

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Área de Concentração

Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**EFEITO DO AGENTE QUELANTE NA ADSORÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PRÓ-
INSULINA RECOMBINANTE EM IMAC**

Eng. Química Lidiania Cristina de Góes

Prof^a Dr^a Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

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

Campinas – São Paulo

Abril de 2009

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

G553e Góes, Lidiania Cristina
Efeito do agente quelante na adsorção e purificação
de pró-insulina recombinante em imac / Lidiania Cristina
de Góes. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Sônia Maria Alves Bueno.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quelantes. 2. Cromatografia de afinidade. 3.
Proteínas recombinantes. I. Bueno, Sônia Maria Alves.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Effect of the chelanting agent in adsorption and purification of
recombinant proinsulin in IMAC

Palavras-chave em Inglês: Chelanting, Affinity chromatography, Proteins
recombinantes

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

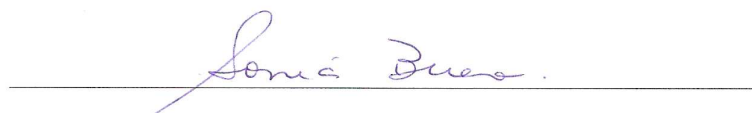
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Pedro de Alcântara Pessoa Filho, Everson Alves Miranda

Data da defesa: 28/04/2009

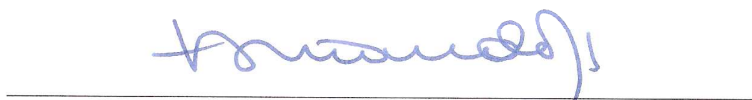
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Lidiania Cristina de Góes e aprovada em 28 de abril de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

A handwritten signature in blue ink, reading "Sônia Bueno", is positioned above a horizontal line.

Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno – FEQ/UNICAMP

Orientadora

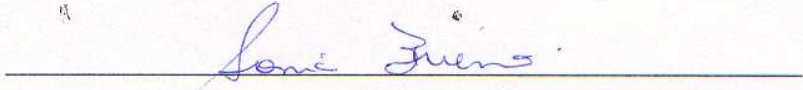
A handwritten signature in blue ink, reading "Everson Miranda", is positioned above a horizontal line.

Prof. Dr. Everson Alves Miranda – FEQ/UNICAMP

A handwritten signature in blue ink, reading "Pedro de Alcântara Pessoa Filho", is positioned above a horizontal line.

Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessoa Filho - EPUSP

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Lidiana Cristina de Góes e aprovada pela comissão julgadora em 28 de abril de 2009.



Orientadora: Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado saúde, forças para agüentar a saudade e perseverança para continuar sempre.

Aos meus amados pais José Aparecido e Maria José, e minhas irmãs Juliana e Cassiana pelo apoio, orações, sacrifícios e amor incondicional, por estarem sempre ao meu lado. Aos meus avôs por toda a ajuda. Muito obrigada.

Ao meu namorado, melhor amigo, maior incentivador e companheiro José Eduardo, obrigada. Esse trabalho também é seu.

A Prof. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno meu sincero agradecimento pela orientação, pelo tema, pelas muitas palavras de incentivo, pela confiança e paciência ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda pelos ensinamentos, sugestões e críticas.

À Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes e ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios para preparo e análise de amostras.

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa e ao Dr. Adriano Azzoni pelas sugestões dadas nos exames de qualificação.

Aos colegas do LIMBio, Igor, Iara, Maria Cristiane e Paula, pela troca de experiências.

Em especial as amigas: Alessandra, Ana Paula, Érika, Fabiana, Luisa, Priscila e Oselys, pela ajuda, discussões, sugestões, conversas e pela amizade.

À empresa BIOMM, nas pessoas do Eng. Luciano Vilela e Dra. Heloísa Tunes, pelo suporte técnico e fornecimento das amostras utilizadas neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto.

À todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XI
LISTAS DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT	XXI
CAPÍTULO 1 : INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 : OBJETIVO	3
CAPÍTULO 3 : REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	5
3.2 PRÓ-INSULINA RECOMBINANTE: OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	8
3.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS	13
3.3.1 Escolha do agente quelante.....	15
3.3.2 Química de coordenação.....	19
3.3.3 Seleção do íon metálico.....	20
3.3.4 Mecanismos de adsorção e dessorção	21
3.4 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	23
CAPÍTULO 4 : MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 MATERIAIS	27
4.1.1 Adsorventes.....	27
4.1.2 Regentes.....	27
4.1.3 Pró-insulina sulfonada com cauda de poli(histidina).....	28
4.2 METODOLOGIA	29
4.2.1 Síntese dos géis Sepharose-IDA, Sepharose-TREN e Sepharose-CM-Asp	29
4.2.2 Determinação da densidade dos ligantes.....	31
4.2.3 Determinação de proteína total.....	31
4.2.4 Experimentos cromatográficos em Sepharose-IDA-Ni(II): Adsorção de PIS a partir de soluções PIS-IMAC e PIS-C.....	32
4.2.5 Experimentos cromatográficos em Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II), Sepharose-TREN-Ni(II) e HisTrap-Ni(II)	32
4.2.6 Eletroforese SDS-PAGE.....	34
4.2.7 Determinação das isotermas de adsorção	34
4.2.8 Determinação das curvas de ruptura	36
4.2.9 Determinação de pró-insulina recombinante sulfonada (PIS) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	37
CAPÍTULO 5 : RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1	ANÁLISE DOS PERFIS PROTÉICOS DAS SOLUÇÕES DE PRÓ-INSULINA RECOMBINANTE (PIS) POR ELETROFORESE SDS-PAGE	39
5.2	EFEITO DO AGENTE QUELANTE NA CAPACIDADE DE IMOBILIZAÇÃO DO ÍON METÁLICO NÍQUEL	40
5.3	ADSORÇÃO DE PIS EM GEL SEPHAROSE-IDA-Ni(II).....	42
5.3.1	<i>Adsorção de PIS a partir de solução PIS-IMAC</i>	43
5.3.2	<i>Efeito do tampão de equilíbrio na adsorção de PIS a partir de solução clarificada</i>	45
5.4	ADSORÇÃO DE PIS A PARTIR DA SOLUÇÃO CLARIFICADA NOS GÉIS SEPHAROSE - IDA-Ni(II), -CM-ASP-Ni(II), -TED-Ni(II), -TREN-Ni(II) E HIS-TRAP-Ni(II)	47
5.5	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE PRÓ-INSULINA RECOMBINANTE.....	53
5.5.1	<i>Determinação da capacidade máxima e da constante de dissociação</i>	53
5.6	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS TERMODINÂMICOS PARA ADSORÇÃO DE PIS	59
CAPÍTULO 6 : CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		71
CAPÍTULO 7 : REFERÊNCIAS		75
APÊNDICE A		83
APÊNDICE B		89

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Alguns exemplos de caudas de afinidade (Adaptado de ARNAU et al., 2006).	7
Tabela 3.2: Produção e purificação de pró-insulina humana recombinante (Adaptado de AQUINO, 2004).	11
Tabela 3.3: Alguns agentes quelantes utilizados em IMAC (Adaptado de GABERCPOREKAR e MENART, 2001).	16
Tabela 3.4: Fatores de estabilidade quelato e ponto de carga nula de alguns dos agentes quelantes (adaptado de PORATH, 1988 e RIBEIRO, 2006)	18
Tabela 3.5: Diferentes formas de linearização da equação de Langmuir. (Adaptado de BOLSTER e HORNBERGER, 2007)	25
Tabela 5.1: Densidade de íon metálico níquel imobilizado em agarose derivatizada com os agentes quelantes IDA, CM-Asp, TREN e TED.	42
Tabela 5.2: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em Sepharose-IDA-Ni(II). ⁽¹⁾	44
Tabela 5.3: Quantidades de proteína total e PIS sulfonada obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias com PIS-C.	51
Tabela 5.4: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de PIS a 25°C.	54
Tabela 5.5: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de PIS.	57
Tabela 5.6: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de PIS	62
Tabela 5.7: Parâmetros termodinâmicos para adsorção de PIS.	65
Tabela 5.8: Quantidades de proteína total e PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das curvas de ruptura.	69
Tabela A.1: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias Sepharose-IDA-Ni(II).	84
Tabela A.2: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias Sepharose-CM-Asp-Ni(II).	85
Tabela A.3: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em Sepharose-TED-Ni(II). ⁽¹⁾	86
Tabela A.4: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em Sepharose-TREN-Ni(II).	87
Tabela A.5: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em coluna HisTrap-Ni(II).	88
Tabela B.1: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de PIS.	91

Listas de Figuras

- Figura 3.1** Representação da estrutura de pró-insulina: cadeias A e B (em vermelho) e peptídeo C (em cinza) (www.sh.isuhsc.edu/intragrads/foundations/217/aw/5). 9
- Figura 3.2:** Representação da conversão da molécula de pró-insulina em insulina através de clivagem proteolítica (http://www.endotext.org/Diabetes/diabetes3_new/diabetes3.htm). 10
- Figura 3.3:** Esquema das etapas de recuperação e purificação de pró-insulina humana recombinante contendo cauda de poli(histidina), produzida em corpos de inclusão em *Escherichia coli* (modificado de PETRIDES et al., 1995 e adaptado de TIKHONOV et al., 2001 e AQUINO, 2004). 12
- Figura 3.4:** Esquema da ligação entre a proteína e o suporte de afinidade com o íon metálico quelatado. Ligações fortes entre a proteína e a matriz de IMAC ocorrem predominantemente por interação multi-ponto (a) das histidinas da superfície da proteína nativa ou recombinante, ou (b) pela cauda de histidina (His-tag) acoplada ao N- ou C-terminal da proteína. (Adaptado de GABERC-POREKAR e MENART, 2001) 15
- Figura 3.5:** Representação esquemática da formação dos complexos quelante-metal em uma superfície sólida ativada com epícloridrina. (Adaptada de GABERC-POREKAR e MENART, 2001 e RIBEIRO, 2006). 17
- Figura 3.6.** Agentes quelantes e íons metálicos: especificidade em função da capacidade de adsorção (adaptado de CHAGA, 2001). 3- tridentado, 4- tetradentado, 5-pentadentado..... 19
- Figura 5.1:** Eletroforese SDS-PAGE a 15% de acrilamida. Amostras em condições redutoras. Faixa M: Marcador de massa molecular (Ge Healthcare), Faixa 1: PIS-NC, Faixa 2: PIS-C, Faixa 3: PIS-IMAC. 39
- Figura 5.2:** Estruturas hipotéticas em pH neutro dos agentes quelantes IDA, CM-Asp, TED e TREN imobilizados em gel de agarose usando epícloridrina como reagente de ativação. (Adaptado de CHAGA, 2001 e SHARMA e AGARWAL, 2002a) (M = matriz). 41
- Figura 5.3:** Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-IMAC, em gel Sepharose-IDA-Ni(II). (I) Injeção: 9,8 mL de solução a 3,2 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa I: PIS-IMAC. Faixas 4-8: Frações de lavagem. Faixas 31-37: Frações de eluição imidazol 100 mM. Faixas 46-47: Frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 58: Fração de regeneração. 43
- Figura 5.4:** Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-IMAC, em gel Sepharose-IDA-Ni(II). (I) Injeção: 3,0 mL de solução a 3,5 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-IMAC. Faixas 3-4: frações de lavagem. Faixas 33-35: Frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 8: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 9: “Pool” frações de regeneração. 44

Figura 5.5: Perfil eletroforético da cromatografia a partir de solução PIS-C na concentração de 2,8 mg/mL em gel de Sepharose-IDA-Ni(II). (a) Coluna equilibrada com tampão A, (b) Coluna equilibrada com tampão B e (c) Coluna equilibrada com tampão F. Eletroforeses SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. (a) e (b): Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-4: “Pool” frações de lavagem. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 7: “Pool” frações de regeneração. Fração 8: Marcador PIS (PIS-IMAC). (c): Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-5: “Pool” frações de lavagem. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 7: “Pool” frações de eluição de imidazol 300 mM. Faixa 8: “Pool” das frações de regeneração..... 46

Figura 5.6: Porcentagem de proteína total eluída do gel Sepharose-IDA-Ni(II) das cromatografias realizadas em diferentes tampões de equilíbrio..... 47

Figura 5.7: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em (a) Sepharose-IDA-Ni(II). (b) Sepharose-CM-Asp-Ni(II). (c) Sepharose-TED-Ni(II). (d) em Sepharose-TREN-Ni(II). (e) HisTrap-Ni(II). Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa M: Marcadores de baixa massa molecular (Sigma, EUA, e GE Healthcare, EUA). Faixa I: PIS-C. Faixas L: “Pool” frações de lavagem. Faixa E1: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa E2: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa R: “Pool” frações da regeneração. Faixa MP: Marcador de PIS (PIS-IMAC). 50

Figura 5.8: Porcentagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976) dessorvidas das cromatografias realizadas com solução de pró-insulina clarificada. 52

Figura 5.9: Porcentagem de PIS sulfonada (quantificada por HPLC) dessorvida das cromatografias realizadas com solução de pró-insulina clarificada. 52

Figura 5.10: Isotermas de adsorção de PIS a 25°C em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio e a linha contínua, a curva ajustada segundo modelo de Langmuir..... 54

Figura 5.11: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de PIS nos adsorventes a) Sepharose-IDA-Ni(II), $R^2 = 0,95$; b) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), $R^2 = 0,85$; c) Agarose-TED-Ni(II), $R^2 = 0,27$; d) Sepharose-TREN-Ni(II), $R^2 = 0,23$; e) HisTrap-Ni(II), $R^2 = 0,64$ 56

Figura 5.12: Isoterma de Adsorção de PIS a 25°C em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio e a linha contínua, a curva ajustada segundo modelo de Langmuir-Freundlich. 58

Figura 5.13: Isotermas de adsorção de PIS em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio ($\square$) 4°C, ($\circ$) 15°C, (Δ) 25°C, (+) 37°C e (x) 45°C e as linhas contínuas, as curvas ajustadas segundo modelo de Langmuir. 1 g de adsorvente seco corresponde a 3,0 mL de gel úmido. 61

Figura 5.14: K_d calculado versus $1/T$ para de adsorção de PIS nos adsorventes ($\diamond$) IDA-Ni(II); ($\square$) TED-Ni(II); (Δ) CM-Asp-Ni(II); ($\circ$) TREN-Ni(II) e (+) HisTrap-Ni(II). 63

Figura 5.15: Gráfico de Van't Hoff para de adsorção de PIS nos adsorventes ($\diamond$) IDA-Ni(II) $R^2 = 0,993$; ($\square$) TED-Ni(II) $R^2 = 0,919$; (Δ) CM-Asp-Ni(II) $R^2 = 0,945$; ($\circ$) TREN-Ni(II) $R^2 = 0,975$ e (+) HisTrap-Ni(II) $R^2 = 0,915$ 64

Figura 5.16: a) Curvas de ruptura de adsorção de PIS em Sepharose-IDA-Ni(II) a partir de solução PIS-C (proteínas totais); ($\square$) vazão de alimentação de 0,5 mL/min, concentração na alimentação de 3,11 mg/mL; ($\circ$) vazão de alimentação de 1,0 mL/min, concentração na alimentação de 3,66 mg/mL. Volume das frações: 2,0 mL. b) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 0,5 mL/min e c) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 1,0 mL/min. M marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare), I amostra inicial; números correspondem as frações de alimentação; L “pool” das frações de lavagem; E1 “pool” das frações de eluição 100 mM imidazol; E2 “pool” das frações de eluição 300 mM imidazol; R “pool” frações de regeneração EDTA 50 mM; P marcador PIS-IMAC. 67

Figura 5.17: a) Curvas de ruptura de adsorção de PIS em Sepharose-TREN-Ni(II) a partir de solução PIS-C (proteínas totais); ($\square$) vazão de alimentação de 0,5 mL/min, concentração na alimentação de 3,75 mg/mL; ($\circ$) vazão de alimentação de 1,0 mL/min, concentração na alimentação de 3,57 mg/mL. Volume das frações: 2,0 mL. b) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 0,5 mL/min e c) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 1,0 mL/min. M marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare), I amostra inicial; números correspondem as frações de alimentação; L “pool” das frações de lavagem; E1 “pool” das frações de eluição 100 mM imidazol; E2 “pool” das frações de eluição 300 mM imidazol; R1 “pool” das frações de regeneração EDTA 50 mM; R2 “pool” das frações de regeneração com NaOH a 50 mM; P marcador PIS-IMAC. 68

Figura A.1: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-IDA-Ni(II). (I) Injeção: 6,0 mL de solução a 4,1 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-4: “Pool” frações de lavagem. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 7 “Pool” frações de regeneração. Faixa 9: Marcador de PIS (PIS-IMAC). 83

Figura A.2: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-CM-Asp-Ni(II). (I) Injeção: 7,0 mL de solução a 3,2 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3: “Pool” frações de lavagem. Faixa 4: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 6: “Pool” frações da regeneração. Faixa 7: Marcador de PIS (PIS-IMAC). 84

Figura A.3: : Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-TED-Ni(II). (I) Injeção: 4,9 mL de solução a 3,2 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) NaOH 50 mM pH 12,0.

Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-4: “Pool” frações de lavagem. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 7: “Pool” frações da regeneração. Faixa 8: Marcador de PIS (PIS-IMAC). 85

Figura A.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-TREN-Ni(II). (I) Injeção: 7,1 mL de solução a 3,0 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3: “Pool” frações de lavagem. Faixa 4: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 6: “Pool” frações da regeneração. Faixa 7: Marcador de PIS (PIS-IMAC). 86

Figura A.5: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em coluna HisTrap-Ni(II). (I) Injeção: 11,9 mL de solução a 3,7 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-5: “Pool” frações de lavagem. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 7: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 8: “Pool” frações da regeneração. Faixa 9: Marcador de PIS (PIS-IMAC). 87

Figura B.1: Isoterma de adsorção de PIS em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio ($\square$) 4°C, ($\circ$) 15°C, (Δ) 25°C, (+) 37°C e (x) 45°C e as linhas contínuas, as curvas ajustadas segundo modelo de Langmuir-Freundlich. 90

Lista de Abreviações

BSA – Albumina do soro bovino

CM-Asp - Ácido aspártico carboximetilado

EDTA - Ácido etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IDA – Ácido iminodiacético (IDA)

IMAC – Cromatografia de afinidade com íon metálico imobilizado

NTA - Ácido nitrilotriacético

PIS – Pró-insulina humana recombinante sulfonada

PIS-C – Solução de pró-insulina humana recombinante sulfonada clarificada

PIS-IMAC - Pró-insulina humana recombinante sulfonada purificada por IMAC

PIS-NC – Solução de pró-insulina humana recombinante sulfonada não clarificada

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TED - Tris(carboximetil) etilenodiamino

TEMED - N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina

TREN - Tris-2(aminoetil)amina

TRIS - Tris(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Este trabalho visou investigar o efeito dos quelatos IDA-Ni(II), CM-Asp-Ni(II), TED-Ni(II) e TREN-Ni(II) na purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de poli(histidina) (PIS) a partir de solução clarificada, obtida após solubilização dos corpos de inclusão e sulfitolise, proveniente do processo de produção de insulina (BIOMM, MG). Dentre os adsorventes estudados, Sepharose-TREN-Ni(II) apresentou a maior capacidade de adsorção em termos de PIS, cerca de 50% da proteína alimentada. Os demais adsorventes apresentaram a seguinte ordem de capacidade de adsorção IDA > HisTrap > CM-Asp > TED. Em termos de seletividade, os adsorventes com CM-Asp-Ni (II) e TED-Ni(II) imobilizados apresentaram maior seletividade. Os dados de adsorção de PIS no equilíbrio a 25°C foram bem representados pelo modelo de Langmuir-Freundlich., fornecendo valores de capacidade máxima de adsorção entre 43,14 mg e 154,56 mg de PIS/g de adsorvente e valores de constante aparente de dissociação entre 10^{-5} a 10^{-7} M. O estudo termodinâmico para adsorção de PIS nos adsorventes estudados na faixa de 4 a 25°C (exceto para TED-Ni(II), faixa de temperatura de 25 a 45°C) mostrou diminuição dos valores de K_d com o aumento da temperatura, fornecendo valores de ΔH° positivos para todos os casos, indicando que a adsorção de PIS nos quelatos estudados é um processo endotérmico. Os valores de ΔG° foram negativos para todos os sistemas, indicando que a adsorção é espontânea. Os valores de ΔS° encontrados foram positivos e pouco alterados com o aumento de temperatura em todos os casos, favorecendo a complexação proteína-íon metálico.

ABSTRACT

This work sought to investigate the effect of the chelating groups IDA-Ni(II), CM-Asp-Ni(II), TED-Ni(II) and TREN-Ni(II) in the purification of a recombinant human proinsulin poly-histidine tagged (PIS) starting from clarified solution, obtained from the dissolution of inclusion bodies and oxidative sulfitolysis, originating from the process of insulin production (BIOMM, MG). Among of the studied adsorbents, Sepharose-TREN-Ni (II) it presented the largest adsorption capacity in terms of PIS, about 50 % of the fed protein. The other adsorbents presented the following order in adsorption capacity IDA > HisTrap > CM-Asp > TED. In selectivity terms, the adsorbents with the chelating groups CM-Asp-Ni (II) and TED-Ni (II) immobilized presented a larger selectivity. The data of adsorption of PIS in the equilibrium to 25°C were well represented by the model of Langmuir-Freundlich, supplying values of maximum adsorption capacity between 43, 14 mg and 154, 56 mg of PIS / g adsorbent and values of apparent constant of dissociation among 10^{-5} to 10^{-7} M. The thermodynamic study for adsorption of PIS in the adsorbents considering the range from 4 to 25°C (except for TED-Ni (II), temperature range from 25 to 45°C) showed decrease of the values of K_d with the increase of temperature, providing positive values of ΔH° for all of the cases, indicating that the adsorption of PIS in the studied chelating groups is an endothermic process. The values of ΔG° were negative for all of the systems, indicating that the adsorption is spontaneous. The values of ΔS° founded were positive and had little alteration due to temperature increase in all of the cases, favoring the formation of complex protein-metallic ion.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

No final dos anos 70 até meados dos anos 80 foram criadas nos EUA várias companhias que se propunham desenvolver comercialmente produtos utilizando a tecnologia do DNA recombinante. O crescimento mais notável desses produtos biotecnológicos foram aqueles para uso terapêutico humano; entre eles as proteínas são os que apresentam maior desenvolvimento. Em 1982, a Eli Lilly Co. foi autorizada pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para entrar no mercado com a insulina humana obtida por engenharia genética, sintetizada em *Escherichia coli*. Hoje já foram reconhecidos outros produtos tais como hormônios, vacinas e anticorpos monoclonais, produzidos utilizando-se sistemas de expressão em bactérias, leveduras e células animais (LADISCH e KOHLMANN, 1992; O’KEEFE, 2000).

A utilização da tecnologia do DNA recombinante apresenta grandes vantagens, entre elas a possibilidade de facilitar a purificação da proteína de interesse, uma vez que a etapa de recuperação e purificação representa cerca de 70% do custo de produção de proteínas recombinantes, chegando a valores de até 90% (DYR e SUTTNAR, 1997). Para a maioria dos casos de proteínas onde a pureza requerida é muito alta, o custo das etapas cromatográficas é de aproximadamente 70% do custo total de operação (PETRIDES et al. 1995).

Visando facilitar a purificação e a recuperação dessas proteínas, a engenharia genética, empregando a técnica do DNA recombinante, tem introduzido caudas (“tag”) na proteína de interesse. As caudas de afinidade podem ser definidas como sequência de aminoácidos ou proteínas exógenas com grande afinidade por ligantes biológicos específicos ou não biológicos. O maior grupo de caudas de afinidade consiste de peptídeos ou proteínas que interagem com pequenos ligantes presentes no suporte sólido. O outro grupo inclui caudas que interagem com proteínas imobilizadas na matriz sólida, como anticorpos (ARNAU, 2006).

A pró-insulina humana, uma proteína α -hélice com massa molecular de 9,5 kDa composta por duas cadeias de peptídeos (A e B) ligadas por um peptídeo C, foi uma das primeiras proteínas a serem produzidas a partir da técnica do DNA recombinante

(WINTER et al., 2002). A pró-insulina recombinante é produzida industrialmente de duas maneiras: expressão das cadeias A e B separadamente, e expressão da pró-insulina contendo cauda de afinidade (LADISCH e KOHLMANN, 1992). Um dos tipos de cauda de afinidade mais utilizados na produção de pró-insulina é a cauda de poli(histidina).

A fusão de uma sequência de histidinas (His-tag) na porção C- ou N-terminal da proteína alvo tem sido amplamente utilizada. A purificação de proteínas contendo esse tipo de cauda é baseada na interação dos resíduos de histidina com íons metálicos quelatados imobilizados na matriz sólida. Esta técnica, baseada na interação entre os resíduos de aminoácidos presentes na superfície de uma molécula em solução (por exemplo, grupos imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano) e o íon metálico imobilizado, foi introduzida por PORATH e colaboradores em 1975, e recebeu o nome de IMAC (“Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography”) (PORATH et al., 1975; PORATH e OLIN, 1983; SULKOWSKI, 1985; SULKOWSKI, 1989; DYR e SUTTNAR, 1997; CHAGA, 2001; ARNAU et al., 2006; MONDAL e GUPTA, 2004).

