principais com 59 e 28 kDa obtidas com SDS- PAGE	De Wilde <i>et al.</i> , 2002
Tabaco (folha)	Xilanase	Clarificação (não fornecida) Purificação -precipitação com temperatura elevada (70 °C) -troca aniônica (Q-Sepharose)	FR = 0,85 Banda principal obtida com SDS- PAGE	Leelavathi <i>et al.</i> , 2003a
Tabaco (folha)	Fusão de GUS- polihistidina- γ - interferon	Clarificação (não fornecida) Purificação -troca aniônica -IMAC com Ni^{2+} -troca catiônica	FR = 0,75 FP não fornecido	Leelavathi e Reddy, 2003b
Tabaco (folha)	Fusão de peptídeo-CBD	Clarificação -centrifugação (2x) Purificação -exclusão pelo tamanho -cromatografia de afinidade usado quitina como ligante	FR e FP não fornecidos	Morassutti <i>et al.</i> , 2002
Tabaco (folha)	IgG	Clarificação -centrifugação (2x) Purificação -cromatografia em leito expandido usando proteína A como ligante de afinidade	FR < 0,60 Pureza > 90%	Valdes <i>et al.</i> , 2003
Tabaco (folha)	Fusão GUS- calmodulina	Clarificação -centrifugação (2x) Purificação -precipitação com sulfato de amônio -diálise concentração -cromatografia de afinidade com pentotiazina	FR = 0,85 FP = 20	Desai <i>et al.</i> , 2002
Tabaco (folha)	Triconsantina	Clarificação -centrifugação Purificação -diálise -exclusão pelo tamanho -concentração -troca catiônica	FR e FP não fornecidos	Krishnan <i>et al.</i> , 2002

Ervilha (semente)	Fusão GUS- polihistidina	Clarificação -centrifugação - filtração (0,22 µm) Purificação -IMAC com Co ²⁺ -troca aniônica(CTA) -precipitação isoelétrica (PI) -precipitação usando polieletrólitos (PP)	Avaliação dos métodos: FP = 260 (IMAC) FP = 3 (CTA) FP = 4 (PI) FP = 1,5 (PP)	Menkhaus <i>et al.</i> , 2004
Arroz (semente)	Lactoferina humana	Clarificação -filtração (3x) Purificação -troca catiônica	Banda única detectada em eletroforese SDS- PAGE	Nandi <i>et al.</i> , 2002
Arroz (semente)	Lisozima humana	Clarificação -filtração (3x) Purificação -troca catiônica -exclusão pelo tamanho	FR = 0,60 Banda única detectada em eletroforese SDS- PAGE	Huang <i>et al.</i> , 2002

FP – fator de purificação, FR – fator de recuperação, CTA – cromatografia de troca iônica, PI – precipitação no ponto isoelétrico, PP – precipitação com polímeros polivalentes.

1.2 Colocação do problema

Os trabalhos realizados utilizando plantas transgênicas como biorreatores para produção de proteínas recombinantes indicam que a canola, o milho e a soja são candidatos de grande potencial devido ao alto rendimento agrônômico em termos de proteína produzida pela área plantada (Holzmann, 1994; Whitlam *et al.*, 1993). Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos realizados nesta área foram feitos com milho e canola, sendo que há poucos estudos utilizando a soja como biorreator, apesar de ser esta uma planta que se autopoliniza (o risco de ser cruzada com plantas nativas é pequeno) e fácil de se modificar geneticamente em comparação ao milho. Pode-se citar os trabalhos de Zeitlin *et al.* (1998) e Philip *et al.* (2001), nos quais a proteína recombinante (anticorpo contra vírus herpes simplex e caseína, respectivamente) foi expressa e purificada usando-se cromatografia de afinidade. Em um terceiro trabalho, a tentativa de usar soja como biorreator (Russel *et al.*, 2005) aparentemente não teve continuidade, devido à baixa expressão da proteína recombinante (hormônio de crescimento humano). Há, no entanto, estudos com soja não

transgênica nos quais “spiking” (adição de proteína estudada ao extrato) procurou emular extratos de soja transgênica (Dharmadi *et al.*, 2003; Menkhaus *et al.*, 2002).

1.3 Objetivo do projeto

O objetivo deste trabalho foi avaliar, sob o ponto de vista de recuperação (extração) e purificação, sementes de soja como biorreatores para produção de proteínas recombinantes, usando β -glucuronidase recombinante (rGUS) como proteína modelo. Assim, estudou-se a extração da rGUS, assim como de compostos naturalmente encontrados na semente (proteínas, polifenóis e carboidratos) e o uso de cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica na purificação de rGUS comparando-se os resultados de purificação com trabalhos semelhantes feitos com canola e milho já publicados.

Capítulo 2 – Revisão bibliográfica

Neste capítulo, a composição das sementes de soja, bem como a extração e purificação das proteínas nativas da soja são abordadas, sabendo-se que, apesar da semente de soja e suas proteínas serem sistemas bem estudados, não existem estudos sistemáticos e comparativos sobre a utilização da soja como um biorreator, no tocante à extração e purificação de proteínas recombinantes. Como este trabalho consiste basicamente em uma comparação do uso da soja como biorreator em relação à canola e ao milho, fez-se também uma revisão sobre as composições das sementes do milho e da canola, assim como a extração e purificação da proteína recombinante β -glucuronidase produzida nestes sistemas.

2.1 Composição e estrutura da semente da soja

A semente da soja (*Glycine max*) é constituída de casca, cotilédono e hipocótil e embrião. Cotilédones (a maior parte da semente) são constituídos por um conjunto de pequenas células de parede celular fina, e são compostos basicamente de proteínas (37%), carboidratos (30%) e óleo (20%). O óleo corresponde a aproximadamente 20% da massa da semente, do qual 12% são de ácidos saturados e 88% de ácidos não-saturados. Os principais açúcares da semente de soja são o dissacarídeo sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), o trissacarídeo rafinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) e o tetrassacarídeo estaciose ($C_{24}H_{42}O_{21}$). A concentração de glicose e de outros açúcares redutores diminuem durante a maturação. Os polifenóis representam aproximadamente 0,02% da massa da semente e têm a concentração mais baixa comparada com o milho (0,03%) e a canola (0,64%). A fitina, um sal de ácido hexafosfórico ou fítico e os ácidos fenólicos são importantes porque influenciam na solubilidade da proteína de soja (Smith *et al.*, 1972). Os ácidos fenólicos, por exemplo, causam precipitação devido as ligações que fazem com as proteínas (Charlton *et al.*, 2002).

A maioria das proteínas da semente de soja está presente dentro de pequenos corpúsculos protéicos. As proteínas de sementes, em geral, podem ser divididas em quatro grupos de acordo com solubilidade diferencial (Osborne, 1924): a) albuminas, solúveis em

água, b) globulinas, solúveis em soluções aquosas salinas, c) prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas e d) glutelinas, solúveis em soluções aquosas de pH alcalino ou com agente redutor (por exemplo, β -mercaptoetanol). As proteínas da soja contém somente dois destes grupos: as albuminas, as quais representam menos de 10% da proteína total (baixa massa molecular, cerca de 20 kDa), e as globulinas, que representam o restante, constituídas de proteínas de massa molecular de 20 a 700 kDa. As globulinas da soja são separadas em quatro grupos baseado nos coeficientes de sedimentação: 2S, 7S, 11S e 15S (22, 37, 31 e 1% das globulinas, respectivamente). A fração 2S, também conhecida como α -conglucina, consiste de proteínas com faixa de massa molecular de 8 até 50 kDa e solubilidade em ampla faixa de pH. A β -conglucina (em alguns artigos chamada de proteína 7S), que representa a maioria das proteínas 7S, consiste de pelo menos sete isômeros os quais são compostos de diferentes combinações das mesmas três subunidades. As diferentes isoformas de β -conglucina têm massa molecular entre 130 e 180 kDa e ponto isoelétrico (pI) perto de 4,9. As demais proteínas encontradas na fração 7S são hemaglutinina, lipoxigenase e β -amilase. A proteína 11S, chamada de glicina (proteína majoritária na fração 11S) é um heteromultímero complexo composto de 11 ou 12 subunidades. A glicina tem massa molecular entre 300 e 350 kDa e ponto isoelétrico entre 4,5 e 4,8. As maiores proteínas da soja são as proteínas 15S, com massa molecular em torno de 700 kDa e com ponto isoelétrico perto de 4,5 (Menkhaus *et al.*, 2004b). As propriedades físicas de algumas proteínas da soja estão apresentadas na Tabela 2.1.

A β -conglucina e a glicina associam-se através de pontes dissulfetos formando polímeros. Este fato contribui para a dificuldade de solubilização da proteína da soja quando precipitada. A polimerização também causa aumento de viscosidade das soluções, porém é um processo reversível quando se adiciona mercaptoetanol, sulfito de sódio ou cisteína (Wolf, 1970). Outra característica em comum é a sensibilidade destas proteínas à força iônica. A mudança mais óbvia é observada com β -conglucina, que em pH 7,6 e concentração de NaCl á 0,5 mol/L existe em forma de monômero com massa molecular de 180 a 210 kDa, mas no mesmo pH e a concentração de NaCl 0,1 mol/L, sua massa molecular é 370 kDa, sendo portanto um dímero. O mesmo fenômeno também é observado com a glicina, mas a dimerização não é completa (Smith *et al.*, 1972).

Tabela 2.1 Propriedades físicas das proteínas purificadas da soja (adaptado de Allan e Sidney, 1972).

Proteína	V_{20} (mL/Gm)	$s_{20, \text{água}}^0$ $\times 10^{13}$ (s)	$D_{20, \text{água}}$ $\times 10^7$ (m ² /s)	MM (Da)	Método de determina- ção de MM	pI
Inibidor de tripsina (Bowman-Birk)	0,69	2,3	9,03	21.000	SD	4,0 – 4,2
				16.400	AE	
				7.975	AA	
				8.000	SE	
				8.250	GF	
				12.000	GF	
Citocromo c		1,8		12.000	GF	
Inibidor de tripsina (Kunitz)	0,698	2,29		21.000	AE	4,5
2.3S Globulina		2,28		18.200	SE	
2.8S Globulina		2,80		32.600	SE	4,4
Alantoinase				50.000	SE	
β -Amilase		4,67	7,47	61.700	SD	5,85
				69.000	AA	
Hemaglutinina		6,4	5,72	105.000	SD	6,1
				89.000	LS	
Lipoxigenase	0,734	5,65	5,59	102.000	SD	5,4 – 5,65
				102.000	GF	
				108.000	SE	
Globulina 7S (β -conglucina)	0,725	7,92	3,85	330.000	AE	4,9
				186.000	AE	
				180.000	SE	
				193.000	SV	
				210.000	GF	
Globulina 11S (glicinina)	0,719	12,2	2,91	333.000	LS	~5,0
				356.000	LS	

¹ AA-Análise de aminoácidos; AE-“approach to equilibrium”; GF-filtração em gel; LS-espalhamento de luz; SD-sedimentação-difusão; SE- equilíbrio de sedimentação; SV-sedimentação- viscosidade.

MM – massa molecular; V_{20} – volume molar; $s_{20, \text{água}}^0$ – coeficiente de sedimentação em água; $D_{20, \text{água}}$ – coeficiente de difusão em água.

2.2 Composição e estrutura de sementes de milho e canola

A semente do milho pode ser dividida em duas partes: embrião e endosperma, onde o endosperma representa a maior parte da semente (83%). O embrião contém aproximadamente 56% de carboidratos, 33% de gordura, 18% de proteína e 0,03% de polifenóis. O endosperma é composto basicamente de amido (88%). O milho contém em torno de 66% de carboidratos, 11% de proteína e 4% de gordura. A Tabela 2.2 mostra as composições e propriedades de proteínas das sementes do milho, canola e soja. As proteínas do milho são divididas em quatro grupos: albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas (conhecidas como zeínas).

Tabela 2.2 Tipos de proteínas em sementes (representados em porcentagem de proteína total) com algumas proteínas principais e propriedades (adaptado de Menkhaus *et al.*, 2004b).

Planta	Tipos de proteínas e suas propriedades			
	Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Canola	14%	70% cruciferina (12S): 280-350 kDa, pI=7,2, 50%; napina (1,7S): 12-14 kDa, pI>10, 20%	<20% (oleosina)	0%
Milho	7% 16-20 kDa	5% 2S: 25 kDa; 3S: 45 kDa; 7S: 60-68 kDa; 12S: 55 kDa	52% (zeína) β -zeína 15 kDa Z19: 19 kDa; Z22: 22 kDa χ -zeína 27 kDa	25% composto de seis frações de 17,5, 25, 38, 53, 70 e >70 kDa
Soja	10% quatro frações: 10- 200 kDa	90% 15S: 720 kDa; glicinina (11S): 300-350 kDa, pI=4,5 – 4,8; β -conglucina (7S): 130- 180 kDa, pI=4,8	0%	0%

A canola é parecida com a soja por ser uma planta dicotiledônea, onde o cotilédono representa 85% da semente. As proteínas e o óleo da canola estão presentes no interior da semente em corpos protéicos conhecidos como corpos oleosos. O óleo representa 40%, a proteína 21%, os carboidratos 5% e polifenóis 0,64% da massa da semente. As proteínas da semente de canola são constituídas principalmente por globulinas, prolaminas e albuminas, sendo o grupo das globulinas o mais abundante (Menkhaus *et al.*, 2004b).

2.3 Extração de proteínas nativas de soja

Dos solventes testados para a extração de proteínas nativas da soja, a água destilada, água a pH 7-9 e soluções aquosas com cloreto de sódio (0,5-2,0 mol/L) são os mais eficientes (Smith *et al.*, 1938a, 1938b, 1966). Estudos sobre a influência de vários ácidos e bases usados para ajuste de pH de extrato de soja mostraram que a quantidade de proteína da soja extraída é independente do ácido ou base usado (Smith *et al.*, 1938a) e tem o mínimo em torno de pH 4,0. Neste trabalho também estudou-se a influência de sais NaCl e CaCl₂ a diferentes valores de pH. Percebeu-se que, em torno de pH 4, a adição de NaCl aumenta a solubilidade das proteínas. Com a adição de pequena concentração de CaCl₂ (até 0,1 mol/L), a solubilidade na faixa de pH de 5 a 9 diminui, mas adição não aumenta a solubilidade das proteínas a pH 4. Com o aumento da concentração de CaCl₂ acima de 0,1 mol/L, observa-se um fenômeno parecido com o observado para o caso de NaCl. Em outro trabalho dos mesmos autores (Smith *et al.*, 1938b), o efeito de diferentes sais na extração de proteína da soja foi estudado. Independente do sal usado, observou-se que se a concentração foi aumentada até certo valor específico (dependendo do sal usado) houve diminuição da solubilidade de proteína, mas se a concentração de sal foi aumentada acima deste valor específico, a solubilidade das proteínas aumentou. Para os sais monovalentes (LiCl, NaF, NaCl, NaBr e KCl), a solubilidade mínima das proteínas era atingida usando concentração de sal igual a 0,1 mol/L. Para os sais bivalentes CaCl₂ e MgCl₂, a solubilidade mínima das proteínas era atingida usando concentração de sal igual a 0,02 mol/L. Usando-se os sais monovalentes, conseguiu-se diminuir a solubilidade das proteínas duas vezes e, no caso dos sais bivalentes, quatro vezes, comparando com solubilidade usando-se água pura.

2.4 Purificação de proteínas de soja

Vários trabalhos já foram feitos usando técnicas cromatográficas de afinidade, troca-iônica, interação hidrofóbica e exclusão pelo tamanho para purificar ou estudar diferentes proteínas nativas de soja. A literatura apresenta pelo menos três trabalhos que utilizam cromatografia de afinidade para purificar proteínas nativas da soja: uricase, usando Arginina-Sepharose (Larsen, 1990), peroxidase, usando Conavalina A-agarose (Miranda *et al.*, 2002) e aglutinina, usando galactosyl-Sepharose (Franco-Fraguas *et al.*, 2003).

Sathe (1991), usando cromatografia de troca iônica (resina DEAE DE-53), estudou propriedades de uma proteína não identificada de propriedades parecidas com glicinina da soja. Porter *et al.* (1991) purificaram α -galactosidase usando resina QAE550C. Stephens *et al.* (1998) purificaram aspartato aminotransferase usando cinco etapas cromatográficas, entre elas DEAE-celulose como primeira etapa e também para concentrar o eluído depois de cromatografia de exclusão pelo tamanho. Ferreira *et al.* (1998) usaram DEAE e SP-Sephadex para purificar e caracterizar as múltiplas formas de fosfatases da soja. Dharmadi *et al.* (2003) fizeram avaliação econômica de purificação de proteínas nativas de soja em paralelo com a proteína recombinante, almejando o uso de soja como possível planta transgênica para produção de proteínas recombinantes. A resina CM-Sephadex C50 foi utilizada neste trabalho.

Stephens *et al.* (1998) usaram cromatografia de interação hidrofóbica como segunda etapa na purificação de aspartato aminotransferase usando Phenyl-Sepharose. Yeboah *et al.* (1995) usaram a resina Butyl-Toyopearl para separar o inibidor de tripsina Bowman-Birk da soja. Yoon *et al.* (2000) purificaram sintetase de espermidina usando omega-Aminooctyl-Sepharose como resina.

A cromatografia de exclusão de tamanho foi usada no trabalho de Thanh *et al.*, (1975) para estudar heterogenidade de fração 7S da proteína de soja com Sephadex G-200. Akhtaruzzaman *et al.* (1993) purificaram e caracterizaram uma protease, que digere glicinina da soja, usando Comosil 5C 18-AR. Cole *et al.* (1994) estudaram separação de proteínas e isoflavonas de soja usando coluna Biosep SEC-S3000. Koplik *et al.* (2002) usaram coluna Fractogel END BioSEC para fracionar a proteína da soja.

2.5 Produção de plantas transgênicas

Até hoje existem três métodos de transformação genética das plantas terrestres para produção das proteínas recombinantes (Horn *et al.*, 2004):

- 1) Transformação nuclear da planta, onde o gene hóspede é transferido para as células das plantas usando-se *Agrobacterium tumefaciens* ou a técnica de bombardeamento com o objetivo de incorporar o gene no genoma da planta;
- 2) Transformação de cloroplasto (estrutura das células de planta responsável pela fotossíntese, com autonomia de replicação contendo DNA plastidial) da planta;
- 3) Transformação temporária das plantas, baseando-se no uso de vírus para infectar a planta e expressar a proteína recombinante.

A vantagem da transformação nuclear é a produção de proteína recombinante no órgão específico, por exemplo, a semente, que vai garantir a estabilidade prolongada da proteína. No entanto, a desvantagem dessa técnica é que a planta pode transferir o gene recombinante ao cruzar com as plantas nativas, se plantada no campo. No caso de transformação do plastídio do tabaco, concentração de proteína recombinante de até 40% de massa seca da folha já foi atingida. Como o DNA do cloroplasto não está presente no pólen, o risco de espalhamento de DNA transgênico é reduzido, mas a proteína expressada na folha não fica estável por muito tempo, quando comparado com a proteína expressada na semente. A técnica de transformação temporária é usada para obter a proteína recombinante em tempos mais curtos, mas o método não é apropriado para produção de proteína em grande escala (Horn *et al.*, 2004).

2.6 A enzima β -glucuronidase (GUS)

2.6.1 Propriedades da GUS

A β -glucuronidase (E.C. 3.2.1.31) é uma enzima homotetramérica com massa molecular de 270 kDa, que catalisa a hidrólise de vários tipos de glucunorídeos. A GUS

hidroliza β -D-glucuronídeo em glucunorato e álcool, conforme a Figura 2.1. Ela pode ser encontrada em mamíferos e também em bactérias. A maioria dos substratos da GUS são produtos do metabolismo de desintoxicação dos vertebrados. Resumidamente, os hormônios esteróides, produtos secundários de plantas e antibióticos, são conjugados com ácido glucurônico no rim e em outros órgãos dos vertebrados e depois secretados pela urina e fezes. A GUS de *Escherichia coli* possui massa molecular de monômero calculada igual a 68.447 Da e é composta de 603 aminoácidos, tendo pI igual a 5,5 (Protein Data Bank). Devido à alta estabilidade do homotetrâmero, simplicidade de detecção e quantificação de sua atividade enzimática, a GUS é muito utilizada como sistema repórter - determinar se a transformação genética foi sucedida (Jefferson, 1989). Uma outra vantagem neste uso é que a GUS está ausente na maioria dos organismos, especialmente plantas, e não compromete a função dos organismos nas quais é expressa.

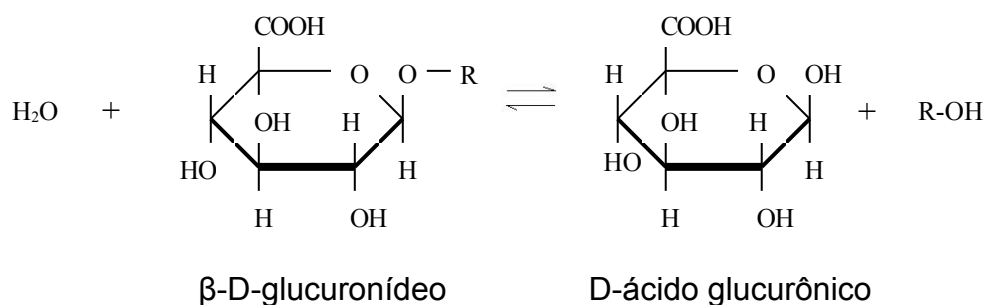


Figura 2.1 Reação catalisada pela β -glucuronidase.

2.6.2 Extração de GUS de *Escherichia coli* e de GUS recombinante (rGUS) de milho e canola transgênicos

A extração de GUS em todos os trabalhos encontrados na literatura era feita usando-se um tampão com pH neutro e sem presença de sal. Na extração de GUS de *E. coli* (Aich *et al.*, 2001), rGUS produzida em milho (Kusnadi *et al.*, 1996) ou em canola (Bai e Nikolov, 1998 e 2002a), o mesmo tampão foi utilizado: tampão fosfato de sódio (NaPi) 50 mM pH 7,5 e, para o caso de rGUS extraída do milho e canola, uma relação sólido-líquido

de 1:10 foi usada. Em estudo feito com rGUS(His6) produzida em ervilha transgênica (Menkhaus *et al.*, 2004a), a extração máxima da proteína foi atingida em pH 7,0.

No caso do milho percebeu-se que a extração de rGUS era completa se mercaptoetanol 2% e dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% fossem adicionados ao tampão de extração (Kusnadi *et al.*, 1996). O uso de detergentes como Triton X-100 ou Tween-20 não aumentou a quantidade de rGUS extraída. Notou-se que o tamanho ou forma (lâminas ou flocos) das partículas de milho como também a velocidade de agitação não contribuíram significativamente na extração de rGUS. A presença de NaCl 0,5 mol/L ou inibidores de proteases no tampão de extração não aumentou a recuperação de rGUS. Também o aumento de pH para 10,0 não melhorou a recuperação de rGUS. Em caso de extração com SDS, a proteína foi inativada, e nem após a diálise recuperou-se sua atividade (Kusnadi *et al.*, 1998).