A adsorção de proteínas em IMAC é influenciada por vários fatores, e, entre eles, alguns dos mais importantes são o agente quelante e o íon metálico utilizado. A interação entre o íon metálico imobilizado e a proteína a ser purificada pode ser forte ou fraca, dependendo do íon metálico utilizado e do número de sítios disponíveis para a interação com a proteína após a quelação do íon metálico na matriz cromatográfica. A escolha correta do agente quelante e do íon metálico é fundamental para se obter maior seletividade, rendimento e pureza na purificação de proteínas recombinantes. Para tanto, são necessários estudos sobre o efeito dos agentes quelantes na adsorção de uma proteína, bem como o entendimento do mecanismo de adsorção das proteínas nos adsorventes. Apesar de existirem estudos de comparação entre agentes quelantes em IMAC (SHARMA e AGARWAL, 2001; RIBEIRO et al., 2006; PORATH e OLIN, 1983; RIBEIRO et al., 2008), normalmente eles são realizados com proteínas já purificadas ou proteínas de grande tamanho molecular, sendo poucos realizados com proteína de baixa massa molecular não purificada, e também os estudos do mecanismo de adsorção são escassos. A escolha de uma proteína com massa molecular pequena, porém dotada de cauda de afinidade como a pró-insulina pode trazer grandes contribuições para o entendimento desse mecanismo, o que auxiliaria no desenvolvimento de processo de purificação.

CAPÍTULO 2: OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos agentes quelantes tridentado (IDA), tetradentados (CM-Asp, e Tris-2(aminoetil)amina, TREN) e pentadentado (TED) na purificação de pró-insulina sulfonada recombinante com cauda de poli(histidina) a partir de solução clarificada, obtida após solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise, proveniente do processo de produção de insulina em escala piloto (BIOMM, MG), utilizando a técnica de cromatografia de afinidade com o íon metálico níquel imobilizado em gel de agarose, técnica amplamente utilizada em processos industriais. Visando obter um adsorvente que apresente grande capacidade de adsorção e seletividade e conhecer o mecanismo de adsorção.

Para atingir o objetivo proposto, este projeto de pesquisa constou das seguintes etapas:

1) Ativação do gel de agarose (Sephacrose 4B) com epícloridrina, seguida da imobilização dos agentes quelantes IDA, CM-Asp e TREN (os demais géis estudados foram adquiridos comercialmente);

2) Ensaios cromatográficos com soluções contendo pró-insulina recombinante sulfonada em colunas cromatográficas contendo os géis derivatizados contendo os quelatos quelantes, IDA-Ni(II), CM-Asp-Ni(II), TREN-Ni(II), TED-Ni(II) e coluna HisTrap-Ni(II) (usada como controle) com o intuito de verificar o perfil de eluição da pró-insulina;

3) Determinação das isotermas de adsorção por meio de ensaios em tanques agitados, utilizando géis derivatizados e pró-insulina recombinante sulfonada de alta pureza para determinação dos parâmetros de adsorção de acordo com os modelos de Langmuir e Langmuir-Freundlich e de parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° e ΔS° ;

4) Determinação de curvas de ruptura (“breakthrough”) dos adsorventes em escala laboratorial visando determinar a capacidade dinâmica dos géis de afinidade (parâmetro importantes no escalonamento do processo).

CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados tópicos de conhecimentos básicos necessários para a compreensão do trabalho. O capítulo está dividido em quatro partes, recuperação e purificação de proteínas recombinantes; pró-insulina humana recombinante: obtenção e purificação; cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) e isotermas de adsorção.

3.1 Recuperação e purificação de proteínas recombinantes

Com os grandes avanços em genômica, proteômica, bioinformática e engenharia genética, o número de proteínas produzidas usando a técnica do DNA recombinante está aumentando rapidamente. Estão sendo realizadas buscas para identificar rapidamente proteínas com uma aplicação potencial como proteínas terapêuticas, diagnósticas ou industriais. A recuperação e purificação do produto de interesse é uma etapa fundamental onde é desejável a obtenção de alta pureza associado a um baixo custo. Com esse objetivo, diferentes sistemas de expressão, tais como leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), bactérias (por exemplo, *Escherichia coli*) e linhagens celulares de mamíferos (por exemplo, células de ovário de hamster chinês) e insetos (por exemplo, *Drosophila melanogaster*) vêm sendo desenvolvidas para expressar proteínas heterólogas (DYR e SUTTNAR, 1997; ARNAU et al., 2006). As proteínas heterólogas são assim denominadas por serem obtidas por células que não as produzem naturalmente. Essas proteínas heterólogas podem ser obtidas na célula hospedeira no espaço periplasmático ou enviada para o meio na forma solúvel, geralmente em concentrações menores ou na forma de agregados densos de proteína inativa, chamados corpos de inclusão no citoplasma, onde apresentam altas concentrações. Um dos sistemas de expressão mais utilizado é a bactéria *E. coli*, por ser considerado um microrganismo bem caracterizado e um sistema de expressão com alta taxa de crescimento de biomassa, baixo custo de produção e grande versatilidade (MALIK et al., 2007). Em sistemas bacterianos, geralmente as proteínas são obtidas intracelularmente e representam 25% ou mais da proteína total no material

produzido (no caso de corpos de inclusão), porém esse material precisa ser solubilizado, renaturado e reovelado (DYR e SUTTNAR, 1997 e BAILEY e MEAGHER, 2000).

A purificação, mais que qualquer outra etapa, define a rentabilidade de um bioprocessos; ela representa cerca de 60-70% dos custos totais de produção, podendo chegar a valores próximos de 90%. A recuperação e purificação de um produto recombinante exigem basicamente a remoção de debris celulares, de alguns precursores de proteína e, finalmente, de impurezas e contaminantes derivados da cultura de células que normalmente diferem significativamente do produto de interesse (DYR e SUTTNAR, 1997; PETRIDES et al., 1995).

Para a recuperação de proteínas obtidas sob a forma de corpos de inclusão em bactérias, é necessário que a célula seja rompida por sonicação ou homogenização, e, imediatamente após isso, deve ser submetida a uma centrifugação a 500 a 1.000 g. Nesse ponto os corpos de inclusão se encontram no precipitado, que deve ser solubilizado e lavado diversas vezes, de forma a retirar qualquer outro material celular que também tenha sido sedimentado. Depois de isolado os corpos de inclusão, são utilizados desnaturantes para solubilizar os agregados de polipeptídios. Os desnaturantes mais utilizados são uréia, guanidina, vários detergentes e solventes orgânicos (DYR e SUTTNAR, 1997).

Atualmente os processos industriais para a obtenção de bioprodutos empregam várias metodologias para a realização das etapas de purificação e recuperação, entre as quais as principais são: precipitação, extração líquido-líquido, filtração em membranas e as cromatografias de afinidade, de interação hidrofóbica, de troca iônica e de fase reversa que, em combinação, resultam em produtos com elevado grau de pureza. Em tais processos, geralmente é necessário uma sequência de múltiplos passos cromatográficos, dos quais a cromatografia por afinidade destaca-se como um dos métodos mais eficientes em termos de purificação (DYR e SUTTNAR, 1997 e BAILEY e MEAGHER, 2000).

Quando se desenvolve as estratégias de recuperação e purificação da proteína, a inclusão de caudas de afinidade mostra-se atrativa por um grande número de razões. Para estudos estruturais, mais de 60% das proteínas produzidas incluem a cauda de poli(histidina). Adicionalmente, o fato de que a purificação por afinidade normalmente resulta em grandes rendimentos - freqüentemente cerca de 90% - faz com que a utilização

de caudas de afinidade seja uma alternativa economicamente favorável (ARNAU et al. 2006).

A introdução da cauda de afinidade tem apresentado efeito positivo nas propriedades bioquímicas da proteína alvo, tais como proteção contra proteólises; facilita o reenovelamento da proteína e aumenta a solubilidade, além do proporcionar aumento no rendimento (ARNAU et al., 2006). Hoje, vários tipos de cauda vêm sendo utilizadas, visando à purificação das proteínas de interesse. Alguns desses tipos estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Alguns exemplos de caudas de afinidade (Adaptado de ARNAU et al., 2006)

Cauda	Tamanho (número de aminoácidos)	Comentários
His-tag ^a	5-15	Purificação por afinidade sobre condições nativas ou desnaturantes (IMAC)
FLAG ^b	8	Purificação baseada em reconhecimento por anticorpos monoclonais
Streptag II ^c	8	Streptavidina modificada, eluição com biotina (uma vitamina hidrossolúvel)
Tiorredoxina ^d	109	Purificação por afinidade (IMAC)
Glutathione S-transferase ^e	201	Glutathione reduzida (GSH) ou afinidade entre glutathione S-transferase-anticorpo
Proteína ligada a maltose ^f	396	Purificação por afinidade em coluna contendo amilose imobilizada

a) His-Tag: cauda de poli(histidina); b) FLAG: conjunto de oito peptídeos hidrofílicos reconhecido por um anticorpo; c) Streptag II- proteína de Streptomyces, similar a biotina, utilizada para detectar sequência de nucleotídeos ou proteínas; d) tiorredoxina: pequena proteína (12 - 14 kDa) com duas cisteínas no sítio ativo; e) Glutathione S-Transferase (GSTs) são um grupo de enzimas que apresentam especificidades comuns em relação ao substrato aceptor eletrofílico; f) proteína ligada a maltose.

A fusão de sequência de histidinas (5 a 15), sendo mais utilizada 6 histidinas na porção C ou N-terminal da proteína alvo, tem sido bastante utilizada, pois a purificação da proteína alvo é baseada na técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). A separação de proteína por IMAC ocorre com base nas interações

entre certos resíduos de aminoácidos, especialmente a histidina, e o íon metálico imobilizado. O anel imidazol, resíduo da histidina exposto na superfície da proteína, apresenta uma grande afinidade por metais quelatados. As interações destes resíduos com íons metálicos decorrem de uma ligação de coordenação entre um par de elétrons do anel imidazol e o ligante: um íon metálico quelatado por agentes como o ácido iminodiácetico (IDA) (PORATH et al., 1975; PORATH e OLIN, 1983; SULKOWSKI, 1985 e SULKOWSKI, 1989, DYR e SUTTNAR, 1997, MONDAL e GUPTA, 2006; ARNAU et al., 2006).

A remoção da cauda é necessária para que a proteína possa ser utilizada parenteralmente. A cisão entre a proteína alvo e a cauda pode ser efetuada empregando-se métodos enzimáticos ou químicos que preservam a estrutura e a atividade da proteína de interesse (COWLEY e MACKIN, 1997).

3.2 Pró-insulina recombinante: obtenção e purificação

A insulina humana foi à primeira proteína humana produzida em bactérias, pela tecnologia do DNA recombinante, em 1978, onde foram sintetizadas separadamente as cadeias A e B da insulina. Sua comercialização pela Eli Lilly foi autorizada pelo FDA (“Food and Drug Administration”) em 1982 (LADISCH e KOHLMANN, 1992). A insulina recombinante tem duas grandes vantagens sobre a insulina tradicional obtida da extração de pâncreas animal: há virtualmente um suprimento ilimitado de insulina humana recombinante, e ela é idêntica à insulina humana. Atualmente a insulina humana tem sido obtida a partir da produção de pró-insulina recombinante, que é o precursor da insulina, uma proteína α -hélice de massa molecular 9,5 kDa, a qual contém as cadeias A e B da insulina interligadas por três pontes de dissulfeto e o peptídeo C (Figura 3.1). A pró-insulina apresenta muitas das propriedades físicas da insulina, tais como agregação, formação de dímeros e hexâmeros coordenados com Zn(II) ou outros cátion divalentes, similares ponto isoelétrico e solubilidade, apesar do maior tamanho da molécula. A vantagem principal da utilização da pró-insulina para a produção da insulina é o enovelamento espontâneo para a formação da estrutura de insulina, sendo o peptídeo C posteriormente removido através de clivagem enzimática (LADISCH e KOHLMANN, 1992; WINTER et al., 2002; WINTER et al., 2000; PITTMAN et al., 2004; MALIK et al., 2007).

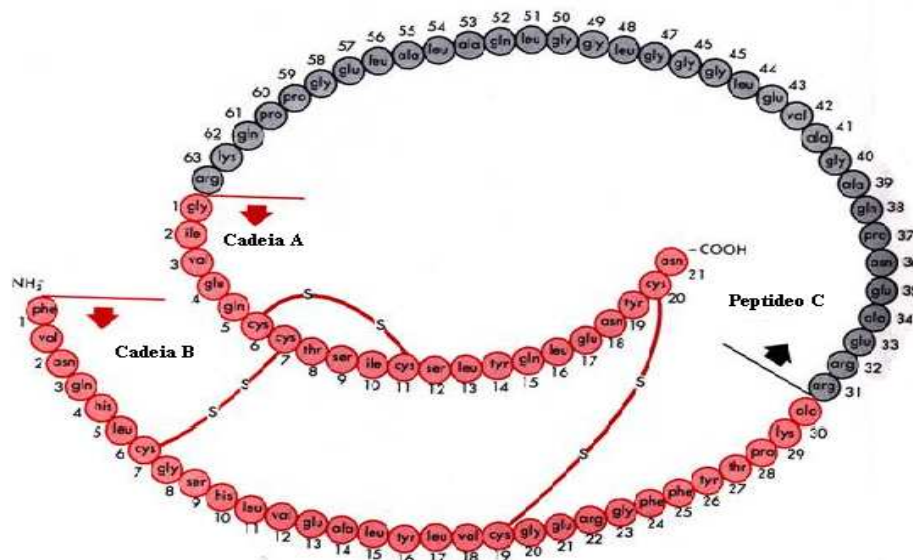


Figura 3.1 Representação da estrutura de pró-insulina: cadeias A e B (em vermelho) e peptídeo C (em cinza) (www.sh.isuhsc.edu/intragrads/foundations/217/aw/5).

Atualmente a pró-insulina tem sido produzida em diferentes microorganismos, como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lividans* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo expressa intra ou extracelularmente.

O principal sistema utilizado para a expressão de pró-insulina humana recombinante é a *E. coli*, devido à habilidade deste hospedeiro em multiplicar-se rapidamente e em elevadas quantidades na presença de substratos de baixo custo, além de possuir características genéticas bem conhecidas.

A pró-insulina humana recombinante expressa em *E. coli* se encontra sob a forma de corpos de inclusão. Apesar das dificuldades de se purificar uma proteína expressa em corpos de inclusão, essa opção é muito utilizada, pois o nível de expressão é muito alto e se adicionando cauda de aminoácidos a essa proteína, ela fica protegida do ataque de proteases presente no citoplasma do hospedeiro. Outra opção seria a produção da proteína no espaço periplasmático da bactéria, uma vez que a maioria das proteases estão localizadas no citoplasma (WINTER et al., 2000; MERGULHÃO et al., 2004; MALIK et al., 2007). Porém a concentração de pró-insulina expressa no periplasma é menor que a expressa em corpos de inclusão.

A conversão da pró-insulina recombinante em insulina ocorre por clivagem enzimática, utilizando tripsina e carboxipeptidase B, como esquematizado na Figura 3.2.

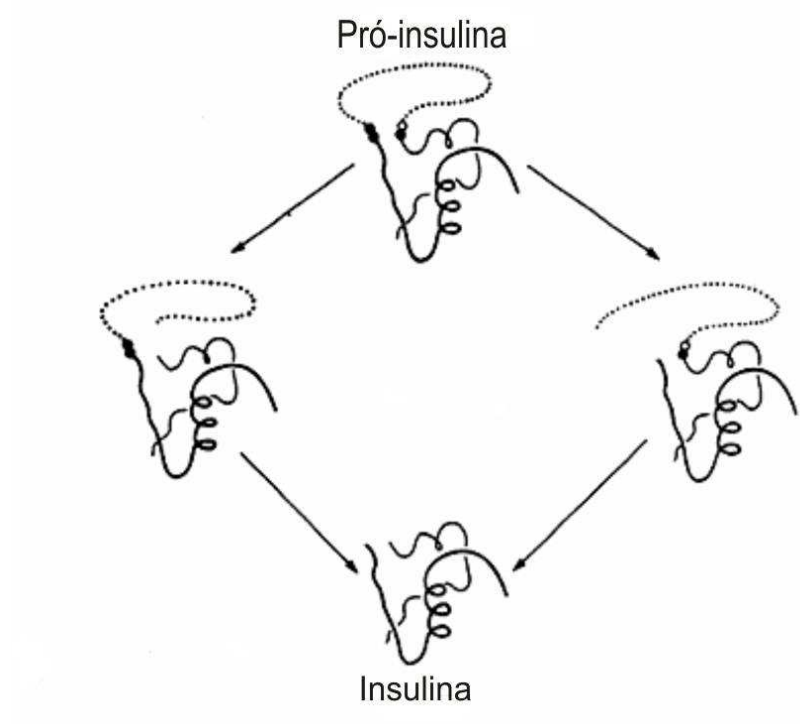


Figura 3.2: Representação da conversão da molécula de pró-insulina em insulina através de clivagem proteolítica (http://www.endotext.org/Diabetes/diabetes3_new/diabetes3.htm).

Nos processos de obtenção de pró-insulina humana recombinante encontrados na literatura (Tabela 3.2), a existência de passos de purificação envolvendo cromatografias com gel como matrizes é uma constante, como em praticamente todo o processo de produção de proteína com alta pureza.

Dentre os processos descritos na literatura para a obtenção de insulina humana a partir da pró-insulina recombinante com cauda de poli(histidina), o diagrama de blocos da Figura 3.3 (modificado de PETRIDES et al., 1995) esquematiza o processo de produção de insulina humana a partir da pró-insulina com cauda de poli(histidina) expressa em corpos de inclusão em *E. coli*, cujas etapas de purificação da insulina foram descritas segundo TIKHONOV et al. (2001).

Tabela 3.2: Produção e purificação de pró-insulina humana recombinante (Adaptado de AQUINO, 2004).

Pró-insulina humana recombinante produzida	Etapa(s) cromatográfica(s)	Adsorvente utilizado	Fonte
Pró-insulina contendo o peptídeo histidina-triptofano	Cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado (IMAC)	Agarose-IDA-Ni(II)	SMITH et al. (1988)
Pró-insulina	Cromatografia de troca iônica, interação hidrofóbica e cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC).	SP Sepharose big beads. (nd)	PETRIDES et al. (1995)
Pró-insulina-ZZ*	Cromatografia de afinidade	Coluna contendo Sepharose-IgG	NILSSON et al. (1996) e MERGULHÃO et al. (2004)
Pró-insulina	Filtração em gel e cromatografia de troca iônica	Sephadex G-25 Pharmacia Mono Q HR 5/5	COWLEY e MACKIN (1997)
Pró-insulina contendo cauda de poli(histidina)	Filtração em gel, IMAC e cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC).	Sephadex G-25 Sepharose chelating actived-Ni(II) Coluna Vydac C4	MACKIN (1999)
Pró-insulina contendo DsbA**	Cromatografia de troca iônica	Coluna DEAE-Sepharose FF	WINTER et al. (2000)
Pró-insulina contendo cauda de poli(histidina)	Cromatografia de troca iônica seguido por IMAC	DEAP-Spheronit Sepharose 4B –IDA-Ni(II)	TIKHONOV et al. (2001)
Pró-insulina	Cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC)	Coluna SOURCE 15RPC	MACKIN e CHOQUETTE (2003)
Pró-insulina contendo cauda de poli(histidina)	IMAC	PEVA-IDA-Ni(II) Sepharose-IDA-Ni(II)	AQUINO et al. (2004)
Pró-insulina humana contendo ecotin***	Cromatografia de afinidade com tripsinogênio imobilizado seguido de IMAC	Coluna HiTrap contendo Sepharose-actived NHS com tripsinogênio imobilizado Coluna HisTrap FF(Ni(II))	MALIK et al. (2007)

*A pró-insulina-ZZ é pró-insulina contendo uma cauda de afinidade ZZ, ou seja, um domínio de ligação à IgG, baseado no domínio B da proteína A encontrada na parede celular de bactérias *Staphylococcus aureus*.

** DsbA é uma proteína que favorece a formação correta das pontes de dissulfeto.

*** Ecotin (*Escherichia coli* inibidor de tripsina), é um dímero periplasmático de 16 kDa

(nd) As colunas de interação hidrofóbica e RP-HPLC não foram informadas.

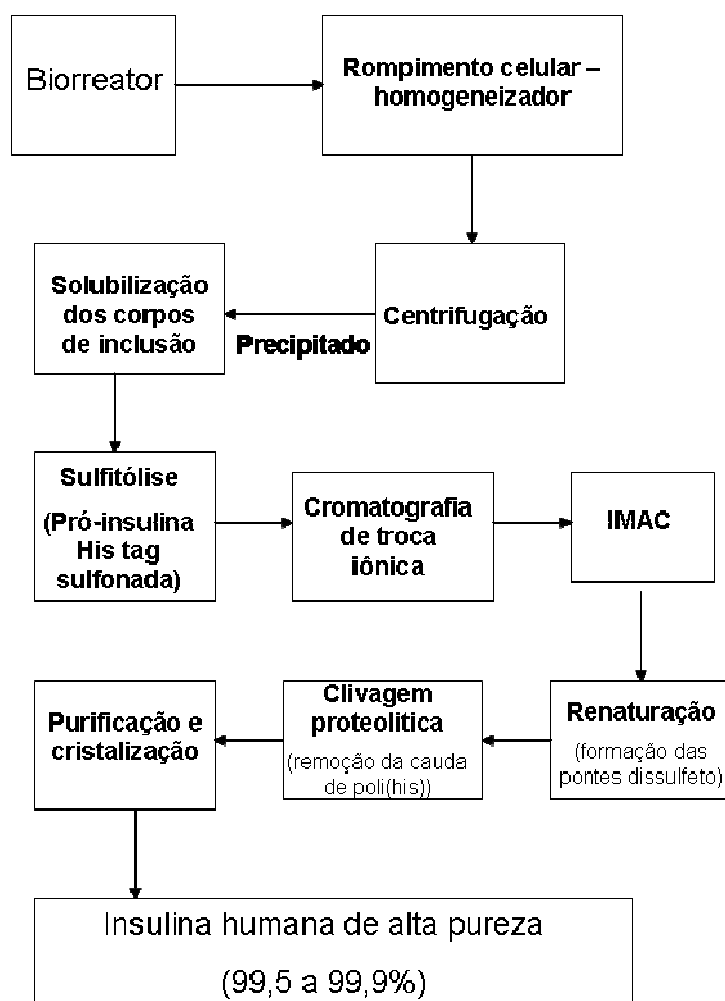


Figura 3.3: Esquema das etapas de recuperação e purificação de insulina humana produzida a partir da pró-insulina recombinante contendo cauda de poli(histidina), produzida em corpos de inclusão em *Escherichia coli* (modificado de PETRIDES et al., 1995 e adaptado de TIKHONOV et al., 2001 e AQUINO, 2004).

O processo de recuperação e purificação da pró-insulina começa com o rompimento da célula hospedeira (*E. coli*) em um homogenizador de alta pressão. Os corpos de inclusão são separados dos constituintes celulares por centrifugação ou microfiltração e, em seguida, os corpos de inclusão são resuspendidos e lavados com soluções tamponantes, uréia e 2- β -mercaptoetanol para manter a proteína desenovelada. A pró-insulina recuperada nestes corpos de inclusão contendo uma cauda de poli(histidina), denominada pró-insulina-His-“tag”, é submetida a uma sulfitólise, que substitui as pontes

de dissulfeto por grupos sulfito (SO_3^-) em todos os resíduos de enxofre nas cisteínas. A pró-insulina-His-“tag” sulfonada resultante é submetida a etapas de purificação por cromatografia de troca iônica e IMAC. A pró-insulina sulfonada recombinante pré-purificada é renaturada, com a formação correta das pontes de dissulfeto. A seguir, a proteína renaturada é purificada por cromatografia de interação hidrofóbica e convertida à insulina pelas enzimas tripsina e carboxipeptidase B, que clivam a cauda de histidina e o peptídeo C, respectivamente. Finalmente, a insulina é submetida às etapas finais de purificação por cromatografia de troca iônica, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por fase reversa, filtração em gel e cristalização, atingindo alto grau de pureza e mantendo suas características (PETRIDES et al., 1995 e TIKHONOV et al., 2001).

Os processos de obtenção da insulina humana a partir da pró-insulina humana recombinante descritos na literatura apresentam etapas cromatográficas, sendo que a cromatografia por IMAC, é um dos métodos cromatográficos mais promissores para purificação da pró-insulina recombinante.

3.3 Cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados

Na metade dos anos 70, PORATH e colaboradores introduziram uma nova técnica de cromatografia, que inicialmente recebeu o nome de cromatografia com quelato metálico, posteriormente substituído por cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados, IMAC (“Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography”). A técnica é um método de separação que se baseia nas diferenças de afinidade de proteínas por íons metálicos imobilizados em uma matriz cromatográfica. Esse diferencial de afinidade advém das ligações de coordenação formadas entre os resíduos de aminoácidos expostos na superfície da molécula, que atuam como uma base de Lewis, doando elétrons aos sítios de coordenação disponíveis dos íons metálicos. Desde que essa interação entre os íons metálicos imobilizados e os resíduos de aminoácidos apresente características reversíveis, essa técnica pode ser explorada na adsorção e separação em condições brandas (PORATH et al., 1975; SULKOWSKI, 1985; WONG et al., 1991; CHAGA, 2001; UEDA et al., 2003).

Em IMAC a adsorção baseia-se em dois componentes: o agente quelante e o íon metálico imobilizado. O íon metálico que interage com a proteína encontra-se imobilizado por meio de um agente quelante, que por sua vez está imobilizado na matriz, via um

espaçador por meio de ligações covalentes. O agente quelante apresenta átomos doadores de elétrons, e eles são capazes de interagir com os íons metálicos através da formação de ligação de coordenação, formando quelatos. As interações entre o íon metálico imobilizado e a proteína são complexas e combinam efeitos eletrostáticos, hidrofóbicos e de coordenação entre o íon metálico e os grupos doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície da molécula. Geralmente, todos os três tipos de interação devem ser considerados, no entanto, nem sempre é possível determinar suas contribuições relativas (PORATH et al., 1975; SHARMA e AGARWAL, 2001). Apesar dos vários resíduos de aminoácidos que podem estar presentes na superfície da proteína participarem das interações, os resíduos que apresentam maior contribuição para a retenção da proteína são histidina, cisteína e triptofano (PORATH et al., 1975; SULKOWSKI, 1985 e BELEW et al., 1987).

A utilização de caudas de poli(histidina) contribui para que a ligação entre a proteína de interesse e o íon metálico imobilizado seja realizada em vários pontos, tornando-a mais estável e mais seletiva, como ilustrado na Figura 3.4. As ligações entre o íon metálico imobilizado e resíduos de aminoácidos na superfície de proteínas nativas são mais complexas, devido ao menor número de resíduos disponíveis e a distância entre eles, enquanto que os resíduos presentes na cauda de uma proteína recombinante são de fácil acesso permitindo interações mais específicas (JOHNSON e ARNOLD, 1995).

A técnica de IMAC apresenta muitas vantagens e facilidades como método de purificação de proteína, graças à sua versatilidade em relação aos adsorventes de afinidade e a alta capacidade de adsorção de proteína, quando comparado com outras técnicas de cromatografia de afinidade (0,1-10 μ M de proteína/mL de gel). Diferentes íons metálicos podem ser imobilizados na mesma matriz e podem ser facilmente removidos através da adição de agentes competidores fortes (ex: EDTA) sem que haja perda da capacidade de adsorção da matriz. A resina cromatográfica apresenta a capacidade de ser regenerada centenas de vezes, sem a perda das características cromatográficas (UEDA et al., 2003).

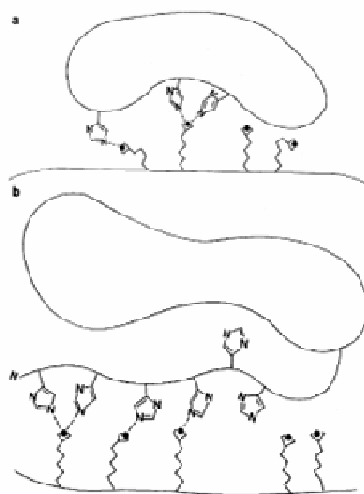


Figura 3.4: Esquema da ligação entre a proteína e o suporte de afinidade com o íon metálico quelatado. Ligações fortes entre a proteína e a matriz de IMAC ocorrem predominantemente por interação multi-ponto (a) das histidinas da superfície da proteína nativa ou recombinante, ou (b) pela cauda de histidina (His-tag) acoplada ao N- ou C-terminal da proteína. (Adaptado de GABERC-POREKAR e MENART, 2001)

Em IMAC, a seletividade da separação de proteínas depende de vários fatores, como a escolha da matriz (que deve possuir basicamente as mesmas características requeridas aos outros suportes utilizados em cromatografias de afinidade) do agente quelante, do íon metálico, da densidade de ligantes e das condições de adsorção e dessorção (UEDA et al., 2003 e AQUINO, 2004).

3.3.1 Escolha do agente quelante

Um dos principais fatores que influenciam na adsorção e seletividade de um adsorvente em IMAC é o agente quelante imobilizado na matriz. Vários agentes quelantes são utilizados em IMAC, dentre eles o Tris(carboximetil) etilenodiamino (TED), o ácido nitrilotriacético (NTA), o ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), o tetraetilenopentamina (TEPA), ácido carboximetil α , β diamino succínico (CM-DASA), Tris-2(aminoetil)amina (TREN) e o ácido iminodiacético (IDA) (Tabela 3.3). Os agentes quelantes podem ser bidentados, tridentados, etc, dependendo do número de ligações de coordenação que formam com o íon metálico. Em geral, quanto mais polidentado o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos devido ao número de ligações entre agente quelante e íon metálico, porém, já que permanecem

poucos sítios disponíveis para a ligação da proteína, esta pode ser adsorvida apenas fracamente.

Tabela 3.3: Alguns agentes quelantes utilizados em IMAC (Adaptado de GABERC-POREKAR e MENART, 2001).

Agente Quelante	Coordenação	Íon Metálico Quelatado
Ácido aminohidroxâmico	Bidentado	Fe(III)
Salicilaldeído	Bidentado	Cu(II)
8-hidroxi-quinolina (8-HQ)	Bidentado	Al(III), Fe(III), Yb(III)
Ácido iminodiacético (IDA)	Tridentado	Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II)
Dipicolamida (DPA)	Tridentado	Zn(II), Ni(II)
Orto-fosfoserina (OPS)	Tridentado	Fe(III), Al(III), Ca(II), Yb(III)
N-(2-piridilmetil) aminoacetado	Tridentado	Cu(II)
2,6-Diaminometilpiridina	Tridentado	Cu(II)
Ácido nitrilo tri-acético (NTA)	Tetradentado	Ni(II)
Ácido aspártico carboximetilado(CM-Asp)	Tetradentado	Ca(II), Ni(II), Co(II)
Tris-2(aminoetil)amina (TREN)	Tetradentado	Cu(II), Ni(II)
N,N,N'-tris-carboximetil-etilenodiamina (TED)	Pentadentado	Cu(II), Ni(II), Zn(II)

A interação entre o agente quelante e o íon metálico é chamada de efeito quelato, por ser mais forte e mais estável do que a formação de um complexo de coordenação. A estabilidade do quelato depende também dos anéis quelatos formados entre os átomos do agente quelante e o íon metálico. Alguns desses anéis quelatos estão representados na Figura 3.5 para os agentes quelantes IDA, NTA, CM-Asp, TED e TREN, que serão utilizados nesse trabalho. Os traçados em cores diferentes representam cada anel quelato.

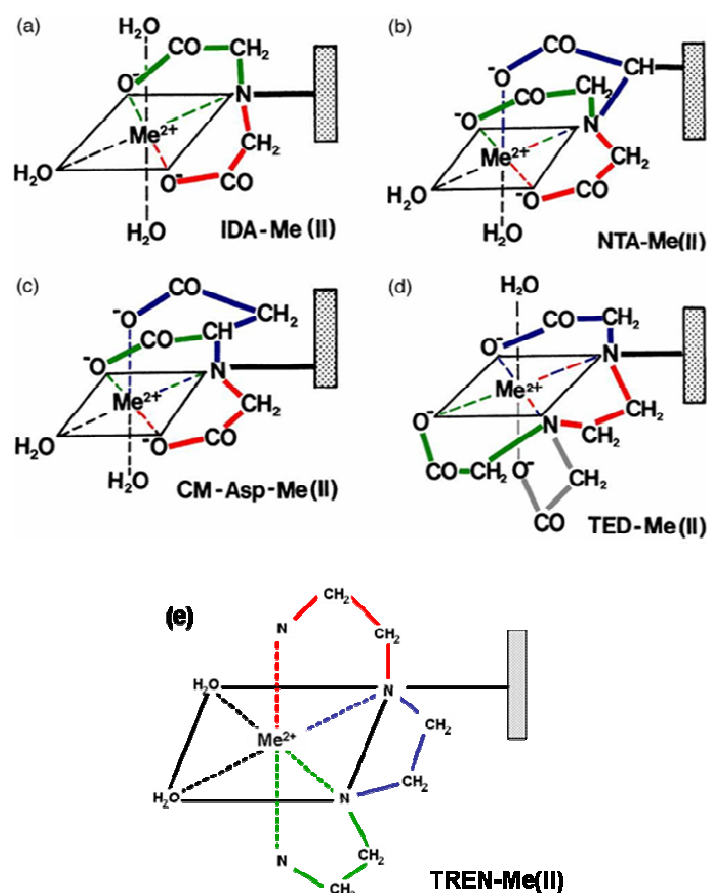


Figura 3.5: Representação esquemática da formação dos complexos quelante-metal em uma superfície sólida ativada com epicloridrina.(Adaptada de GABERC-POREKAR e MENART, 2001 e RIBEIRO, 2006).

O anel quelato é uma estrutura cíclica formada da ligação entre um composto que se coordena com um metal em pelo menos dois pontos, em formato de pinça. A formação do anel quelato é mais estável que a coordenação com ligantes monodentados, pois a dissociação do ligante-quelato envolve o rompimento de várias ligações, ao invés de uma (LEE, 1980). O número de átomos envolvidos na formação de cada anel quelato determina a estabilidade do complexo metálico, sendo que a configuração recomendada é a formação de anéis contendo no máximo cinco a seis átomos (Tabela 3.4), pois números maiores de átomos podem dificultar a formação de anéis quelatos devido ao impedimento estérico, que é a interferência ou inibição de uma reação, devido ao tamanho de uma ou de outra parte reativa (DWYER e MELLOR, 1964).

O ácido iminodiacético (IDA) é o ligante mais utilizado em IMAC, sendo um composto tridentado que ocupa três sítios de coordenação ao quelatar o íon metálico. No caso de íons hexacoordenados, os mais utilizados em IMAC, três sítios são ocupados pelo IDA e os outros três ficam disponíveis para a ligação com a proteína (SULKOWSKI, 1985 e WONG et al., 1991).

Tabela 3.4: Fatores de estabilidade quelato e ponto de carga nula de alguns dos agentes quelantes (adaptado de PORATH, 1988 e RIBEIRO, 2006)

Agente quelante	Número de átomos que participam da coordenação do		Número de anéis quelato formado		pH onde a carga líquida do agente quelante é nula
	Nitrogênio	Oxigênio	5 átomos	6 átomos	
IDA	1	2	2	0	2,0-3,0 ⁽²⁾
NTA	1	3	3	0	5,8 ⁽¹⁾
CM-Asp	1	3	2	1	<4,0 ⁽²⁾
TREN	4	0	3	0	10,5 ⁽²⁾
TED	2	3	4	0	Nd

(1) TARESTE et al., 2002.

(2) Sigma-Aldrich Technical Service

CHAGA (2001) desenvolveu uma representação da capacidade de adsorção e seletividade para alguns agentes quelantes e íons metálicos imobilizados (Figura 3.6). A estabilidade dos complexos formados pelos agentes quelantes é inversa à capacidade de adsorção. Este autor também mostrou que cerca de 50% das proteínas oriundas de fontes biológicas (nativas) poderiam ser retidas em Cu(II) imobilizado, ao passo que esse número tende a cair significativamente se Ni(II), Co(II) ou Zn(II) são utilizados, pois requerem sítios de ligação precisos.

O agente quelante TREN não foi mencionado nos estudos realizados por Porath, 1988, uma vez que esse agente quelante foi pouco utilizado até então. Dados obtidos da literatura mostram que em termos de capacidade de adsorção, o complexo TREN-Me(II) é inferior aos complexos IDA-Me(II), CM-Asp-Me(II) e NTA-Me(II) e superior ao complexo TED-Me(II), devido ao fato de ser um agente quelante tetradentado, e apresentar 4 nitrogênios que realizam a imobilização do íon metálico, sendo que dois nitrogênios

correspondem a aminas primárias, um nitrogênio a amina secundária e um nitrogênio a amina terciária (SHARMA e AGARWAL, 2002b).



Figura 3.6. Agentes quelantes e íons metálicos: especificidade em função da capacidade de adsorção (adaptado de CHAGA, 2001). 3- tridentado, 4- tetradentado, 5-pentadentado.

3.3.2 Química de coordenação

Em IMAC, a adsorção de proteínas é baseada na coordenação entre os íons metálicos imobilizados e os grupos doadores de elétrons da superfície da proteína.

Os íons metálicos mais comumente utilizados em IMAC são os íons de metais de transição como Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Co(II), que são receptores de pares de elétrons e podem ser considerados ácidos de Lewis (GABERC-POREKAR e MENART, 2001). Os átomos doadores de elétrons (N, S e O), presentes nos compostos quelantes imobilizados no suporte cromatográfico, são capazes de se ligar por coordenação aos íons metálicos formando quelatos metálicos, que podem ser bi, tri, tetra ou pentadentados, dependendo do número sítios de coordenação ocupados. Os sítios de coordenação metálicos que permanecem livres são normalmente ocupados com moléculas de água que podem ser trocadas com grupos doadores de elétrons disponíveis da proteína (GABERC-POREKAR e MENART, 2001). Quando uma molécula de proteína que possui grupos doadores de elétrons (histidina, cisteína e triptofano) acessíveis em sua superfície é inserida, em pH neutro, em uma coluna cromatográfica contendo íons metálicos imobilizados (Co(II), Ni(II), Cu(II) ou Zn(II)), a ligação de coordenação é estabelecida resultando na retenção da proteína e possibilitando sua purificação (SULKOWSKI, 1989).

O princípio de Ácidos e Bases Fortes e Fracos (HSAB – “Hard and Soft Acids and Bases”) assume que na ligação de dois átomos, um atua como ácido de Lewis e o outro como base de Lewis. Átomos como oxigênio, nitrogênio alifático e fósforo são classificados como bases fortes, enquanto o nitrogênio aromático é classificado como base intermediária e o enxofre como base fraca. Os cátions monovalentes (Ag(I), Au(I), Hg(I) e Cu(I)) são os ácidos fracos, enquanto K(I), Na(I), Ca(II), Mg(II) e Fe(III) são ácidos fortes e os íons metálicos Co(II), Zn(II), Cu(II) e Ni(II) ácidos intermediários. De acordo com o HSAB, os ácidos fortes formam ligações estáveis com as bases fortes e, os ácidos fracos com as bases fracas (WONG et al., 1991 e UEDA et al., 2003).

Portanto, os íons metálicos fortes Fe(III), Ca(II) e Al(III) formam ligações mais estáveis com átomos de oxigênio, enquanto os íons metálicos fracos Cu(I), Hg(II) e Ag(I) coordenam preferencialmente com enxofre e os intermediários Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Co(II) com nitrogênio, mas também com oxigênio e enxofre. A seletividade dos íons metálicos fortes e intermediários são muito diferentes, mesmo no pH ótimo de adsorção (pH ácido e pH neutro, respectivamente), eles interagem com diferentes resíduos na superfície da proteína (PORATH, 1988 e CHAGA, 2001).

Segundo PORATH et al. (1975) e SULKOWSKI (1985), o anel imidazol da histidina é responsável pela ligação da proteína aos íons metálicos Cu(II), Zn(II), Ni(II) e Co(II) quelatados, devido à coordenação entre o par de elétrons presentes no nitrogênio do anel e o íon metálico. Desta maneira, tem-se estudado, em diversos trabalhos, a incorporação de caudas de poli(histidina) na proteína de interesse, conferindo a possibilidade de sua purificação por IMAC.

3.3.3 Seleção do íon metálico

Um dos fatores fundamental na técnica de IMAC é a escolha do íon metálico a ser imobilizado. Em princípio, todos os íons metálicos capazes de interagir com as proteínas podem ser utilizados em IMAC, porém, Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Al(III) e Ca(II), são os íons metálicos mais utilizados.(WONG et al., 1991; CHAGA, 2001) .

Os íons Fe(III) e Al(III) ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários podendo ser utilizados para separar fosfoproteínas (SULKOWSKI, 1988 e ANDERSSON e PORATH, 1986) e o íon Ca(II), por formar ligações de coordenação estáveis com o átomo de oxigênio

presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos aspartato e glutamato, pode ser utilizado para purificação de proteínas contendo grupamentos carboxílicos (MANTOVAARA et al., 1991).

A análise da retenção de peptídeos e proteínas realizada por SULKOWSKI, 1989, utilizando tampão fosfato 20 mM a pH 7,0 e NaCl 1,0 M, determinou regras de interação entre os resíduos de histidina com adsorventes contendo IDA-Cu(II), IDA-Ni(II), IDA-Co(II) e IDA-Zn(II) que são as seguintes:

I. A presença de pelo menos um resíduo de histidina disponível na superfície da proteína para a coordenação é suficiente para a retenção da mesma em um gel de IDA-Cu(II);

II. A presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma mais forte retenção da proteína em um gel de IDA-Cu(II);

III. A presença de dois resíduos histidina disponíveis para a coordenação é requerida para a retenção em um gel de IDA-Ni(II);

IV. A presença de dois resíduos histidina espacialmente localizadas em uma α -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em géis de IDA-Zn(II) e de IDA-Co(II);

V. A retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina vicinais (efeito quelato) será mais forte, em todos os géis IDA-Me(II), que a retenção de uma proteína que possui dois resíduos histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.

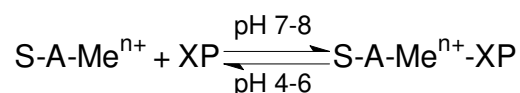
Como o resultado desta regra, pode-se determinar uma ordem crescente de força de retenção de proteínas em géis IDA-Me(II), da seguinte forma: Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) $\geq$ Co(II).

3.3.4 Mecanismos de adsorção e dessorção

Como já mencionado, a ligação entre a proteína e os íons metálicos imobilizados em IMAC resulta da habilidade de ligantes ricos em elétrons de deslocar ligantes fracamente ligados, como a água, em complexo com íons metálicos. As interações entre íons metálicos e proteínas que estão envolvidas na formação do complexo de coordenação específica são tanto eletrostáticas, hidrofóbicas e transferência de cargas. A ligação das proteínas resulta da habilidade de ligantes aminoácidos rico em elétrons deslocarem a água

do complexo formado com o íon metálico, que pode doar ou receber elétrons dos aminoácidos. Quando a proteína é exposta a um íon metálico imobilizado na matriz cromatográfica, esta tem a capacidade de formar ligações coordenadas e interações multipontos. A ligação é seletiva para altas concentrações de sal desde que a força iônica impeça a existência de qualquer outra interação eletrostática.

A etapa de adsorção-dessorção é importante em qualquer processo de cromatografia de afinidade e pode ser representado no caso de IMAC pela equação:



em que S representa o suporte, A o agente quelante, Me^{n+} o metal imobilizado e X o grupo reativo da proteína P.

A adsorção da proteína em gel de IMAC é realizada a um pH em que os grupos doadores de elétrons da superfície da proteína se encontrem parcialmente desprotonados. Para tanto, é comum aplicar a proteína em gel contendo íon metálico imobilizado em pH alcalino.

A eluição das proteínas adsorvidas na matriz cromatográfica pode ser conduzida utilizando-se um dos três métodos: protonação, adição de agente competidor e deslocamento do complexo proteína-íon metálico.

A protonação é um dos métodos mais utilizados. Consiste na protonação dos grupos doadores de elétrons da superfície da proteína por abaixamento do pH da fase móvel. Porém, alguns cuidados devem ser tomados ao se utilizar essa técnica de eluição: 1) utilização de condições ácidas de eluição moderadas, a fim de evitar a desnaturação da biomolécula, acarretando perda irreversível da atividade; 2) cuidados com a possível precipitação isoelétrica das proteínas dentro da coluna, também ocasionada pelas condições de baixo pH; e 3) monitoramento do desprendimento do íon metálico da coluna, causado pelo enfraquecimento da interação entre o agente quelante e o íon metálico imobilizado, o qual pode ser influenciado pelo abaixamento do pH do meio (SULKOWSKI, 1985; SHARMA e AGARWAL, 2001).

A adição de agente competidor, como por exemplo, imidazol, que também possua capacidade de interagir com o íon metálico faz com que a eluição seja feita em condições de pH neutro. Este método de eluição apresenta a vantagem de evitar o abaixamento de pH

na recuperação de proteínas e com isso evitar os problemas citados no item anterior; porém requer a adição de uma etapa para a retirada do agente competidor do meio contendo a proteína (SULKOWSKI, 1985).

O deslocamento do complexo íon metálico-proteína utilizando outro agente quelante mais forte (por exemplo, EDTA) é normalmente utilizado como etapa para a regeneração da coluna, após a etapa de eluição. Porém, em alguns casos, a interação entre o íon metálico e a proteína de interesse se apresenta tão forte que sua dessorção só é possível se deslocando o íon metálico (SULKOWSKI, 1985).

3.4 Isotermas de adsorção

Os dados de equilíbrio de adsorção são muito importantes para avaliar as propriedades do adsorvente e fornecer parâmetros relacionados às operações de purificação de proteína por cromatografia em larga escala. A adsorção pode ser avaliada quantitativamente através de isotermas, as quais permitem avaliar a capacidade de adsorção e a força com a qual as proteínas se ligam a determinado adsorvente. Uma isoterma de adsorção mostra a quantidade de um determinado soluto adsorvido por uma superfície adsorvente, em função da concentração de equilíbrio do soluto à uma dada temperatura.

Embora as interações entre o íon metálico imobilizado e a proteína em IMAC apresentem características extremamente complexas, elas podem ser muitas vezes, descritas pelo modelo de Langmuir (SERPA, 2002; AQUINO, 2004; RIBEIRO, 2006). CHASE (1984) descreveu a equação (3.1) de transferência de massa da adsorção que é consistente com a isoterma de Langmuir

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q \quad (3.1)$$

onde C é a concentração de soluto na solução, Q é a concentração de soluto adsorvido à matriz, Q_m é a capacidade máxima de soluto adsorvido à matriz e t é o tempo. As constantes k_1 e k_2 representam, respectivamente, as constantes das taxas de adsorção e dessorção do soluto na matriz contendo o ligante imobilizado e também as contribuições da limitação da transferência de massa. Admitindo-se que os sítios de adsorção têm energia igual, são independentes entre si, as ligações entre sítio e proteína são reversíveis e limitadas a uma só camada, a equação (3.1) pode ser reduzida a isoterma de adsorção de Langmuir.

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{(K_d + C^*)} \quad (3.2)$$

em que $K_d (= k_2/k_1)$ é a constante de dissociação no estado de equilíbrio (*), que indica a afinidade entre a proteína e o agente quelante-íon metálico, em termos da facilidade de separar o complexo proteína-íon metálico, C^* é a concentração de soluto na solução, Q^* é a concentração de soluto adsorvido à matriz, todos no estado de equilíbrio.

Para estabelecer a validade do modelo de Langmuir, a linearização do gráfico Q^*/C^* em função de Q^* (Gráfico de Scatchard – equação (3.3)), que tem como limitação o fato de empregar Q^* em ambos os eixos. Esse método é sensível a efeitos de cooperação das ligações e interações não homogêneas e se mostra particularmente sensível para indicar desvios do modelo de Langmuir

$$\frac{Q^*}{C^*} = \frac{Q_m}{K_d} - \frac{Q^*}{K_d} \quad (3.3)$$

O perfil do gráfico de Scatchard obtido da linearização da isoterma de Langmuir pode indicar se há cooperatividade positiva (curva assintótica ou curva côncava), onde cada molécula adsorvida aumenta a probabilidade de outra molécula ser adsorvida no sítio vizinho, ou cooperatividade negativa (curva convexa), onde cada molécula adsorvida diminui a probabilidade de adsorção de outra. Quando a curva apresenta a forma linear indica que as proteínas não interagem entre si (KALTENBRUNNER e JUNGBAUER, 1996; SHARMA e AGARWAL, 2001 e BOLSTER e HORNBERGER, 2007). Outras linearizações para a equação de Langmuir e suas limitações estão apresentadas na Tabela 3.5.

Como as interações ligante-proteína em alguns sistemas são freqüentemente caracterizadas pela participação de sítios de ligação dependentes, é normalmente observado que o modelo de Langmuir não é capaz de descrever satisfatoriamente os dados experimentais da isoterma de adsorção. Nesse caso utiliza-se a isoterma de Freundlich (3.4)

$$Q^* = K C^{\eta} \quad (3.4)$$

onde K e η são a constante de equilíbrio e a constante de potência da isoterma de Freundlich, respectivamente, e são específicos para cada sistema íon metálico imobilizado-proteína, e devem ser determinado experimentalmente. A limitação da isoterma de

Freundlich é que a quantidade adsorvida aumenta indefinidamente com o aumento da concentração em solução.

Tabela 3.5: Diferentes formas de linearização da equação de Langmuir (adaptado de BOLSTER e HORNBERGER, 2007).

Equação	Forma da equação	Limitações
Duplo recíproco	$\frac{1}{Q^*} = \frac{1}{Q_m} + \frac{K_d}{Q_m} \cdot \frac{1}{C^*}$	Linearização agrupa os pontos próximos da origem — região extremamente sensível a variação, valores baixos de Q^* (elevados valores de $1/Q^*$).
Semi-recíproco	$\frac{C^*}{Q^*} = \frac{K_d}{Q_m} + \frac{C^*}{Q_m}$	Como $x (C^*)$ e $y (C^*/Q^*)$ não são independentes entre si, a correlação entre x e y é superestimada, isto é, equação pode não fornecer bons ajustes aos dados que são conformes ao modelo de Langmuir.

Uma aproximação para esclarecer a natureza heterogênea da interação entre íon metálico imobilizado e a proteína, é o modelo de Langmuir-Freundlich (Equação 3.5)

$$Q^* = \frac{Q_m (C^*)^n}{K_{d(LF)} + (C^*)^n} \quad (3.5)$$

em que $K_{d(LF)}$ é a constante de dissociação aparente que inclui as contribuições de da ligação entre monômeros, monômero-dímeros, e outras formas de associação de proteína, Q_m é a capacidade máxima de ligação e n é o coeficiente de Langmuir-Freundlich. Como a equação apresenta três termos, é melhor para aproximação da adsorção de natureza heterogênea e explicar a cooperatividade de adsorção. O parâmetro n é classicamente um indicativo do tipo de cooperatividade presente no mecanismo de adsorção. No caso de $n = 1$, não há cooperatividade entre as proteínas, ou os sítios são independentes. Para $n > 1$, uma cooperatividade positiva é sugerida e quando $0 < n < 1$, uma cooperatividade negativa é atribuída ao processo (SHARMA e AGARWAL, 2001).

CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Adsorventes

O gel Sepharose 4B (contendo 4% de agarose reticulada, tamanho de partícula entre 45-165 μm), a coluna HisTrap HP de 5,0 mL - pré empacotada com níquel imobilizado, com densidade de ligantes de 15,0 $\mu\text{mol Ni(II)/mL gel}$ e capacidade de adsorção de 40,0 mg proteína-(his)₆/mL gel - e a coluna de dessalinização PD-10 Sephadex G 25 Medium foram adquiridas da GE Healthcare (EUA). O gel de agarose 4% contendo o agente quelante imobilizado Tris(carboximetil) etileno diamina (Sepharose-TED) foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA).