2.6.3 Purificação de GUS de fontes naturais e de rGUS de canola e milho transgênicos

2.6.3.1 *Escherichia coli*

Na purificação de GUS de *E. coli* por Blanco e Nemoz (1987), os autores utilizaram cromatografia de afinidade com tiofenil-glucunorídeo como ligante. O eluente desta cromatografia foi repassado na mesma coluna, mas usando condições de eluição diferentes da primeira cromatografia, obtendo-se uma pureza de 95%. Na primeira cromatografia, a GUS foi adsorvida usando Tris-HCl com pH 7,0. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão de adsorção com 3 mol/L de KCl. Para eluir a proteína, um gradiente de NaCl 0,1 a 0,4 mol/L foi utilizado em tampão de adsorção. A fração que apresentou atividade de GUS foi coletada, re-alimentada na coluna e a eluição realizada com gradiente de NaCl de 0,1 a 0,5 mol/L na tampão de adsorção.

Carlsson *et al.* (1996) utilizaram a precipitação de afinidade por íons metálicos – utilizando etileno glicol-bis(β -aminoetil éter) N,N,N',N'-ácido tetraacético (EGTA) com o íon metálico Zn^{2+} imobilizado e cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) usando Zn^{2+} para purificar GUS contendo a fusão de polihistidina. Os autores constataram que a enzima perdeu 90% de atividade devido à inibição pelo Zn^{2+} . Segundo Doyle *et al.*

(1955), íons metálicos inibem a atividade da GUS, sendo que Cu^{2+} , Hg^{2+} e Ag^{+} provocam a inibição completa, Ni^{2+} , Sn^{2+} e Zn^{2+} causam inibição parcial e Al^{3+} , Fe^{3+} e Sn^{3+} não têm o efeito na atividade de GUS. A inibição é reversível usando-se agentes quelantes e componentes contendo grupo sulfidril (por exemplo cisteína).

No trabalho de Aich *et al.* (2001) a purificação de GUS constitui-se de quatro etapas: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), filtração em gel (Superose 12) e cromatografia de troca iônica usando hidroxiapatita como suporte. A pureza da enzima obtida por este método estimada foi de 90% usando-se análise de SDS-PAGE.

2.6.3.2 Fígado bovino

A GUS de fígado bovino foi purificada usando-se cromatografia de afinidade com sacaro-1, 4-lactona (forte inibidor da atividade de GUS) e *o*-aminofenyl- β -gluconorídeo como ligantes (Harris *et al.* 1972). Em ambos casos a cromatografia foi feita nas mesmas condições, com tampões de adsorção e lavagem Tris 2 mmol/L e HCl 5 mmol/L a pH 7,3 sendo a GUS eluída usando ácido acético 0,1 mol/L.

2.6.3.3 Milho transgênico

A rGUS produzida em milho transgênico foi purificada (como proteína modelo) por dois processos (seqüência de cromatografias) semelhantes. No primeiro caso, Kusnadi *et al.* (1996) estudaram a influência do tecido da semente (embrião ou endosperma), como também o processo de desengorduramento na recuperação e purificação da rGUS. A primeira cromatografia da seqüência foi troca iônica usando DEAE-Toyopearl, para capturar a rGUS do extrato. O tampão de fosfato 50 mmol/L com pH 7,5 foi utilizado para lavagem e para eluir a rGUS, o tampão de lavagem com NaCl 300 mmol/L. As frações com rGUS foram combinadas em um “pool” que foi diluído com tampão de eluição contendo sulfato de amônio 1 mol/L e filtrado com filtro 0,45 μm de poro. O “pool” foi injetado na coluna de interação hidrofóbica de Octyl-Sepharose. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,5 com NaCl 300 mmol/L e sulfato de amônio 1 mol/L e

as proteínas fracamente adsorvidas foram eluídas usando tampão de lavagem com NaCl 150 mmol/L e sulfato de amônio 500 mmol/L. Para eluição da rGUS utilizou-se um gradiente de NaCl 105 mmol/L com sulfato de amônio 350mmol/l á NaCl 52 mmol/L com sulfato de amônio 175 mmol/L em tampão de extração. As frações que apresentaram atividade de rGUS foram agrupadas e dialisadas com água destilada. O produto da diálise foi injetado numa segunda coluna contendo DEAE-Toyopearl equilibrada com tampão de lavagem. A eluição foi feita com gradiente de NaCl 0 a 0,3 mol/L no tampão de lavagem. A pureza obtida para a rGUS usando esta seqüência de cromatografias foi aproximadamente 50%. Concluiu-se também que o amido presente no endosperma e o óleo da embrião não afetaram na purificação.

No segundo caso, Kusnadi *et al.* (1998) otimizaram as cromatografias realizadas anteriormente e incluíram a cromatografia de exclusão pelo tamanho como etapa final. A resina da cromatografia de interação hidrofóbica foi substituída pela resina Phenyl-Sepharose, mantendo-se o mesmo tampão de lavagem: fosfato de amônio 50 mmol/L pH 7,5. Inicialmente, a cromatografia de troca iônica com a resina DEAE-Sepharose Fast Flow foi usada para capturar a rGUS. A rGUS foi eluída usando-se NaCl 0,3 mol/L e mercaptoetanol 10 mmol/L no tampão de extração. O fator de purificação antigido foi 5 e a recuperação de atividade foi de 110% devido, possivelmente, à remoção de um ou mais inibidores da rGUS. Assim, testes foram feitos com GUS de *E. coli* para verificar se o extrato de milho continha substâncias que inibiam sua atividade. Observou-se que a GUS adicionada no extrato de milho perdeu em torno de 40% de atividade, comportamento parecido àquele quando se usou extrato de soja. As frações com rGUS presentes no eluato da primeira cromatografia foram agrupadas e diluídas 1:1 com tampão de eluição contendo sulfato de amônio 3 mol/L para atingir a concentração final de sulfato de amônio de 1,5 mol/L. Primeiro as proteínas fracamente adsorvidas foram eluídas usando sulfato de amônio 225 mmol/L no tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,5 e a rGUS eluída usando 140 mL de mesmo tampão mas sem sulfato de amônio. O fator de purificação e a recuperação foram, respectivamente 8 e 46% para rGUS extraída do endosperma e 10 e 42% para o caso de uso de embrião. Devido à baixa condutividade do eluato, a diálise não foi necessária. A terceira cromatografia usada foi a troca iônica (DEAE Sepharose Fast Flow) sendo que a rGUS foi eluída por meio de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,5 mol/L no tampão de

lavagem. Foram coletadas frações de 5 mL e as que continham rGUS foram diafiltradas (usando NaCl 150 mmol/L e glicerol 5% no tampão de lavagem) e concentradas até atingir um volume de 5 mL. O diafiltrado foi injetado na coluna Hi-Prep 26/60 Sephacryl S-300 HR. Os resultados de purificação de rGUS a partir de endosperma ou embrião são apresentados na Tabela 2.3. Os fatores de purificação foram elevados (da ordem de 1000 mas a recuperação final baixa, apenas 10%).

Tabela 2.3 Purificação de rGUS de endosperma e embrião (Kusnadi *et al.*, 1998).

	Fator de purificação		Recuperação (%)	
	Endosperma	Embrião	Endosperma	Embrião
Extração	1	1	100	100
DEAE-Sepharose	5	6	110	110
Phenyl-Sepharose	40	60	46	42
DEAE-Sepharose	130	190	36	23
Sephacryl S-300 HR	1.100	900	10	10

2.6.3.4 Canola transgênica

Zhang *et al.* (2001) compararam a purificação da GUS de *E. coli* e fusões de GUS com histidina produzidas em *E. coli* adicionadas a extrato de canola não transgênica (técnica chamada “spiking”) através de cromatografias de troca aniônicas utilizando três resinas: Q-Sepharose Fast Flow, DEAE-Sepharose Fast Flow e DEAE-Sepharose-CL6B. Em todos os casos, o tampão de extração foi fosfato 50 mmol/L a pH 7,0 e razão massa volume de 1:10. O “spiking” era feito combinando-se 3 mL de extrato da canola e 2 mL de solução de GUS, com concentração final de 0,4 a 1% de proteína total. Em todas as cromatografias, o volume de injeção na coluna foi de 5 mL e a eluição foi feita usando gradiente linear de NaCl de 0 a 1mol/L em tampão fosfato 50 mmol/L a pH 7,0. No caso de GUS purificada usando Q-Sepharose Fast Flow, o fator de purificação atingido foi 55 e a recuperação de 77%.

Bae e Glatz, 2002b purificaram rGUS de canola transgênica usando Streamline DEAE. A extração usando farinha de canola desengordurada com hexano foi feita com tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5 e razão massa volume 1:10. Compararam-se duas formas de eluição. No primeiro caso, a eluição foi feita usando gradiente linear de

NaCl 0 a 500 mmol/L no tampão de extração. No segundo caso, as proteínas fracamente adsorvidas (em torno de 70% de proteínas totais) foram eluídas com NaCl 175 mmol/L no tampão de extração e a rGUS com NaCl 500 mmol/L no tampão de extração. No primeiro caso (gradiente linear), o fator de purificação foi 18 e a recuperação de 104% e no segundo de 31 e 112%, respectivamente. Observou-se que no segundo caso, a fator de recuperação quase dobrou.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais e as metodologias empregadas no presente trabalho. Como o objetivo geral do trabalho é avaliar a soja como biorreator, os dados obtidos nos estudos de extração e purificação foram comparados com os já publicados (Figura 3.1). O planejamento geral dos experimentos utilizados para obter estes dados está apresentado na Figura 3.2.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

A β -glucuronidase de *E. coli* (β -glucuronidase from *E. coli* Type IX-A), o substrato metil-umbeifenil-glucuronídeo (MUG) e metil-umbeifenila (MU), usado como referência no ensaio de atividade de GUS, foram adquiridos da Sigma (EUA). Os principais reagentes utilizados na preparação dos solventes – ácido fosfórico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, ácido cítrico, citrato de sódio, bicarbonato de sódio, sulfato de amônio, cloreto de sódio e hexano –eram de grau analítico (Synth, Brasil).

3.1.2 Soja transgênica e não-transgênica

Sementes de soja variedade BR-16 (chamada neste trabalho de BR-16) e variedade da soja BR-16 geneticamente modificada expressando a rGUS (chamada neste trabalho de BR-16tg) foram doadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ambas variedades BR-16 e BR-16tg eram de ano 2003 cultivadas no estado do Paraná, Brasil. Para expressar a rGUS usou-se promotor constitutivo (ACT2p) e terminador “nost”. A transformação genética foi feita utilizando técnica de bombardeamento de região meristemática dos embriões (Aragão *et al.*, 2000), que resultou em soja transgênica fértil. O cassete de

expressão também possuía o gene marcador *ahas* (isolado de *Arabidopsis thaliana*) para conferir tolerância ao herbicida imazapyr (Aragão *et al.*, 2000).

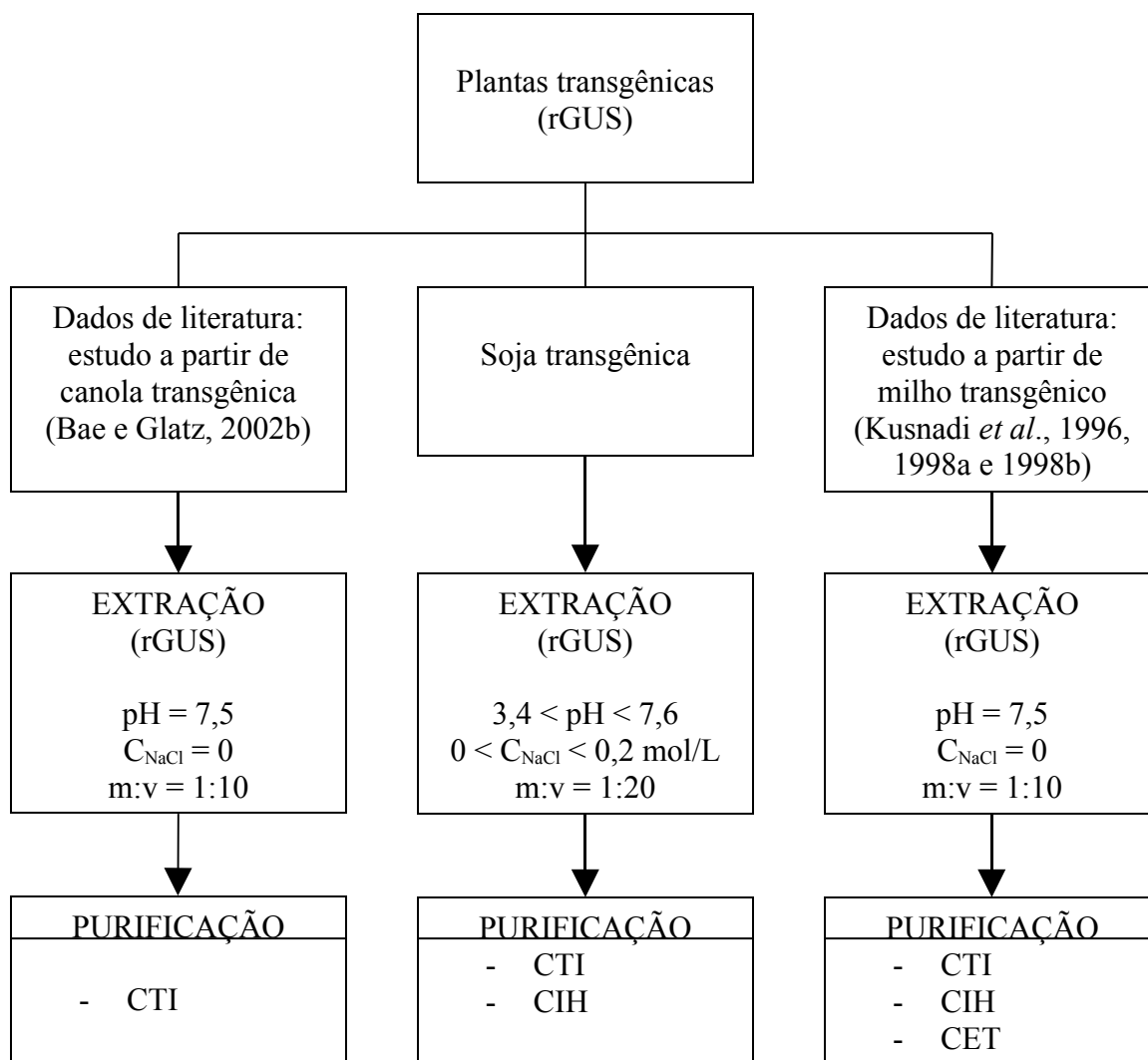


Figura 3.1 Fluxograma esquematizando os estudos descritos na literatura sobre extração e purificação de rGUS e o planejado neste trabalho. C_{NaCl} = concentração de NaCl; m:v = massa de farinha de soja : volume de tampão; CTI = cromatografia de troca iônica; CIH = cromatografia de interação hidrofóbica; CET = cromatografia de exclusão pelo tamanho.

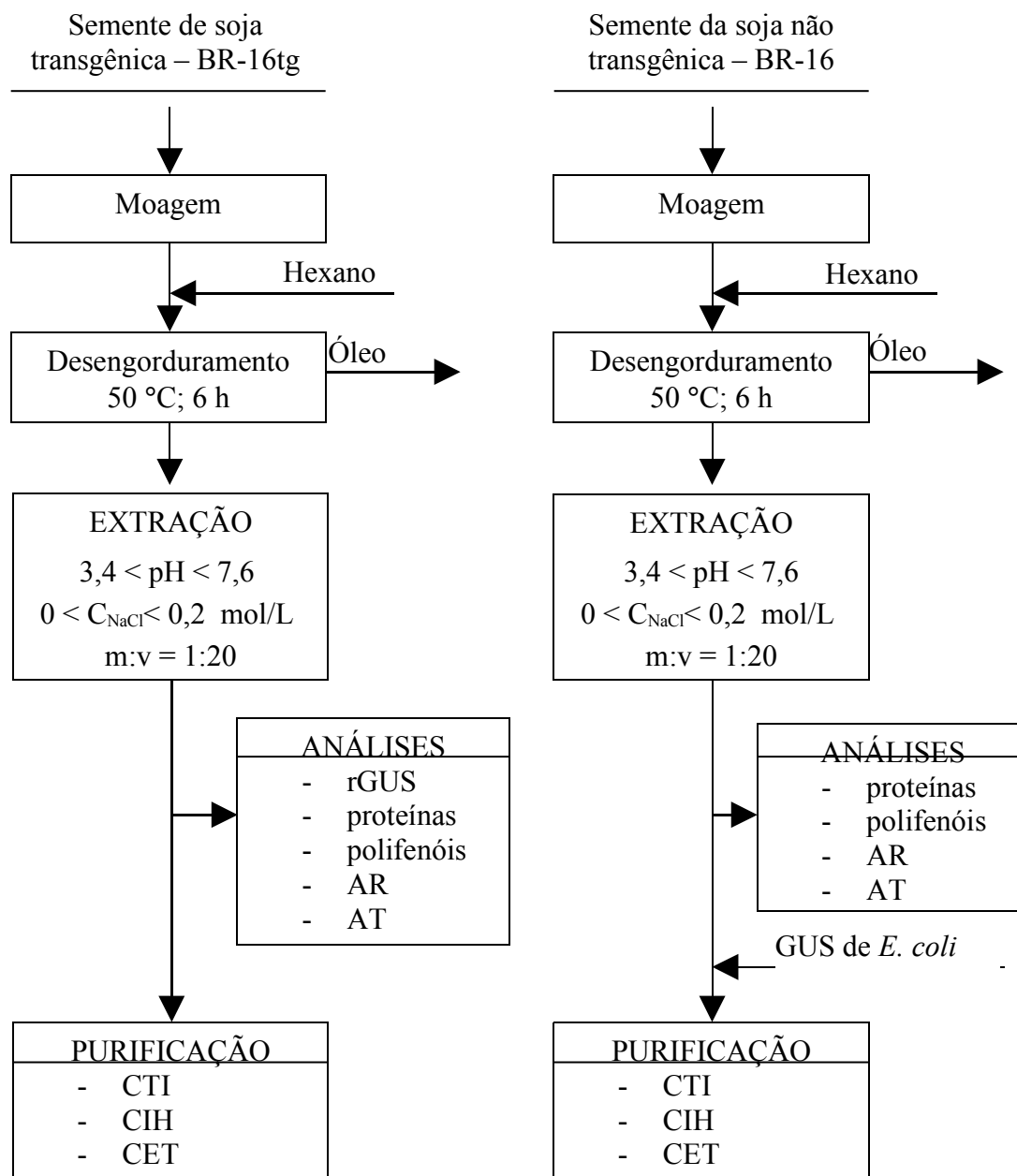


Figura 3.2 Fluxograma esquematizando o plano de trabalho. C_{NaCl} = concentração de NaCl; m:v = massa de soja : volume de tampão; CTI = cromatografia de troca iônica; CIH = cromatografia de interação hidrofóbica; CET = cromatografia de exclusão pelo tamanho; AR = açúcares redutores; AT = açúcares totais

3.2 Métodos

3.2.1 Moagem das sementes

As sementes de soja foram moídas a seco utilizando um moedor de café (MIMI-MATE PLUS, Cuisinart, EUA). A temperatura de farinha foi monitorada durante a moagem e mantida abaixo de 60 °C. A farinha da soja foi peneirada, usando-se uma peneira de abertura 0,5 mm. A fração com diâmetro de partícula menor que 0,5 mm foi usada para desengorduramento.

3.2.2 Desengorduramento da farinha de soja

O desengorduramento da farinha da soja foi feito usando-se hexano (Synth, Brasil) em aparelho tipo Soxhlet. Um volume de 400 mL de hexano foi usado para 100 g de farinha da soja. O desengorduramento da farinha foi feito a 60 °C por 6 horas e a farinha desengordurada retirada do aparelho e deixada no dessecador à temperatura ambiente durante a noite para evaporar o hexano da farinha.

3.2.3 Extração aquosa com variação de pH e força iônica

Em béqueres de 250 mL (5,5 cm de diâmetro), 5,0 g de farinha de soja desengordurada, com teor de óleo menor que 2%, foram agitados com 100 mL de tampão aquoso (razão volume:massa de 20:1) por 30 min a 20 °C. A força iônica da solução extratora foi variada pela adição de NaCl. O pH desejado foi mantido com tampão de citrato 50 mmol/L e fosfato 50 mmol/L. Utilizou-se um agitador mecânico modelo Q-251D da marca IKA Labortechnik (Alemanha) com um impelidor do tipo pás inclinadas (4 cm de diâmetro e inclinação de pás de 45°, construído pela empresa Kroma, Brasil) a uma rotação de 500 rpm. Ensaios de cinética de extração foram realizados, para determinar o tempo necessário para se extrair a rGUS da soja transgênica. Após o período de 30 min (o tempo de extração escolhido), a suspensão foi centrifugada em 15.000 g por 20 min a 5 °C em uma centrífuga (5804R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi removido, filtrado em uma membrana de poro de 3 µm (Inlab, Brasil) e utilizado imediatamente para análise ou congelado em tubos Eppendorf de 1 mL para análise posterior.

3.2.4 Planejamento experimental

O objetivo da seleção das condições de extração foi tentar minimizar a quantidade de proteínas nativas, polifenóis e açúcares extraídos e maximizar a extração de rGUS. Os limites para planejamento experimental (Tabela 3.1) foram escolhidos com base de dados da literatura: proteínas de soja têm solubilidade mínima em pH 4,2 (Wolf, 1970) e concentração de sais monobásicos (NaCl) de 100 mM (Smith *et al.* 1938b); para rGUS(His6) de ervilha, a extração máxima da proteína foi obtida em pH 7,0 (Menkhaus *et al.*, 2004a). O modelo polinomial quadrático apresentado na Equação 3.1 foi ajustado para cada uma das respostas, sendo que os parâmetros não significativos foram retirados do modelo e adicionados à falta de ajuste.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad \text{Equação 3.1}$$

Na equação 3.1, Y representa a variável resposta ou dependente; x_1 e x_2 representam os níveis codificados das variáveis independentes; β_0 é o coeficiente que representa a média; β_1 e β_2 são os coeficientes dos termos lineares; β_{11} e β_{22} são os coeficientes dos termos quadráticos e β_{12} é o coeficiente do termo de interação.

Tabela 3.1 Ensaios do planejamento experimental fatorial completo da extração utilizando com tampão citrato – fosfato 50 mmol/L de semente de soja BR-16 e BR-16tg.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis decodificadas	
	pH	C _{NaCl}	pH	C _{NaCl} (mmol/L)
1	+1	+1	7,00	170
2	+1	-1	7,00	30
3	-1	+1	4,00	170
4	-1	-1	4,00	30
5	0	0	5,50	100
6	0	0	5,50	100
7	0	0	5,50	100
8	+1,41	0	7,60	100
9	-1,41	0	3,40	100
10	0	+1,41	5,50	200
11	0	-1,41	5,50	0

3.2.5 Concentração de proteína total

As concentrações de proteína total nas amostras foram determinadas utilizando o método de Bradford (1976), com albumina de soro bovino (Sigma, EUA) como referência para a obtenção da curva padrão. O procedimento se constituiu em adicionar 200 μ L de solução cuja concentração foi medida em 1000 μ L da solução contendo azul de Commasie e agitar a mistura em vortex. Após 10 min fazia-se a medida da absorbância da mistura reacional a 595 nm. Quando maior sensibilidade foi necessária, utilizou-se o reagente Protein Plus (Pierce, EUA), também baseado na coloração por azul de Commasie. Colocou-se 750 μ L de solução junto com 750 μ L de reagente Protein Plus, agitou-se a mistura em vortex e, após 10 min, a absorbância a 595 nm da mistura reacional foi medida.