4.1.2 Regentes

Ácido iminodiacético (IDA), ácido L-aspartico, albumina de soro bovino (BSA), imidazol, tris-2(aminoetil)amina (TREN) foram obtidos da Sigma (EUA). Ácido etileno-dinitrilo-tetraacético sal dissódico (EDTA), acetato de sódio anidro, sulfato de níquel, sulfato de cobre, epícloridrina, Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) e uréia foram obtidos da Merck (Alemanha). Cloreto de sódio, metanol, etanol, ácido clorídrico, nitrato de prata e carbonato de sódio foram obtidos da Synth (Brasil) e hidróxido de sódio e glutaraldeído da Nuclear (Brasil). Dodecil sulfato de sódio (SDS), N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED), acrilamida e glicina foram obtidos da BioAgency (Brasil), ácido acético e ácido fosfórico da Ecibra (Brasil). Azul de bromofenol, persulfato de amônio, glicerol e ditiotreitol foram adquiridos da Amersham Biosciences (Suécia). Coomassie Brilliant Blue G-250 foi obtido da Vetec (Brasil). Nas eletroforeses SDS-PAGE utilizou-se kits de marcadores de baixa massa molecular, adquiridos da GE Healthcare (EUA), contendo as proteínas fosforilase b (97 kDa), albumina (65 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa)) e adquiridos da Sigma (EUA), contendo as proteínas albumina de soro bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), 3-fosfato gliceraldeído desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica

(29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), α -lactoalbumina (14,2 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

Utilizou-se, nas eletroforeses, pró-insulina purificada por IMAC (PIS-IMAC) cedida pela BIOMM (Brasil) como marcador de pró-insulina. Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Utilizou-se água ultrapura preparada em equipamento Milli-Q (Millipore, EUA).

4.1.3 Pró-insulina sulfonada com cauda de poli(histidina)

Nos experimentos cromatográficos foram utilizadas soluções de pró-insulina humana recombinante sulfonada (PIS) contendo cauda de poli(histidina) doadas pelo Engenheiro Luciano Vilela (BIOMM, Brasil), com as seguintes especificações:

a) Pró-insulina sulfonada purificada por IMAC em gel Sepharose IDA-Ni(II) (PIS-IMAC) lote HGN 0201 Fr A de 27/11/2001. Segundo o fornecedor, este material contém aproximadamente 84% de PIS, análise por SDS-PAGE;

b) Solução não clarificada (PIS-NC): solução obtida após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise, lote HGF 0160 de 08/01/02. Esta solução é constituída de PIS, a qual se encontra solubilizada em tampão de desnaturação (tampão contendo uréia 8 M) e vários outros componentes não divulgados. Segundo o fornecedor, este material tem 35% de PIS (análise por SDS-PAGE). A solução não clarificada foi centrifugada a 9.000 g por 30 min. a temperatura de 20°C em centrífuga (Eppendorf 5804 R, EUA). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de microfiltração de celulose regenerada, com diâmetro de poro de 0,45 μ m (Corning, Alemanha) e posteriormente realizada filtração em gel em uma coluna PD-10 (GE Healthcare, EUA). Após este procedimento, a solução obtida foi denominada de solução clarificada (PIS-C).

4.2 Metodologia

4.2.1 Síntese dos géis Sepharose-IDA, Sepharose-TREN e Sepharose-CM-Asp

4.2.1.1 Ativação do gel agarose (Sepharose 4B) com epicloridrina

O gel Sepharose 4B foi ativado com epicloridrina, baseado no procedimento descrito por PORATH e OLIN (1983). A matriz (20 g de gel de agarose filtrado a vácuo por 5 min), previamente lavada com água, foi colocada em um frasco Erlenmeyer de 250 mL onde adicionou-se 50,0 mL de solução de NaOH 2,0 M contendo 5,0 mL de epicloridrina e 0,266 g de boroidreto de sódio (NaBH_4). A suspensão foi deixada sob agitação por 15 min a temperatura ambiente, gotejando-se, em seguida, durante um período de 2 h, 50,0 mL de NaOH 2,0 M e 23,3 mL de epicloridrina simultaneamente, para evitar o aumento da temperatura durante a reação, a uma vazão de 0,27 e 0,13 mL/min, respectivamente. A mistura foi deixada sob agitação por mais 16 h em temperatura ambiente e após o término da reação, lavou-se a matriz com água para remoção de excesso de epicloridrina até verificação de mesmo valor de pH na água de lavagem.

4.2.1.2 Imobilização do agente quelante IDA

Ao gel Sepharose previamente ativado com epicloridrina, adicionou-se uma solução de carbonato de sódio 2,0 M. Preparou-se, então, uma solução de 26,0 g de IDA dissolvida em 65,0 mL de NaOH 2,0 M, à qual adicionou-se pastilhas de NaOH até se atingir pH 10,0 e, em seguida, uma solução de carbonato de sódio 2,0 M (65,0 mL). Mantendo-se o pH 10,0, as soluções de IDA e carbonato foram misturadas e adicionadas à matriz, sob agitação por 24 h e em temperatura de 65 °C. Ao término da reação, com o intuito de remover o excesso de IDA não imobilizado, o gel foi lavado com água até verificação de mesmo valor de pH da água ultrapura (PORATH e OLIN, 1983). O gel derivatizado foi denominado Sepharose-IDA.

4.2.1.3 Imobilização do agente quelante TREN

A imobilização do TREN foi realizada conforme o procedimento descrito por BODEN et al. (1995). Preparou-se uma solução contendo 5 mL de TREN (96% m/v) em 25

mL de água ultrapura (o frasco contendo o reagente TREN foi aberto em uma capela com atmosfera de argônio, uma vez que o mesmo absorve umidade e CO₂ do ar) . Esta solução foi adicionada à matriz previamente ativada. Esta suspensão permaneceu sob agitação durante 48 horas à temperatura ambiente. Finalizada a imobilização, a matriz foi lavada com água ultrapura para remover o excesso de TREN não imobilizado até verificação de mesmo valor de pH da água ultra pura e a água de descarte, indicando que todo o excesso de solução de TREN foi removido. O adsorvente obtido foi denominado Sepharose-TREN.

4.2.1.4 Síntese e imobilização do CM-Asp

A síntese do ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp) foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por MANTOVAARA et al. (1991), em duas etapas. Primeiramente, o ácido L-aspártico foi imobilizado na matriz previamente ativada e, em seguida, foi realizada a carboxi-metilação.

Imobilização do ácido L-aspártico:

Seguiu-se o mesmo protocolo para a imobilização do ligante a partir de um grupamento amino em matriz ativada contendo epícloridrina. A matriz foi lavada com uma solução de NaHCO₃/Na₂CO₃ 2,0 M. Foi preparada uma solução de 8,0 g de ácido L-aspártico adicionados a 50 mL de uma solução aquosa de NaHCO₃/Na₂CO₃ 1,0 M, tendo o pH ajustado para 11,5 com pastilhas de NaOH. Esta solução foi, então, adicionada à matriz, e mantida sob agitação durante a noite a temperatura ambiente. Após a imobilização, o gel foi lavado com água, até que o pH da solução fosse igual ao pH da água.

Carboxi-metilação:

O gel agarose contendo o ácido L-aspártico imobilizado foi lavado com uma solução de NaHCO₃/Na₂CO₃ 1,0 M pH 10,5. Simultaneamente preparou-se uma solução, contendo 12,6 g de ácido bromo-acético em 30 mL de NaOH 4,0 M e o pH foi ajustado para 10,5 com pastilhas de NaOH. Esta solução foi adicionada ao gel e a mistura permaneceu sob agitação durante a noite. Após a carboxi-metilação, o gel foi lavado com água, até que o pH da solução fosse igual ao pH da água. O gel derivatizado foi denominado Sepharose-CM-Asp.

4.2.2 Determinação da densidade dos ligantes

A determinação da quantidade de íon metálico quelatado nas matrizes Sepharose-IDA, Sepharose-TREN e Sepharose-CM-Asp foi realizada segundo procedimento descrito por SERPA (2002). Primeiramente, alimentou-se, na coluna cromatográfica, solução de sulfato de níquel 50 mM até a saturação e lavou-a com água e tampão acetato 100 mM a pH 4,0 para retirar o íon metálico fracamente quelatado. Realizou-se, então, a eluição do íon níquel alimentando-se solução de EDTA 50 mM a pH 7,0, recolhendo-se as frações de eluição e analisando-as por medida de absorbância em um espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Perkin Elmer AA100, EUA), conforme procedimento descrito pelo fabricante.

As densidades dos ligantes quelatados nas matrizes Sepharose-TED-Ni(II) e coluna HisTrap HP foram informadas pelos fabricantes.

4.2.3 Determinação de proteína total

A proteína total presente nas amostras foi quantificada utilizando-se o método colorimétrico empregando o corante comassie blue, segundo BRADFORD (1976). BSA foi utilizada como proteína de referência.

4.2.4 Soluções tamponantes utilizadas.

- Tampão A: Tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5;
- Tampão B: Tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo imidazol 20 mM;
- Tampão C: Tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo uréia 6 M;
- Tampão D: Tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo NaCl 500 mM e imidazol 100 mM;
- Tampão E: Tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo NaCl 500 mM e imidazol 300 mM;
- Tampão F: Tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo NaCl 500 mM e uréia 7,5 M.

4.2.5 Experimentos cromatográficos em Sepharose-IDA-Ni(II): Adsorção de PIS a partir de soluções PIS-IMAC e PIS-C

Estes experimentos foram realizados em colunas cromatográficas, contendo 3,0 e 5,0 mL de adsorvente, com o objetivo de avaliar o desempenho do gel Sepharose-IDA-Ni(II) na adsorção de pró-insulina sulfonada a partir das soluções PIS-IMAC e PIS-C, em cada condição de equilíbrio da coluna:

As soluções de PIS-IMAC foram preparadas na proporção 1:1 no tampão F e as soluções de PIS-C foram preparadas na proporção 1:1 nos tampões A, B e F. As amostras de PIS-IMAC (concentração de 3,2 mg/mL e 3,5 mg/mL) foram alimentadas, em termos de proteína total, nas quantidades de 31,57 mg e 10,57 mg, e as amostras de PIS-C (concentração de 2,20 mg/mL, 2,50 mg/mL, 3,10 mg/mL), nas quantidades de 7,67 mg, 12,22 mg, 27,82 mg. As soluções (PIS-IMAC ou PIS-C) foram alimentadas na coluna a uma vazão de 0,5 mL/min.

As proteínas não adsorvidas no suporte foram removidas através da lavagem sequencial com tampão B, tampão A e, finalmente, tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo uréia 6 M (tampão C). A dessorção de proteínas foi realizada, sequencialmente, com o tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo NaCl 50 mM, uréia 6 M e imidazol 100 mM (tampão D) e tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 contendo NaCl 50 mM, uréia 6 M e imidazol 300 mM (tampão E). O adsorvente foi regenerado com solução de EDTA 50 mM a pH 8,0.

Durante as cromatografias foram coletadas frações individuais de 2,0 mL das etapas de adsorção, eluição e regeneração para serem analisadas pelo método de BRADFORD (1976) para se determinar a quantidade total de proteína. Para a análise por eletroforese SDS-PAGE foi utilizado um “pool” de cada pico cromatográfico.

4.2.6 Experimentos cromatográficos em Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II), Sepharose-TREN-Ni(II) e HisTrap-Ni(II)

- ***Adsorção de PIS a partir de solução clarificada***

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o desempenho dos géis Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II), Sepharose-TREN-Ni(II) e da coluna HisTrap-Ni(II) na adsorção de pró-insulina sulfonada a partir das soluções clarificadas.

Os experimentos foram realizados em colunas cromatográficas contendo 3,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL e 5,0 mL de adsorvente, respectivamente, para Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II), Sepharose-TREN-Ni(II) e coluna HisTrap-Ni(II), equilibrados com tampão A. A dificuldade na padronização dos volumes das colunas se deve a limitação da quantidade de resina disponível.

As soluções de PIS-C foram preparadas na proporção 1:1 no tampão F. As amostras de PIS-C (concentração de 3,0 mg/mL a 4,0 mg/mL), nas quantidades de 13,67 mg a 44,59 mg de proteína total, foram alimentadas na coluna a uma vazão de 0,5 mL/min.

As proteínas não adsorvidas pelo suporte foram removidas através da lavagem sequencial com tampão B, tampão A e, finalmente, tampão C. A dessorção de proteínas foi realizada, sequencialmente, com o tampão D e tampão E. O adsorvente foi regenerado com solução de EDTA 50 mM a pH 8,0, exceto para Sepharose-TED-Ni(II), que foi regenerado com NaOH a 50 mM. A escolha do NaOH para a regeneração da coluna contendo Sepharose-TED-Ni(II) se deve ao fato de não ser possível a retirada do metal da coluna com a solução de EDTA utilizada nos demais adsorventes.

Durante as cromatografias foram coletadas frações individuais de 2,0 mL das etapas de adsorção, eluição e regeneração, para serem quantificada pelo método de BRADFORD (1976) (em termo de proteína total).

A seletividade dos suportes para purificação de pró-insulina foi avaliada qualitativa e quantitativamente através da análise de “pool” das frações correspondentes aos picos cromatográficos por eletroforese SDS-PAGE e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (HPLC) (Waters, EUA), respectivamente.

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata (Apêndice A).

4.2.7 Eletroforese SDS-PAGE

As proteínas adsorvidas e não adsorvidas durante os experimentos cromatográficos utilizando amostras PIS-IMAC e PIS-C foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes e redutoras, na presença de SDS e β -mercaptoetanol. A eletroforese SDS-PAGE realizada no equipamento Mini Protean III (Bio Rad, EUA), consistiu inicialmente na preparação de um gel de poliacrilamida (30% de acrilamida e 2,7% de bisacrilamida) na concentração de 15%. As amostras protéicas foram desnaturadas com solução de SDS a 10%, β -mercaptoetanol e aquecimento a 100 °C por 8 min. A separação das proteínas no gel foi obtida em cuba vertical com voltagem constante de 200 V. Ao término da eletroforese, as bandas de proteínas foram visualizadas pela coloração do gel com nitrato de prata, fixando-se, inicialmente, o gel em solução aquosa contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético, mantendo, sob agitação, por um período de 20 min. Em seguida, o gel foi colocado em uma solução aquosa com 5% de metanol e 7% de ácido acético e mantido, sob agitação, durante 20 min. Após este tempo, o gel foi colocado em uma solução aquosa com 10% de glutaraldeído, permanecendo em contato com esta solução por 20 min. O gel foi, então, lavado com água Milli-Q de 5 em 5 min por 1,5 h e adicionou-se uma solução de ditioneitol a uma concentração de 5 μ g/mL, mantendo-se, sob agitação, durante 20 min. Em seguida, adicionou-se uma solução a 0,1% de nitrato de prata (w/v), a qual foi mantida em contato com o gel por 20 min. O gel, após este procedimento, foi lavado com água Milli-Q e duas vezes com a solução de revelação (50 μ l de formaldeído a 37% em 100 mL de carbonato de sódio a 3% (w/v)). Em seguida, adicionou-se um volume de solução reveladora suficiente para cobrir o gel e agitou-se até a visualização completa das bandas de proteínas no gel. A revelação foi finalizada ao adicionar 5 mL de solução de ácido cítrico 2,3 M, a qual foi mantida, sob agitação, por 10 min. Lavou-se o gel várias vezes com água Milli-Q por 30 min. O gel foi então envolto em plástico e armazenado sob refrigeração.

4.2.8 Determinação das isotermas de adsorção

Os experimentos para obtenção das isotermas de adsorção nos diversos adsorventes estudados, foram realizados em triplicata, a 4°C, 15°C, 25°C, 37°C e 45°C.

Amostras de pró-insulina purificada liofilizada (doadada pela empresa BIOMM) foram solubilizadas no tampão F (30 mM Tris-HCl 500 mM NaCl e 7,5 M uréia, tampão de adsorção, pH 7,5). Foram colocados em tubos Eppendorf de 1,5 mL, 50 µL de adsorvente (cerca de 17 mg de gel seco) previamente equilibrados com tampão A (30 mM Tris-HCl pH 7,5). Em seguida, foram adicionados aos tubos 1,0 mL de solução de pró-insulina em tampão F com concentrações de 0,45 a 14,0 mg/mL e estes ficaram sob agitação por 3 hs (tempo necessário para atingir o equilíbrio). Após esse período, os géis foram separados da solução por centrifugação e a densidade óptica dos sobrenadantes foram medidas a 280 nm, no espectrofotômetro Beckman, DU 650 (utilizando absorvidade específica para PIS obtida por curvas padrões de 0,47 cm²/mg) e, em seguida, foi calculada a concentração de PIS não adsorvida (concentração da solução no equilíbrio, C*). A quantidade de proteína adsorvida (Q*) foi determinada pela diferença entre a concentração inicial da solução de pró-insulina (C) e a concentração da solução no equilíbrio (C*) dividido pela massa de adsorvente seco. Com os dados de adsorção obtidos, foram traçadas as isotermas e realizado o ajuste não linear de parâmetros do modelo de Langmuir (3.2) e de Langmuir-Freundlich (3.5), usando o método de Levenberg-Marquardt. Visando a otimização na determinação dos valores numéricos dos parâmetros a partir de dados experimentais, é necessário conhecer uma função para a qual os valores calculados sejam os mais próximos possíveis dos valores experimentais, conhecida como função objetivo. A função objetivo deve ser mínima porque corresponde a somatória dos erros.

A função objetivo (4.1) otimizada pelo software Origin 7.5, usado para o ajuste dos parâmetros foi :

$$f = \sum_{j=1}^p E_j^2 \quad (4.1)$$

$$\text{onde } E_j = Y_j^{\text{exp}} - y_j^{\text{cal}}(x) \quad j = 1, 2, \dots, p$$

4.2.7.1. Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Uma vez obtido os valores de K_d para os sistemas estudados nas temperaturas de 4, 15, 25, 37 e 45°C, como descrito no item 4.2.7, foram determinados os parâmetros termodinâmicos da adsorção de PIS conforme descrito por HAUPT et al. (1995), THRASH Jr. et al. (2004), CHANG et al. (2006) e RIBEIRO (2006). Os valores de ΔG° obtidos pela equação de Van't Hoff (4.2).

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_d \quad (4.2)$$

equação na qual ΔG° de adsorção é calculado a partir da constante de dissociação a uma dada temperatura. A relação entre a temperatura e a constante de dissociação é representada pela equação de Van't Hoff na forma integrada (4.3):

$$\ln K_d = \frac{\Delta H^\circ}{R \cdot T} + J \quad (4.3)$$

J é a constante de integração, e equivale a $\Delta S^\circ/R$ quando ΔH° é independente da temperatura na faixa estudada. A inclinação da reta obtida da relação entre K_d e $1/T$ na forma gráfica nos fornece o valor de ΔH° . Nesse caso, ΔH° é independente da temperatura na faixa estudada. Através da relação de Gibbs-Helmholtz (4.4) é possível determinar o parâmetro ΔS° .

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \cdot \Delta S^\circ \quad (4.4)$$

4.2.9 Determinação das curvas de ruptura

Os experimentos para determinação das curvas de ruptura foram realizados para avaliar a capacidade dinâmica dos adsorventes Sepharose-IDA-Ni(II) e Sepharose-TREN-Ni(II) para adsorção de PIS a partir de solução PIS-C. Foram preparadas 100,0 mL de solução PIS-C na concentração de 3,7 mg/mL diluída 1:1 no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl. A solução de PIS foi alimentada em duas vazões, 0,5 mL/min e 1,0 mL/min, visando avaliar a influência do tempo de residência na adsorção de PIS até a saturação da coluna. O tempo de residência (τ) foi calculado segundo a equação (4.5) (FOGLER, 2002).

$$\tau = \frac{V_v}{v} \quad (4.5)$$

na qual τ é o tempo de residência (108 s e 54 s para vazões de 0,5 e 1,0 mL/min, respectivamente), V_v é o volume de vazios do leito e v é a vazão volumétrica da alimentação. Segundo o fabricante (GE Healthcare, USA), o volume de vazios do leito corresponde a cerca de 30% do volume total para o caso de matrizes não-rígidas, tais como a Sepharose utilizada.

As curvas de ruptura foram obtidas através de análises quantitativas e qualitativas (dosagem pelo método de BRADFORD e SDS-PAGE, respectivamente) das frações coletadas em volumes de 2,0 mL. Após a alimentação, visando determinar a capacidade dinâmica do adsorvente, foram realizadas as etapas de lavagem, eluição e regeneração da coluna, segundo o procedimento utilizado nos experimentos cromatográficos (item 4.2.6). As frações de todas essas etapas foram coletadas, analisadas pelo método de BRADFORD, e foram feitos “pools” das frações de alimentação, lavagem, eluição e regeneração para análise de eletroforese SDS-PAGE e para análise quantitativa de PIS por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.2.10 Determinação de pró-insulina recombinante sulfonada (PIS) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As frações de alimentação, lavagem, eluição e regeneração obtidas durante os experimentos cromatográficos foram analisadas, para quantificação de PIS, em um sistema HPLC da Waters (EUA), constituído de um sistema de bombas binário modelo 1525, detector de absorvância modelo 2487 e um computador Compaq com software Breeze versão 3.20, utilizando o protocolo estabelecido por AQUINO, 2006. Foi utilizada uma coluna trocadora de ânions (contendo como grupo trocador de ânions o quaternário de amônio) Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare, EUA), de volume de leito de 1,0 mL, constituída de resina hidrofílica de poliestireno/divinil benzeno com tamanho médio de partículas de 10 μ m. As análises foram realizadas a 29 °C, à uma vazão de 1,0 mL/min, com volume de injeção de 20 μ l. As amostras foram previamente filtradas em filtros

PVDF-Millex-HV (Millipore, EUA) de diâmetro de poro de 0,45 μm . A eluição das proteínas foi realizada em um gradiente descontínuo utilizando como fase móvel A, o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 6,0 M de uréia e como fase móvel B, o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo 6,0 M de uréia e 1,0 M de NaCl. O gradiente foi realizado empregando as seguintes proporções da fase móvel B na fase móvel A: 0-50% em 9 min, 50-80% em 3 min, 80% por 2 min, 80-81% em 1 min, 81% por 1 min, 81-100% em 1 min e 100% por 2 min, reequilibrando a coluna com 100 % da fase móvel A por 10 min. Durante as análises, a proteína foi detectada pelo equipamento no comprimento de onda de 280 nm.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, primeiramente são apresentados os resultados das análises do efeito do agente quelante na purificação da pró-insulina recombinante a partir de solução clarificada usando IMAC com íon níquel imobilizado. Em seguida, são discutidos os resultados das isotermas de adsorção de pró-insulina a 25°C nos géis estudados. Estas isotermas foram determinadas com a finalidade de calcular os parâmetros capacidade de adsorção e constante de dissociação do complexo pró-insulina-Ni(II)-agente quelante, parâmetros importantes para ampliação de escala. Finalizando, são expostos e discutidos os resultados da determinação de parâmetros termodinâmicos (ΔG° , ΔH° e ΔS°) com intuito de investigar a natureza das interações entre pró-insulina e o ligante imobilizado.

5.1 Análise dos perfis protéicos das soluções de pró-insulina recombinante (PIS) por eletroforese SDS-PAGE

Os experimentos cromatográficos deste trabalho de pesquisa foram realizados com amostras de soluções provenientes de duas diferentes etapas do processo de produção em escala piloto de insulina humana a partir de pró-insulina humana recombinante da indústria BIOMM (Brasil). Com o intuito de avaliar qualitativamente a pureza da PIS em soluções não clarificadas (PIS-NC), clarificadas no LIMBio (PIS-C) e da pró-insulina purificada por IMAC (PIS-IMAC), os perfis das bandas protéicas destas soluções foram obtidas através de eletroforese SDS-PAGE (Figura 5.1).

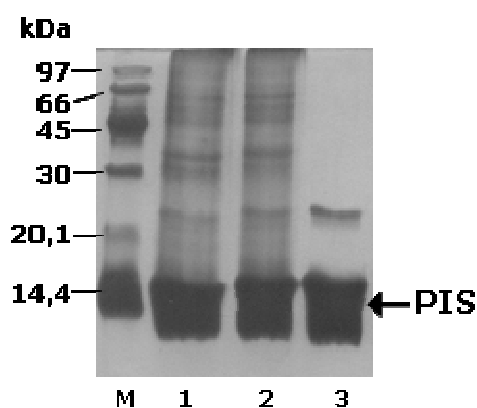


Figura 5.1: Eletroforese SDS-PAGE a 15% de acrilamida. Amostras em condições redutoras. Faixa M: Marcador de massa molecular (GE Healthcare), Faixa 1: PIS-NC, Faixa 2: PIS-C, Faixa 3: PIS-IMAC.

Verifica-se em todas as amostras a presença de uma banda de massa molecular em torno de 10 kDa, que corresponde a pró-insulina. Segundo o fornecedor (BIOMM, Brasil), esta banda corresponde a pró-insulina sulfonada e não sulfonada. A PIS-IMAC (coluna 3), por apresentar alto grau de pureza eletroforético, foi utilizada nos ensaios preliminares cuja finalidade era comprovar a adsorção de PIS em Sepharose-IDA-Ni(II), gel sintetizado no LIMBio. Como solução de alimentação para experimentos cromatográficos de purificação, foi utilizada a solução de PIS-C (item 4.1.3 do capítulo Materiais e Métodos), uma vez que a eliminação de agregados e precipitados por centrifugação evita entupimentos e colmatagem da coluna cromatográfica.

5.2 Efeito do agente quelante na capacidade de imobilização do íon metálico níquel

Os agentes quelantes IDA, CM-Asp, TREN e TED foram imobilizados covalentemente ao gel de agarose via ligação éter, para que as capacidades de quelação do íon níquel pudessem ser comparadas com base no mesmo tipo de ligação e tamanho de braço espaçador. Tanto os géis derivatizados no LIMBio quanto os adquiridos comercialmente, com exceção da coluna HisTrap (agente quelante e braço espaçador não divulgados pelo fornecedor), foram ativados com epicloridrina apresentando, portanto, três átomos de carbono como braço espaçador (Figura 5.2). Os valores de capacidade de imobilização do íon metálico níquel nos adsorventes derivatizados no LIMBio foram muito próximos daqueles publicados na literatura para matrizes de agarose (Tabela 5.1).