3.2.6 Electroforese SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em equipamento Mini-Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes e redutoras (Laemmli, 1970). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100 °C por 5-7 min, com ou sem presença de β -mercaptoetanol no tampão de desnaturação. Alíquotas de 5 a 15 μ L de cada amostra foram aplicadas nos géis e estes submetidos a uma voltagem de 180 mV em cuba vertical. O procedimento de coloração dos géis foi feito usando solução de azul de Commasie R 250 a 0,2% ou nitrato de prata, segundo protocolo descrito por Morrissey (1981). Os marcadores de massa molecular usados foram albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina de ovo de galinha (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa), anidrase carbônica de eritrócito bovino (29 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24 kDa), inibidor de tripsina da soja (20 kDa), α -lactalbumina de leite bovino (14,2 kDa) e aprotinina de pulmão bovino (6,5 kDa).

As caracterizações dos extratos da soja e a identificação das proteínas presentes nos extratos foram feitas comparando as bandas protéicas com as obtidas por Wolf *et al.* (1992) que realizaram a eletroforese, sem β -mercaptoetanol no tampão de desnaturação, juntamente com a análise de sequência de aminoácidos “N-terminal” para identificar as

proteínas ou subunidades destas. As bandas eletroforéticas foram identificadas de acordo com as suas massas moleculares: lipoxigenase (100 kDa), subunidades da β -conglitinina (α' , α e β com as massas moleculares de 76, 63 e 48 kDa, respectivamente), β -amilase (55 kDa), subunidades da glicinina (A_3 com massa molecular 40 kDa, subunidades A_{1a} , A_{1b} e A_2 com massas moleculares iguais a 34 kDa e subunidade B de massa molecular de 22 kDa), aglutinina (32 kDa) e inibidor da tripsina de soja (20 kDa).

3.2.7 Concentração de carboidratos

As concentrações de açúcares redutores (AR) e açúcares totais (AT) foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) como descrito por Miller *et al.* (1959), que se baseia na reação de óxido-redução de glicose pelo DNS. As curvas de calibração foram feitas com glicose (no caso de AR) e sacarose (no caso de AT) da Synth (Brasil). O protocolo do método consiste em adicionar 0,5 mL da amostra a 0,5 mL de solução de reagente DNS e aquecer a mistura a 100 °C durante 5 min. Em seguida, resfriar a amostra em banho de gelo e adicionar 8,0 mL de solução de tartarato de sódio e potássio 54 mmol/L. Por fim, medir a absorbância a 540 nm. A concentração de AR é então determinada pela curva padrão de glicose. O procedimento para determinação de AT possui uma etapa adicional ao prévio procedimento de AR, que é a hidrólise ácida dos carboidratos da amostra. Para tal, adiciona-se 2,0 mL de HCl 2,0 mol/L a 2,0 mL da amostra e aquece-se a 100 °C por 5 min. Após o resfriamento em banho do gelo, adiciona-se 2,0 mL de NaOH 2,0 mol/L. A partir daí, foi determinado o teor de AR como descrito anteriormente, porém utilizando uma curva padrão de sacarose, cujas soluções de concentrações conhecidas são também previamente hidrolisadas por HCl.

3.2.8 Conteúdo de óleo

A concentração de óleo foi medida usando método gravimétrico com hexano como solvente em aparelho do tipo soxhlet (determinador de lipídeos Q-308G22, Quimis, Brasil) segundo método 920.39 da AOAC (1995). O procedimento constituiu-se em pesar 5,0 g de farinha de soja e envolvê-la em papel de filtro e acomodar em um cilindro de

celulose. O cilindro era imergido no solvente em ebulição durante 30 min. Após este tempo o cilindro foi levantado e o gotejamento sobre a amostra foi mantido por mais 15 min para se fazer uma lavagem do óleo contido no solvente que molhava a farinha. Depois da recuperação do solvente, o copo da fervura contendo o óleo foi levado para a secagem em estufa a 70 °C durante 15 min. Após o resfriamento, o copo de fervura, previamente tarado, foi pesado e o conteúdo de óleo determinado.

3.2.9 Concentração de compostos fenólicos

Polifenóis em solução foram quantificados através do método colorimétrico azul da Prússia (Price e Butler, 1977) usando-se $K_3Fe(CN)_6$ como reagente e D-catequina (Sigma, EUA) para construção de uma curva padrão. A base química da metodologia é a redução, pelos grupos hidroxifenólicos, de íons Fe^{+3} a Fe^{+2} , os quais são complexados com $K_3Fe(CN)_6$ para produzir uma solução de coloração azul. O procedimento de análise consiste em adicionar 250 µL de solução de $FeCl_3$ 0,1 mol/L (preparada em solução de HCl 0,1 mol/L) e 250 µL de $K_3Fe(CN)_6$ 0,1 mol/L a 5,0 mL da amostra. Após 10 min da adição do último reagente, fez-se a medida da absorbância da mistura reacional a 720 nm.

3.2.10 Análise de atividade de GUS

O método da atividade de GUS utilizado foi adaptado do método Jefferson (Brasileiro e Carneiro, 1998). Baseia-se na hidrólise do substrato metil-umberifenil-gucuronóideo (MUG) pela GUS, cujo produto da reação é metila-umberifenila (MU). Em pH alcalino (11,5) a MU é excitada com luz de comprimento de onda 360 nm e a emissão é medida no comprimento de onda 460 nm. Uma unidade enzimática corresponde à hidrólise de 1 pmol de substrato por minuto. Para preparar curva da calibração usou-se solução de MU a várias concentrações.

Em um ensaio de medida de atividade, 150 µL do tampão de reação (2,2 mg de MUG dissolvido em 2,5 mL de tampão de extração para atingir a concentração final da MUG de 2 mmol/L) foi pré-aquecido em banho termostatizado por 10 min a 37 °C. Depois, adiciona-se 50 µL de solução da amostra e imediatamente uma alíquota de 20 µL da

mistura reacional foi retirada e transferida para 1980 μL de tampão de parada (Na_2CO_3 0,2 mol/L pH 11,5) para determinar o ponto zero de reação. As alíquotas de 20 μL são retiradas dos tubos contendo a mistura reacional, incubados a 37 $^\circ\text{C}$, durante uma hora, a cada 15 min, as quais foram transferidas para 1980 μL de tampão de parada. Em seguida, a fluorescência foi medida no espectrômetro de fluorescência modelo F-4500 (Hitachi, Japão), onde a MU liberada pela rGUS foi excitada com 365 nm e a absorbância da radiação emitida foi medida a 460 nm. A atividade e atividade específica foram calculadas conforme Equações 3.2 e 3.3.

$$A_{GUS} = \frac{U_{f(MEDIDA)}}{U_{f(CALIBRAÇÃO)}} \cdot \frac{V_{REAÇÃO}}{V_{EXTRATO}} \cdot \frac{1}{V_{MEDIDO}} \quad \left[\frac{\text{pmolMU}}{\text{min} \cdot \text{mL}} \right] \quad \text{Equação 3.2}$$

$$AE_{GUS} = \frac{U_{f(MEDIDA)}}{U_{f(CALIBRAÇÃO)}} \cdot \frac{V_{REAÇÃO}}{V_{EXTRATO}} \cdot \frac{1}{V_{MEDIDO} \cdot C_{PROTEÍNA}} \quad \left[\frac{\text{pmolMU}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] \quad \text{Equação 3.3}$$

em que:

$U_{f(MEDIDA)}$	=	variação de absorção com o tempo (1/min)
$U_{f(CALIBRAÇÃO)}$	=	inclinação de curva de calibração com UM (1/pmol MU)
$V_{REAÇÃO}$	=	volume de reação = 200 μL (μL)
$V_{EXTRATO}$	=	volume de extrato utilizado no ensaio = 50 μL (μL)
V_{MEDIDO}	=	volume de mistura reacional usada na medida = 20 μL (μL)
$C_{PROTEÍNA}$	=	concentração de proteína (mg/mL)
A_{GUS}	=	atividade de GUS (pmol MU/(min·mL))
AE_{GUS}	=	atividade específica de GUS (pmol MU/(min·mg))

3.2.11 Ensaios de cromatografia de troca aniônica usando resina DEAE-Sephadex

O gel DEAE-Sephadex A25 (Pharmacia, Suécia) foi preparado da seguinte maneira: 1,025 g de gel foi colocado em béquer juntamente com 30 mL de tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,00 contendo NaCl 200 mmol/L. O béquer foi levado para um banho a 100 $^\circ\text{C}$, tampado com placa de vidro e levemente agitado a cada 15 min. Depois de duas horas deixou-se a solução resfriar até atingir a temperatura ambiente. Uma coluna C10/10

(Pharmacia, Suécia) com 10,0 cm de altura e 1,0 de diâmetro foi empacotada com o gel até atingir um volume de 5,5 mL de leite.

O pH dos extratos da soja foi ajustado para pH 7,0 usando-se a solução de fosfato bibásico de sódio 500 mmol/L pH 11,40 (pH ajustado com NaOH), para resultar em uma concentração final de fosfato 50 mmol/L. O extrato com o pH ajustado foi usado para alimentação da coluna.

Em todas as cromatografias, a coluna foi equilibrada com tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,00 (tampão A) e vazão era de 1,0 mL/min. Depois da injeção, a coluna foi lavada com pelo menos 55 mL de tampão A (10 volumes de coluna). Dois sistemas cromatográficos foram usados. O sistema Waters consistia de bombas 1525 Binary HPLC Pump com detector 2487 Dual λ Absorbance detector (Waters, EUA) e o sistema Gilson era composto de bomba Miniplus 3 com Detector 112 UV/VIS (Gilson, França). Três modos de eluição foram utilizados: 1) gradiente linear de tampão A a tampão A com NaCl 500 mmol/L; 2) eluição em degrau usando tampão A com NaCl 200 mmol/L e tampão A com NaCl 300 mmol/L e 3) eluição usando tampão A com NaCl 300 mmol/L (tampão B).

Depois de cada cromatografia, a coluna foi regenerada usando solução aquosa de NaCl 1,0 mol/L. As frações das cromatografias foram coletadas e a atividade de GUS e a concentração da proteína total foram medidas. Também eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas foi realizada. Os fatores de purificação e recuperação foram calculados para “pools” de frações contendo atividade de GUS conforme as Equações 3.4 e 3.5.

$$\text{Fator de purificação} = \frac{AE_{GUS}(\text{pool})}{AE_{GUS}(\text{injetada})} \quad \text{Equação 3.4}$$

$$\text{Recuperação} = \frac{A_{GUS}(\text{pool}) \cdot V(\text{pool})}{A_{GUS}(\text{injetada}) \cdot V(\text{injetado})} \quad \text{Equação 3.5}$$

3.2.12 Ensaios de cromatografia de interação hidrofóbica usando Streamline-Phenyl

O gel Streamline-Phenyl (Pharmacia, Suécia) foi preparado da seguinte maneira: o gel foi colocado em sonificador e degaseificado sob pressão reduzida. A coluna C10/20 (Pharmacia, Suécia) com 20,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro foi empacotada com este gel para se atingir um volume de leito de 12,0 mL.

Para preparar as amostras a serem injetadas, as frações de cromatografia de troca iônica foram combinadas com tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,00 com NaCl 300 mmol/L (tampão B) contendo sulfato de amônio 3,0 mol/L na proporção 1:1 (v/v) para atingir a concentração final de sulfato de amônio de 1,5 mol/L. Um volume de 10 mL da amostra foi injetado e a vazão da coluna foi mantida durante todo o ensaio em 1,0 mL/min. A lavagem foi feita usando-se 40 mL de tampão B com sulfato de amônio 1,5 mol/L. As proteínas fracamente adsorvidas foram eluídas usando-se dois passos, onde o primeiro tampão era o tampão B com sulfato de amônio 0,5 mol/L e o segundo apenas o tampão B. A GUS foi eluída usando-se água ultra pura. As frações das cromatografias foram coletadas e a atividade de GUS e a concentração da proteína total foram medidas. Também eletroforese SDS-PAGE das frações eluídas foi realizada. Os fatores de purificação e recuperação foram calculados para “pool” de frações contendo atividade de GUS. A regeneração da coluna foi feita usando-se pelo menos 250 mL de água ultra pura.

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

4.1 Extração e análise dos extratos de sementes de soja BR-16

Realizou-se o estudo da extração dos componentes nativos da soja (proteínas, carboidratos e polifenóis) utilizando a semente da soja BR-16. O estudo da cinética de extração foi feito para definir o tempo em que a extração alcançasse o equilíbrio, avaliado em termos de concentração de proteínas totais extraídas. Os resultados das extrações nas várias condições estão descritos na Tabela 4.1 e discutidos a seguir.

Tabela 4.1 Resultados dos ensaios de extração para a semente de soja BR-16.

Ensaio	Variáveis codificadas		Condições de extração		Concentrações dos componentes nativos medidos			
	pH	C _{NaCl}	pH	C _{NaCl}	C _P	C _F	C _{AR}	C _{AT}
				(mmol/L)	(mg/mL)	(mmol/L)	(mg/mL)	(mg/mL)
1	-1	-1	4	30	1,55	0,084	0,20	5,69
2	-1	1	4	170	2,19	0,099	0,19	4,81
3	1	-1	7	30	6,36	0,092	0,45	5,80
4	1	1	7	170	7,32	0,179	0,49	5,49
5	-1,41	0	3,4	100	1,92	0,103	0,13	5,38
6	1,41	0	7,6	100	7,24	0,201	0,82	5,29
7	0	-1,41	5,5	0	4,55	0,143	0,37	5,16
8	0	1,41	5,5	200	5,84	0,180	0,39	5,46
9	0	0	5,5	100	5,55	0,189	0,47	5,34
10	0	0	5,5	100	5,84	0,163	0,39	4,45
11	0	0	5,5	100	5,35	0,156	0,22	5,10

C_{NaCl} – concentração de NaCl; C_P – concentração de proteína total; C_F – concentração dos polifenóis; C_{AR} – concentração de açúcares redutores; C_{AT} – concentração de açúcares totais.

4.1.1 Estudo de cinética para definir o tempo de extração

Para definir o tempo de extração, a concentração de proteínas foi medida ao longo do tempo de uma extração com tampão fosfato 50 mmol/L e NaCl 100 mmol/L a pH 5,5 e a m:v de 1:20. Os resultados apresentados na Figura 4.1 demonstram, que a concentração de proteínas no extrato atingia um valor máximo depois de 15 min.

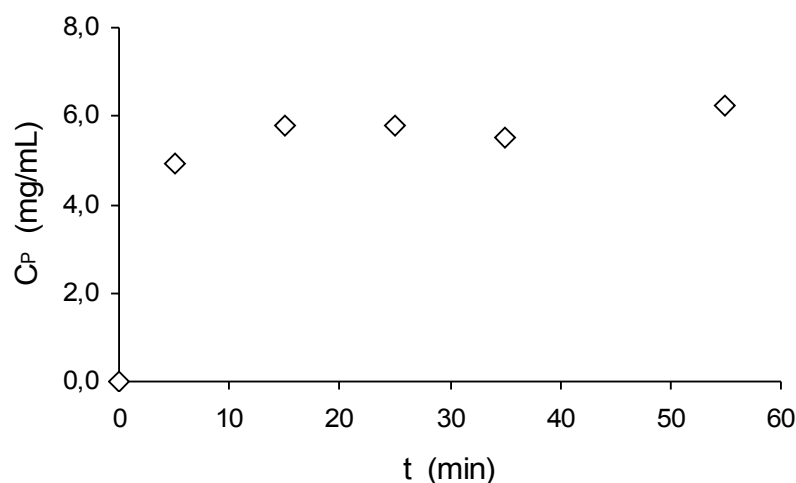


Figura 4.1 Cinética de extração de proteína de semente de soja BR-16. Solução extratora: tampão de fosfato 50 mmol/L e NaCl 100 mmol/L a pH 5,5; temperatura, 20 °C; razão massa:volume 1:20.

Portanto nos estudos a seguir, utilizou-se um tempo de extração de 30 min. Este tempo foi o mesmo usado para extração de rGUS de canola (Zhang *et al.*, 2001); no caso de milho transgênico contendo rGUS, os tempos de extração usados foram pelo menos 15 min (Kusnadi *et al.*, 1996 e 1998a) ou 25 min (Kusnadi *et al.*, 1998b).

4.1.2 Extração das proteínas da semente de soja BR-16

A concentração das proteínas nos extratos variou de 1,55 mg/mL (condição de extração a pH 4,0 e NaCl 30 mmol/L) a 7,24 mg/mL (condição de extração a pH 7,6 e NaCl 100 mmol/L), sendo 4,7 vezes maior em pH 7,6 do que em pH 4,0 (Figura 4.2). Esta diferença, se desconsideramos as diferentes concentrações de NaCl, está em concordância

com trabalho de Smith *et al.* (1938a), no qual a concentração de proteínas extraídas usando NaCl 100mM era 4,3 vezes maior em pH 7,6 do que em pH 4,0.

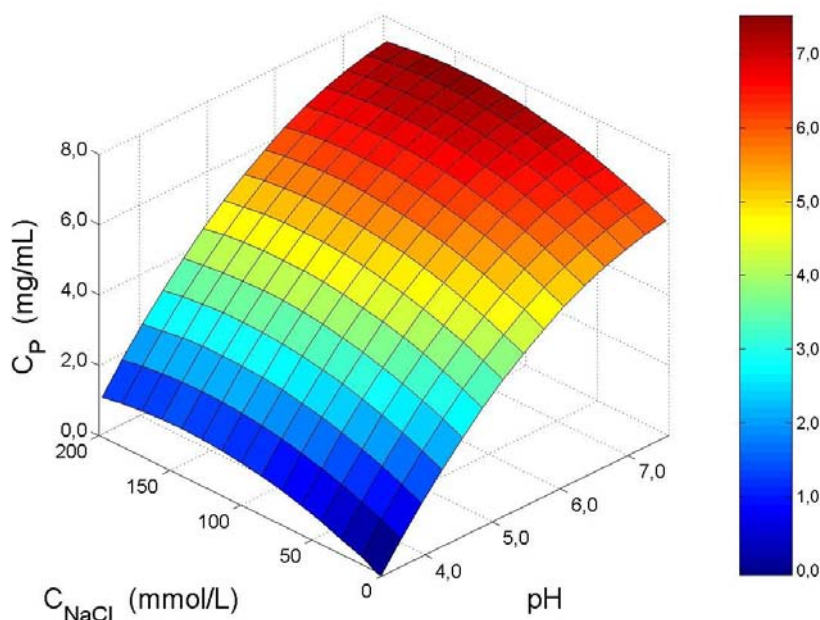


Figura 4.2 Superfície de resposta para a concentração de proteína (C_p) nos extratos de semente da soja BR-16 em função de pH e concentração de NaCl.

A Tabela 4.2 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t , o valor p e os limites de confiança para a concentração das proteínas no extrato de semente da soja BR-16. Todos os efeitos, exceto a interação entre o pH e a força iônica se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança. Isto significa, que não há interação entre estas duas variáveis na extração de proteínas para a faixa estudada.

Estes resultados estão em concordância com trabalho de Smith *et al.* (1938a), devido ao fato, que a adição de sal causa um aumento de solubilidade das proteínas da soja. O efeito de diminuição de solubilidade das proteínas em pH neutro e concentração de NaCl 100 mM, como escrito pelo Smith *et al.* (1938b) não foi observado, possivelmente porque o trabalho do Smith e colaboradores foi feito usando apenas água e, neste trabalho, o tampões de fosfato e citrato foram usados. Isto poderia interferir nos resultados, pois a concentração

de tampão em si já era 100 mM. Os efeitos das variáveis estudadas são apresentadas na Figura 4.3.

Tabela 4.2 Coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração das proteínas no extrato de sementes da soja BR-16.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	5,623	0,109	51,513	0,000	5,153	6,093
pH (L)*	2,184	0,067	32,668	0,001	1,896	2,471
pH (Q)*	-0,655	0,080	-8,238	0,014	-0,998	-0,313
C_{NaCl} (L)*	0,429	0,067	6,421	0,023	0,142	0,717
C_{NaCl} (Q)*	-0,348	0,080	-4,369	0,049	-0,690	-0,005
pH(L)×C_{NaCl}(L)	0,080	0,095	0,851	0,484	-0,326	0,487

* Fatores estatisticamente significativos $p < 0,05$ (95% nível de confiança); L – coeficiente linear; Q – coeficiente quadrático.

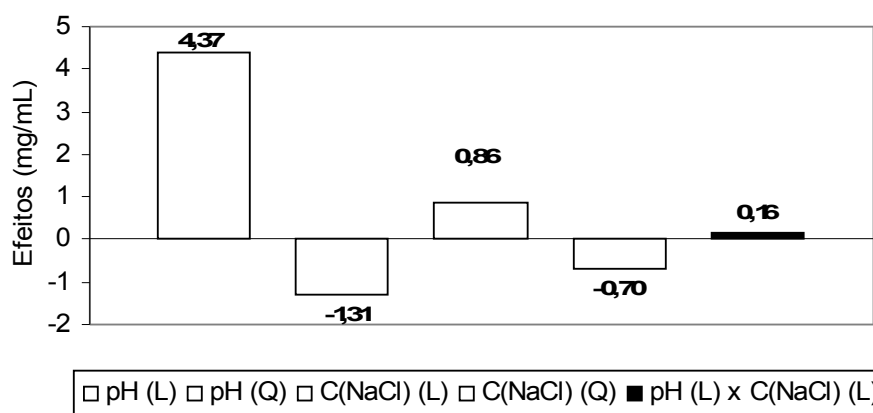


Figura 4.3 Histograma do efeito do pH e concentração de NaCl sobre a concentração das proteínas nos extratos de semente de soja BR-16.

4.1.3 Extração dos polifenóis de semente de soja BR-16

A concentração de polifenóis extraídas em todos os ensaios variou de 0,084 a 0,201 mmol/L ou 24,39 a 58,35 mg/mL (expresso em concentração de catequina). Dados sobre a concentração de polifenóis da soja solúveis em água não foram encontrados na literatura. A superfície de resposta para concentração dos polifenóis esta apresentada na Figura 4.4.

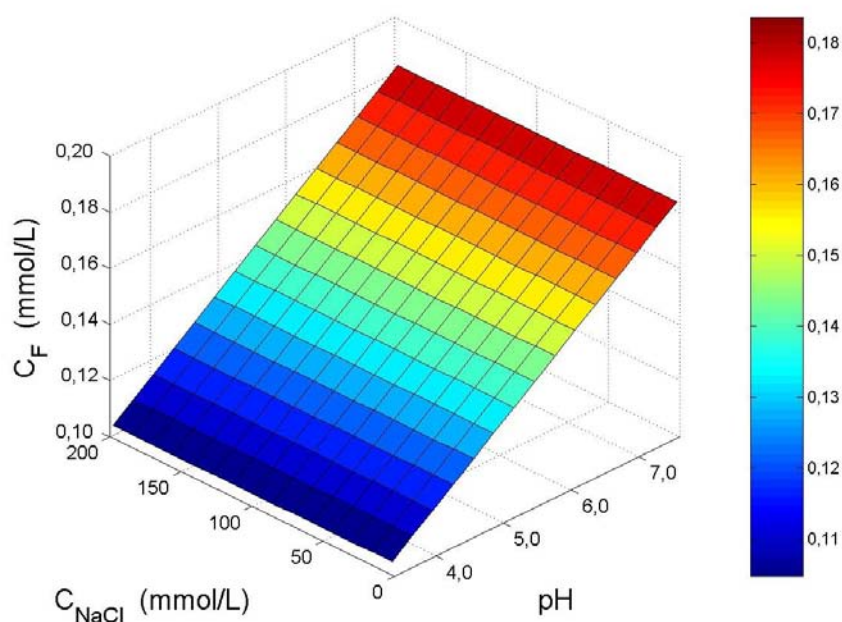


Figura 4.4 Superfície de resposta para a concentração de polifenóis (C_F) nos extratos de semente da soja BR-16 em função de pH e concentração de NaCl.

A Tabela 4.3 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos polifenóis no extrato de semente de soja BR-16. Somente o efeito linear do pH se mostrou estatisticamente significativo, indicando que a força iônica não influencia na concentração dos polifenóis extraídos das sementes de soja BR-16. Os efeitos padronizados das variáveis estudadas estão apresentados na Figura 4.5.

Tabela 4.3 Coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração de polifenóis no extrato de sementes de soja BR-16.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	0,169	0,010	16,870	0,003	0,126	0,213
pH (L)*	0,028	0,006	4,576	0,045	0,002	0,055
pH (Q)	-0,019	0,007	-2,652	0,118	-0,051	0,012
C_{NaCl} (L)	0,019	0,006	3,118	0,089	-0,007	0,046
C_{NaCl} (Q)	-0,015	0,007	-2,034	0,179	-0,046	0,017
pH(L)×C_{NaCl}(L)	0,018	0,009	2,046	0,177	-0,020	0,055

* Fatores estatisticamente significativos $p < 0,05$ (95% nível de confiança)); L – coeficiente linear; Q – coeficiente quadrático.

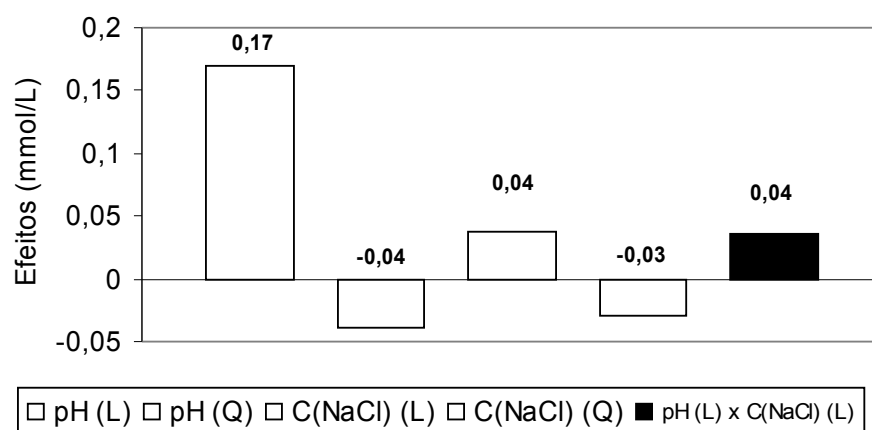


Figura 4.5 Histograma do efeito do pH e concentração de NaCl sobre a concentração dos polifenóis nos extratos de soja BR-16.

4.1.4 Extração dos açúcares redutores de semente de soja BR-16

As concentrações dos açúcares redutores nos extratos (0,13 a 0,82 mg/mL) representam de 0,26 a 1,64% de massa total da farinha. Smith *et al.* (1972) indicam que a concentração de açúcares redutores diminui (abaixo de 1,8% de massa total do semente), quando a semente amadurece. Portanto se consideramos a soja BR-16 madura, a concentração dos açúcares redutores está em concordância com dados encontrados na literatura. Foi observado, também, que a concentração dos açúcares redutores aumenta com

o aumento do pH. A superfície de resposta correspondente a açúcares redutores é apresentada na Figura 4.6.

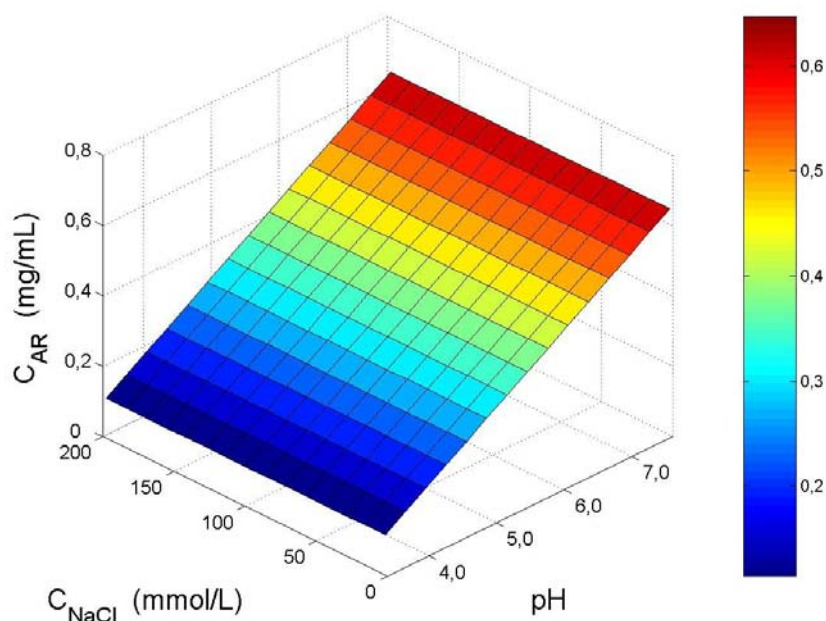


Figura 4.6 Superfície de resposta para a concentração de açúcares redutores (C_{AR}) nos extratos em função de pH e concentração de NaCl.

A Tabela 4.4 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos açúcares redutores no extrato de semente de soja BR-16. Apenas o efeito linear de pH se mostrou estatisticamente significativo. Isto sugere que a força iônica não influencia na concentração dos açúcares redutores extraídos de soja BR-16 não transgênica. Os efeitos padronizados das variáveis estudadas estão apresentados na Figura 4.7.

Tabela 4.4 Coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos açúcares redutores no extrato de soja BR-16.

	Coefficiente de regressão	Desvio padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	0,391	0,046	8,587	0,013	0,195	0,587
pH (L)*	0,190	0,028	6,819	0,021	0,070	0,310
pH (Q)	0,019	0,033	0,572	0,625	-0,124	0,162
C_{NaCl} (L)	0,008	0,028	0,301	0,792	-0,112	0,128
C_{NaCl} (Q)	-0,030	0,033	-0,905	0,461	-0,172	0,113
pH(L)×C_{NaCl}(L)	0,011	0,039	0,270	0,813	-0,159	0,180

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

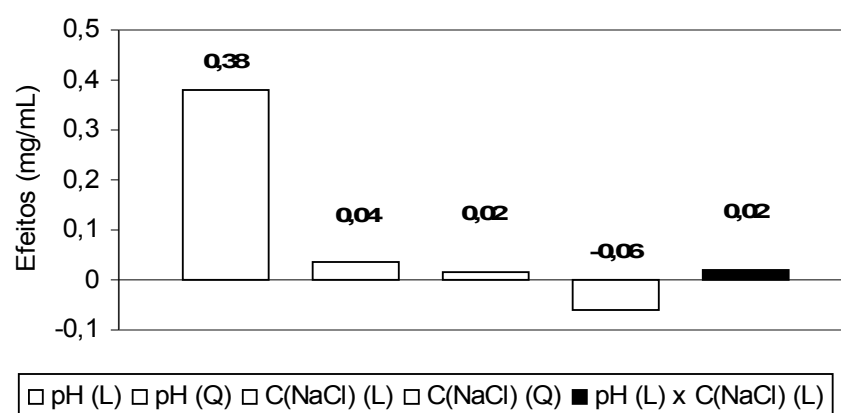


Figura 4.7 Histograma do efeito do pH e concentração de NaCl sobre a concentração dos açúcares redutores nos extratos de soja BR-16.

4.1.5 Extração das açúcares totais da soja BR-16

As concentrações dos açúcares totais nos extratos (4,45 a 5,69 mg/mL) representam de 7,36 a 9,40% de massa total da farinha. Este resultado está em concordância com a literatura (Smith *et al.*, 1972), que mostra que a concentração de açúcares totais em semente de soja madura está em torno de 7,4%.

Nenhum dos efeitos se mostrou estatisticamente significativo, ou seja, nem o pH nem a concentração de NaCl influenciam na concentração dos açúcares totais extraídos de semente de soja BR-16. A concentração média dos açúcares redutores em todos os ensaios foi 5,27 mg/mL expressa em concentração de glicose.

4.1.6 Análise do perfil das proteínas extraídas por SDS-PAGE

A análise qualitativa das proteínas extraídas foi feita através de eletroforese SDS-PAGE. As amostras foram congeladas depois da extração e usadas sem diluição. A concentração do gel foi 15% de poliacrilamida e a revelação foi feita com azul de Comassie R250.

Observou-se no gel de eletroforese referente aos extratos obtidos a valores de pH igual ou acima de 5,50 (Figura 4.8, pistas de 4 a 10) bandas fortes de massas moleculares de aproximadamente 76, 63 e 48 kDa, correspondentes às subunidades de β -conglucina, 40, 34 e 22 kDa, correspondentes às subunidades de glicina, e 20 kDa correspondente ao inibidor de tripsina de soja (Wolf *et al.*, 1992). A presença majoritária destas proteínas nos extratos é explicada, em parte, por β -conglucina e a glicina representarem cerca de 50% da proteína total solúvel da semente de soja (Menkhaus *et al.*, 2004). Extratos a pH igual ou menor que 4,00 (Figura 4.8, pistas de 1 a 3) já não apresentam estas bandas de forma acentuada, devido em parte à baixa solubilidade destas duas globulinas na faixa de pH em questão (Smith *et al.*, 1972). Nesta faixa de pH prevalecem a lipoxigenase, β -amilase, aglutinina e o inibidor de tripsina, como demonstra a presença de bandas correspondentes a 100, 55, 32 e 20 kDa, respectivamente (Wolf *et al.*, 1992).

A eletroforese, juntamente com os resultados de análises dos extratos anteriores mostrou que, na faixa de pH e concentração de NaCl estudados, condição ótima para extração de uma proteína recombinante, se encontra a um valor de baixo pH e na ausência de NaCl no tampão, pois a maioria das proteínas extraídas nesta condição têm a massa molecular menor do que 66 kDa (Figura 4.8 – Pista 2), a concentração das proteínas extraídas é mínima e concentração de AR diminui com diminuição pH do extrato. As proteínas nativas da soja com massa molecular até 66 kDa não só tem a massa molecular bem menor do que a β -glucuronidase (270 kDa), mas também os pontos isoeletricos destas proteínas (Tabela 2.1) são menores (4,0 a 4,5) do que da β -glucuronidase (pI igual a 5,5).

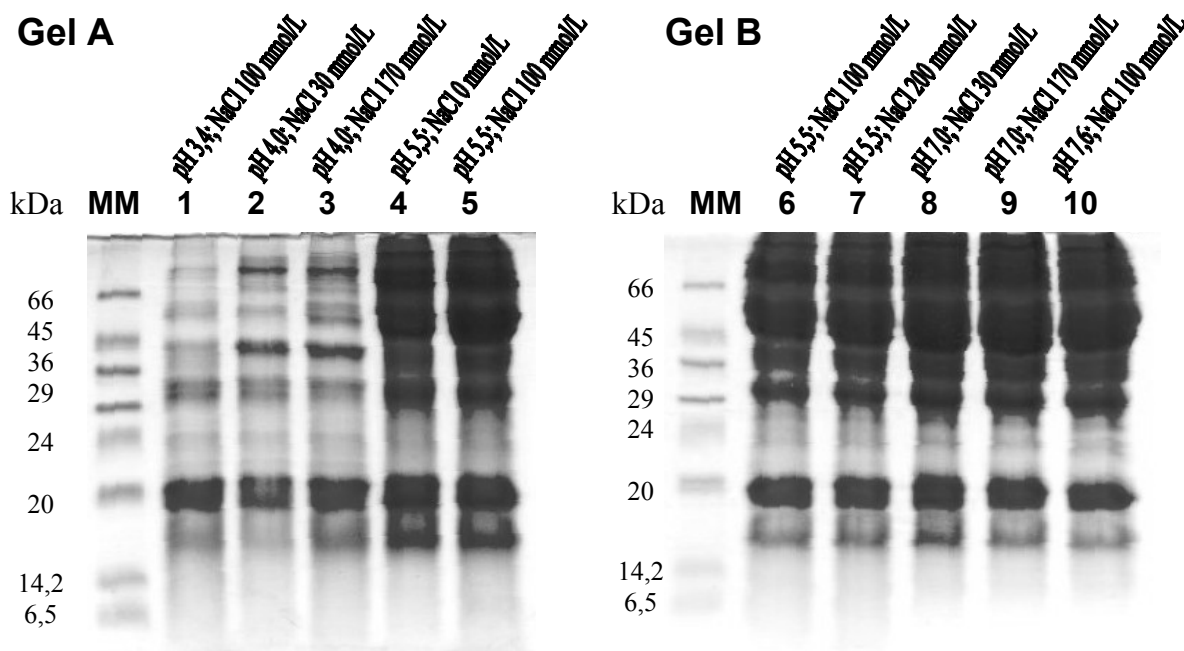


Figura 4.8 Perfil eletroforético SDS-PAGE em gel 15% dos extratos de BR-16 em várias condições de pH e concentração de NaCl. Tampão de desnaturação sem β -mercaptoetanol. **MM:** marcadores de massa molecular. **Gel A. Pista 1:** pH 3,4 e 100 mM de NaCl. **Pista 2:** pH 4,0 e 30 mM de NaCl. **Pista 3:** pH 4,0 e 170 mM de NaCl. **Pista 4:** pH 5,5 e 0 mM de NaCl. **Pista 5:** pH 5,5 e 100 mM de NaCl. **Gel B. Pista 6:** pH 5,5 e 100 mM de NaCl. **Pista 7:** pH 5,5 e 200 mM de NaCl. **Pista 8:** pH 7,0 e 30 mM de NaCl. **Pista 9:** pH 7,0 e 170 mM de NaCl. **Pista 10:** pH 7,6 e 100 mM de NaCl. Revelação feita com azul de Coomassie.

4.2 Extração e análise dos extratos de semente da soja BR-16tg

O estudo da extração das sementes de soja BR-16tg objetivou, principalmente, a solubilização da rGUS mas aliou-se também a extração dos componentes nativos (proteínas, polifenóis, açúcares redutores e açúcares totais) como feito para a soja BR-16 (item 4.1). Inicialmente o estudo da cinética de extração da rGUS foi feito para definir o tempo suficiente para extração em termos de rGUS. Os resultados das extrações em várias condições estão descritos na Tabela 4.5 e discutidos a seguir.

Tabela 4.5 Resultados dos ensaios de extração para a semente de soja BR-16tg.

Ensaio	Variáveis codificadas		Condições de extração		Concentrações dos componentes medidas				
	pH	C _{NaCl}	pH	C _{NaCl}	A _{GUS}	C _P	C _F	C _{AR}	C _{AT}
				(mmol/L)	(pmol MU /min·mL)	(mg/mL)	(mmol /L)	(mg/mL)	(mg/mL)
1	-1	-1	4,00	30	0	1,36	0,101	0,22	7,58
2	-1	1	4,00	170	0	2,16	0,123	0,22	7,61
3	1	-1	7,00	30	$3,75 \cdot 10^7$	7,70	0,172	0,58	8,00
4	1	1	7,00	170	$3,52 \cdot 10^7$	7,61	0,179	0,58	8,12
5	-1,41	0	3,40	100	0	1,62	0,085	0,08	7,24
6	1,41	0	7,60	100	$3,69 \cdot 10^7$	8,13	0,150	0,65	7,26
7	0	-1,41	5,50	0	$3,46 \cdot 10^7$	4,44	0,164	0,47	7,75
8	0	1,41	5,50	200	$3,06 \cdot 10^7$	6,26	0,24	0,42	7,00
9	0	0	5,50	100	$3,07 \cdot 10^7$	5,82	0,173	0,48	7,69
10	0	0	5,50	100	$3,19 \cdot 10^7$	6,02	0,195	0,47	7,75
11	0	0	5,50	100	$3,29 \cdot 10^7$	6,01	0,182	0,45	7,68

C_{NaCl} – concentração de NaCl; C_P – concentração de proteína total; C_F – concentração dos polifenóis; C_{AR} – concentração de açúcares redutores; C_{AT} – concentração de açúcares totais; A_{GUS} – atividade de GUS.

4.2.1 Estudo de cinética da extração de rGUS

Para definir o tempo mínimo para atingir a concentração de equilíbrio da extração de rGUS, a atividade de GUS de uma extração foi medida ao longo do tempo. O estudo de cinética foi feito usando tampão fosfato 50 mmol/L NaCl 100 mmol/L e pH 5,50, valores de concentração de NaCl e pH intermediários das faixas do planejamento, e razão massa:volume 1:20. Os resultados apresentados na Figura 4.9 mostram, que a atividade de rGUS não aumenta significativamente após de 25 min de extração.

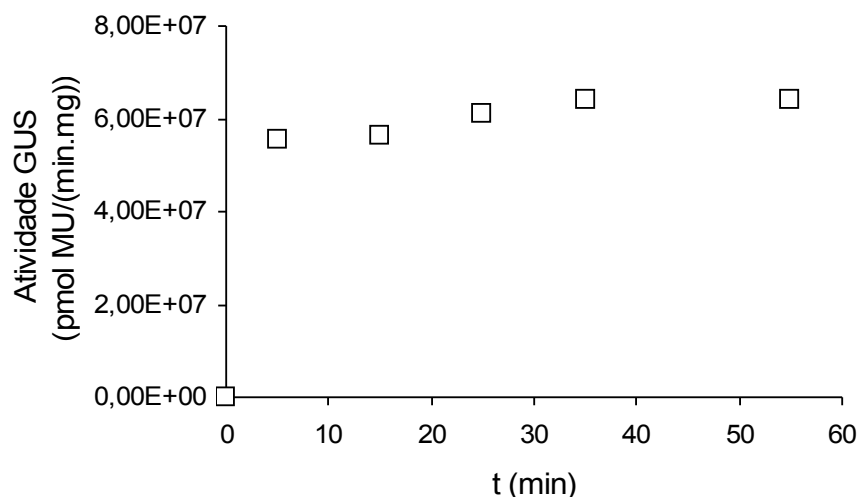


Figura 4.9 Extração de rGUS em função de tempo. Solução extratora: tampão de fosfato 50 mmol/L e NaCl 100 mmol/L a pH 5,5; temperatura, 20 °C; razão massa:volume 1:20.

Bai *et al.* (2002) estudaram a cinética de extração de rGUS produzida em canola transgênica e constataram que a recuperação de rGUS não depende tanto do tamanho das partículas de farinha desengordurada, mas da técnica de moagem, ou seja da quantidade de células rompidas. Como as partículas da farinha de soja BR-16tg desengordurada eram menores do que 500 μm (comparáveis com o tamanho das partículas dos estudos feitos usando canola transgênica), a influência do tamanho das partículas na cinética da extração de rGUS não foi estudada, e o tempo de 30 min foi considerado apropriado para os estudos posteriores.

4.2.2 Extração de rGUS da semente de soja BR-16tg

A extração de rGUS, monitorada pela atividade GUS nos extratos, foi totalmente ineficiente a valores de pH 3,40 e 4,00: a solubilização da rGUS não aconteceu, a enzima foi inibida ou desnaturada a estes baixos valores de pH. Desta forma, a análise estatística do planejamento para esta variável de resposta não pode ser considerada, pois a superfície gerada possibilita a previsão de valores positivos de atividade em extratos obtidos a pH igual a 4,00 e até mesmo menores que este valor (dados não apresentados), o que não

condiz com os resultados experimentais obtidos. No entanto, o aumento da concentração de NaCl, tanto para extrações a pH 5,50 como a pH 7,00, resultou em diminuição da atividade de rGUS no extrato. Assim, a extração de rGUS foi otimizada em função do pH (sem a adição de NaCl no tampão de extração) para a faixa de pH de 4,00 a 6,00 (item 4.3).

4.2.3 Extração de proteínas da semente de soja BR-16tg

A concentração das proteínas variou de 1,36 mg/mL (condição de extração a pH 4,0 e NaCl 30 mmol/L) a 8,13 mg/mL (condição de extração a pH 7,6 e NaCl 100 mmo/L). A faixa de concentração, assim como as tendências que se pode observar na superfície de resposta nas faixas estudadas, foram praticamente iguais àquelas obtidas com semente da soja BR-16 (Figura 4.10). A superfície de resposta para a concentração de proteína nos extratos de semente de soja BR-16tg tem um comportamento também similar com as superfícies obtidas para as proteínas extraídas de cinco variedades do milho (Farinas, 2004), porém, a faixa de concentração das proteínas extraídas da soja é superior.

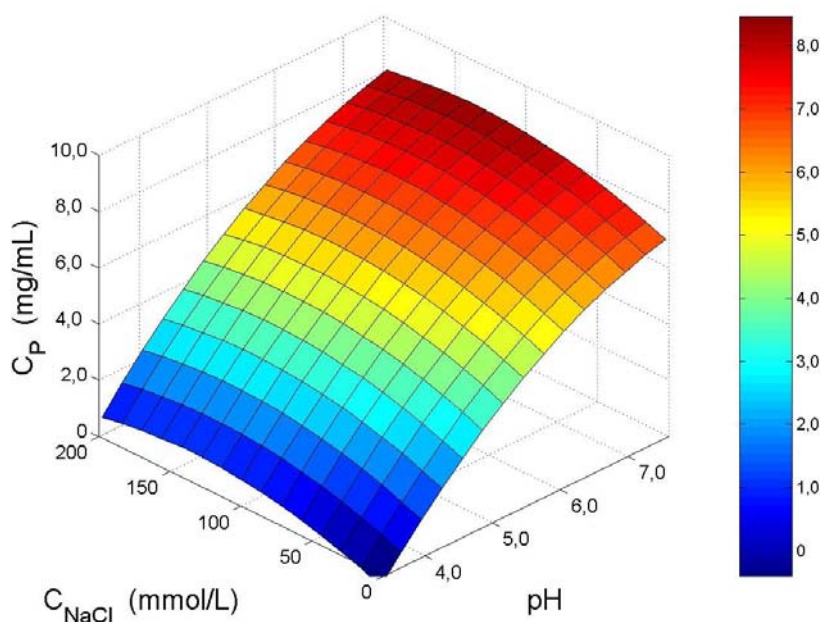


Figura 4.10 Superfície de resposta para a concentração de proteína (C_P) nos extratos de semente da soja BR-16tg em função de pH e concentração de NaCl.