A afinidade e a densidade de íon metálico quelatado na matriz cromatográfica são influenciadas pelo tipo e pela quantidade de átomos eletronegativos doadores de elétrons presente no agente quelante. O agente quelante tridentado IDA e os tetradentados TREN e CM-Asp apresentaram valores próximos de densidade de níquel imobilizado. O agente quelante IDA quelatou cerca de 10% mais níquel que os tetradentados TREN e CM-Asp, provavelmente devido à presença de dois átomos de oxigênio e a configuração planar, porém assimétrica que os átomos que formam o quelato metálico apresentam na molécula. Essa distribuição planar facilita a imobilização do íon metálico, pois diminui os efeitos de impedimento estérico da molécula. Nos agentes quelantes tetradentados, o impedimento estérico é responsável pela diminuição na quantidade de íons metálicos imobilizados (DWYER e MELLOR, 1964).

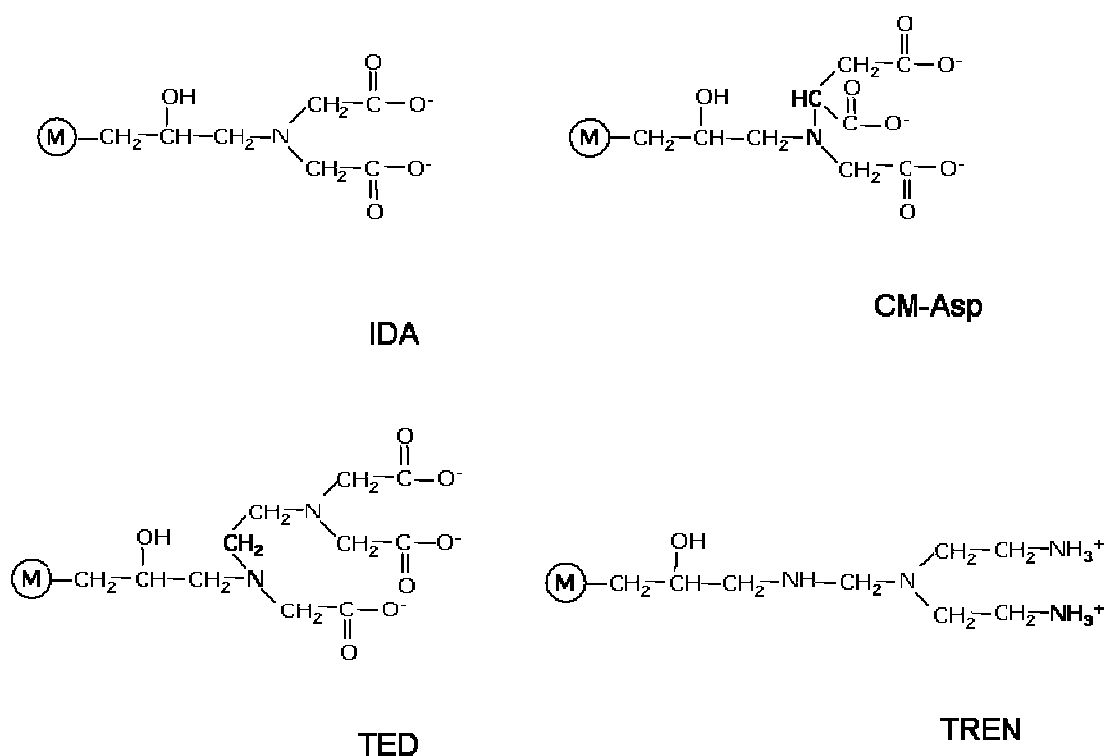


Figura 5.2: Estruturas hipotéticas em pH neutro dos agentes quelantes IDA, CM-Asp, TED e TREN imobilizados em gel de agarose usando epicloridrina como reagente de ativação. (Adaptado de CHAGA, 2001 e SHARMA e AGARWAL, 2002a) (M = matriz).

O agente quelante pentadentado TED, provavelmente devido à configuração espacial dos átomos doadores de elétrons, quelatou menor quantidade de níquel (três vezes menos, quando comparado aos tri e tetradentados). Quanto a coluna HisTrap, como o agente quelante não foi divulgado pelo fornecedor, não se pode inferir sobre o efeito do agente quelante na imobilização de íons metálicos.

Determinada a densidade de íons metálicos imobilizados, foi realizado o estudo dos efeitos dos complexos IDA-Ni(II), CM-Asp-Ni(II), TREN-Ni(II) e TED-Ni(II) na capacidade de adsorção e na seletividade para a purificação de PIS, tendo-se iniciado os estudos com adsorvente Sepharose-IDA-Ni(II).

Tabela 5.1: Densidade de íon metálico níquel imobilizado em agarose derivatizada com os agentes quelantes IDA, CM-Asp, TREN e TED.

Agente quelante	Ativação	Densidade de Ni(II) ($\mu\text{mol/mL}$)	Referência
Sepharose-IDA ¹	epicloridrina	37,8	*
Sepharose-IDA ²	epicloridrina	38,0	Ribeiro, 2006
Sepharose-IDA ¹	bisoxirano	36,8	Sharma and Agarwal, 2002a
Sepharose-CM-Asp ¹	epicloridrina	33,5	*
Sepharose-CM-Asp ²	epicloridrina	36,9	Ribeiro, 2006
Sepharose-TREN ¹	epicloridrina	32,8	*
agarose-TREN	epicloridrina	25,0	Valor fornecido pela Sigma
Sepharose-TREN ¹	bisoxirano	26,6	Sharma and Agarwal, 2002a
agarose-TED	epicloridrina	10,0	Valor fornecido pela Sigma
HisTrap	não divulgado	15,0	Valor fornecido pela GE Healthcare (agente quelante não divulgado)

*Valores determinados neste trabalho; ¹determinados por espectrometria de absorção atômica; ²determinado por espectrofotometria UV-Vis.

5.3 Adsorção de PIS em gel Sepharose-IDA-Ni(II)

Foram realizados experimentos preliminares de adsorção de PIS em gel Sepharose-IDA-Ni(II) a partir de solução de PIS purificada por IMAC (PIS-IMAC) e de PIS clarificada (PIS-C) com o intuito de comparar seu desempenho com os demais agentes quelantes, uma vez que Sepharose-IDA-Ni(II) é utilizado pela empresa BIOMM (Brasil) para purificação de PIS. A análise do desempenho foi baseada na seletividade do adsorvente e na capacidade de adsorção de PIS.

5.3.1 Adsorção de PIS a partir de solução PIS-IMAC

Os experimentos cromatográficos em Sepharose-IDA-Ni(II) a partir da solução PIS-IMAC foram realizadas com intuito de comprovar a adsorção de PIS neste gel, uma vez que o mesmo foi sintetizado no LIMBio. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas em AQUINO e colaboradores, 2006 (Figura 5.3 e Figura 5.4 e Tabela 5.2).

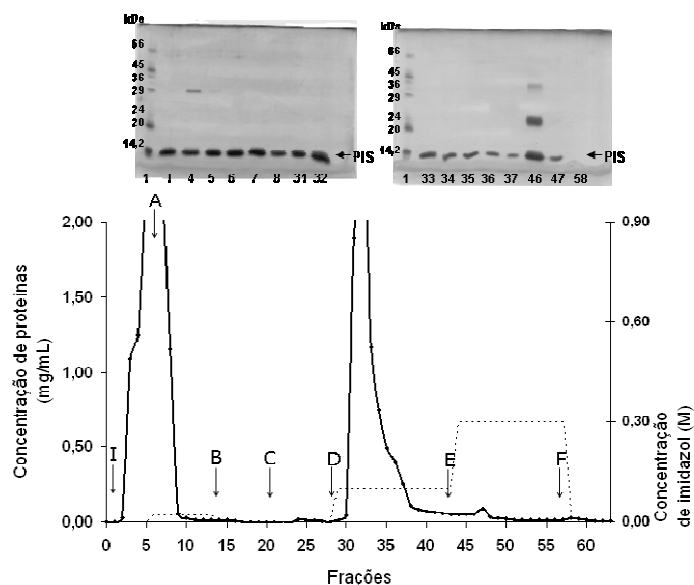


Figura 5.3: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-IMAC, em gel Sepharose-IDA-Ni(II). (I) Injeção: 9,8 mL de solução a 3,2 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa I: PIS-IMAC. Faixas 4-8: Frações de lavagem. Faixas 31-37: Frações de eluição imidazol 100 mM. Faixas 46-47: Frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 58: Fração de regeneração.

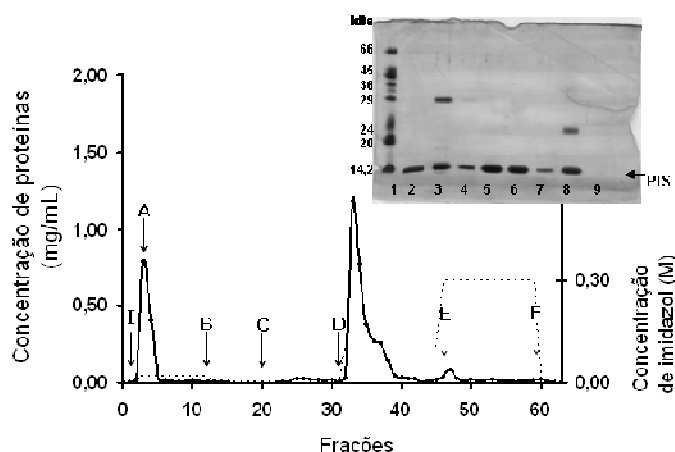


Figura 5.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-IMAC, em gel Sepharose-IDA-Ni(II). (I) Injeção: 3,0 mL de solução a 3,5 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-IMAC. Faixas 3-4: frações de lavagem. Faixas 33-35: Frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 8: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 9: “Pool” frações de regeneração.

Tabela 5.2: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em Sepharose-IDA-Ni(II).⁽¹⁾

Fração	Imidazol	Exp. 1 ⁽²⁾		Exp. 2 ⁽³⁾	
		(mg)	(%)	(mg)	(%)
Injeção	0 mM	31,47	100,00	10,57	100,00
Lavagem	20 mM	12,04	38,26	2,94	27,81
Eluição	100 mM	16,10	51,16	6,48	61,30
	300 mM	0,85	2,72	0,68	6,43
Regeneração	---	0,14	0,45	0,13	1,23
Total		29,14	92,59	10,23	96,78

(1) 3,0 mL de Sepharose-IDA-Ni(II). Densidade de ligante Ni(II): 37,8 $\mu\text{mol/mL}$ de gel

(2) Experimento 1: Injeção 9,8 mL de solução PIS-IMAC a 3,2 mg/mL de proteína total. Coluna equilibrada com tampão A

(3) Experimento 2: Injeção 3,0 mL de solução PIS-IMAC a 3,5 mg/mL de proteína total. Coluna equilibrada com tampão A.

O perfil cromatográfico obtido nos experimentos com PIS-IMAC comprovou que o adsorvente sintetizado no LIMBio foi capaz de adsorver PIS (5,69 e 2,43 mg pró-insulina/mL de gel para experimentos 1 e 2, respectivamente), obtendo-se valores entre 55 a 65% de proteínas totais adsorvidas (do total de proteínas injetado na coluna), valores similares àqueles obtidos por AQUINO (2004).

5.3.2 Efeito do tampão de equilíbrio na adsorção de PIS a partir de solução clarificada

O efeito da adição de imidazol, uréia e NaCl no tampão de equilíbrio da coluna visando a purificação de PIS a partir da solução clarificada foi avaliada em termos da capacidade de adsorção de PIS e da seletividade do adsorvente. Para tanto, foram empregados os seguintes tampões de equilíbrio: Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (tampão A), Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo imidazol 20 mM (Tampão B) e Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo NaCl 500 mM e uréia 7,5 M (Tampão F).

A escolha do tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 se deveu ao fato do Tris ser um agente competitivo (presença de um grupo amino primário) e, por esse motivo, tem sido utilizado na purificação de proteínas com cauda de poli(histidina) para evitar interações não específicas de impurezas, melhorando a seletividade. A adição de 20 mM de imidazol no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (tampão B) teve o objetivo de saturar a coluna de IMAC com imidazol antes da separação cromatográfica, para que não ocorresse queda do pH causada pelo efeito de protonação do imidazol durante a eluição, evitando problemas com proteínas sensíveis ao abaixamento do pH, e até mesmo precipitação das proteínas dentro da coluna (GABERC-POREKAR e MENART, 2001).

A adição de NaCl e uréia no tampão Tris-HCl 30 mM pH 7,5 (tampão F) teve a finalidade de diminuir as interações eletrostáticas não específicas e manter a pró-insulina desnaturada, deixando a cauda de poli(histidina) acessível para ligações com os íons metálicos (GABERC-POREKAR e MENART, 2001 e CHAGA et al., 2001).

As análises por SDS-PAGE dos “pools” das frações correspondentes aos picos cromatográficos de lavagem e eluição e as quantificação da proteína eluída, obtida da

purificação de PIS em Sepharose-IDA-Ni(II), equilibrada com tampão A, tampão B e tampão F e estão apresentados nas Figuras 5.5 e 5.6.

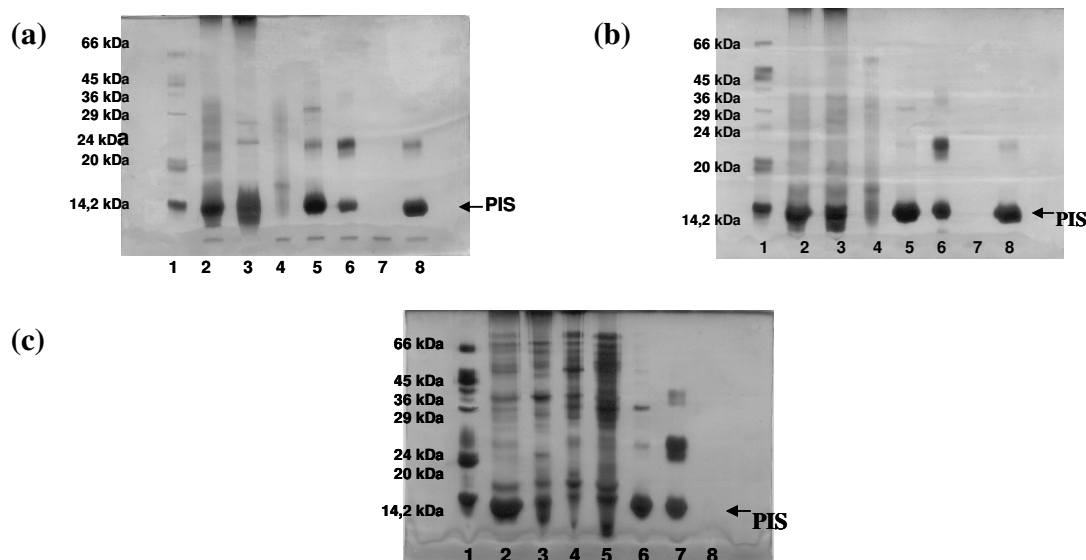


Figura 5.5: Perfil eletroforético da cromatografia a partir de solução PIS-C na concentração de 2,8 mg/mL em gel de Sepharose-IDA-Ni(II). (a) Coluna equilibrada com tampão A, (b) Coluna equilibrada com tampão B e (c) Coluna equilibrada com tampão F. Eletroforeses SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. (a) e (b): Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-4: “Pool” frações de lavagem. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 7: “Pool” frações de regeneração. Fração 8: Marcador PIS (PIS-IMAC). (c): Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-5: “Pool” frações de lavagem. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 7: “Pool” frações de eluição de imidazol 300 mM. Faixa 8: “Pool” das frações de regeneração.

Em todas as condições de equilíbrio testadas, o adsorvente Sepharose-IDA-Ni(II) apresentou capacidades de adsorção similares (cerca de 3,0 mg de proteína total/mL de gel), correspondendo cerca de 50% do total de proteína alimentada. Não foram notadas alterações com relação à seletividade em cada um dos experimentos, analisados por eletroforese SDS-PAGE. Observa-se a presença de bandas de impurezas nas faixas de eluição, algumas das quais são visualizadas também no marcador PIS-IMAC (Figuras 5.1. e 5.5 a e 5.5 b).

Devido ao fato de não ter sido observado grandes variações na porcentagem de proteínas adsorvidas nas diferentes condições tamponantes testadas (Figura 5.6), para fins

de padronização, a condição de equilíbrio da coluna escolhida foi tampão Tris-HCl 30 mM a pH 7,5 (Tampão A), tampão esse mais simples e também utilizado por TIKHONOV et al. (2001) e AQUINO et al. (2006) em experimentos de purificação de pró-insulina recombinante com cauda de poli(histidina).

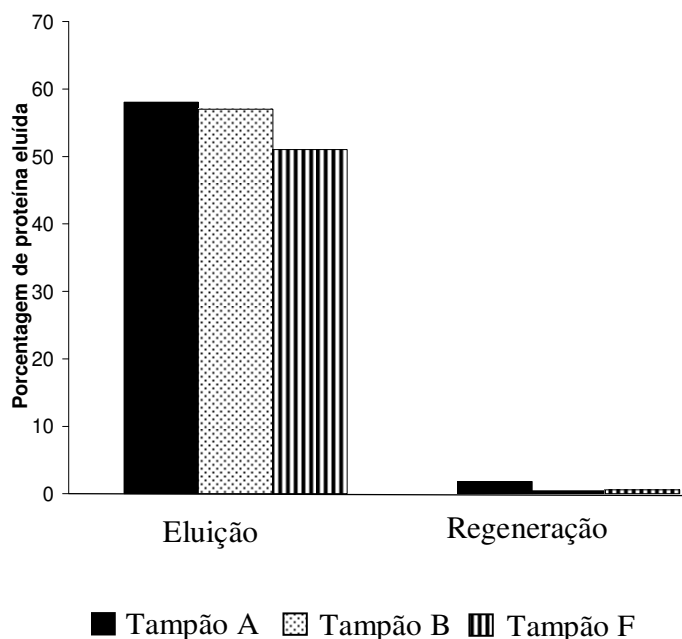


Figura 5.6: Porcentagem de proteína total eluída do gel Sepharose-IDA-Ni(II) das cromatografias realizadas em diferentes tampões de equilíbrio.

5.4 Adsorção de PIS a partir da solução clarificada nos géis Sepharose -IDA-Ni(II), -CM-Asp-Ni(II), -TED-Ni(II), -TREN-Ni(II) e HisTrap-Ni(II)

Os resultados das cromatografias de purificação de PIS a partir da solução PIS-C nos adsorventes Sepharose -IDA-Ni(II), -CM-Asp-Ni(II), -TED-Ni(II), -TREN-Ni(II) e HisTrap-Ni(II) estão apresentados na Figura 5.7 e o balanço de massa, na Tabela 5.3. As duplicatas dos experimentos encontram-se no Apêndice A.

A capacidade de adsorção dos adsorventes estudados, em termos de proteína total, seguiu a seguinte ordem: IDA > TREN $\cong$ HisTrap > CM-Asp > TED. De acordo com CHAGA, 2001, a capacidade de adsorção de proteínas em adsorventes IMAC segue a ordem IDA > NTA $\geq$ CM-Asp > TED (o agente quelante TREN não foi estudado por CHAGA, 2001), pois quanto mais polidentado o agente quelante, menor o número de sítios

disponíveis para a coordenação com a proteína e mais fraca é a interação com a mesma, conseqüentemente, menor a capacidade de adsorção.

Em termos de PIS sulfonada, quantificada por HPLC, o agente quelante TREN apresentou 49,2% de PIS adsorvida (Figura 5.9 e Tabela 5.3), enquanto que IDA, HisTrap, CM-Asp e TED apresentaram 31,5%, 23,9%, 6,3% e 1,3%, respectivamente de PIS adsorvida. Para PIS sulfonada, a ordem de capacidade de adsorção foi alterada para TREN > IDA > HisTrap > CM-Asp > TED, contrariando a ordem estabelecida por Chaga 2001 em termos de proteína total. O TREN apresentou maior capacidade de adsorção de PIS sulfonada, e, além disso, apresentou comportamento distinto em relação aos demais adsorventes estudados no que diz respeito a força de retenção da PIS (Figura 5.9 e Tabela 3.1). Apesar da Sepharose-TREN-Ni(II) ter apresentado capacidade de adsorção em termos de proteína total próxima à dos adsorventes HisTrap e Sepharose-IDA-Ni(II), do total de proteínas adsorvidas (10,24 mg), 65% foram dessorvidas com imidazol e 35% com EDTA (forte retenção). O agente quelante TREN apresenta característica distinta, que difere dos demais agentes quelantes: dispõe somente de átomos de nitrogênio para coordenação com o íon metálico, sendo que 2 são de aminas primárias, um de amina secundária e um de amina terciária, enquanto IDA e CM-Asp apresentam somente 1 átomo de nitrogênio, e o TED, 2 átomos de nitrogênio. Essa diferença estrutural acarreta ao TREN uma carga líquida total positiva a pH 7,5 (carga baseada no complexo agente quelante-íon metálico imobilizado), pois o TREN apresenta carga nula em pH acima de 10,5, valor muito superior ao dos demais agentes quelantes estudados (Tabela 3.4 do capítulo 3, Revisão Bibliográfica). Possivelmente o TREN apresente repulsão eletrostática pelas proteínas de carga positiva, atraindo a pró-insulina sulfonada, fazendo com que a interação entre o complexo formado por TREN-Ni(II)-PIS seja muito forte (pI de PIS próximo a 5,5, MORGULHÃO, 2004).

Além das possíveis interações eletrostáticas, as diferenças entre os agentes quelantes CM-Asp e TREN, em termos de capacidade de adsorção de proteína total e de PIS sulfonada (ambos quelantes tetradentados), podem ser explicadas pela diferença entre os anéis quelatos formados entre o agente quelante e o íon metálico imobilizado. O agente quelante CM-Asp forma 2 anéis quelatos de 5 átomos e 1 anel de 6 átomos, fator de estabilidade diferente do apresentado pelo agente quelante TREN, que apresenta três anéis de 5 átomos (PORATH, 1988). No caso do CM-Asp, o tipo de anéis quelatos formados

implica em maior impedimento estérico, fazendo com que a capacidade de adsorção de pró-insulina diminua.

Apesar dos quelatos IDA-Ni(II) e TREN-Ni(II) terem apresentado maior capacidade dinâmica de adsorção em termos de proteína total e de PIS sulfonada, os quelatos CM-Asp-Ni(II) e TED-Ni(II) apresentaram melhor seletividade, observada pelas análises eletroforéticas (SDS-PAGE). A maior seletividade do TED-Ni(II) se deve, provavelmente, ao fato deste agente quelante ser pentadentado, deixando somente um sítio livre para a adsorção de proteínas.

Quanto ao adsorvente HisTrap-Ni(II), pelo fato de não se conhecer a estrutura do agente quelante imobilizado, não se pode inferir sobre o fenômeno de quelação. Em termos de capacidade de adsorção de proteína total, o resultado obtido para este adsorvente foi próximo ao obtido por MALIK e colaboradores (2007), os quais utilizaram a coluna HisTrap para a purificação de pró-insulina com cauda de ecotina.

Os valores de pureza das frações de eluição não foram calculados neste trabalho, uma vez que a coluna de troca iônica utilizada para determinação de PIS por HPLC adsorve somente a PIS sulfonada (que tem carga negativa), não quantificando, portanto, a PIS não sulfonada. Segundo informações da empresa BIOMM, a solução de PIS-C (obtida após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise) contém PIS sulfonada e não sulfonada. O grau de pureza das frações eluídas seria calculado como a razão entre a massa de PIS e a massa de proteína total da fração multiplicado por 100. Como o método de BRADFORD utilizado para determinação de proteínas totais não diferencia a PIS sulfonada da PIS não sulfonada, os valores de proteína total obtidos nas etapas de eluição são bem maiores que os valores obtidos por HPLC. Isto indica, portanto, um grau de pureza muito baixo, que não condiz com os perfis eletroforéticos obtidos para todos os agentes quelantes utilizados, que mostram bom grau de pureza, segundo análise através do software GelQuantNET version 1.6.8 (BioChemLab Solutions) de aproximadamente de 80 a 95% .

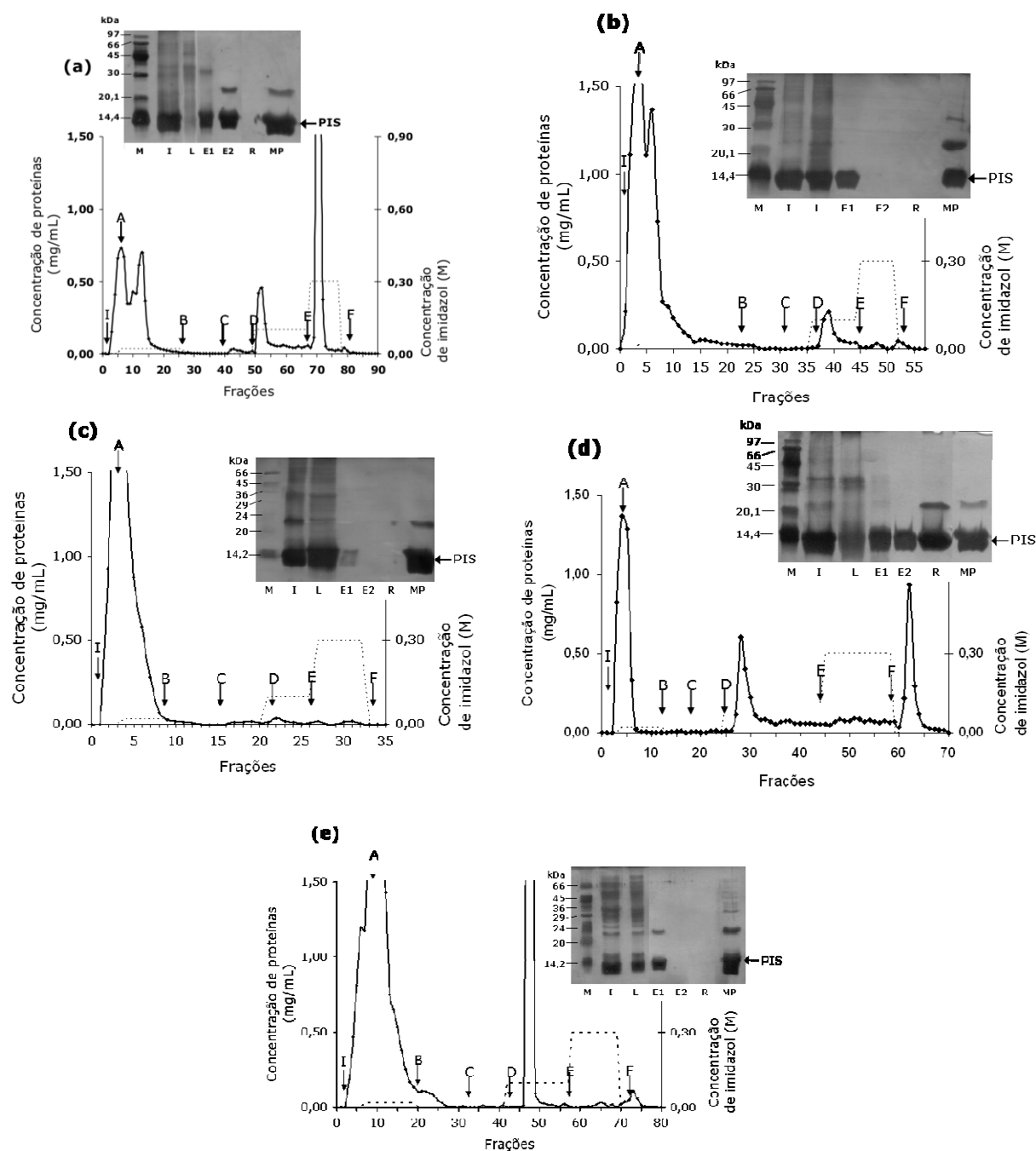


Figura 5.7: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em (a) Sepharose-IDA-Ni(II). (b) Sepharose-CM-Asp-Ni(II). (c) Sepharose-TED-Ni(II). (d) em Sepharose-TREN-Ni(II). (e) HisTrap-Ni(II). Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa M: Marcadores de baixa massa molecular (Sigma, EUA, e GE Healthcare, EUA). Faixa I: PIS-C. Faixas L: “Pool” frações de lavagem. Faixa E1: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa E2: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa R: “Pool” frações da regeneração. Faixa MP: Marcador de PIS (PIS-IMAC).

Tabela 5.3: Quantidades de proteína total e PIS sulfonada obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias com PIS-C.

Agente Quelante	Dosagem de Proteína		Injeção	Lavagem	Eluição		Regeneração	Total
					100 mM	300 mM		
IDA ¹	Bradford ⁶	(mg)	24,52	12,9	3,66	10,65	0,22	27,43
		(%)	100,00	52,61	14,92	43,43	0,90	111,87
	HPLC ⁷	(mg)	7,84	4,46	0,65	1,71	0,11	6,93
		(%)	100,00	56,89	8,29	21,81	1,40	88,39
CM-Asp ²	Bradford	(mg)	22,22	19,14	1,36	0,18	0,18	20,86
		(%)	100,00	86,14	6,12	0,81	0,81	93,88
	HPLC	(mg)	5,90	4,54	0,26	0,06	0,05	4,92
		(%)	100,00	76,95	4,41	1,02	0,85	83,39
TED ³	Bradford	(mg)	13,67	13,67	0,16	0,07	0,07	13,97
		(%)	100,00	100,00	1,17	0,51	0,51	102,19
	HPLC	(mg)	3,04	3,02	0,04	nd	nd	3,06
		(%)	100,00	99,34	1,31	-	-	100,66
TREN ⁴	Bradford	(mg)	19,86	7,82	4,65	2,02	3,57	18,06
		(%)	100,00	39,37	23,41	10,17	17,97	90,94
	HPLC	(mg)	5,96	2,26	0,71	0,64	1,58	5,19
		(%)	100,00	37,92	11,91	10,74	26,51	87,08
HisTrap ⁵	Bradford	(mg)	44,59	32,23	15,22	0,25	0,56	23,23
		(%)	100,00	72,43	34,14	0,55	1,25	108,24
	HPLC	(mg)	14,94	8,26	3,30	0,17	0,1	11,83
		(%)	100,00	55,29	22,09	1,14	0,67	79,18

(1) Experimento 1 :Coluna 3,0 mL Sepharose-IDA-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II) 43,2 µmol/mL de gel. Injeção 6,0 mL a 4,1 mg/mL de solução PIS-C.

(2) Experimento 2 :Coluna 3,0 mL Sepharose-CM-Asp-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II) 13,3 µmol/mL de gel. Injeção 7,0 mL a 3,2 mg/mL de solução PIS-C.

(3) Experimento 3: Coluna 2,0 mL Sepharose-TED-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II) 10,0 µmol/mL de gel. Injeção 5,0 mL a 2,7 mg/mL de solução PIS-C.

(4) Experimento 4: Coluna 3,0 mL Sepharose-TREN-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II) 32,7 µmol/mL de gel. Injeção 7,0 mL a 2,9 mg/mL de solução PIS-C.

(5) Experimento 5: Coluna 5,0 mL HisTrap-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante 15 µmol/mL de gel. Injeção 12,0 mL a 3,7 mg/mL de solução PIS-C.

(6) Proteínas totais, medida pelo método de Bradford (1976)

(7) PIS sulfonada, medida por HPLC.

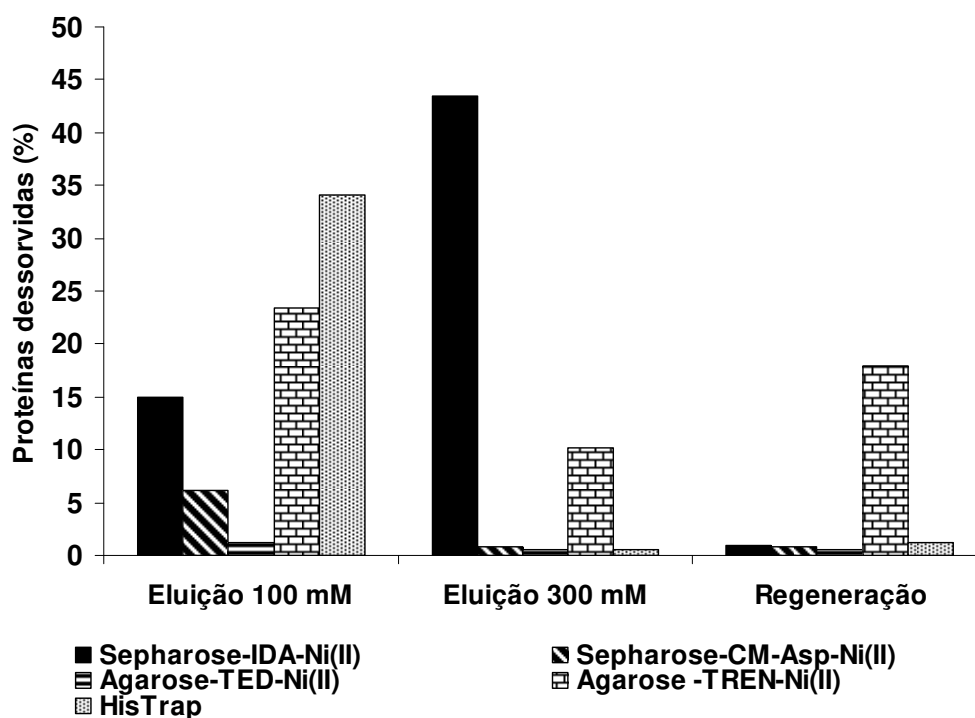


Figura 5.8: Porcentagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976) desorvidas das cromatografias realizadas com solução de pró-insulina clarificada.

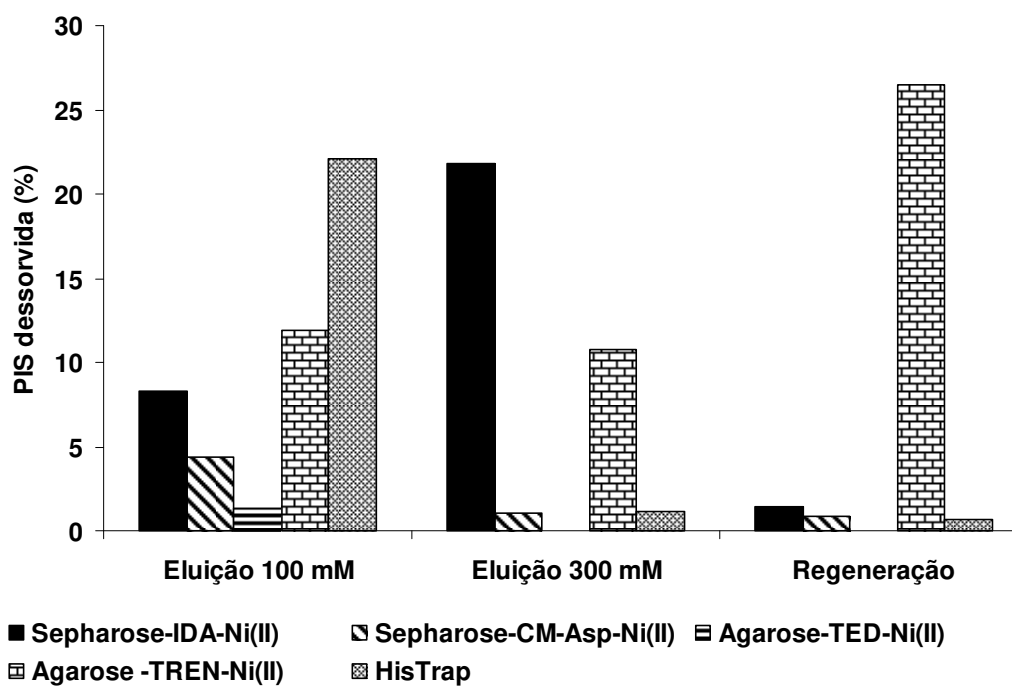


Figura 5.9: Porcentagem de PIS sulfonada (quantificada por HPLC) desorvida das cromatografias realizadas com solução de pró-insulina clarificada.

5.5 Isotermas de adsorção de pró-insulina recombinante.

5.5.1 Determinação da capacidade máxima e da constante de dissociação

Os experimentos para a determinação das isotermas de adsorção de PIS para os adsorventes Sepharose-IDA-Ni(II), Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TREN-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II) e HisTrap-Ni(II) foram realizados conforme procedimento descrito no item 4.5.7 do capítulo Materiais e Métodos. Com os dados experimentais de adsorção de PIS a 25°C foram construídas isotermas e os parâmetros capacidade máxima de adsorção (Q_m) e a constante de dissociação do complexo agente quelante-Ni(II)-PIS (K_d) foram ajustados segundo o modelo de Langmuir (Figura 5.10 e Tabela 5.4).

Os resultados obtidos a 25°C mostram que, dependendo do agente quelante utilizado, ocorre uma variação na constante de dissociação K_d da ordem de uma magnitude (10^{-6} M e 10^{-7} M). Os valores de K_d encontrados seguem a seguinte ordem: TED > TREN $\cong$ CM-Asp > IDA $\cong$ HisTrap, ou seja, os ligantes IDA-Ni(II) e HisTrap-Ni(II) (agente quelante não divulgado pelo fornecedor) apresentam maior afinidade pela PIS que os demais ligantes. Esta ordem também foi obtida por RIBEIRO (2006) para adsorção de IgG humana (imunoglobulina G), com ligantes TREN-Ni(II), CM-Asp-Ni(II) e IDA-Ni(II) imobilizados em membranas de fibras ocas de álcool poli(etilenovinílico). Apesar dos íons metálicos imobilizados serem considerados ligantes pseudobioespecíficos, neste trabalho os valores de K_d obtidos para os complexos IDA-Ni(II)-PIS (10^{-7} M) e HisTrap-Ni(II)-PIS (10^{-7} M) foram valores típicos de ligantes de bioespecíficos.

Com relação à capacidade máxima de adsorção, Q_m , ela pode ser o mais que o dobro, dependendo do agente quelante utilizado (69,20 e 172,80 mg de PIS/mL de adsorvente, para TED e TREN, respectivamente). Em termos de capacidade máxima de adsorção, tem-se a seguinte ordem: TREN $\cong$ HisTrap > IDA > CM-Asp > TED. Esta ordem na capacidade de adsorção de PIS diferiu ligeiramente da observada em modo dinâmico para PIS sulfonada: TREN > IDA > HisTrap > CM-Asp > TED. Além disso, a capacidade de adsorção de PIS sulfonada em Sepharose-CM-Asp-Ni(II) em modo dinâmico foi muito mais baixa que a dos adsorventes Sepharose-TREN-Ni(II) e HisTrap-Ni(II), o que não foi observado para os valores de Q_m .

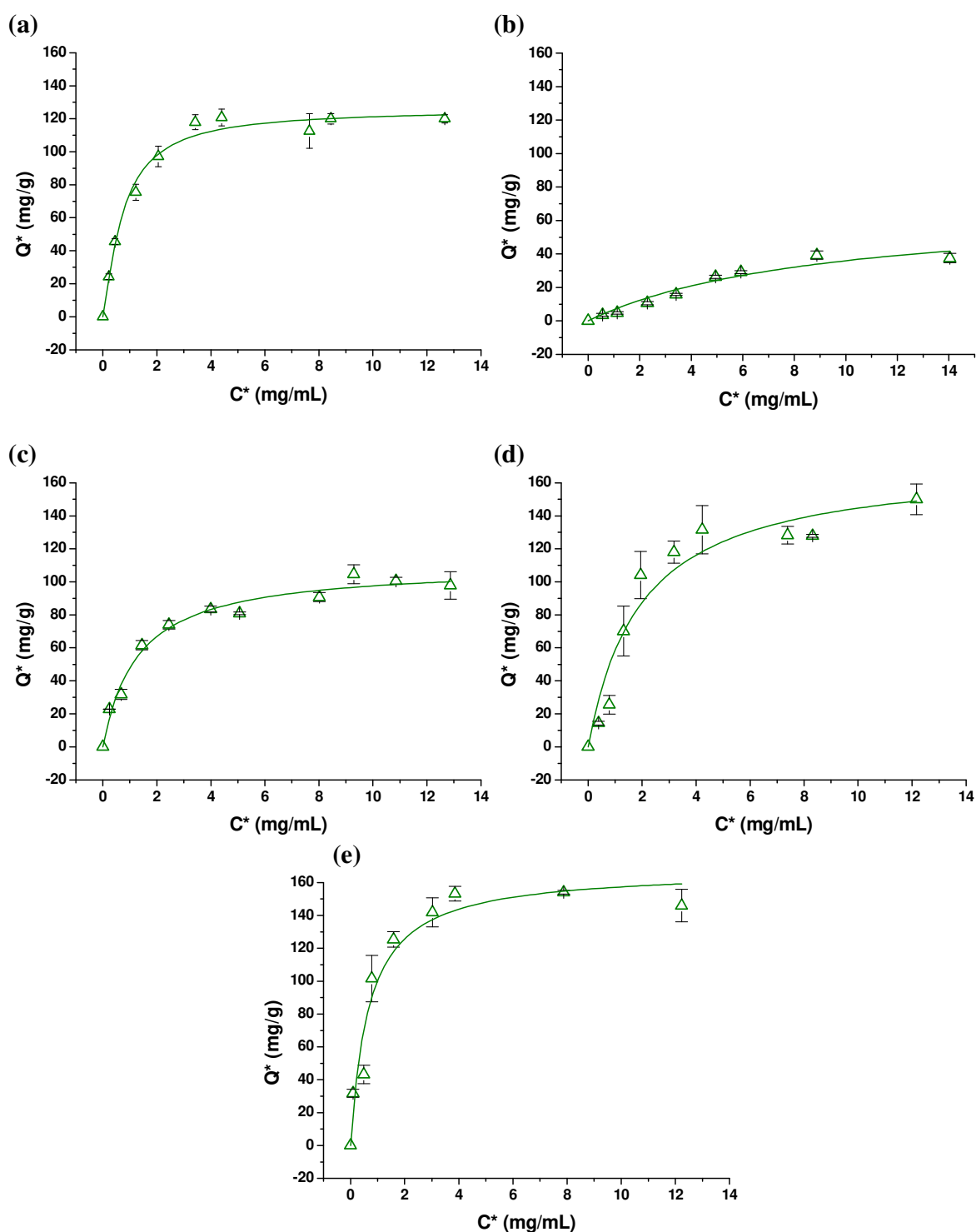


Figura 5.10: Isotermas de adsorção de PIS a 25°C em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio e a linha contínua, a curva ajustada segundo modelo de Langmuir.

Tabela 5.4: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de PIS a 25°C.

<i>Ligante de afinidade</i>	<i>Q_m (mg/g)</i>	<i>K_d (mol/L)</i>	<i>R²</i>	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>
IDA-Ni(II)	133,09 ± 4,47	(8,10 ± 1,2) x 10 ⁻⁷	0,98	31,56	5,62
TED-Ni(II)	69,22 ± 14,34	(9,24 ± 3,46) x 10 ⁻⁶	0,95	11,67	3,41
CM-Asp-Ni(II)	110,18 ± 3,85	(1,30 ± 0,19) x 10 ⁻⁶	0,98	24,24	4,92
TREN-Ni(II)	172,82 ± 16,03	(1,95 ± 0,56) x 10 ⁻⁶	0,94	201,2	14,18
HisTrap-Ni(II)	167,98 ± 10,85	(6,78 ± 0,18) x 10 ⁻⁷	0,95	195,37	13,98

Os experimentos em modo dinâmico foram realizados com soluções clarificadas, contendo grande quantidade de impurezas (diferentemente dos realizados para determinação da isoterma de adsorção), das quais algumas também adsorvem no íon Ni(II) imobilizado, competindo com a PIS pelos sítios de adsorção. Como para determinação das isotermas é utilizada PIS com alta pureza, não há competição das proteínas pelos sítios de adsorção.

Segundo os valores dos coeficientes de correlação (Tabela 5.4), o modelo de Langmuir não representou muito bem os dados experimentais de adsorção de PIS para todos os adsorventes estudados. Com a finalidade de avaliar a validade do ajuste, foi realizada a linearização da equação de Langmuir (equação de Scatchard) (Figura 5.11).

A análise do gráfico de Scatchard indica que os dados de adsorção de PIS nos adsorventes estudados apresentaram comportamento linear somente no caso do adsorvente Sepharose-IDA-Ni(II), indicando a validade do modelo de Langmuir para esse caso. Para os demais adsorventes, o gráfico de Scatchard apresentou comportamento não linear, indicando a existência de desvios do modelo de Langmuir, tais como a existência de cooperatividade proteína-proteína, ou heterogeneidade da superfície, acarretando a existência de múltiplas interações entre o adsorvente e os grupos funcionais das biomoléculas.

Como o modelo de Langmuir não representou bem os dados experimentais, empregou-se o modelo semi-empírico Langmuir-Freundlich, que leva em consideração a existência de cooperatividade e heterogeneidade da superfície do adsorvente (SHARMA e AGARWAL, 2001). A Figura 5.12 apresenta os dados experimentais e a curva ajustada

segundo o modelo de Langmuir-Freundlich e os parâmetros ajustados do modelo estão apresentados na Tabela 5.5.

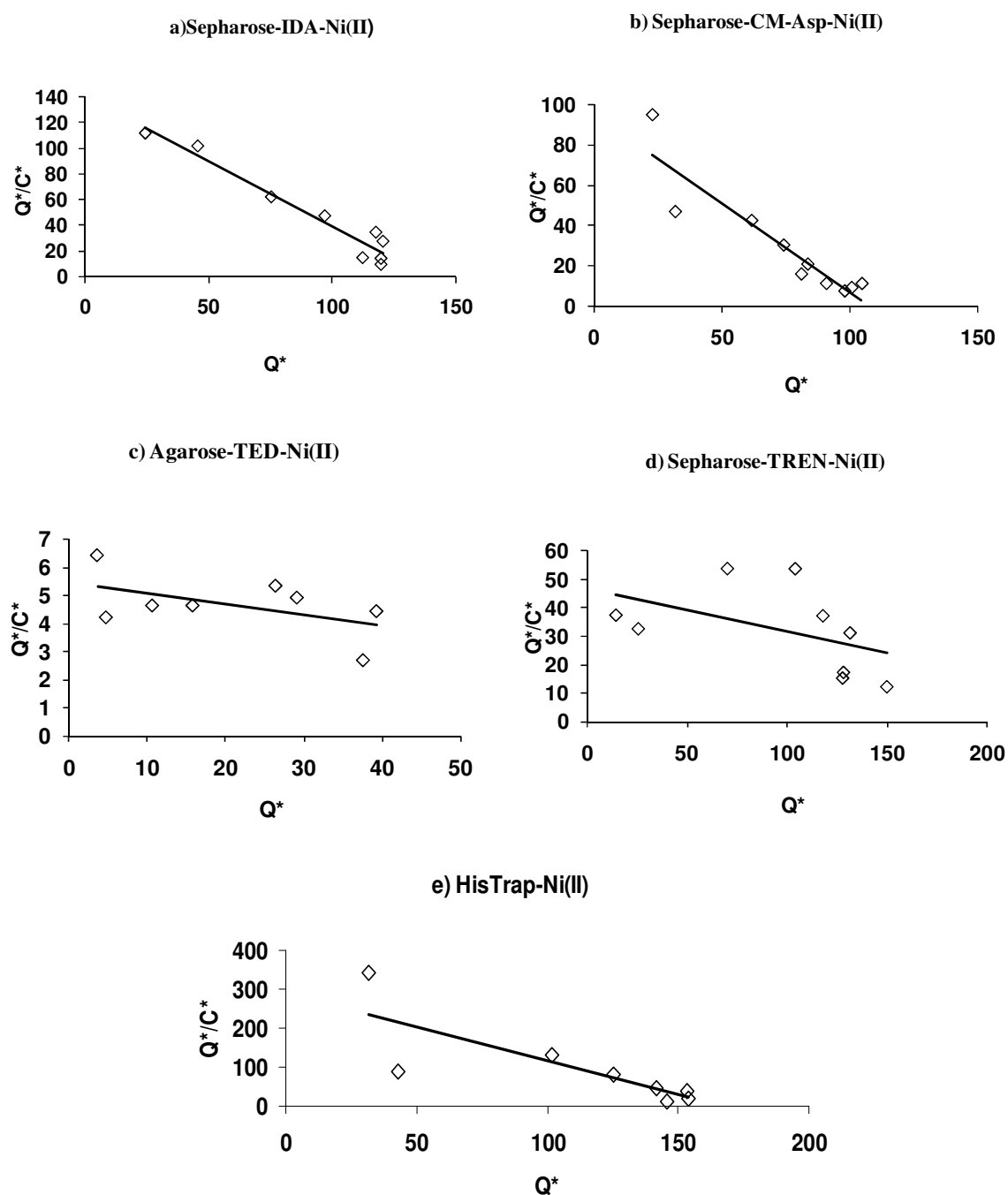


Figura 5.11: Gráfico de Scatchard para os dados de adsorção de PIS nos adsorventes a) Sepharose-IDA-Ni(II), $R^2 = 0,95$; b) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), $R^2 = 0,85$; c) Agarose-TED-Ni(II), $R^2 = 0,27$; d) Sepharose-TREN-Ni(II), $R^2 = 0,23$; e) HisTrap-Ni(II), $R^2 = 0,64$.

Os ajustes de parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich apresentaram valores de coeficiente de correlação mais próximos a 1,0 quando comparados àqueles obtidos pelo modelo de Langmuir, porém o parâmetro $K_{d(LF)}$ corresponde a constante aparente de dissociação do complexo agente quelante-Ni(II)-PIS. Os valores de $K_{d(LF)}$ obtidos estão na faixa de 10^{-5} a 10^{-7} M. Quanto à capacidade máxima de adsorção (Q_m), os valores dos parâmetros ajustados pela equação de Langmuir foram muito próximos dos ajustados segundo equação de Langmuir-Freundlich.

Segundo o modelo de Langmuir-Freundlich, obteve-se, exceto para CM-Asp-Ni(II), valores de n maior que 1 para todos os adsorvente, indicando cooperatividade positiva, ou seja, a adsorção de uma molécula de PIS favorece a adsorção de outra molécula desta proteína no adsorvente. SHARMA E AGARWAL (2002) também obtiveram valores de n maiores que 1,0 para a adsorção de lisozima em Sepharose-IDA-Ni(II) ($n = 1,70$) e Sepharose-TREN-Ni(II) ($n = 1,81$). Para Sepharose-CM-Asp-Ni(II), pode-se considerar o valor de n igual a 1, mostrando a inexistência de cooperatividade.