A Tabela 4.6 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração das proteínas no extrato de semente de soja BR-16tg. Todos os efeitos, exceto a interação entre a pH e concentração de NaCl, se mostraram estatisticamente significativos a 95% de confiança. Isto significa que não há interação entre estas duas variáveis na extração de proteínas para a faixa estudada. Os efeitos das variáveis estudados estão apresentados na Figura 4.11.

Tabela 4.6 Coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração das proteínas no extrato de sementes da soja BR-16tg.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	5,951	0,066	90,120	0,000	5,667	6,235
pH (L)*	5,250	0,081	64,918	0,000	4,902	5,598
pH (Q)*	-1,278	0,096	-13,272	0,006	-1,692	-0,863
C_{NaCl} (L)*	0,821	0,081	10,147	0,010	0,473	1,169
C_{NaCl} (Q)*	-0,802	0,096	-8,328	0,014	-1,216	-0,387
pH(L)×C_{NaCl}(L)	-0,444	0,114	-3,882	0,060	-0,936	0,048

* Fatores estatisticamente significativos $p < 0,05$ (95% nível de confiança); L – coeficiente linear; Q – coeficiente quadrático.

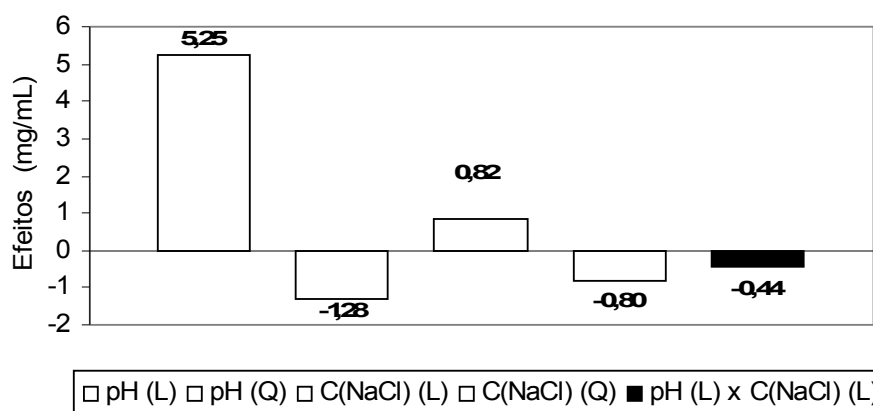


Figura 4.11 Histograma do efeito do pH e concentração de NaCl sobre a concentração das proteínas nos extratos de semente de soja BR-16tg.

4.2.4 Extração dos polifenóis da semente de soja BR-16tg

A concentração de polifenóis extraídos variou de 0,101 a 0,195 mmol/L ou 29,32 a 56,61 mg/mL (expresso em concentração de catequina). Estes valores de concentração de polifenóis obtidos são muito similares aos resultados obtidos com soja BR-16 e aproximadamente na mesma faixa obtida em extratos de semente de milho (Farinas, 2004). A superfície da resposta para concentração dos polifenóis está representada na Figura 4.12.

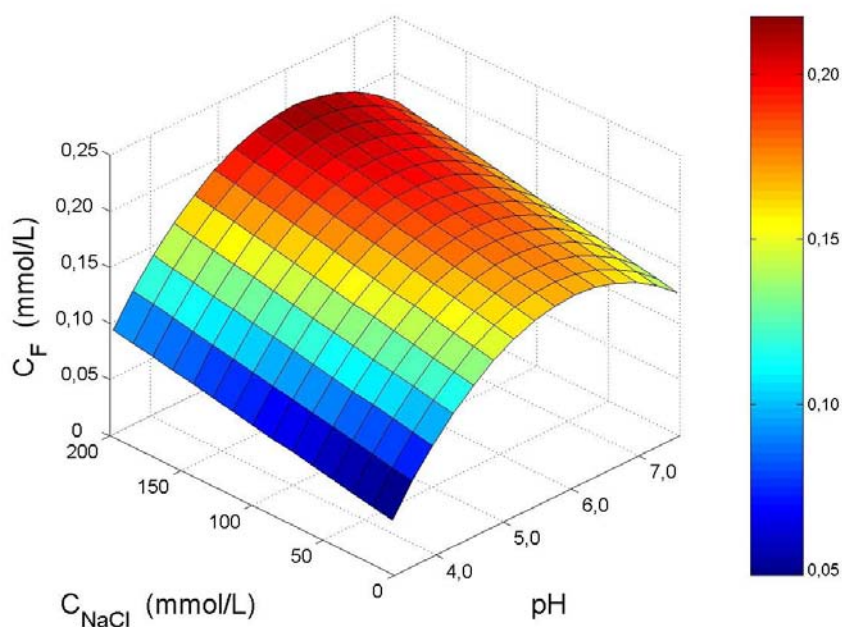


Figura 4.12 Superfície de resposta para a concentração de polifenóis (C_F) nos extratos de semente de soja em função de pH e concentração de NaCl.

A Tabela 4.7 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos polifenóis no extrato de soja BR-16. O efeito linear e quadrático do pH e o efeito linear de concentração de NaCl se mostraram estatisticamente significativos. Os efeitos das variáveis estudadas estão apresentados na Figura 4.13.

Tabela 4.7 Coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos polifenóis no extrato de sementes de soja BR-16tg.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	0,184	0,011	17,191	0,000	0,156	0,211
pH (L)*	0,055	0,013	4,204	0,008	0,021	0,089
pH (Q)*	-0,074	0,016	-4,783	0,005	-0,115	-0,034
C_{NaCl} (L)*	0,035	0,013	2,637	0,046	0,001	0,068
C_{NaCl} (Q)	0,011	0,016	0,700	0,515	-0,029	0,050
pH(L)xC_{NaCl}(L)	-0,007	0,019	-0,404	0,703	-0,055	0,040

* Fatores estatisticamente significativos $p < 0,05$ (95% nível de confiança); L – coeficiente linear; Q – coeficiente quadrático.

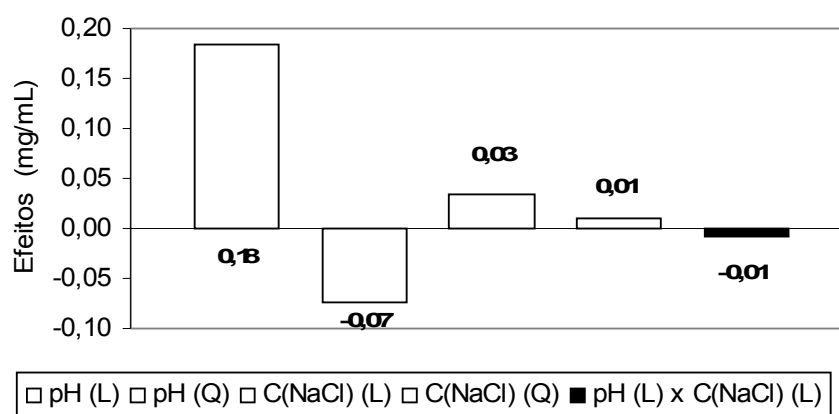


Figura 4.13 Histograma do efeito do pH e concentração de NaCl sobre a concentração dos polifenóis nos extratos de soja BR-16tg.

4.2.5 Extração dos açúcares redutores da semente de soja BR-16tg

As concentrações de açúcares redutores extraídos (0,08 a 0,65 mg/mL) representam 0,16 a 1,30% da massa total da farinha. Estes valores de concentrações de açúcares redutores nos extratos são parecidos com as concentrações obtidas com semente da soja BR-16 (Figura 4.14).

A Tabela 4.8 apresenta os coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos açúcares redutores no extrato de

semente de soja BR-16. Apenas o efeito linear e o efeito quadrático de pH se mostraram estatisticamente significativos, ou seja, a concentração de NaCl não influencia na concentração dos açúcares redutores extraídos de soja BR-16tg. Comparando as concentrações de açúcares redutores no extrato de semente de soja BR-16tg com os medidos no extratos da endosperma de semente de milho (Farinas, 2004), percebeu-se que no caso da soja, a concentração é 2 a 10 vezes menor dependendo da variedade do milho. Os efeitos das variáveis estudadas são apresentados em Figura 4.15.

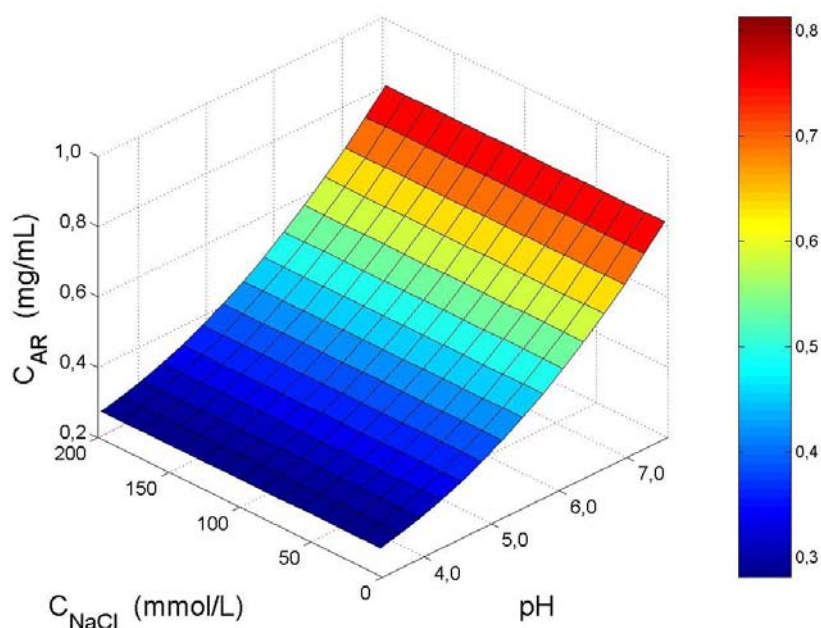


Figura 4.14 Superfície de resposta para a concentração de açúcares redutores (C_{AR}) nos extratos de semente de soja BR-16tg em função de pH e concentração de NaCl.

Tabela 4.8 Coeficientes de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a concentração dos açúcares redutores no extrato de semente de soja BR-16tg.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Média*	0,467	0,011	44,435	0,000	0,440	0,494
pH (L)*	0,382	0,013	29,670	0,000	0,349	0,415
pH (Q)*	-0,103	0,015	-6,724	0,001	-0,142	-0,064
C_{NaCl} (L)	-0,018	0,013	-1,416	0,216	-0,051	0,015
C_{NaCl} (Q)	-0,024	0,015	-1,597	0,171	-0,064	0,015
pH(L)×C_{NaCl}(L)	0,000	0,018	0,024	0,982	-0,046	0,047

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

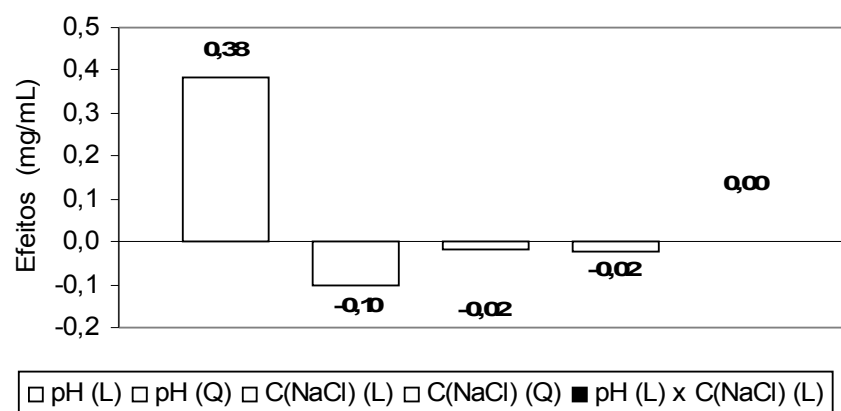


Figura 4.15 Histograma do efeito do pH e concentração de NaCl sobre a concentração dos açúcares redutores nos extratos de semente de soja BR-16tg.

4.2.6 Extração de açúcares totais de semente de soja BR-16tg

As concentrações dos açúcares totais extraídos estão dentro de uma faixa bem estreita (7,24 a 8,12 mg/mL) e representam 11,98 a 13,39% de massa total da farinha. Nenhum dos efeitos se mostrou estatisticamente significativo pois, nem o pH nem a concentração de NaCl influenciam na concentração dos açúcares totais extraídos de soja BR-16tg. A concentração média dos açúcares totais em todos os ensaios foi 7,61 mg/mL expressa em concentração de glicose. Isto é comparável com as concentrações de açúcares

totais extraídas de endosperma de semente do milho (Farinas, 2004). A concentração dos açúcares totais extraídos da soja BR-16tg foi em torno de 40% maior do que no caso de soja BR-16.

4.2.7 Análise do perfil das proteínas extraídas por SDS-PAGE

O perfil das bandas protéicas obtidas através de SDS-PAGE com os extratos de semente de soja BR-16tg (Figura 4.16) é praticamente o mesmo do perfil obtido com soja BR-16. Uma vez que as concentrações de proteínas totais dos extratos de soja BR-16 e BR-16tg também eram muito próximas, espera-se que a técnica de “spiking” com a soja BR-16 possa ser usada com alto grau de representatividade para estudar a purificação de GUS usando-se técnicas cromatográficas.

4.3 Extração de rGUS de semente de soja BR-16tg em função de pH sem NaCl no tampão de extração

A otimização da extração de rGUS em função do pH foi realizada apenas com um agente tamponante, o citrato de sódio na concentração de 50 mmol/L, e não com citrato e fosfato, devido à faixa de pH utilizada nesta otimização – 4,10 a 6,25 – ser mais estreita, eliminando-se, assim, o possível efeito na extração de íons tamponantes distintos. Com a determinação da concentração de proteína total nos extratos, pôde-se plotar a atividade e atividade específica dos extratos, além da concentração de proteína total, em função do pH (Figura 4.17). Tanto a atividade de GUS quanto a concentração de proteína total nos extratos aumentaram com o aumento do pH de extração. No entanto, a atividade GUS específica apresentou um máximo entre pH 4,75 e 5,25, o que indica que o extrato tem maior relação de atividade de rGUS por massa de proteína nativa. Pode-se, assim considerar o pH 5,25 como ponto ótimo de extração da rGUS pois possibilita o rendimento de extração mais elevado (maior atividade de GUS por unidade de volume) dentro da faixa de pH de atividade específica máxima. Com extração a este pH, 75% da rGUS é extraída com apenas 40% da proteína total, quando comparada com valores obtidos a pH 6,25.

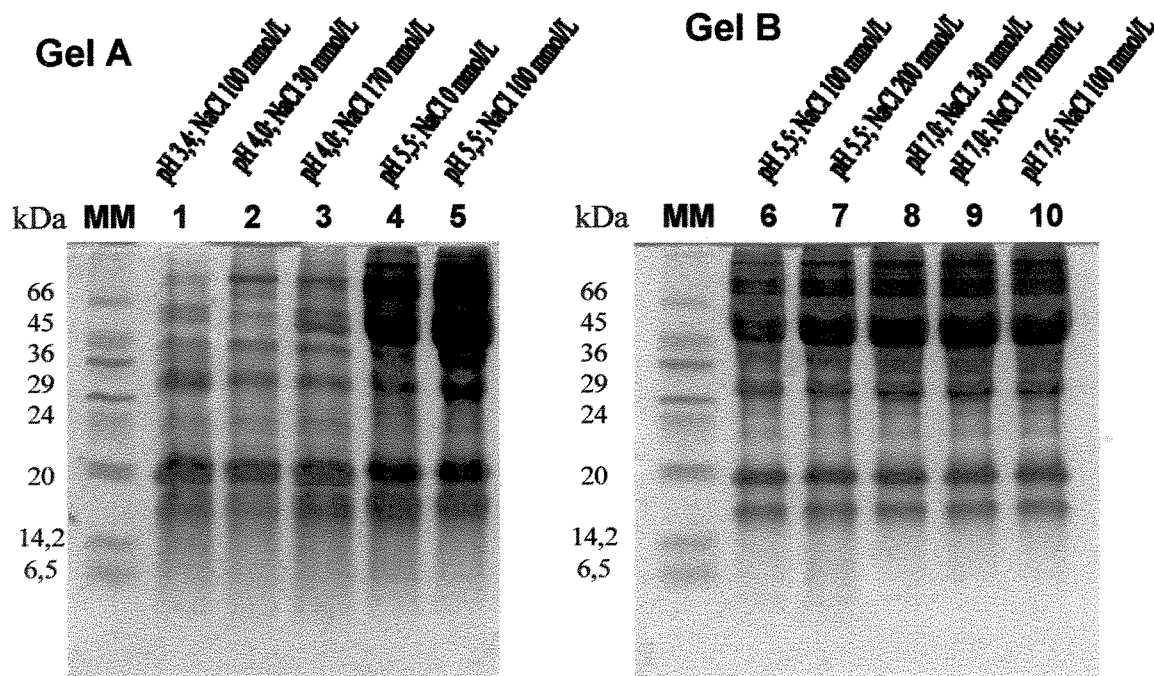


Figura 4.16 Perfil eletroforético (SDS-PAGE em gel 15%) dos extratos de BR-16tg em várias condições de pH e concentração de NaCl. Tampão de desnaturação sem β -mercaptoetanol. **MM:** marcadores de massa molecular. **Gel A. Pista 1:** pH 3,4 e 100 mM de NaCl. **Pista 2:** pH 4,0 e 30 mM de NaCl. **Pista 3:** pH 4,0 e 170 mM de NaCl. **Pista 4:** pH 5,5 e 0 mM de NaCl. **Pista 5:** pH 5,5 e 100 mM de NaCl. **Gel B. Pista 6:** pH 5,5 e 100 mM de NaCl. **Pista 7:** pH 5,5 e 200 mM de NaCl. **Pista 8:** pH 7,0 e 30 mM de NaCl. **Pista 9:** pH 7,0 e 170 mM de NaCl. **Pista 10:** pH 7,6 e 100 mM de NaCl. Revelação feita com azul de Coomassie.

As concentrações nos extratos dos componentes nativos polifenóis, açúcares redutores e açúcares totais foram também medidos (Figuras 4.18, 4.19 e 4.20). As concentrações de polifenóis e açúcares totais foram praticamente constantes em toda a faixa de pH, enquanto que a concentração dos açúcares redutores extraídos aumentou com o aumento de pH.

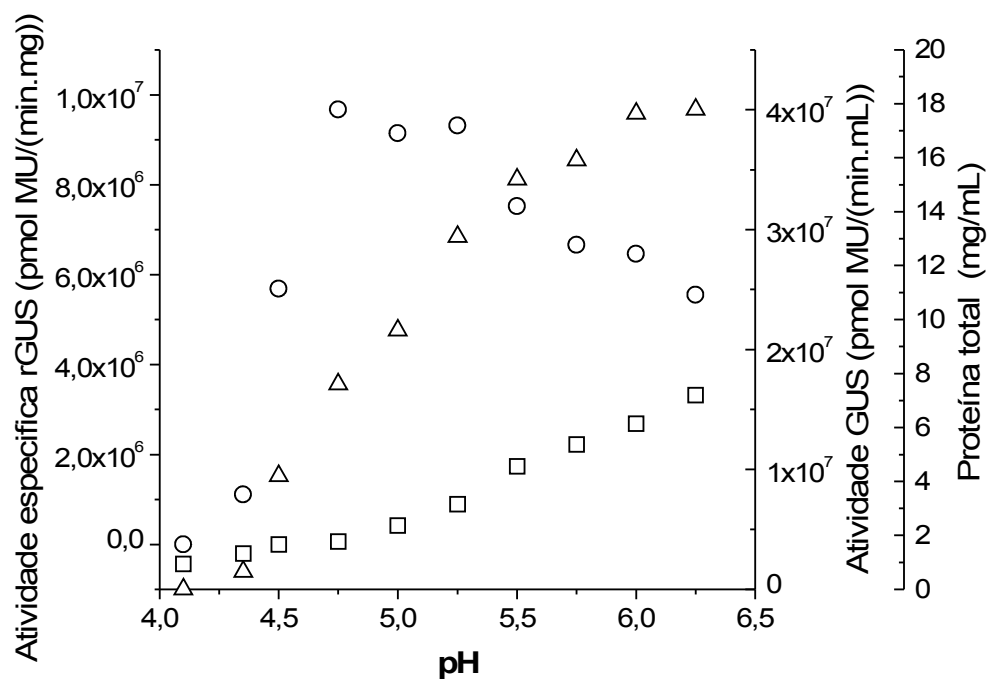


Figura 4.17 Extração de rGUS e proteína total de semente de soja BR-16tg em função do pH. Os pontos representam a média de duas extrações. ○ – Atividade específica de GUS, Δ – Atividade de GUS, □ – Proteína total.

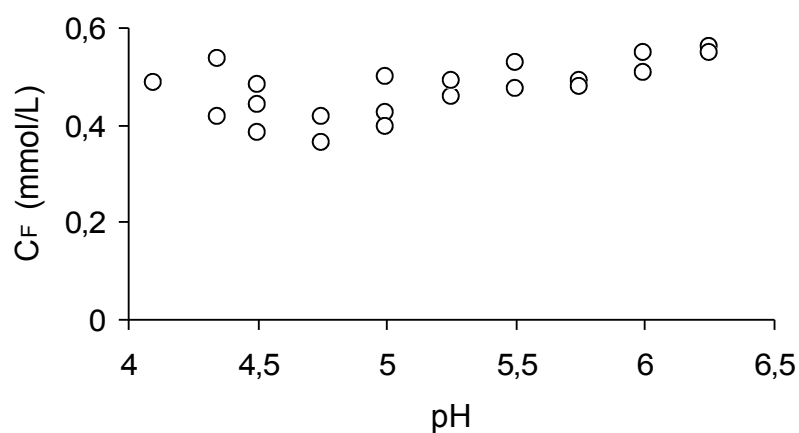


Figura 4.18 Extração de polifenóis de semente de soja BR-16tg com mudança de pH usando tampão citrato 50 mmol/L razão massa:volume igual a 1:20.

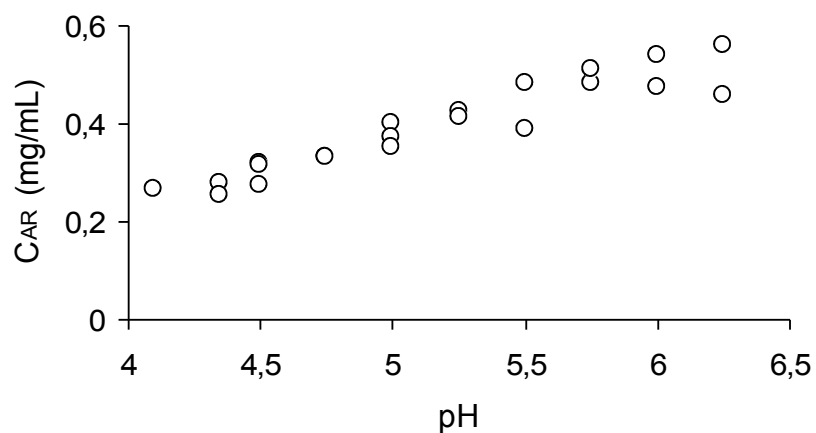


Figura 4.19 Extração de açúcares redutores de semente de soja BR-16tg com mudança de pH usando tampão citrato 50 mmol/L razão massa:volume igual a 1:20.