Tabela 5.5: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de PIS

<i>Ligante de afinidade</i>	Q_m (mg/g)	$K_{d(LF)}$ (mol/L)	n	R^2	<i>Variância</i>	<i>Desvio padrão</i>
IDA-Ni(II)	125,76 ± 5,09	$(6,88 \pm 1,32) \times 10^{-7}$	1,25 ± 0,18	0,99	31,55	5,62
TED-Ni(II)	43,14 ± 4,05	$(1,66 \pm 0,73) \times 10^{-5}$	2,01 ± 0,41	0,98	5,54	2,75
CM-Asp-Ni(II)	114,56 ± 10,73	$(1,38 \pm 0,28) \times 10^{-6}$	0,91 ± 0,17	0,98	26,45	5,14
TREN-Ni(II)	136,98 ± 4,79	$(1,87 \pm 0,35) \times 10^{-6}$	2,41 ± 0,41	0,98	61,04	7,81
HisTrap-Ni(II)	154,56 ± 10,74	$(4,97 \pm 0,21) \times 10^{-7}$	1,63 ± 0,57	0,96	197,61	10,06

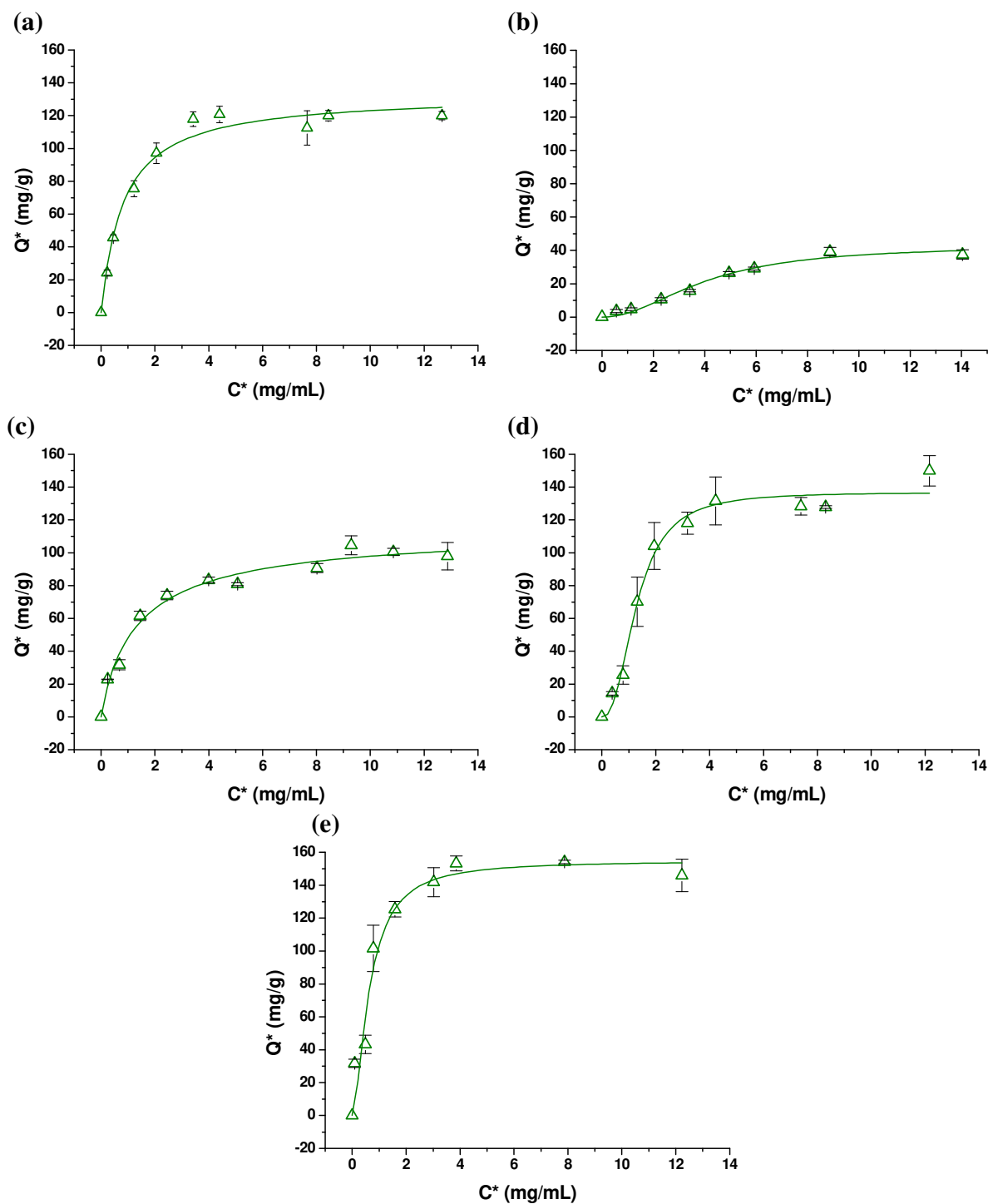


Figura 5.12: Isotherma de adsorção de PIS a 25°C em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio e a linha contínua, a curva ajustada segundo modelo de Langmuir-Freundlich.

5.6 Determinação de parâmetros termodinâmicos para adsorção de PIS

A natureza das interações entre pró-insulina recombinante e níquel quelatado (AQ-Ni(II)) foi investigada com base na análise dos parâmetros termodinâmicos de adsorção ΔG° , ΔH° e ΔS° , calculados a partir da equação de Van't Hoff (4.2). Para cálculo dos parâmetros termodinâmicos, foram realizados experimentos para determinação de isotermas de adsorção a temperaturas constante de 4°C, 15°C, 25°C, 37°C e 45°C. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e foram calculados os desvios para todos os sistemas em todas as temperaturas. O ajuste não-linear segundo modelo de Langmuir (Figura 5.13) forneceram, para cada temperatura estudada, valores da constante de dissociação K_d (Tabela 5.6). Foram realizados também os ajustes de acordo com o modelo de Langmuir-Freundlich, cujos gráficos e parâmetros obtidos deste ajuste encontram-se no apêndice B.

Os valores de K_d obtidos para maioria dos casos (10^{-5} M e 10^{-6} M) são típicos de ligantes pseudobioespecíficos, enquanto que os valores de K_d obtidos para IDA-Ni(II)-PIS e HisTrap-Ni(II)-PIS a 25°C (K_d igual a 10^{-7} M) são característicos de ligantes bioespecíficos.

Os adsorventes estudados não apresentaram linearidade no gráfico de Van't Hoff na faixa de temperatura estudada (4°C a 45°C), ou seja, a entalpia não é constante no delta de temperatura de 40°C (Figura 5.14). Observou-se, no entanto, que aumento de temperatura na faixa de 4°C a 25°C, exceto para Sepharose-TED-Ni(II), afetou de maneira similar o parâmetro K_d de todos os adsorventes (queda nos valores de K_d), indicando aumento da afinidade da PIS pelos quelatos metálicos (Figura 5.15), fato este também observado por RIBEIRO et al. (2008) para adsorção de IgG humana em Ni(II)-IDA-PEVA. O oposto foi observado para a capacidade de adsorção de PIS, que diminuiu com o aumento de temperatura, fenômeno também observado por RIBEIRO et al. (2008).

Na faixa de temperatura de 4°C a 25°C observa-se linearidade do gráfico de Van't Hoff (entalpia constante), sugerindo que o mecanismo de adsorção não é afetado significativamente nesta faixa (Figura 5.15). Para Sepharose-TED-Ni(II), observa-se linearidade na faixa de temperatura de 25 a 45°C (Figura 5.15), provavelmente pelo fato deste agente quelante ser pentadentado e a ligação de coordenação da PIS com o íon níquel ser muito fraca, predominando outros tipos de interações, como hidrofóbicas. As faixas de temperatura que apresentaram linearidade foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros

termodinâmicos de adsorção de PIS, de acordo com o procedimento, descrito por HAUPT et al. (1995), RIBEIRO (2006), THRASH Jr. et al. (2004) e CHANG et al. (2006), cujos valores de ΔH° são fornecidos através do coeficiente angular da reta obtida no gráfico de Van't Hoff (Tabela 5.7.)

A diminuição dos valores de K_d com o aumento da temperatura forneceu valores de ΔH° positivos para todos os casos, indicando que a adsorção de PIS nos quelatos estudados é um processo endotérmico (Tabela 5.7). O fenômeno endotérmico observado pode ser explicado com base na solvatação das moléculas de proteína e dos íons metálicos imobilizados. Para que a proteína seja adsorvida, ela deve perder parte da camada de hidratação dos resíduos de histidina (perda de moléculas de água ligados ao anel imidazol). Além disso, as moléculas de água ao redor dos íons metálicos imobilizados também são excluídas, sendo, em ambos os casos, um processo endotérmico e há aumento de entropia do sistema. Esta energia requerida para a desidratação é superior a energia liberada (processo exotérmico) para que ocorra a formação de ligações de coordenação e/ou outras interações como eletrostáticas entre a proteína e o íon metálico imobilizado, tendo como resultado líquido um processo endotérmico (LIN et al., 1999 e DONAT et al., 2005).

Os valores de ΔG° , que variaram de -26,30 a -34,78 kJ/mol (Tabela 5.7), foram negativos para todos os sistemas, indicando que a adsorção é espontânea e mais favorável com o aumento de temperatura. Esses valores de ΔG° são de magnitudes similares aos valores encontrados por FINETTE et al. (1997) para adsorção de lisozima (-23,2 a -24,3 kJ/mol) e albumina do soro humano (-28,3 a -29,4 kJ/mol) em Cu(II)-IDA-sílica e RIBEIRO et al. (2008), para adsorção de imunoglobulina G humana em Ni(II)-IDA-PEVA. Os valores de ΔS° encontrados foram positivos (Tabela 5.7) e pouco alterados com o aumento de temperatura em todos os casos, indicando um aumento na desordem total do sistema, favorecendo a complexação e estabilidade da proteína-íon metálico (DONAT et al., 2005).

Quanto à capacidade de adsorção de PIS dos sistemas estudados, esta foi desfavorecida com o aumento da temperatura na faixa linear, provavelmente as interações de coordenação e eletrostáticas promovam maior adsorção de PIS em temperaturas mais baixas, onde estas forças são favorecidas.

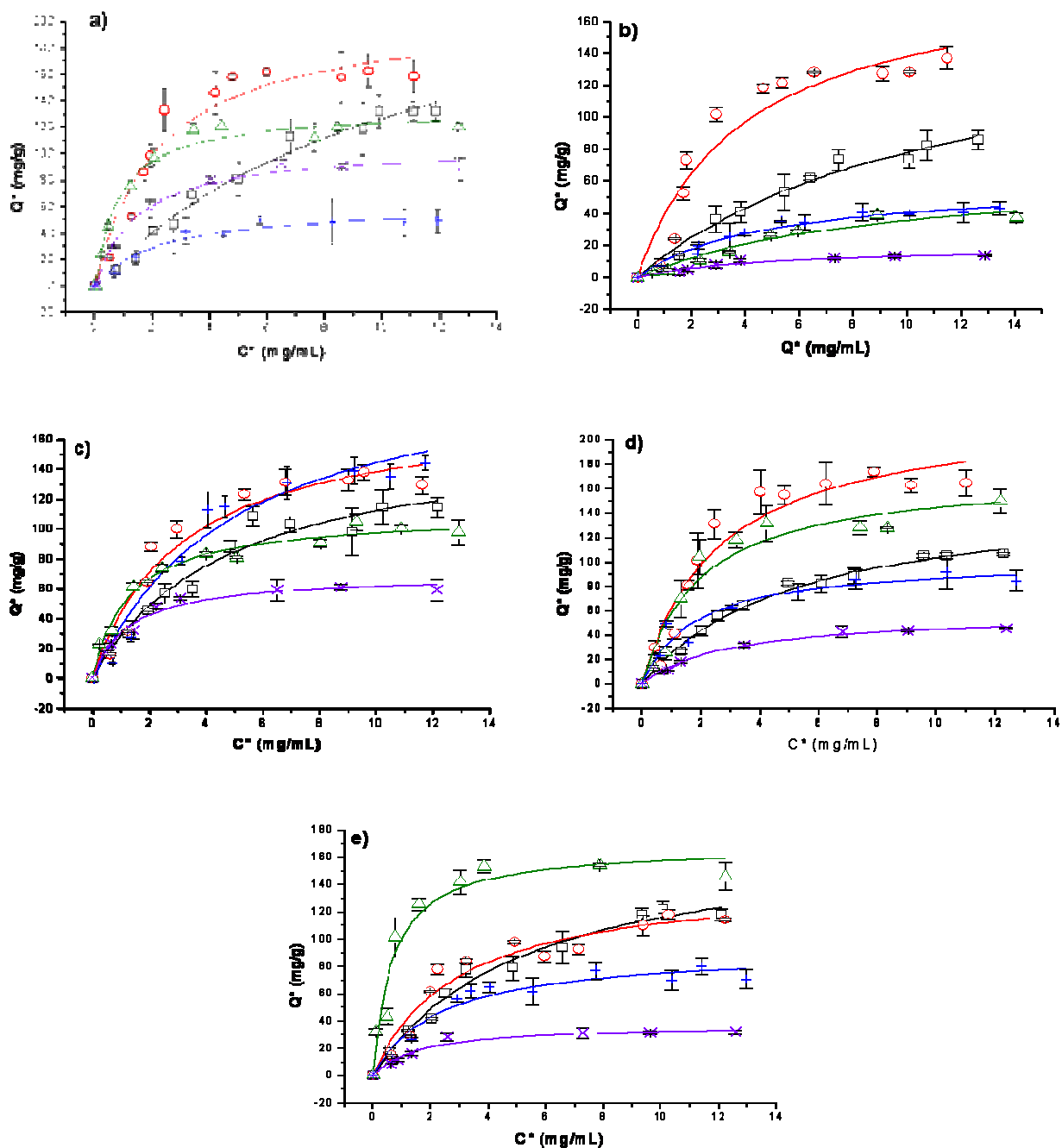


Figura 5.13: Isotermas de adsorção de PIS em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio ($\square$) 4°C, ($\circ$) 15°C, (Δ) 25°C, (+) 37°C e (x) 45°C e as linhas contínuas, as curvas ajustadas segundo modelo de Langmuir. 1 g de adsorvente seco corresponde a 3,0 mL de gel úmido.

Tabela 5.6: Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de PIS

Parâmetros		4°C	15 °C	25 °C	37 °C	45 °C
Sepharse- IDA-Ni(II)	Q _m (mg/g gel seco)	268,74 ± 32,70	207,27 ± 17,07	133,09 ± 4,47	61,05 ± 4,70	112,84 ± 9,55
	K _d (M)	(1,11 ± 0,23) x 10 ⁻⁵	(2,17 ± 0,54) x 10 ⁻⁶	(8,15 ± 1,25) x 10 ⁻⁷	(2,16 ± 0,57) x 10 ⁻⁶	(2,04 ± 0,57) x 10 ⁻⁶
	R ²	0,987	0,939	0,983	0,962	0,959
	Desvio padrão	6,52	15,31	5,62	3,93	7,89
Agarose- TED-Ni(II)	Q _m (mg/g gel seco)	167,84 ± 22,55	191,68 ± 26,42	69,22 ± 14,34	60,22 ± 4,08	19,34 ± 2,19
	K _d (M)	(1,14 ± 0,26) x 10 ⁻⁵	(3,87 ± 1,32) x 10 ⁻⁶	(9,24 ± 3,46) x 10 ⁻⁶	(4,79 ± 0,78) x 10 ⁻⁶	(4,41 ± 1,19) x 10 ⁻⁶
	R ²	0,984	0,912	0,954	0,977	0,961
	Desvio padrão	4,17	15,99	3,41	2,27	2,61
Sepharse- CM-Asp- Ni(II)	Q _m (mg/g gel seco)	167,08 ± 17,10	181,91 ± 17,51	110,18 ± 3,85	209,56 ± 25,62	69,83 ± 3,04
	K _d (M)	(4,84 ± 1,14) x 10 ⁻⁶	(3,12 ± 0,82) x 10 ⁻⁶	(1,30 ± 0,19) x 10 ⁻⁶	(4,71 ± 1,39) x 10 ⁻⁶	(1,28 ± 0,20) x 10 ⁻⁶
	R ²	0,961	0,947	0,982	0,962	0,981
	Desvio padrão	8,35	12,38	4,92	11,72	3,27
Sepharse- TREN-Ni(II)	Q _m (mg/g gel seco)	156,29 ± 8,15	224,52 ± 20,67	172,82 ± 16,03	101,77 ± 8,97	57,89 ± 2,44
	K _d (M)	(5,11 ± 0,61) x 10 ⁻⁶	(2,57 ± 0,66) x 10 ⁻⁶	(1,95 ± 0,56) x 10 ⁻⁶	(1,77 ± 0,54) x 10 ⁻⁶	(2,98 ± 0,36) x 10 ⁻⁶
	R ²	0,990	0,939	0,941	0,933	0,993
	Desvio padrão	3,88	16,64	14,18	8,85	3,86
HisTrap- Ni(II)	Q _m (mg/g gel seco)	176,83 ± 13,15	143,91 ± 12,49	167,98 ± 10,85	92,42 ± 7,46	37,21 ± 2,50
	K _d (M)	(5,26 ± 0,87) x 10 ⁻⁶	(2,92 ± 0,73) x 10 ⁻⁶	(6,72 ± 1,87) x 10 ⁻⁷	(2,34 ± 0,63) x 10 ⁻⁶	(1,59 ± 0,36) x 10 ⁻⁶
	R ²	0,982	0,945	0,951	0,945	0,964
	Desvio padrão	5,92	9,69	13,98	6,77	2,53

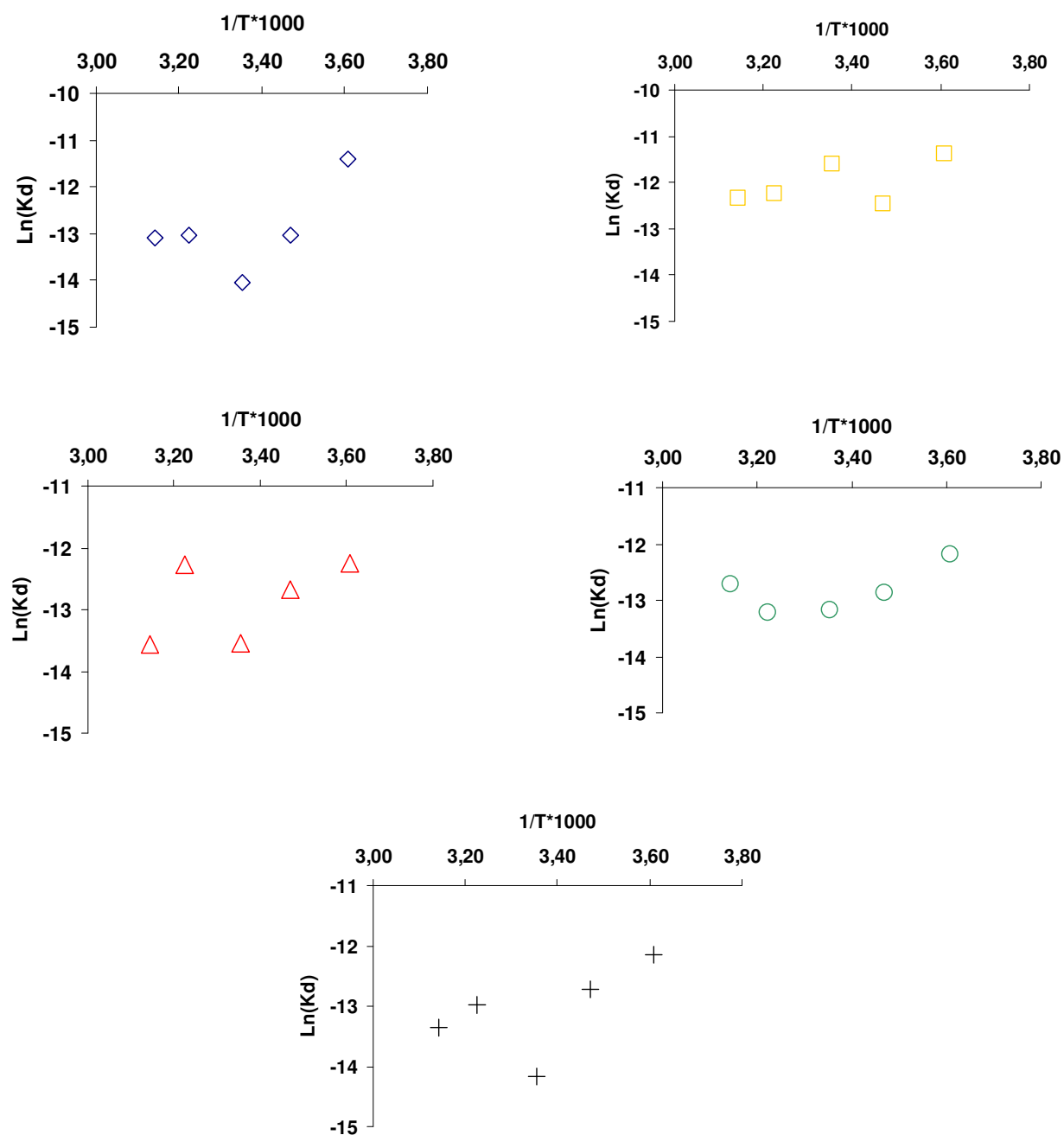


Figura 5.14: $\ln(K_d)$ calculado versus $1/T$ para de adsorção de PIS nos adsorventes ($\diamond$) IDA-Ni(II); ($\square$) TED-Ni(II); (Δ) CM-Asp-Ni(II); ($\circ$) TREN-Ni(II) e (+) HisTrap-Ni(II).

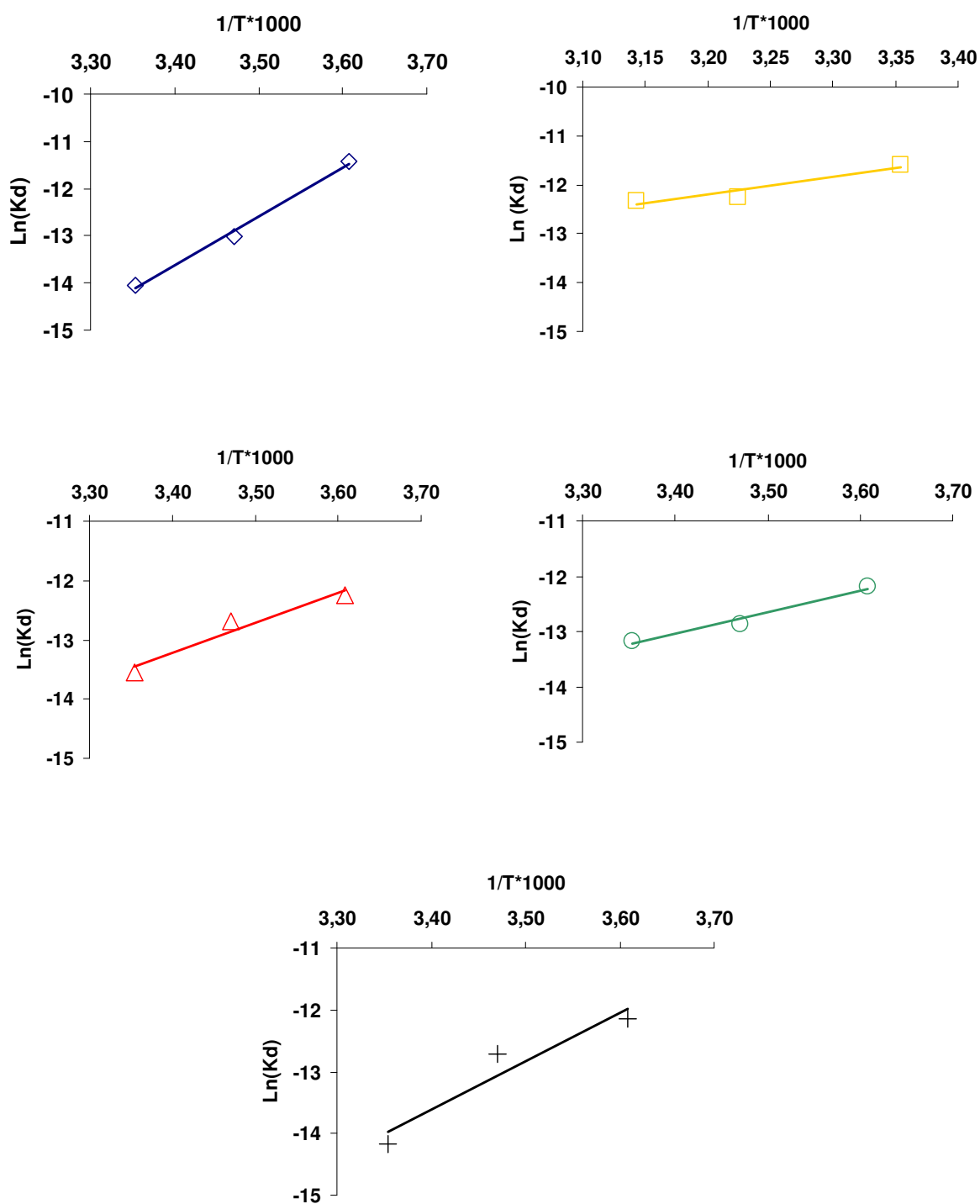


Figura 5.15: Gráfico de Van't Hoff para de adsorção de PIS nos adsorventes ($\diamond$) IDA-Ni(II) $R^2 = 0,993$; ($\square$) TED-Ni(II) $R^2 = 0,919$; (Δ) CM-Asp-Ni(II) $R^2 = 0,945$; ($\circ$) TREN-Ni(II) $R^2 = 0,975$ e (+) HisTrap-Ni(II) $R^2 = 0,915$.

Tabela 5.7: Parâmetros termodinâmicos para adsorção de PIS.

Adsorvente	Temperatura	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (J/molK)
IDA-Ni(II)	4°C	-26,30	86,05	405,36
	15°C	-31,19		406,88
	25°C	-34,78		405,27
TED-Ni(II)	25°C	-28,72	30,13	197,39
	37°C	-31,57		198,94
	45°C	-32,60		197,18
CM-Asp-Ni(II)	4°C	-28,21	42,22	254,10
	15°C	-30,37		251,92
	25°C	-33,58		254,23
TREN-Ni(II)	4°C	-28,07	32,54	218,67
	15°C	-30,79		219,79
	25°C	-32,64		218,61
HisTrap-Ni(II)	4°C	-27,98	18,83	336,91
	15°C	-30,45		332,05
	25°C	-35,11		336,55

5.7 Curva de ruptura: determinação da capacidade dinâmica de adsorção de PIS

Os experimentos para obtenção das curvas de ruptura (“breakthrough curves”) para os adsorventes Sepharose-IDA-Ni(II) e Sepharose-TREN-Ni(II) foram realizadas visando a determinação da capacidade dinâmica de adsorção de PIS, da perda de PIS no efluente durante a alimentação e o tempo de processo. Os adsorventes IDA-Ni(II) e TREN-Ni(II) foram escolhidos devido ao fato de terem apresentado as maiores capacidades de adsorção de PIS a 25°C.