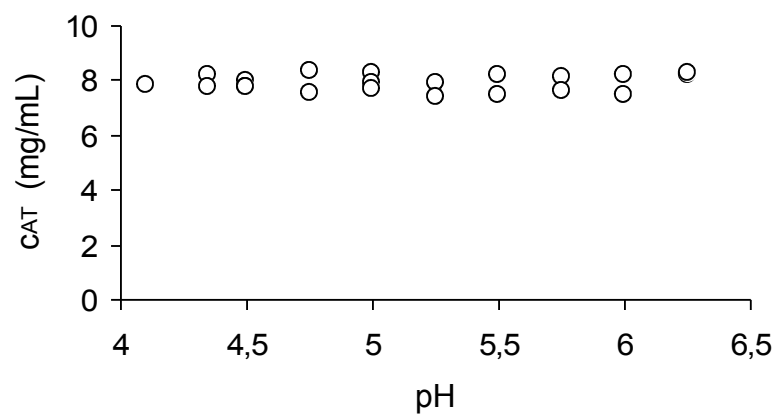


Figura 4.20 Extração de açúcares totais de semente de soja BR-16tg com mudança de pH usando tampão citrato 50 mmol/L razão massa:volume igual a 1:20.

O perfil das bandas obtidas com extratos de semente de soja BR-16tg usando-se o tampão de citrato de sódio 50 mmol/L (Figura 4.21) foi similar aos perfis obtidos com

extratos segundo o planejamento experimental, isto é, na faixa de pH de 4,10 a 6,25 a solubilidade das proteínas de massa molecular mais alta aumenta com o aumento de pH.

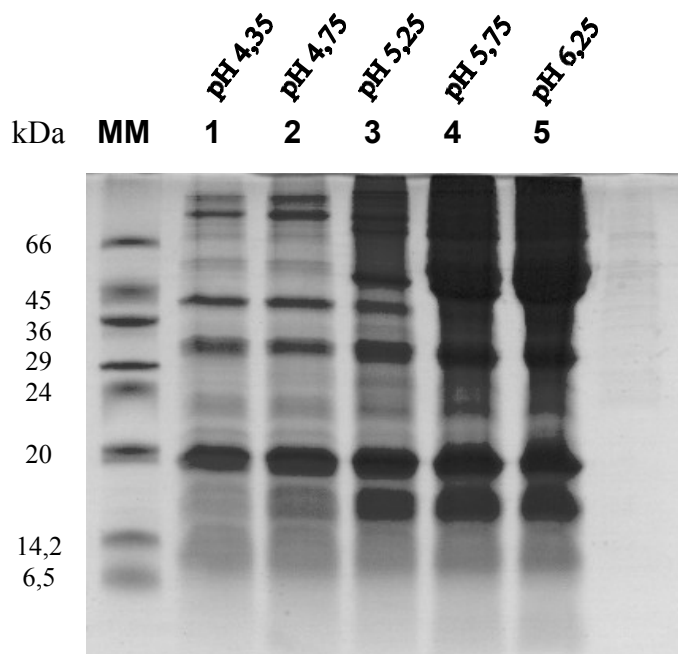


Figura 4.21 Perfil eletroforético (SDS-PAGE em gel 15%) dos extratos de semente de soja BR-16tg usando tampão de citrato de sódio 50 mM. Sem β -mercaptoetanol presente no tampão de desnaturação. **MM:** marcadores de massa molecular. **Pista 1:** extrato a pH 4,35. **Pista 2:** extrato a pH 4,75. **Pista 3:** extrato a pH 5,25. **Pista 4:** extrato a pH 5,75. **Pista 5:** extrato a pH 6,25. Revelação feita com azul de Coomassie.

4.4 Estudos cromatográficos de purificação da rGUS de semente de soja BR-16tg

A estratégia geral dos estudos cromatográficos era primeiramente conseguir comparar a purificação da rGUS de sementes da soja com a purificação desta enzima a partir de semente de milho e de canola. Tentou-se aproximar o tipo de cromatografia e resina, assim como também a condição de adsorção e eluição utilizados daqueles relatados na literatura (Figura 3.1). No caso de purificação de rGUS do milho (Kusnadi *et al.*, 1996, 1988a e 1988b), como também no caso de canola (Bae e Glatz 2002), o extrato foi injetado numa coluna trocadora de ânions baseado em DEAE e o tampão de adsorção foi fosfato de

sódio 50 mmol/L pH 7,00. A eluição da enzima foi realizada de modos distintos, devido às impurezas (proteínas) diferentes presentes nos extratos mas, em ambos casos, com adição de NaCl no tampão de adsorção. Assim, no estudo presente usou-se também o adsorvente DEAE e o tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,00, como tampão de adsorção e tentou-se achar a melhor condição de dessorção de rGUS em termos de concentração de NaCl no tampão de eluição.

No caso de usar semente de milho como biorreator (Kusnadi *et al.*, 1998a e 1998b), a etapa cromatográfica após a cromatografia de troca iônica foi a cromatografia de interação hidrofóbica usando resina phenyl-sepharose. A fração contendo rGUS da primeira etapa cromatográfica foi usada como alimentação na cromatografia de interação hidrofóbica, onde a tampão de adsorção era tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00 com NaCl 300 mmol/L e sulfato de amônio 1,5 mol/L. No estudo presente, a mesma resina e condição de adsorção foi utilizada, porém a condição de dessorção foi diferente devido às presença de impurezas distintas.

4.4.1 Cromatografia de troca-iônica em trocador de ânions DEAE-Sephadex

A condição de adsorção em todas as cromatografias foi tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,00 (tampão A) por razões descritas no item 4.4, usando-se injeção de 5,0 mL de extrato da soja BR-16tg. Três condições de eluição da rGUS foram estudadas, todas com NaCl adicionado ao tampão fosfato 50 mmol/L pH 7,00. As frações de eluição combinados em “pools” foram analisadas em termos de atividade de GUS e concentração de proteína total.

Primeiramente, empregou-se um gradiente de NaCl de 0 a 500 mmol/L no tampão A com aumento da concentração salina de 4 mmol/L por minuto (Dessorção #1), similar ao relatado por Bae e Glatz (2002). O perfil cromatográfico deste ensaio (Figura 4.22) apresentou um pico a cerca de 65-70 min de eluição (proteínas fracamente adsorvidas) e dois picos entre 106 (concentração de NaCl de 240 mmol/L) e 140 min que corresponderam a dois picos de atividade (pico maior em torno de NaCl 290 mmol/L). As frações correspondentes a estes dois picos foram combinadas em um único “pool” e analisados. O fator de purificação e a recuperação obtidos foram 2,3 e 43%, respectivamente.

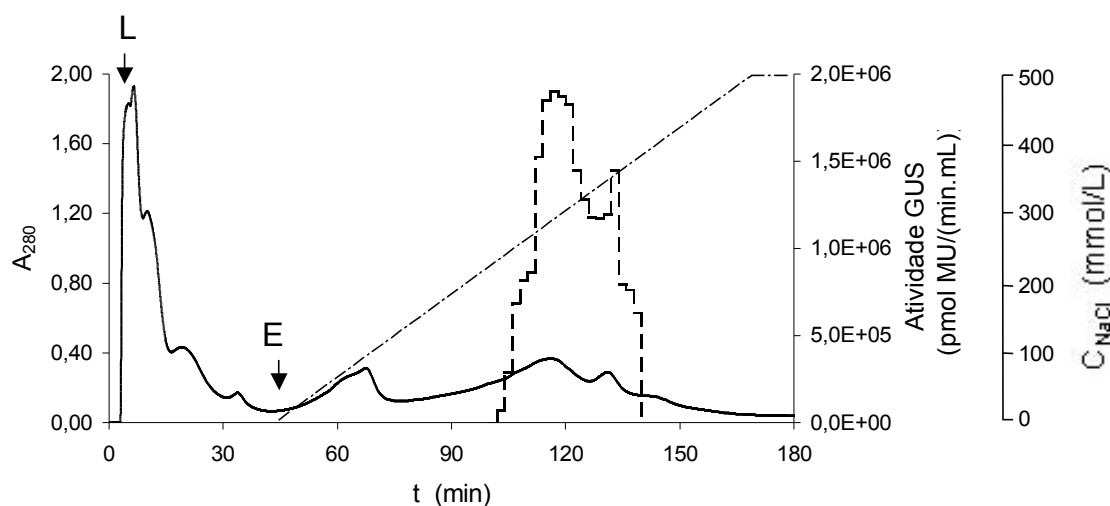


Figura 4.22 Cromatografia de extrato de semente de BR-16tg usando o suporte DEAE-Sephadex. Tampão de eluição: fosfato 50 mmol/L pH = 7,00 com NaCl de 0 a 500 mmol/L com aumento da concentração de NaCl de 4 mmol/L por minuto com começo à 45 min. As setas indicam início das etapas de lavagem (L) e eluição (E). – Absorbância a 280 nm; --- Atividade GUS; --- C_{NaCl} .

O segundo esquema de eluição testado (Dessorção #2) consistiu em eluição com três degraus de concentração de NaCl – um primeiro a 200 mmol/L (E_1), um segundo a 300 mmol/L (E_2) e um último degrau a 500 mmol/L (E_3) (Figura 4.23) – baseado no trabalho de Bai e Glatz (2002) que utilizaram 175 e 500 mmol/L de NaCl. Combinou-se as frações em “pools” relativos aos tempos de eluição de 60 a 90 min (eluição E_1), de 100 a 105 min (eluição E_2) e de 145 a 150 (eluição E_3). Os fatores de purificação e a recuperação foram de 3,2 e 38% para o primeiro “pool”, 3,3 e 11% para o segundo “pool” e 1,8 e 3% para o terceiro “pool”.

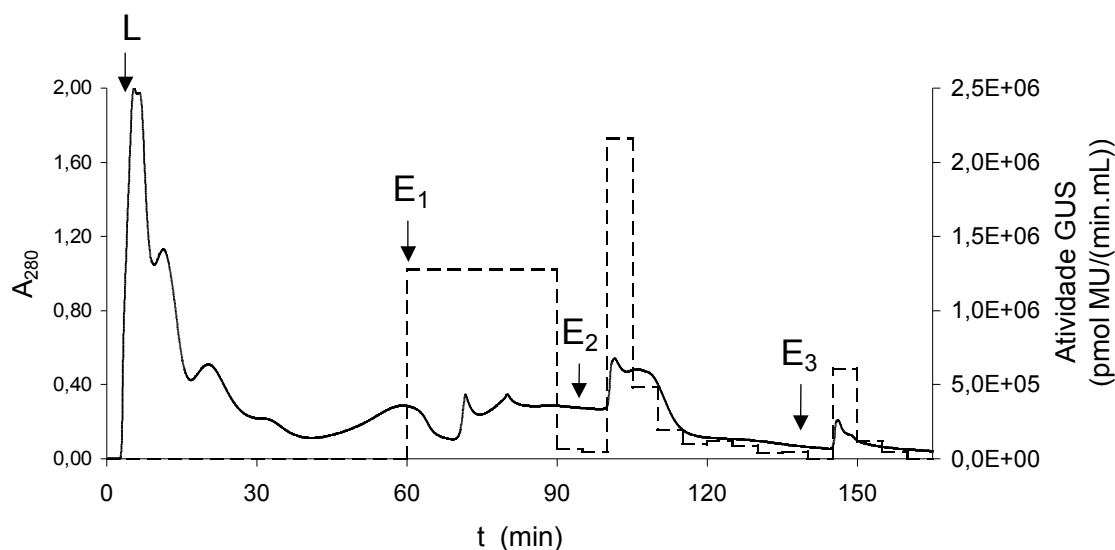


Figura 4.23 Cromatografia de extrato de soja BR-16tg usando DEAE-Sephadex como suporte. O tampão de eluição, usado em todos os casos, foi fosfato 50 mmol/L a pH 7,0 com: NaCl 200 mmol/L (E₁), NaCl 300 mmol/L (E₂) e NaCl 500 mmol/L (E₃). As setas indicam o início das etapas de lavagem (L) e eluições (E_i). – Absorbância a 280 nm; --- Atividade GUS.

Um último esquema de eluição (Dessorção #3) utilizou um degrau de 300 mmol/L de NaCl (Figura 2.24) baseado no tampão de eluição usado no trabalho de Kusunadi *et al.* (1996). A lavagem de coluna foi feita usando-se 55 mL de tampão de adsorção e o começo da eluição se deu a 60 min. A fração relativa ao tempo de 65-70 min resultou em fator de purificação de 3,6 e recuperação de 41% (Tabela 4.9).

A análise conjunta dos fatores de purificação e as recuperações em termos da atividade total alimentada (Tabela 4.10) permitiram a seleção da Dessorção #3 (degrau de 300 mmol/L de NaCl) como a condição de maior eficiência (Tabela 4.9), pois com ela obteve-se o maior fator de purificação (3,6) e uma recuperação da mesma ordem de grandeza da Dessorção #2. Percebeu-se também, que usando-se Dessorção #3, em torno de 50% de rGUS foi perdida na etapa de lavagem. Concluiu-se, que o volume de extrato de soja injetado deveria ser otimizado para se obter uma maior recuperação de rGUS.

Tabela 4.9 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex a partir de extrato de semente da soja BR-16tg (eluição com NaCl 300 mmol/L).

Fração*	V (mL)	C_P (mg/mL)	m_P (mg)	A_{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT_{GUS} (pmol MU/min)	AE_{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	5	3,23	16,15	21,20·10 ⁶	106,00·10 ⁶	6,56·10 ⁶	1,00	100
Lavagem (0 – 60 min)	60	0,09	5,13	0,84·10 ⁶	50,60·10 ⁶	9,86·10 ⁶	1,50	48
Fração 1 (60 – 65 min)	5	0,02	0,09	0,24·10 ⁶	1,20·10 ⁶	12,80·10 ⁶	1,95	1
Fração 2 (65 – 70 min)	5	0,37	1,86	8,74·10 ⁶	43,70·10 ⁶	23,50·10 ⁶	3,59	41
Fração 3 (70 – 75 min)	5	0,13	0,67	0,47·10 ⁶	2,34·10 ⁶	3,48·10 ⁶	0,53	2
Fração 4 (75 – 80 min)	5	0,07	0,33	0,23·10 ⁶	1,16·10 ⁶	3,51·10 ⁶	0,54	1
Fração 5 (80 – 85 min)	5	0,05	0,25	0,18·10 ⁶	0,89·10 ⁶	3,53·10 ⁶	0,54	1
Fração 6 (85 – 90 min)	5	0,03	0,17	0,10·10 ⁶	0,51·10 ⁶	2,91·10 ⁶	0,44	0
Fração 7 (90 – 95 min)	5	0,03	0,15	0,12·10 ⁶	0,61·10 ⁶	3,98·10 ⁶	0,61	1
Fração 8 (95 – 100 min)	5	0,03	0,15	0,10·10 ⁶	0,49·10 ⁶	3,32·10 ⁶	0,51	0
Fração 9 (100 – 105 min)	5	0,03	0,15	0,07·10 ⁶	0,35·10 ⁶	2,37·10 ⁶	0,36	0
Fração 10 (105 – 135 min)	30	0,02	0,52	0,21·10 ⁶	6,15·10 ⁶	11,90·10 ⁶	1,81	6
Fração 11 (135 – 145 min)	10	0,00	0,03	0	0	0	0,00	0
Total	90		9,50		108,00·10 ⁶			102

* Tempo apresentado em termos de período após início de injeção da alimentação

FP = fator de purificação; R = recuperação de atividade de GUS; C_P = concentração de proteína total; m_P = massa total de proteína; A_{GUS} = atividade de GUS; AT_{GUS} = atividade total de GUS; AE_{GUS} = atividade específica de GUS.

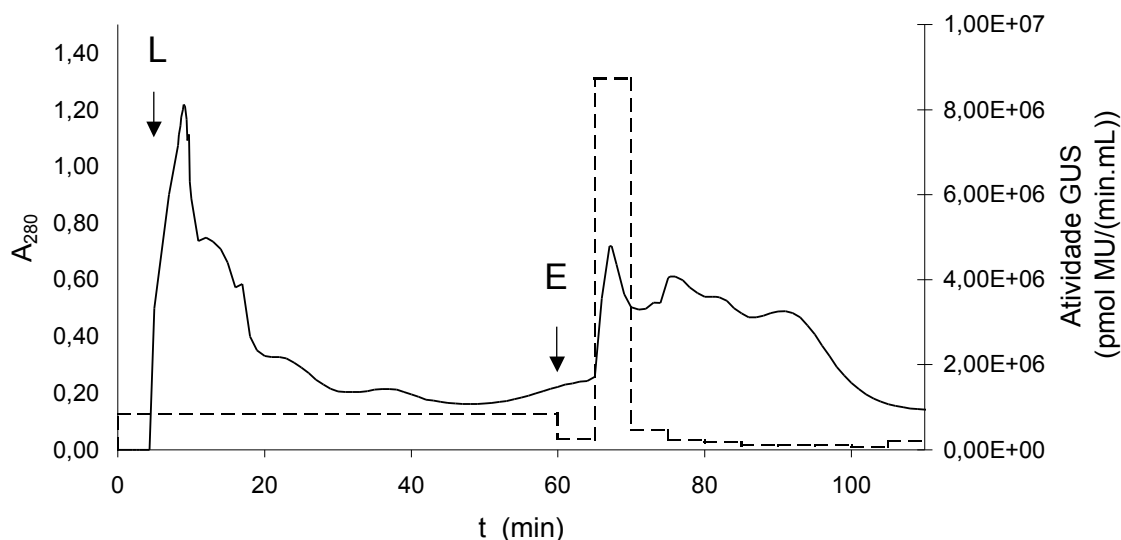


Figura 4.24 Cromatografia de extrato de soja BR-16tg usando DEAE-Sephadex como suporte. O tampão de eluição usado foi fosfato 50 mmol/L a pH 7,0 com NaCl 300 mmol/L (E). As setas indicam o início das etapas de lavagem (L) e eluição (E). – Absorbância a 280 nm; --- Atividade GUS.

Tabela 4.10 Estudos de eluição da rGUS adsorvida em DEAE-Sephadex a partir de extrato de semente de soja BR-16tg.

Esquema de eluição	Concentração de NaCl (mmol/L)	Fator de purificação	Recuperação da atividade GUS (%)
Dessorção #1	240 - 380	2,3	43
E ₁	200	3,2	38
Dessorção #2	300	3,3	11
E ₃	500	1,8	3
Dessorção #3	300	3,6	41

Tampão de adsorção, fosfato 50 mmol/L pH 7,00; volume de injeção, 5,0 mL; Volume de leito de adsorção, 5,5 mL; 10^9 pmol MU/min corresponde a 100%.

4.4.2 Otimização do volume de injeção de extrato usando DEAE-Sephadex

A fim de se otimizar o volume de alimentação da cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephadex, volumes de 1,0 a 5,0 mL de extrato de semente de soja BR-16tg (extração com tampão citrato 50 mmol/L pH 5,25) com pH ajustado em 7,00 foram injetadas na coluna e a eluição foi realizada conforme a esquema de dessorção #3. Os tempos de eluição do pico de rGUS variaram entre 10 e 15 minutos. Frações de 5,0 mL foram coletadas e atividade de GUS e proteína total foram medidas. Os fatores de purificação e a recuperação determinados estão apresentados na Tabela 4.11. O volume de injeção de 4,0 mL forneceu os maiores fatores de purificação e recuperações de rGUS (6,2 e 63% respectivamente). Para volumes de injeção inferiores a 4,0 mL, a recuperação de enzima foi a mesma, porém, o fator de purificação diminuiu. Como a eluição feita com NaCl 300 mmol/L e injeção de 4,0 mL foram consideradas as condições ótimas o eluído desta cromatografia foi usada para a alimentação de próxima etapa cromatográfica (cromatografia de interação hidrofóbica).

Tabela 4.11 Os fatores de purificação e recuperação da cromatografia em DEAE-Sephadex para diferentes volumes de injeção de extrato de semente de soja BR-16tg.

Volume de injeção (mL)	Fator de purificação	Recuperação (%)
1,0	2,6	63
2,0	2,5	53
3,0	3,6	62
4,0	6,2	63
5,0	3,6	41

Tampão de adsorção, fosfato 50 mmol/L pH 7,00; Volume de leite de adsorção, 5,5 mL

Os fatores de purificação de rGUS obtidos nos trabalhos de Kusnadi *et al.* (1998a) e Kusnadi *et al.* (1998b) foram de 5 e 8, respectivamente, da mesma ordem de grandeza do obtido neste trabalho. Portanto, em termos de purificação de rGUS usando-se cromatografia de troca iônica com adsorvente baseado em DEAE, a soja e o milho são sistemas similares. No caso de canola transgênica, o fator de purificação foi 32 (Bai e Glatz, 2002). A diferença no fator de purificação de canola e soja vem do fato que a maioria das proteínas da canola tem o ponto isoelétrico básico e, portanto, a canola é uma planta bem mais apropriada para purificação das proteínas recombinantes com o ponto isoelétrico ácido, como é o caso da rGUS.

4.4.3 Análise de fração contendo rGUS através de SDS-PAGE

Para se caracterizar o perfil de massa molecular das proteínas que co-purificaram com rGUS e também para estimar sua pureza, fez-se eletroforese SDS-PAGE do extrato das sementes e da fração eluída contendo rGUS (Figura 4.25). Esperava-se detectar uma banda de 68 kDa referente ao monômero da molécula de GUS, pois estes monômeros são ligados através de resíduos de lisina (Matsumura *et al.*, 1999), ligação que é desfeita na presença de SDS (Flores e Ellington, 2002). No entanto, esta banda não foi detectada. Como as proteínas recombinantes podem formar pontes dissulfeto com outras proteínas nativas, fez-se também eletroforese adicionando-se β -mercaptoetanol no tampão de desnaturação para detectar se o monômero foi “sequestrado” por uma proteína nativa da semente da soja. Mesmo usando este agente redutor, a banda referente ao monômero da GUS não apareceu (Figura 4.25 B).

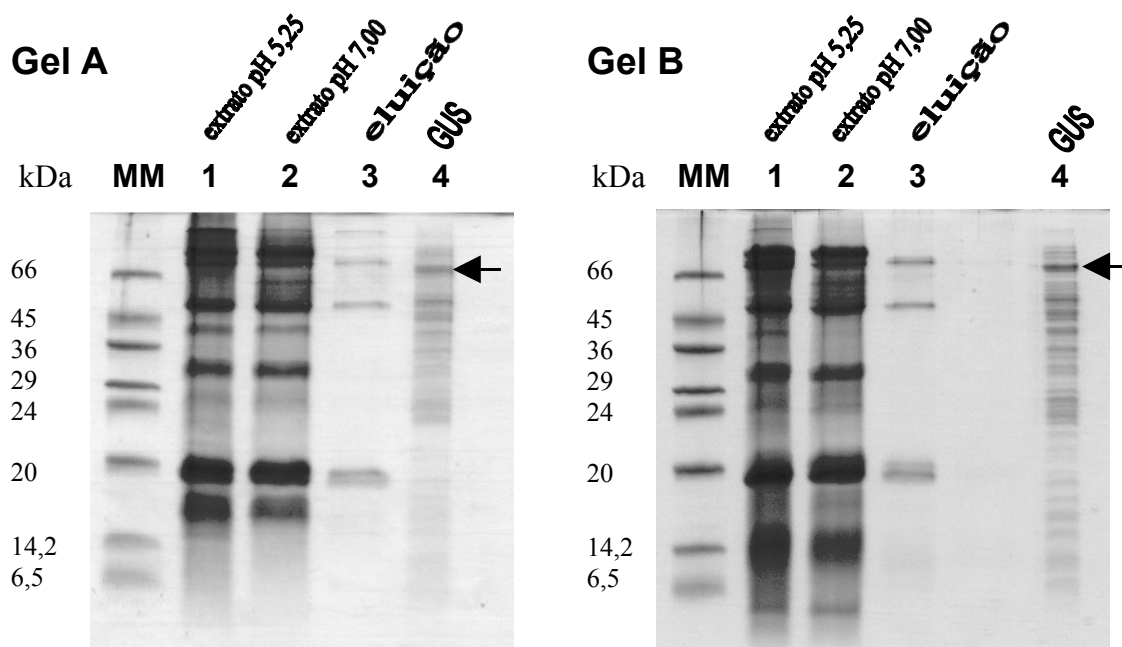


Figura 4.25 Perfil eletroforético (SDS-PAGE, gel 15%) da cromatografia em DEAE-Sephadex. Gel A e gel B: amostras tratadas sem e com β -mercaptoetanol no tampão de desnaturação, respectivamente. **MM:** marcadores de massa molecular. **Pista 1:** extrato de semente de soja pH 5,25. **Pista 2:** extrato de semente de soja com pH ajustado a 7,00. **Pista 3:** eluição com NaCl 300 mmol/L em tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,00. **Pista 4:** GUS da *E. coli*. As setas indicam a GUS da *Escherichia coli* (Sigma, EUA). Revelação feita com azul de Coomassie.

A banda com massa molecular igual ao monômero de GUS da *E. coli* não pode ser observada no gel quando usando o agente redutor β -mercaptoetanol no tampão de desnaturação (Figura 4.25, gel B). Portanto, concluiu-se que a rGUS deve estar em concentração ainda muito baixa depois de cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex. A presença de bandas com massas moleculares de 76, 63, 48 e 20 kDa indicam que as maiores impurezas no extrato foram β -conglucina e inibidor de tripsina da soja.

4.4.4 Cromatografia de interação hidrofóbica com resina Streamline-Phenyl

A cromatografia de interação hidrofóbica utilizada por Kusnadi *et al.* (1996, 1998a e 1998b) foi aqui também utilizada como segunda etapa de purificação da rGUS usando-se injeção de 10,0 mL de “pool” de frações da cromatografia de troca iônica entre 60 e 70 min (item 4.4.2) com sulfato de amônio adicionado (vazão de 1,0 mL/min).

O tampão de adsorção utilizado foi fosfato 50 mmol/L pH 7,00 com NaCl 300 mmol/L (tampão B) e sulfato de amônio 1,5 mol/L. Os eluentes foram tampão B com 0,5 mol/L de sulfato de amônio (na etapa de eluição E₁), tampão B (na etapa de eluição E₂) e água ultra pura (na etapa de eluição E₃). Estas condições de eluição foram selecionadas pois em testes preliminares (dados não apresentados) constatou-se que uma fração da rGUS alimentada permanecia adsorvida mesmo após se lavar a coluna com tampão B, sendo desorvida apenas com água e Yeboah *et al.* (1996) relataram que a maioria das proteínas de soja se desorveram usando-se sulfato de amônio 0,5 mol/L. O perfil cromatográfico está apresentado na Figura 4.26. Cada pico cromatográfico foi coletado com uma única fração e as concentrações de proteína total e atividade da GUS foram medidos (Tabela 4.12).

O fator de purificação e a recuperação para as frações coletadas de 180 a 195 min foram de 15,7 e 174%, respectivamente. A recuperação maior que 100% obtida deve-se provavelmente, ao fato de remoção de um tipo de inibidor não identificado (o fenômeno não estudado). O mesmo fenômeno foi observado na purificação de rGUS do milho transgênico por Kusnadi *et al.* (1998a). Eles também notaram que até 40% de atividade inicial foi perdida depois de se adicionar a GUS de *E. coli* no extrato do milho e que inibição parecida foi observada usando extrato de soja.

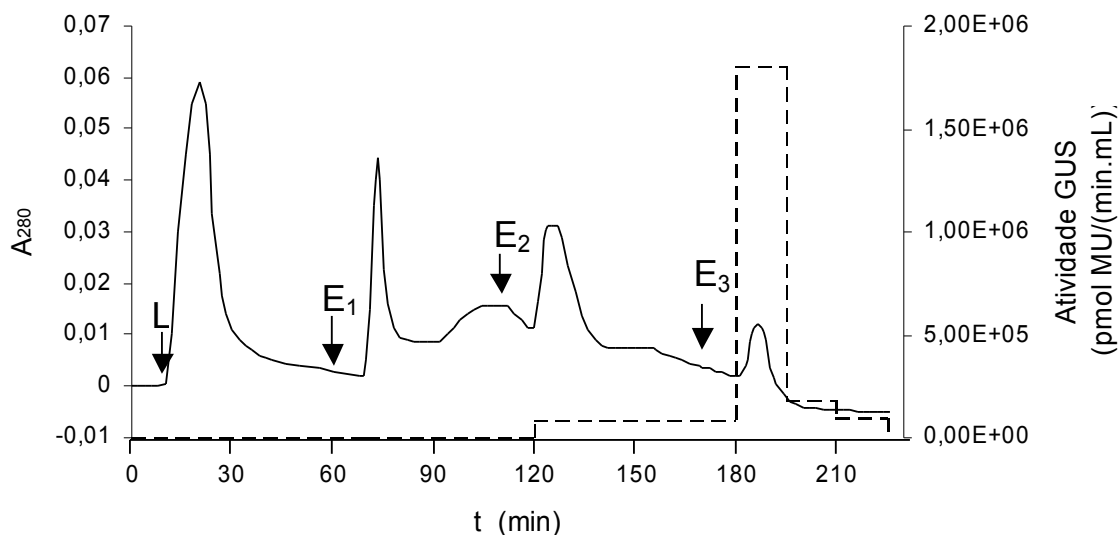


Figura 4.26 Cromatografia de rGUS a partir da fração obtida da troca iônica, usando Streamline-Phenyl como suporte. Tampão de eluição fosfato 50 mmol/L pH = 7,00 com NaCl 300 mmol/L e sulfato de amônio 0,5 mol/L (E₁), E₁ sem sulfato de amônio (E₂), água ultra pura (E₃). As setas indicam início das etapas de lavagem (L) e eluições (E_i). – Absorbância a 280 nm; --- Atividade GUS.

Nos trabalhos de Kusnadi *et al.* (1998a e 1998b), este inibidor de atividade de rGUS foi removido com cromatografia de troca iônica, porém a rGUS injetada na segunda coluna já estava livre dos inibidores. No estudo presente, a atividade total da rGUS eluída da coluna foi em torno de 230% da atividade total alimentada, provavelmente devido à remoção deste inibidor. Para poder comparar o fator de purificação obtido com cromatografia de interação hidrofóbica usando-se o extrato de soja com o obtido usando-se o extrato do milho, o fator de purificação obtido no trabalho presente deve ser dividido pelo fator 2,3 para compensar a atividade restabelecida com a remoção do inibidor e, assim obteve-se o fator de purificação 7, que bem próximo o fator obtido usando-se extrato do milho (8) (Kusnadi *et al.*, 1998a e 1998b).

Tabela 4.12 Cromatografia de interação hidrofóbica com resina Streamline-Phenyl.

Fração*	V (mL)	C _P (mg/mL)	m _P (mg)	A _{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT _{GUS} (pmol MU/min)	AE _{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	10,0	0,08	0,80	1,56·10 ⁶	15,6·10 ⁶	0,20·10 ⁸	1	100
Lavagem (0 – 70 min)	70	0	0	0	0	0	0	0
Fração 1 (70 – 120 min)	50	0,01	0,55	0	0	0	0	0
Fração 2 (120 – 140 min)	20	0,02	0,38	0,09·10 ⁶	1,83·10 ⁶	0,05·10 ⁸	0,03	12
Fração 3 (140- 180 min)	40	0,0023**	0,10	0,09·10 ⁶	3,40·10 ⁶	0,39·10 ⁸	0,25	22
Fração 4 (180- 195 min)	15	0,0064**	0,10	1,81·10 ⁶	27,1·10 ⁶	3,11·10 ⁸	15,70	174
Fração 5 (195 – 210 min)	15	0,0014**	0,02	0,18·10 ⁶	2,73·10 ⁶	1,43·10 ⁸	0,92	17
Fração 6 (210 – 225 min)	15	0,0008**	0,01	0,09·10 ⁶	1,39·10 ⁶	1,27·10 ⁸	0,82	9
Total	225		1,15		36,5·10 ⁶			234

* Tempo apresentado em termos de período após início de injeção da alimentação

** A proteína total medida com reagente Protein Plus (Pierce, EUA)

FP = fator de purificação; R = recuperação de atividade de GUS; C_P = concentração de proteína total; m_P = massa total de proteína; A_{GUS} = atividade de GUS; AT_{GUS} = atividade total de GUS; AE_{GUS} = atividade específica de GUS.

4.5.3 Análise de fração contendo rGUS com SDS-PAGE

Com finalidade de determinar massa molecular das impurezas (proteínas) que co-purificaram com rGUS (e também para a estimativa da pureza de rGUS), utilizou-se a eletroforese SDS-PAGE sem presença de β-mercaptoetanol no tampão de desnaturação (Figura 4.27). Observou-se que as massas moleculares das proteínas eluídas com água ultra-pura possuem baixa massa molecular (provavelmente o inibidor da tripsina de soja), o que está em concordância com o trabalho de Yeboah *et al.* (1996). A banda com mesma massa molecular de monômero de GUS de *E. coli* (68 kDa) não foi observada neste gel e também quando usou-se β-mercaptoetanol no tampão de desnaturação (dado não apresentado), pois provavelmente a rGUS esteja numa concentração muito baixa.

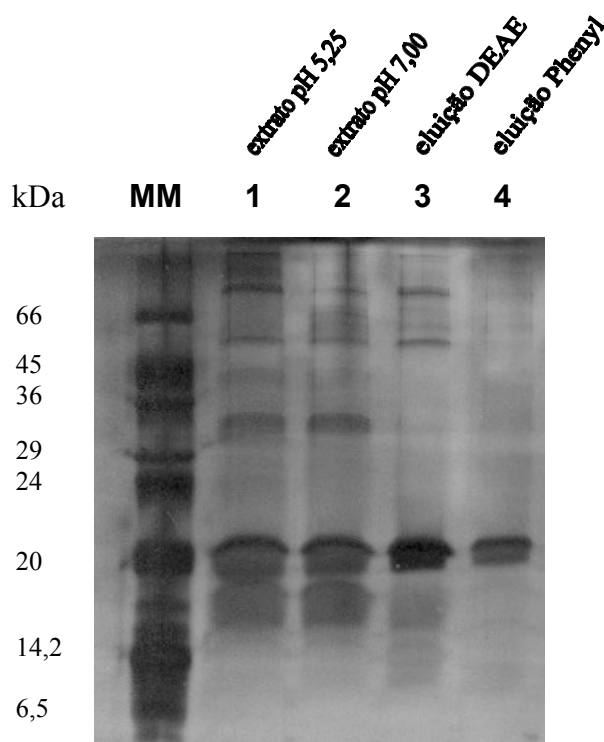


Figura 4.22 Perfil eletroforético (SDS-PAGE, gel 15%) da cromatografia em DEAE-Sephadex e cromatografia em Streamline-Phenyl. Sem presença de β -mercaptoetanol no tampão de desnaturação. **MM:** marcadores de massa molecular. **Pista 1:** extrato de semente de soja pH 5,25. **Pista 2:** extrato de semente de soja com pH ajustado a 7,00. **Pista 3:** eluição com NaCl 300 mmol/L em tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,00 da coluna DEAE-Sephadex. **Pista 4:** eluição com água ultra pura da coluna Stramline-Phenyl. Revelação com nitrato de prata, segundo Morrissey (1981).

4.6 Comparação da purificação de rGUS a partir de soja, canola e milho

De acordo com os fatores de purificação já existentes na literatura para as sementes de canola e milho transgênicos contendo rGUS, realizou-se uma comparação com

os obtidos para as sementes de soja transgênica. Na Tabela 4.13 são apresentados os fatores de purificação e recuperação de rGUS a partir das sementes de soja, canola e milho transgênicos. Analisando-se os fatores de purificação, percebeu-se que a soja tem potencial como biorreator, uma vez que apresentou fatores semelhantes aos obtidos para o milho. Por outro lado, comparando-se os fatores de purificação da soja e da canola, percebeu-se que a canola é o biorreator mais apropriado para produção desta enzima, pois a rGUS é uma enzima de pI ácido e a maioria das proteínas da canola tem pI acima de 7.

Tabela 4.13 **Comparação de purificação de rGUS a partir das sementes de soja, canola e milho transgênicos.**

Etapa de purificação	Soja		Milho (Kusnadi <i>et al.</i> , 1998a)		Milho (Kusnadi <i>et al.</i> , 1998b)		Canola (Bai e Glatz, 2003)	
	FP	R (%)	FP	R (%)	FP	R (%)	FP	R (%)
Extração	1	100	1	100	1	100	1	100
CTI (DEAE)	6,2	63	5	110	8	126	32	112
CIH (Phenyl)	97	110	40	46	62	81		

FP = fator de purificação, R = recuperação de atividade da GUS, CTI = cromatografia de troca aniônica, CIH = cromatografia de interação hidrofóbica.

Capítulo 5 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

5.1 Conclusões

O objetivo deste trabalho foi estudar extração e purificação da β -glucuronidase recombinante (rGUS) produzida na semente da soja e comparar sua purificação com purificações de rGUS de milho e canola transgênicos, para avaliar, sob o ponto de vista da recuperação e purificação, a soja como possível biorreator para produção de proteínas recombinantes.

A primeira etapa do trabalho foi composta de otimização de condições de extração em termos de pH e concentração de sal do tampão de extração. Concluiu-se que o tampão de extração com pH em torno de 4,0, na ausência de NaCl, representa o ponto ótimo para extrair as possíveis proteínas recombinantes produzidas na semente de soja. No geral, a solubilidade da proteína nativa da soja, como também a concentração de carboidratos e compostos fenólicos, diminui com a diminuição do pH. No entanto, percebeu-se que o extrato não possui atividade de GUS nesta condição (pH 4,0) e que a maior atividade específica do extrato se deu na faixa de pH 4,75 a 5,25. Assim, concluiu-se o processo de extração otimizado para a condição de pH a 5,25 pois obteve-se um extrato com maior atividade de GUS para a faixa de 4,75 – 5,25.

Na segunda etapa do trabalho, a purificação de rGUS foi feita usando-se duas etapas de cromatográficas, a primeira de troca aniônica (DEAE-Sephadex) e a segunda de interação hidrofóbica (Streamline-Phenyl). Comparando os fatores de purificação global para as duas etapas, constatou-se que as sementes do milho e de soja transgênicas são sistemas muito parecidos em termos de purificação de rGUS. Em relação à semente de canola transgênica, a semente de soja é inferior para purificação de rGUS com cromatografia de troca iônica, devido ao fato que a maioria das proteínas da canola têm ponto isoeletrico básico.

Observou-se um fator de purificação de rGUS na segunda cromatografia (interação hidrofóbica) próximo ao resultado obtido no caso de milho transgênico. As impurezas ainda presentes depois da cromatografia de interação hidrofóbica eram proteínas de baixa massa molecular. Portanto, com a adição de mais uma etapa cromatográfica, filtração em gel, provavelmente, se obteria a rGUS de alta pureza. Como a concentração de rGUS depois de cromatografia de interação hidrofóbica ainda era muito baixa, este estudo não foi realizado. A concentração de rGUS na semente da soja BR-16tg está abaixo de 0,1% da proteína total. Pela análise econômica feita por Nikolov (comunicação pessoal, 2004) esta é a concentração mínima para se tornar economicamente viável um processo de produção de proteína recombinante em planta transgênica.

A maior vantagem de usar soja como biorreator é o fato que existem inúmeros trabalhos descrevendo purificação das proteínas nativas da soja e, portanto, o desenvolvimento de processo de purificação da proteína recombinante talvez seja mais rápida do que se usar canola ou milho como biorreatores. A maior desvantagem é o fato que até hoje não se conseguiu expressar a proteína recombinante dentro da semente da soja em concentrações suficientemente altas. Apesar da baixa concentração de rGUS nas sementes usadas neste trabalho, confirmou-se que a soja tem potencial como biorreator.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

1) A β -conglucina e glicina são as proteínas mais abundantes no extrato da soja (cerca de 50% de proteína extraída) e elas poderiam ser removidas usando-se a precipitação com sulfato de amônio. Uma vez precipitadas estas proteínas polimerizam (formam pontes dissulfeto) e ressolubilização é possível somente com adição de agente redutor (por exemplo, β -mercaptoetanol) para romper estas pontes. Portanto, depois da extração, poderia se adicionar uma etapa de precipitação e ressolubilização do precipitado, e verificar se a rGUS ressolubilizaria deixando as maiores impurezas (β -conglucina e glicina) ainda no precipitado.

2) A influência de CaCl_2 na extração de rGUS poderia ser estudada, pois este sal causa diminuição de solubilidade de proteínas da soja na faixa de pH 5 a 9 (Smith *et al.*, 1938a).

3) A associação das proteínas de soja, e por consequência a massa molecular das proteínas, depende do pH e da força iônica da solução (Smith *et al.*, 1972). Portanto, a influência destas condições na purificação de rGUS usando coluna de exclusão de tamanho poderá ser estudada.

4) A adição de β -mercaptoetanol no tampão de eluição de cromatografia de troca aniônica empregada neste trabalho poderia ser estudada, pois no trabalho de Kusnadi *et al.* (1998a e 1998b) o uso de β -mercaptoetanol no tampão de dessorção permitiu que a rGUS fosse eluída usando-se concentração de NaCl de 200 mmol/L.

Referências bibliográficas

Aich S., Delbaer L. T. J., Cheng R., *Expression and purification of Escherichia coli β -glucuronidase*, Protein Expression and Purification, 22, 75-81, 2001

Aktaruzzaman M., Kimura Y., Takagi S., *Purification and characterization of a CM-glycinin digesting protease from soybean seeds*, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 57, 1119-1124, 1993

Allan K. S., Sydney J.C., *Soybeans: Chemistry and Technology*, The Avi Publishing Company, Westport, 27-144, 1972

Aragão F. J. L., Sarokin L., Vianna G. R., Rech E. L., *Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [Glycine max (L.) Merrill] plants at a high frequency*, Theoretical and Applied Genetics, 101, 1-6, 2000

Azzoni A. R., Kusnadi A. R., Miranda E. A., Nikolov Z. L., *Recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: Extraction and purification studies*, Biotechnology and Bioengineering, 80, 268-276, 2002

Bai Y., Nikolov Z. L., *Effect of processing on the recovery of recombinant β -glucuronidase from transgenic canola*, The proceedings of the 28th annual biochemical engineering symposium, Iowa State University, Ames, Iowa, 69-76, 1998

Bai Y., Nikolov Z. L., Glatz C. E., *Aqueous extraction of β -glucuronidase from transgenic canola: Kinetics and microstructure*, Biotechnology Progress, 18, 1301-1305, 2002

Bai Y., Glatz C. E., *Capture of recombinant protein from unclarified canola extract using streamline expanded bed anion exchange*, Biotechnology and bioengineering, 81, 855-864, 2003

Barros Neto B., Scarmino I., Bruns R. E., *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Editora Unicamp, Campinas, 2003

Blanco C., Nemoz G., *One sep purification of Escherichia coli β -glucuronidase*, Biochimie, 69, 157-161, 1987

Box G. E. P., Hunter W. G., Hunter J. S., *Statistics for experimenters*, John Wiley & Sons Inc., New York 1978

Bradford M. M. A., *Rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, 72, 248-254, 1976

Brasileiro A. C. M., Carneiro V. T. C., *Manual de transformação genética de Plantas*, EMBRAPA-SPI, 1998, 133-138

Carlsson J., Mosbach K., Bülow L., *Affinity precipitation and site-specific immobilization of proteins carrying polyhistidine tails*, Biotechnology and Bioengineering, 51, 221-228, 1996

Charlton A. J., Baxter N. J., Khan M. L., Moir A. J. G., Haslam E., Davies A. P., Williamson M. P., *Polyphenol/Peptide binding and precipitation*, Journal of Agricultural and Food chemistry, 50, 1593-1601, 2002

Cole K., Cousin S. L., *Size exclusion chromatography of soybean proteins and isoflavones*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 2713-2720, 1994

Denenberg V. H., *Statistics and experimental design for behavioral and biological reserchers*, John Wiley & Sons Inc., Washington 1976

Desai U. ^a, Sur G., Danuert S., Babbitt R., Li Q., *Expression and affinity purification of recombinant proteins from plants*, Protein Expression and Purification, 25, 195-202, 2002

De Wilde S., Peeters K., Jacobs A., Peck I., Dipecker A., *Expression of antibodies and Fb fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants*, Molecular Breeding, 9, 271-282, 2002

Dharmadi Y., Chang Q., Glatz C. E., *Recovery of enzyme byproducts from potential plant hosts for recombinant protein production*, Enzyme and Microbial Technology, 33, 596-605, 2003

Doyle M. L., Katzman P. A., Doisy E. A., *Production and properties of bacterial β -glucuronidase*, Journal of biological chemistry, 217, 921-930, 1955

Farinas C. S., *Plantas como biorreatores: Extração de pró-insulina recombinante produzida em sementes de milho transgênico*, Tese de doutorado apresentada ao Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004

Ferreira C. V., Granjeiro J. M., Taga E. M., Aoyama H., *Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases*, Plant physiology and Biochemistry, 36, 487-494, 1998

Flores H., Ellington A. D., *Increasing the termal stability of an oligomeric protein, beta-glucuronidase*, Journal of Molecular Biology, 315, 325-337, 2002

Franco-Fraguas L., Pla A., Ferreira F., Massaldi H., Suarez N., Batista-Viera F., *Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation*, Journal of Chromatography B, 790, 365-372, 2003

Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A., *Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals*, National Biotechnology, 18, 1151-1155, 2000

Holzmann D., *Agracetus grows monoclonals in soybeans and corn plants*, Genetical Engineering News, 14, 34, 1994

Horn M. E., Woodard S. L., Howard J. A., *Plant molecular farming: systems and products*, Plant Cell Reports, 22, 711-720, 2004

Huang J., Nandi S., Wu L., Yalda D., Bartley G., Rodriguez R., Lonnerdal B., Huang N., *Expression of natural antimicrobial lysozyme in rice grains*, Molecular Breeding, 10, 83-94, 2002

Jefferson R. A., *The GUS reporter gene system*, Nature, 342, 837-838, 1989

Koplik R., Pavelkova H., Cincibuchova J., Mestek O., Kvasnicka F., Suchanek M., *Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*, Jpurnal of Chromatography B, 770, 261-273, 2002

Krishnan R., McDonald K. A., Dandekar A. M., Jackman A. P., Falk B., *Expression of recombinant trichosanthinin, a ribosome-inactivating protein, in transgenic tobacco*, Journal of Biotechnology, 97, 69-88, 2002

Kusnadi A. R., Evangelista R., Nikolov Z. L., *Recovery of recombinant β -glucuronidase from transgenic corn*, The proceedings of the 26th annual biochemical engineering symposium, Kansas State University, Manhattan, Kansas, 143-152, 1996

Kusnadi A. R., Evangelista R. L., Hood E. E. Howard J. A., Nikolov Z. L., *Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant β -glucuronidase*, Biotechnology and Bioengineering, 60, 44-52, 1998a

Kusnadi A. R., Hood E. E., Witcher D. R., Howard J. A., Nikolov Z. L., *Production and purification of two recombinant proteins from transgenic corn*, Biotechnology Progres, 14, 149-155, 1998b

Laemmli U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4*, Nature, 227, 680-685, 1970

- Larsen K., *Purification of nodule-specific uricase from soybean by arginine-sepharose affinity-chromatography*, 20, 1-9, 1990
- Leelavathi L., Gupta N., Maiti S., Gosh A., Reddy V. S., *Overproduction of an alcali- and thermostable xylanase in tobacco chloroplast and efficient recovery of the enzyme*, Molecular Breeding, 11, 59-67, 2003a
- Leelavathi L., Reddy V. S., *Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and overproduction of an alcali- and thermostable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme*, Molecular Breeding, 11, 49-58, 2003b
- Matsumura I., Wallingford J. B., Surana N. K., Vize P. D., Ellington A. D., *Directed evolution of the surface chemistry of the reporter enzyme β -glucuronidase*, Nature Biotechnology, 17, 696-700, 1999
- McCabe D.E., Martinell B. J., Christou P., *Stable transformation of soybean (Glycine Max) by particle acceleration*, Biotechnology, 6, 923-926, 1988
- Menkhaus T. J., Eriksson S. U., Whitson P. B., Glatz C. E., *Host selection as a downstream strategy: Polyelectrolyte precipitation of β -glucuronidase from plant extracts*, Biotechnology and Bioengineering, 77, 148-154, 2002
- Menkhaus T. J., Pate C., Krech A., Glatz C. E., *Recombinant purification from pea*, Biotechnology and Bioengineering, 86, 108-114, 2004a
- Menkhaus T.J., Bai Y., Zhang C., Nikolov Z.L., Glatz C.E., *Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants*, American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers, Published on Web, 2004b
- Miller G. L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical Chemistry, 31, 426-428, 1959
- Miranda M. V., Magri M. L., Canizo A. A. N., Cascone O., *Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concavalin-A agarose*, Process Biochemistry, 38, 437-543, 2002
- Morassutti C., De Amici F., Skerlavaj B., Zanetti M., Marchetti S., *Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system*, FEBS Letters, 519, 141-146, 2002
- Morrissey J. H., *Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity*, Analytical Biochemistry, 117, 307-310, 1981

Nandi S., Suzuki Y. A., Huang J., Yalda D., Pham P., Wo L., Bartley G., Huang N., Lonnerdal B., *Expression of human lactoferrin in transgenic rice grain for the application in infant formula*, Plant Science, 163, 713-722, 2002

Nikololov Z. L., Woodard S. L., *Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock*, Current Opinion in Biotechnology, 15, 479-486, 2004

Osborne T. B., *The vegetable proteins*, Longman Green and Co., London, 1924

Porter J. E., Ladisch M., R., Hermann K. M., *Ion-exchange and affinity-chromatography in the scaleup of the purification of alpha-galactosidase from soybean seeds*, Biotechnology and Bioengineering, 37, 356-363, 1991

Price M. L., Butler L. G., *Rapid visual estimation and spectrometric determination of tannin content of sorghum grain*, Journal of Agricultural Food and Chemistry, 25, 1268-1273, 1977

Russel D. A., Spatola L. A., Dian T., Paradkar V.M., Dufield D. R., Carrol J. A., Schlitter M. R., *Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems*, Biotechnology and Bioengineering, 89, 775-782, 2005

Sathe S. K., *Isolation and characterization of the protein that copurifies with soybean (Glycine Max L) glycinin*, Journal of Food Biochemistry, 15, 33-49, 1991

Smith A. K., Circle S. J., *Peptization of soybean proteins. Extraction of nitrogenous constituents from oil-free meal by acids and bases with and without added salts*, Industrial Engineering Chemistry, 30, 1414-1418, 1938a

Smith A. K., Circle S. J., Brother G. H., *Peptization of soybean proteins. The effect of neutral salts on the quantity of nitrogenous constituents extracted from oil-free meal*, Journal of American Chemical Society, 60, 1316-1320, 1938B

Smith A. K., *Nitrogen solubility index, isolated protein yield, and whey nitrogen content of several soybean strains*, Cereal Chemistry, 43, 261-270, 1966

Smith A. K., Sidney J. C., *Soybeans:Chemistry and technology*, The AVI Publishing Company, 1972, 470 p

Stephens A. S., Gelbhardt J. S., Matthews B. F., Wadsworth G. J., *Purification and preliminary characterization of the soybean glycosomal aspartate aminotransferase isozyme*, Plant Science, 139, 233-242, 1998

Teli N. P., Timko M. P., *Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79, 125-145, 2004

Thanh V. H., Okubo K., Shibasaki K., *Heterogeneity of 7S soybean protein by Sepharose gel-chromatography and disc-gel electrophoresis*, Agricultural and Biological Chemistry, 39, 1501-1503, 1975

Valdes R., Reyes B., Alvarez T., Garcia J., Montero J. A., Figueroa A., Gomez L., Padilla S., Geada D., Abrahantes M.C., *Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale*, Biochemical and Biophysical Communications, 310, 742-747, 2003

Whitelam G. C., Cockburn B., Gandecha A. R., Owen M. R. L., *Heterologous protein production in transgenic plants*, Biotechnology and Genetical Engineering Reviews, 11, 1-29, 1993

Wolf W. J., *Soybean proteins: Their functional, chemical and physical properties*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 18, 969-976, 1970

Wolf W. J., Peterson R. E., Schaer M. L., *Preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography of soybean proteins and characterisation of fractions by gel electrophoresis*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 1809-1816, 1992

Woodard S. L., Mayor J. M., Bailey M. R., Barker D. K., Love R. T., Lane J. R., Delaney D. E., McComas-Wagner J. M., Mallubhotia H. D., Hood E. E., *Maize (Zea mays)-derived bovine trypsin: characterization of the first large scale, commercial protein product from transgenic plants*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 38, 123-130, 2003

Yeboah N. A., Arahira M., Udaka K., Fukazawa C., *A rapid purification method for soybean Bowman-Birk protease inhibitor using hydrophobic interaction chromatography*, Protein expression and purification 7, 309-314, 1996

Yoon S. O., Lee Y. S., Lee S. H., Cho Y. D., *Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (Glycine max) axes*, Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects, 1475, 17-26, 2000

Zhang C., Love R. T., Jilka J. M., Glatz C. E., *Genetic engineering strategies for purification of recombinant proteins from canola by anion exchange chromatography: An example of β -glucuronidase*, Biotechnology progress, 17, 161-167, 2001

Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb/

ANEXO 1

Planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta

Para determinar a influencia de variáveis das condições de extração (pH, C_{NaCl} , T, t, nível de agitação) sobre variáveis de interesse (concentração de proteína, açúcares totais e redutores, compostos fenólicos e atividade de GUS) a metodologia de superfície de resposta foi utilizada.

Barros Neto et al. (2003) apresentam uma metodologia bastante simples que consiste, basicamente, em planejar a execução de experimentos de modo que eles sejam capazes de fornecer o tipo de informações procuradas, optando-se, normalmente, pela utilização de planejamentos fatoriais completos, quando o número de variáveis é pequeno.

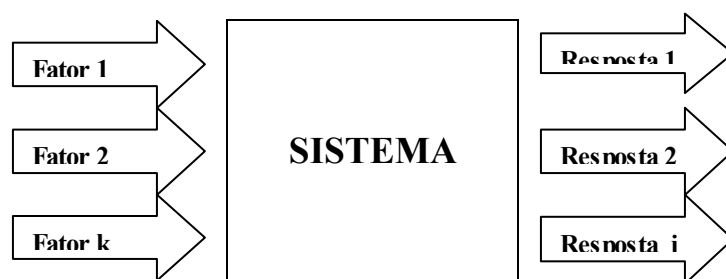


Figura 2 Um sistema pode ser representado por uma função ligando os fatores (variáveis de entrada) às respostas (variáveis de saída).

Basicamente as variáveis (fatores) do processo são inseridas em dois modelos, o polinomial linear

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i \quad (1)$$

e o polinomial quadrático (nosso caso – planejamento estrela)

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=2}^k \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (2)$$

, onde β_i são os coeficientes do modelo empírico e x_i são as variáveis independentes estudadas. As constantes são determinadas pelo método dos mínimos quadrados. A função obtida se chama superfície de resposta.

Para conhecer melhor a superfície de resposta é preciso também avaliar o erro das medidas. Isto é feito pela repetição dos ensaios (realizar experimentos num maior numero de níveis), que é feito no caso de planejamento de estrela com repetição das medidas em ponto central (três em nosso caso). Assim nos pudemos avaliar a erro aleatório das nossas medidas (fatores não controlados, erro de equipamento,...), ou também chamado, erro puro.

O planejamento experimental permite também a determinação dos efeitos (ou falando em língua matemática: coeficientes - β) de interação entre as variáveis. Para avaliar significância dos fatores os parâmetros estatísticos t (t de Student) e p são utilizados. O valor t é uma medida, que representa o quanto maior é o coeficiente do modelo em relação ao desvio padrão e é obtido pela razão entre o valor de cada coeficiente pelo seu desvio padrão ($t = \bar{x}/s_{\bar{x}}$). Aqui nos estamos propondo a hipótese nula, que é: “o coeficiente ou efeito é nulo” (Box et al. 1978).

O valor p determina a probabilidade (importância estatística) dos efeitos observados serem pura coincidência, ou este efeito realmente existe (em língua matemática: se o coeficiente tem uma influencia sobre resultados). Um valor de p pequeno esta associado a um valor de t grande, implicando que o efeito (coeficiente) é muito maior que o seu desvio padrão. O valor p denota a probabilidade do efeito observado (coeficiente) ser nulo. Por exemplo, a probabilidade $p < 0,05$ significa, que tem-se menos do que 5% de chances de que o efeito (coeficiente) seja nulo, ou mais do que 95% de ser diferente de nulo e portanto significativo (Denenberg, 1976).

Se o coeficiente não tem significância estatística, ele é usualmente tirado do modelo ou deixado só por razões matemáticos e não estatísticas. Neste trabalho os coeficientes sem significância estatística foram tirados do modelo.

ANEXO 2

Tabelas de análises de variância dos extratos para soja BR-16 e Br-16tg

Tabela A.1 Análise de variância para a concentração de proteína total para o milho BR-16.

Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regressão	42,1924	4	10,548090	44,86
Resíduo	1,41074	6	0,235123	
Falta de ajuste	1,339255	4	0,334814	
Erro puro	0,071486	2	0,0357429	
Total	43,6031	10		
R ²	0,93634			
F Tabelaado _(4,6) 5% = 4,53		F _{modelo} /F _{tabelaado} = 9,90		

Tabela A.2 Análise de variância para a concentração de polifenóis para o milho BR-16.

Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regressão	0,0063	1	0,006339	4,82
Resíduo	0,01184	9	0,001316	
Falta de ajuste	0,011239	7	0,001606	
Erro puro	0,000605	2	0,0003027	
Total	0,0182	10		
R ²	0,12154			
F Tabelaado _(1,9) 5% = 5,12		F _{modelo} /F _{tabelaado} = 0,94		

Tabela A.3 Análise de variância para a concentração de AR para o milho BR-16.

Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regressão	0,2892	5	0,057833	4,69
Resíduo	0,06168	5	0,012336	
Falta de ajuste	0,049239	3	0,016413	
Erro puro	0,012439	2	0,0062197	
Total	0,3508	10		
R ²	0,67931			
F Tabelaado _(1,9) 5% = 5,12		F _{modelo} /F _{tabelaado} = 0,92		

Tabela A.4 Análise de variância para a concentração de proteína total para o milho BR-16tg.

Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regresão	59,0556	4	14,763890	48,86
Resíduo	1,81314	6	0,302190	
Falta de ajuste	1,78698	4	0,446745	
Erro puro	0,02616	2	0,0130802	
Total	60,86870	10		
R²	0,94131			
F Tabelaado _(4,6) 5% = 4,53		F _{modelo} /F _{tabelaado} = 10,79		

Tabela A.5 Análise de variância para a concentração de polifenóis para o milho BR-16tg.

Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regresão	0,0178	3	0,005921	21,41
Resíduo	0,00194	7	0,000277	
Falta de ajuste	0,001694	5	0,000339	
Erro puro	0,000242	2	0,0001208	
Total	0,019698	10		
R²	0,81311			
F Tabelaado _(3,7) 5% = 4,35		F _{modelo} /F _{tabelaado} = 4,92		

Tabela A.6 Análise de variância para a concentração de AR para o milho BR-16tg.

Variáveis estatísticas	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F
Regresão	0,3054	1	0,305431	869,47
Resíduo	0,00316	9	0,000351	
Falta de ajuste	0,002720	7	0,000389	
Erro puro	0,000442	9	0,0000491	
Total	0,308593	10		
R²	0,97961			
F Tabelaado _(1,9) 5% = 5,12		F _{modelo} /F _{tabelaado} = 169,82		

ANEXO 3

Resultados dos ensaios de extração para a semente da soja BR-16tg usando: tampão de citrato de sódio 50 mmol/L, temperatura 20 °C e razão massa:volume 1:20

pH	Concentrações dos componentes					
	AE _{GUS} (pmol UM/ min·mg)	A _{GUS} (pmol UM/ min·mL)	C _P (mg/mL)	C _F (mmol/L)	C _{AR} (mg/mL)	C _{AT} (mg/mL)
4,10	0	0	0,80	0,440	0,22	8,03
4,10	0	0	0,93	0,486	0,26	7,78
4,35	$1,33 \cdot 10^6$	$0,12 \cdot 10^7$	0,93	0,533	0,28	8,17
4,35	$1,11 \cdot 10^6$	$0,15 \cdot 10^7$	1,33	0,414	0,25	7,70
4,50	$5,68 \cdot 10^6$	$0,95 \cdot 10^7$	1,66	0,383	0,27	7,92
4,50	$5,53 \cdot 10^6$	$0,92 \cdot 10^7$	1,66	0,481	0,32	7,72
4,75	$9,73 \cdot 10^6$	$1,71 \cdot 10^7$	1,76	0,439	0,32	7,77
4,75	$9,67 \cdot 10^6$	$1,71 \cdot 10^7$	1,77	0,417	0,33	8,31
5,00	$8,04 \cdot 10^6$	$1,78 \cdot 10^7$	2,21	0,422	0,37	7,87
5,00	$9,14 \cdot 10^6$	$2,16 \cdot 10^7$	2,36	0,397	0,35	7,70
5,25	$9,31 \cdot 10^6$	$2,94 \cdot 10^7$	3,16	0,458	0,42	7,85
5,25	$7,74 \cdot 10^6$	$2,54 \cdot 10^7$	3,28	0,490	0,41	7,39
5,50	$7,67 \cdot 10^6$	$3,59 \cdot 10^7$	4,68	0,471	0,39	8,21
5,50	$7,52 \cdot 10^6$	$3,42 \cdot 10^7$	4,55	0,524	0,48	7,44
5,75	$6,66 \cdot 10^6$	$3,58 \cdot 10^7$	5,38	0,490	0,48	8,14
5,75	$5,67 \cdot 10^6$	$3,26 \cdot 10^7$	5,74	0,477	0,51	7,63
6,00	$6,97 \cdot 10^6$	$3,79 \cdot 10^7$	5,44	0,548	0,47	8,20
6,00	$6,46 \cdot 10^6$	$3,97 \cdot 10^7$	6,14	0,504	0,54	7,48
6,25	$4,70 \cdot 10^6$	$3,37 \cdot 10^7$	7,18	0,559	0,46	8,18
6,25	$5,55 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^7$	7,20	0,546	0,56	8,24

AE_{GUS} – atividade específica de GUS; A_{GUS} – atividade de GUS; C_P – concentração de proteína total; C_F – concentração dos polifenóis; C_{AR} – concentração de açúcares redutores; C_{AT} – concentração de açúcares totais.

ANEXO 4

Otimização de volume de injeção de extrato para cromatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex

Tabela A.1 Comatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex (eluição com NaCl 300 mmol/L) para o volume de injeção 1,0 mL.

Fração*	V (mL)	C_P (mg/mL)	m_P (mg)	A_{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT_{GUS} (pmol MU/min)	AE_{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	1	3,06	3,06	$22,70 \cdot 10^6$	$22,70 \cdot 10^6$	$7,43 \cdot 10^6$	1,00	100
Lavagem (0-60 min)	60	0,03	1,62	0	0	0	0	0
Fração 1 (60 – 65 min)	5	0,01	0,04	0	0	0	0	0
Fração 2** (65 – 70 min)	5	0,08	0,39	$2,52 \cdot 10^6$	$12,60 \cdot 10^6$	$32,70 \cdot 10^6$	4,40	56
Fração 3** (70 – 75 min)	5	0,05	0,27	$0,35 \cdot 10^6$	$1,73 \cdot 10^6$	$6,33 \cdot 10^6$	0,85	8
Fração 4 (75 – 80 min)	5	0,03	0,13	$0,18 \cdot 10^6$	$0,88 \cdot 10^6$	$6,73 \cdot 10^6$	0,91	4

* Tempo apresentado em termos de período após de injeção da alimentação

** Frações usadas para o calculo de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da cromatografia

Tabela A.2 Comatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex (eluição com NaCl 300 mmol/L) para o volume de injeção 2,0 mL.

Fração *	V (mL)	C _P (mg/mL)	m _P (mg)	A _{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT _{GUS} (pmol MU/min)	AE _{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	2	3,06	6,12	$22,70 \cdot 10^6$	$45,50 \cdot 10^6$	$7,43 \cdot 10^6$	1,00	100
Lavagem (0-60 min)	60	0,03	2,01	0	0	0	0	0
Fração 1 (60 – 65 min)	5	0,02	0,08	0	0	0	0	0
Fração 2 ** (65 – 70 min)	5	0,16	0,78	$3,18 \cdot 10^6$	$15,90 \cdot 10^6$	$20,30 \cdot 10^6$	2,74	35
Fração 3 ** (70 – 75 min)	5	0,09	0,43	$1,67 \cdot 10^6$	$8,36 \cdot 10^6$	$19,30 \cdot 10^6$	2,59	18
Fração 4 (75 – 80 min)	5	0,04	0,21	$0,17 \cdot 10^6$	$0,87 \cdot 10^6$	$4,13 \cdot 10^6$	0,56	2

* Tempo apresentado em termos de período após de injeção da alimentação

** Frações usadas para o calculo de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da cromatografia

Tabela A.3 Comatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex (eluição com NaCl 300 mmol/L) para o volume de injeção 3,0 mL.

Fração *	V (mL)	C _P (mg/mL)	m _P (mg)	A _{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT _{GUS} (pmol MU/min)	AE _{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	3	3,06	9,18	$22,70 \cdot 10^6$	$68,20 \cdot 10^6$	$7,43 \cdot 10^6$	1,00	100
Lavagem (0-60 min)	60	0,06	3,86	0	0	0	0	0
Fração 1 (60 – 65 min)	5	0,01	0,07	$0,37 \cdot 10^6$	$1,86 \cdot 10^6$	$26,30 \cdot 10^6$	3,54	3
Fração 2 ** (65 – 70 min)	5	0,25	1,25	$6,74 \cdot 10^6$	$33,70 \cdot 10^6$	$26,90 \cdot 10^6$	3,62	50
Fração 3 ** (70 – 75 min)	5	0,12	0,59	$1,68 \cdot 10^6$	$8,38 \cdot 10^6$	$14,20 \cdot 10^6$	1,91	12
Fração 4 (75 – 80 min)	5	0,05	0,25	$0,23 \cdot 10^6$	$1,14 \cdot 10^6$	$4,47 \cdot 10^6$	0,60	2

* Tempo apresentado em termos de período após de injeção da alimentação

** Frações usadas para o calculo de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da cromatografia

Tabela A.4 Comatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex (elução com NaCl 300 mmol/L) para o volume de injeção 4,0 mL.

Fração*	V (mL)	C_P (mg/mL)	m_P (mg)	A_{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT_{GUS} (pmol MU/min)	AE_{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	4	2,68	10,71	$22,50 \cdot 10^6$	$90,00 \cdot 10^6$	$8,40 \cdot 10^6$	1,00	100
Lavagem (0-60 min)	60	0,08	5,08	$0,12 \cdot 10^6$	$6,87 \cdot 10^6$	$1,35 \cdot 10^6$	0,16	8
Fração 1** (60 – 65 min)	5	0,06	0,28	$4,96 \cdot 10^6$	$24,80 \cdot 10^6$	$89,00 \cdot 10^6$	10,59	28
Fração 2** (65 – 70 min)	5	0,35	1,74	$5,31 \cdot 10^6$	$26,50 \cdot 10^6$	$15,20 \cdot 10^6$	1,81	29
Fração 3 (70 – 75 min)	5	0,12	0,58	$1,04 \cdot 10^6$	$5,18 \cdot 10^6$	$8,85 \cdot 10^6$	1,05	6
Fração 4 (75 – 80 min)	5	0,06	0,28	$0,24 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^6$	$4,34 \cdot 10^6$	0,52	1

* Tempo apresentado em termos de período após de injeção da alimentação

** Frações usadas para o calculo de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da cromatografia

Tabela A.5 Comatografia de troca iônica usando DEAE-Sephadex (elução com NaCl 300 mmol/L) para o volume de injeção 5,0 mL.

Fração*	V (mL)	C_P (mg/mL)	m_P (mg)	A_{GUS} (pmol MU /(min.mL))	AT_{GUS} (pmol MU/min)	AE_{GUS} (pmol MU /(min.mg))	FP	R (%)
Alimentação	5	3,23	16,15	$21,20 \cdot 10^6$	$106,00 \cdot 10^6$	$6,56 \cdot 10^6$	1,00	100
Lavagem (0-60 min)	60	0,09	5,13	$0,84 \cdot 10^6$	$50,60 \cdot 10^6$	$9,86 \cdot 10^6$	1,50	48
Fração 1 (60 – 65 min)	5	0,02	0,09	$0,24 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^6$	$12,80 \cdot 10^6$	1,95	1
Fração 2* (65 – 70 min)	5	0,37	1,86	$8,74 \cdot 10^6$	$43,70 \cdot 10^6$	$23,50 \cdot 10^6$	3,59	41
Fração 3 (70 – 75 min)	5	0,13	0,67	$0,47 \cdot 10^6$	$2,34 \cdot 10^6$	$3,48 \cdot 10^6$	0,53	2
Fração 4 (75 – 80 min)	5	0,05	0,26	$0,23 \cdot 10^6$	$1,16 \cdot 10^6$	$4,46 \cdot 10^6$	0,68	1

* Tempo apresentado em termos de período após de injeção da alimentação

** Frações usadas para o calculo de fator de purificação (FP) e recuperação (R) da cromatografia