Foram realizados experimentos em colunas com 3,0 mL de adsorvente, com vazões de alimentação de 0,5 mL/min e 1,0 mL/min, visando verificar o efeito do tempo de residência na adsorção da PIS. Alimentou-se, nestes experimentos, solução de PIS-C em tampão F (Tris-HCl 30 mM pH 7,5 contendo 7,5 M de uréia e 0,5 M de NaCl). Após

atingidos concentrações de proteína constante no efluente, seguiu-se o procedimento descrito em xx para a eluição das proteínas adsorvidas.

As curvas de ruptura obtidas para Sepharose-IDA-Ni(II) e Sepharose-TREN-Ni(II), nas vazões de 0,5 mL/min e 1,0 mL/min estão representadas nas

Figura 5.16 e Figura 5.7, respectivamente, e na Tabela 5.8: Quantidades de proteína total e PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das curvas de ruptura.

Para ambos adsorventes estudados, não foi notado efeito significativo da vazão de alimentação nas curvas de ruptura. Para Sepharose-IDA-Ni(II) (

Figura 5.16, Tabela 5.8), na vazão de 0,5 mL/min, a concentração de proteínas no efluente aumentou até atingir valor estacionário de C/C_0 próximo a 0,8, enquanto que na vazão de 1,0 mL/min, a concentração de proteínas na saída aumenta até atingir valor constante em C/C_0 próximo a 0,9. Para Sepharose-TREN-Ni(II) (

Figura 5.16a, Tabela 5.8), a concentração constante de proteína no efluente ocorreu em C/C_0 próximo a 1,0 para ambas vazões, sendo, então, o adsorvente completamente saturado. A análise das eletroforeses para ambos adsorventes (

Figura 5.16 e Figura 5.17) mostrou a presença da banda relativa à PIS já nas primeiras frações de alimentação de PIS-C, indicando a baixa captura de PIS de ambos adsorventes.

O adsorvente Sepharose-IDA-Ni(II) apresentou capacidade de adsorção em termos de PIS em torno de 4,90 mg por mililitro de gel, valores inferiores aos obtidos para o adsorvente TREN-Ni(II), que variaram entre 7,18 mg e 8,70 mg por mililitro de gel (Tabela 5.8). No entanto, cerca de 1,3 mg de PIS por mililitro de gel não foi eluída com imidazol e EDTA, tendo sido necessária a eluição com solução de hidróxido de sódio. Este comportamento não foi verificado nos demais experimentos cromatográficos, podendo ser, possivelmente, devido a adsorção de PIS no agente quelatante TREN, que apresenta carga positiva a pH 7,5. Neste caso, a interação da PIS com o TREN foi intensa, não tendo sido possível a dessorção completa das proteínas com a utilização de agentes competitivos (imidazol e EDTA). Para a dessorção das proteínas que interagiram com o agente quelante TREN, foi necessário o emprego de solução de hidróxido de sódio a 50 mM, regenerando, assim, o adsorvente.

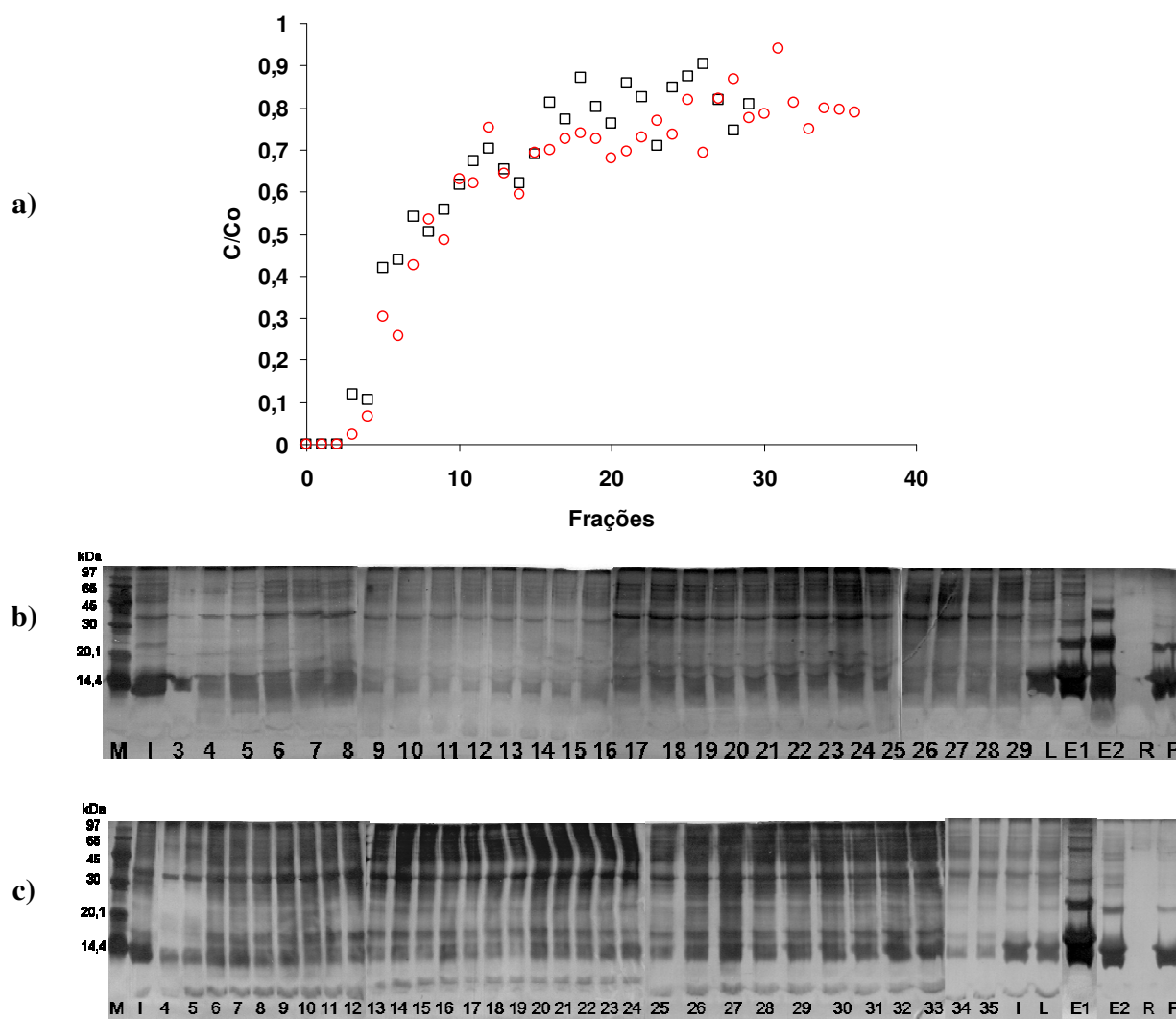


Figura 5.16: a) Curvas de ruptura de adsorção de PIS em Sepharose-IDA-Ni(II) a partir de solução PIS-C (proteínas totais); (□) vazão de alimentação de 0,5 mL/min, concentração na alimentação de 3,11 mg/mL; (○) vazão de alimentação de 1,0 mL/min, concentração na alimentação de 3,66 mg/mL. Volume das frações: 2,0 mL. b) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 0,5 mL/min e c) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 1,0 mL/min. M marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare), I amostra inicial; números correspondem as frações de alimentação; L “pool” das frações de lavagem; E1 “pool” das frações de eluição 100 mM imidazol; E2 “pool” das frações de eluição 300 mM imidazol; R “pool” frações de regeneração EDTA 50 mM; P marcador PIS-IMAC.

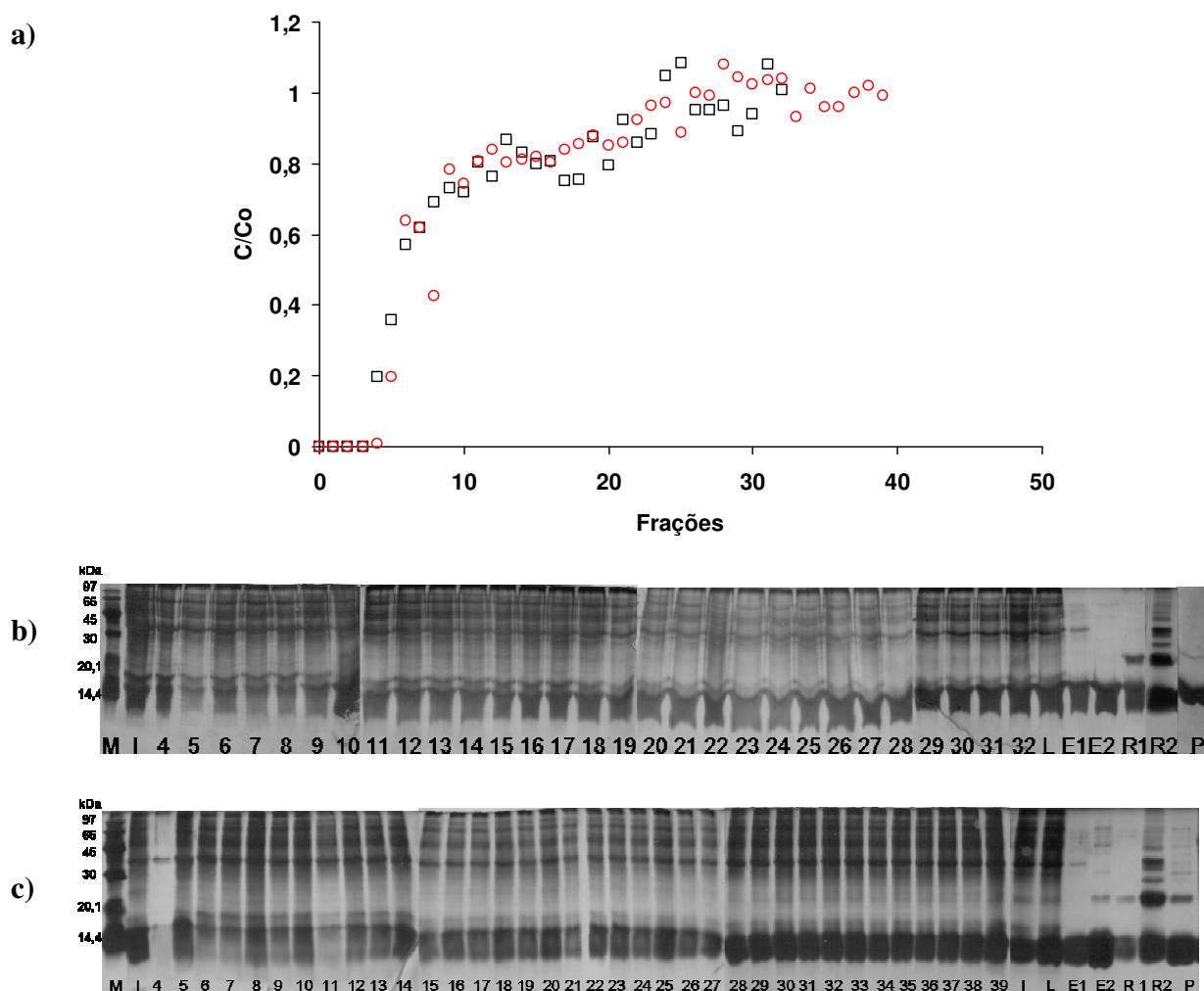


Figura 5.17: a) Curvas de ruptura de adsorção de PIS em Sepharose-TREN-Ni(II) a partir de solução PIS-C (proteínas totais); (□) vazão de alimentação de 0,5 mL/min, concentração na alimentação de 3,75 mg/mL; (○) vazão de alimentação de 1,0 mL/min, concentração na alimentação de 3,57 mg/mL. Volume das frações: 2,0 mL. b) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 0,5 mL/min e c) Eletroforese SDS-PAGE do experimento a vazão de 1,0 mL/min. M marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare), I amostra inicial; números correspondem as frações de alimentação; L “pool” das frações de lavagem; E1 “pool” das frações de eluição 100 mM imidazol; E2 “pool” das frações de eluição 300 mM imidazol; R1 “pool” das frações de regeneração EDTA 50 mM; R2 “pool” das frações regeneração com NaOH a 50 mM; P marcador PIS-IMAC.

Tabela 5.8: Quantidades de proteína total e PIS obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das curvas de ruptura

	IDA-Ni(II)				TREN-Ni(II)			
	0,5 (mL/min)		1,0 (mL/min)		0,5 (mL/min)		1,0 (mL/min)	
	PT ¹ (mg)	PIS ² (mg)	PT ¹ (mg)	PIS ² (mg)	PT ¹ (mg)	PIS ² (mg)	PT ¹ (mg)	PIS ² (mg)
Alimentação ³	180,09	68,04	256,31	96,83	240,30	90,78	278,27	105,13
Lavagem	161,54	39,98	191,52	47,5	190,51	47,25	250,33	62,08
Eluição 100 mM	4,08	3,11	9,06	5,61	5,23	2,26	12,70	5,48
Eluição 300 mM	51,53	11,62	41,07	9,26	26,31	13,18	30,76	15,41
Regeneração EDTA	0,16	0	0,13	0	3,80	1,81	2,33	1,11
Regeneração NaOH	-	-	-	-	5,36	4,30	6,15	4,10
Total de proteína eluída (mg)	55,77	14,73	50,26	14,87	40,70	21,55	51,94	26,10
Capacidade de adsorção (mg/mL gel)	18,59	4,91	16,76	4,95	13,57	7,18	17,31	8,70

¹PT: proteína total²PIS: pró-insulina sulfonada quantificada por HPLC³Volume alimentado de 58,0; 70,0; 64,0 e 78,0 mL para os adsorventes IDA-Ni(II) e TREN-Ni(II) nas vazões de 0,5 e 1,0 mL/min, respectivamente.

Os valores de pureza das frações de eluição não foram calculados, uma vez que a coluna de troca iônica utilizada para determinação de PIS por HPLC adsorve somente a PIS sulfonada (que tem carga negativa), não quantificando, portanto, a PIS não sulfonada. Segundo informações da empresa BIOMM, a solução de PIS-C (obtida após a solubilização dos corpos de inclusão e sulfitólise) contém PIS sulfonada e não sulfonada. O grau de pureza das frações eluídas seria calculado como a razão entre a massa de PIS e a massa de PT da fração multiplicado por 100. Como o método de Bradford utilizado para determinação de proteínas totais não diferencia a PIS sulfonada da PIS não sulfonada, os valores de PT obtidos nas etapas de eluição são bem maiores que os valores obtidos por HPLC. Isto indica, portanto, um grau de pureza muito baixo, que não condiz com os perfis eletroforéticos obtidos para todos os agentes quelantes utilizados, que mostram, segundo análise das eletroforeses pelo software GelQuantNET version 1.6.8 (BioChemLab Solutions), grau de pureza de cerca de 80%.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foi avaliado o efeito dos agentes quelantes IDA, TREN, CM-Asp e TED imobilizados em géis de agarose para a purificação de PIS recombinante com cauda de poli(histidina) a partir de solução clarificada (solução obtida após solubilização dos corpos de inclusão, sulfitólise e centrifugação) proveniente do processo de produção industrial de insulina (BIOMM, MG).

Foi demonstrado inicialmente que o método utilizado para a imobilização dos agentes quelantes IDA, CM-Asp, e TREN em géis de agarose (ativação com epicloridrina e imobilização do agente quelante pelo grupo amina), pode ser eficientemente empregado uma vez que os valores de densidade de íons metálicos imobilizados foram comparáveis àqueles encontrados na literatura consultada. A seguir, demonstrou-se que, dentre os adsorventes estudados, Sepharose-TREN-Ni(II) apresentou os melhores resultados de purificação de PIS a partir de solução clarificada, tendo adsorvido cerca de 50% da pró-insulina sulfonada injetada. No entanto, o adsorvente Sepharose-IDA-Ni(II) apresentou a maior capacidade de adsorção em termos de proteína total, cerca de 50% da proteína total injetada. Os adsorventes Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II) e HisTrap-Ni(II) apresentaram capacidades de adsorção menores em modo dinâmico, em termos de proteína total, seguindo a ordem $IDA > TREN \cong HisTrap > CM-Asp > TED$ (de acordo com a ordem estabelecida por CHAGA, 2001). Por outro lado, em termos de capacidade de adsorção de pró-insulina sulfonada, a ordem diferiu para $TREN > IDA > HisTrap > CM-Asp > TED$, contrariamente da ordem estabelecida por CHAGA (2001), que afirma que quanto mais polidentado o agente quelante, menor o número de sítios disponíveis para a coordenação com a proteína e mais fraca é a interação com a mesma, consequentemente, menor a capacidade de adsorção.

Os adsorventes Sepharose-CM-Asp-Ni(II) e Sepharose-TED-Ni(II) apresentaram maior seletividade quando comparados a Sepharose-IDA-Ni(II) (análise das eletroforeses SDS-PAGE). Do total de proteínas adsorvidas em Sepharose-TREN-Ni(II) (10,24 mg),

65% foram eluídas com imidazol e 35% com EDTA (forte retenção), apresentando alta capacidade de adsorção de PIS (8,9 mg de PIS/mL de gel). Isto se deve, possivelmente, ao fato do agente quelante TREN imobilizar o íon metálico Ni(II) somente através de átomos de nitrogênio, apresentando carga líquida do complexo TREN-Ni(II) positiva em pH 7,5, implicando em uma interação muito forte com a pró-insulina que se encontra carregada negativamente nesse mesmo pH, além da capacidade de fazer pontes de hidrogênio entre a proteína-adsorvente.

A análise equilíbrio demonstrou que adsorção de PIS a 25°C segue o modelo de Langmuir-Freundlich, provavelmente devido à presença de íons metálicos mal espaçados no suporte (superfície heterogênea) ou interação proteína-proteína, que provocariam o desvio do comportamento de Langmuriano, comumente ocasionado em sistemas IMAC.

O ajuste dos parâmetros, segundo o modelo de Langmuir-Freundlich, forneceu valores de capacidades máxima de adsorção (Q_m) entre 43,14 mg/mL (Sephacrose-TED-Ni(II)) e 154,56 mg/mL (HisTrap-Ni(II)) e de constante aparente de dissociação ($K_{d(LF)}$), para TED-Ni(II), CM-Asp-Ni(II) e TREN-Ni(II) entre 10^{-5} a 10^{-6} M (valores típicos de ligantes pseudobioespecíficos) e para IDA-Ni(II) e HisTrap de 10^{-7} M (valores típicos de ligantes bioespecíficos). Obteve-se valores de n maiores que 1,0 para os adsorventes estudados (exceto para CM-Asp-Ni(II), $n \approx 1,0$, não apresentando cooperatividade). Valores de n maiores que 1,0 indicam cooperatividade positiva, ou seja, a adsorção de uma molécula de PIS favorece a adsorção de outra molécula desta proteína.

O estudo termodinâmico para adsorção de PIS nos adsorventes estudados, demonstrou linearidade do gráfico de Van't Hoff (entalpia constante) na faixa de temperatura de 4°C a 25°C, exceto para Sepharose-TED-Ni(II), cuja linearidade foi observada na faixa de temperatura de 25 a 45°C, provavelmente pelo fato deste agente quelante ser pentadentado e a ligação de coordenação da PIS com o íon níquel ser muito fraca, predominando outros tipos de interações, como hidrofóbicas.

A diminuição dos valores de K_d com o aumento da temperatura forneceu valores de ΔH° positivos para todos os casos, indicando que a adsorção de PIS nos quelatos estudados é um processo endotérmico. Os valores de ΔG° foram negativos para todos os sistemas, indicando que a adsorção é espontânea e mais favorável com o aumento de temperatura. Os valores de ΔS° encontrados foram positivos e pouco alterados com o

aumento de temperatura em todos os casos, indicando um aumento na desordem total do sistema, favorecendo a complexação proteína-íon metálico.

Quanto às curvas de ruptura, não foi observado efeito da vazão no ponto de ruptura na faixa estudada. O adsorvente Sepharose-IDA-Ni(II) apresentou capacidade dinâmica de adsorção em termos de PIS em torno de 4,90 mg por mililitro de gel, valor inferior ao obtido para o adsorvente TREN-Ni(II), (entre 7,18 mg e 8,70 mg de PIS por mililitro de gel). No entanto, para TREN-Ni(II), cerca de 1,3 mg de PIS por mililitro de gel não foi eluída com imidazol e EDTA, tendo sido necessária a eluição com solução de hidróxido de sódio, devido a adsorção intensa, provavelmente em virtude das interações de PIS com agente quelatante TREN ou com o espaçador.

Os resultados obtidos permitem concluir que os diferentes agentes quelantes apresentaram variações significativas na capacidade de adsorção e seletividade na purificação de pró-insulina recombinante. Foi possível também obter o comportamento da adsorção da pró-insulina nos sistemas estudados, o que auxilia no desenvolvimento de estratégias de recuperação e purificação de biomoléculas. A técnica de IMAC com agente quelante TREN imobilizado (agentes quelante não utilizado tradicionalmente em IMAC) é potencialmente viável para a purificação de PIS a partir clarificada de lisado de células, uma vez observada seletividade (presença da PIS nas frações de eluição com pouca presença de impurezas) e a capacidade de adsorção de PIS similar ao do adsorvente tradicional IDA-Ni(II).

Como sugestões para trabalhos futuros, tem-se:

- 1) Emprego de duas colunas de IMAC em série, com diferentes agentes quelantes imobilizados, a fim de melhorar a capacidade e a seletividade de purificação de PIS a partir de solução clarificada;
- 2) Investigar o potencial de utilização do adsorvente Sepharose-TREN sem íon metálico quelatado na purificação de PIS.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS

ANDERSSON, L., PORATH, J. Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{3+}) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 154, p. 250-254, 1986.

AQUINO, L.C.L. Purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de poli(histidina): cromatografia em membranas de afinidade com íons metálicos imobilizados. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 126p. Tese (Doutorado).

AQUINO, L. C. L., SOUSA, H. R. T., MIRANDA, E. A., VILELA, L., BUENO, S. M. A. Evaluation of IDA-PEVA hollow fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin. *Journal of Chromatography B*, v. 834, p. 68–76, 2006.

ARNAU, J., LAURITZEN, C., PETERSEN, G. E., PEDERSEN, J. Current strategies for the use of affinity tags and removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression e Purification*, v. 48, p. 1-13, 2006.

BAILEY, S. M., MEAGHER, M. M. Separation of soluble protein from inclusion bodies in *Escherichia coli* lysate using crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 166, p. 137-146, 2000.

BELEW, M., YIP, T. T., ANDERSSON, L., PORATH, J. Interaction of proteins with immobilized Cu^{2+} - Quantitation of adsorption capacity, adsorption-isotherms and equilibrium-constants by frontal analysis. *Journal of Chromatography*, v. 403, p. 197-206, 1987.

BODEN, V., WINZERLING, J. J., VIJAYALAKSHMI, M., PORATH, J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*. v. 181, p. 225-232, 1995.

BOLSTER, C. H., HORNBERGER, G. M. On the use of linearized Langmuir equations. *Soil Science Society of America Journal*. v. 71, n. 6, p.1796-1806, 2007.

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

CHAGA, G. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 49, p. 313-334, 2001.

CHANG Y.-K., HUANG, R.-Z., LIN, S.-Y., CHIU, S.-J., TSAI, J.-C. Equilibrium study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. *Biochemical Engineering Journal*, v. 28, p. 1-9, 2006

CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 297, p. 179-202, 1984.

COWLEY, D. J., MACKIN, R. B. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. *FEBS Letters*, v. 402, p. 124-130, 1997.

DWYER, F. P., MELLOR, D. P. *Chelating agents and metal chelates*. New York. Academic Press, 1964

DYR, J. E., SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. *Journal of Chromatography B*, v. 699, p. 383-401, 1997.

DONAT R., AKDOGAN, A., ERDEM, E., CETISLI, A. Thermodynamics of Pb^{2+} and Ni^{2+} adsorption onto natural bentonite from aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 286, p. 43-52, 2005.

FINETTE, G. M. S., MAO, Q. M., HEARN, M. T. H. Comparative studies on isothermal characteristics of proteins adsorbed under batch equilibrium conditions to ion-exchange, immobilized metal ion affinity and dye affinity matrices with different ionic strength and temperature conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 763, p. 71-90, 1997

FOGLER, H. S. *Elementos de engenharia das reações químicas*. Trad. MORAES, F.F; PORTO L.M, 3ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2002, p. 56.

GELQUANTNET – Software gratuito para análise de eletroforese 1D. Disponível em: <http://netcpp.com/GelQuantNet.htm> Acesso em: 06 Mar. 2009.

GABERC-POREKAR, V. MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. v. 49, p. 335-360, 2001.

HAUPT, K., BUENO, S. M. A, VIJAYALAKSHMI, M. A. Interaction of human immunoglobulin G with L-histidine immobilized onto poly(ethylene vinyl alcohol) hollow-fiber membranes. *Journal of Chromatography B*. v. 674, p. 13-21, 1995.

JOHNSON, R. D., ARNOLD, F. H. Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 437-443, 1995.

KALTENBRUNNER, O., JUNGBAUER, A. Adsorption isotherms in protein chromatography. Combined influence of protein and salt concentration on adsorption isotherm. *Journal of Chromatography A*, v. 734, p. 183-194, 1996.

LADISCH, M. R., KOHLMANN K. L. Recombinant human insulin. *Biotechnology Progress*, v 8, p. 469-478, 1992.

LEE, J. D. *Química inorgânica, um texto conciso*. Trad. MAAR, J.H. 3ª ed. 1980.

LIN, F.-Y., CHEN, W.-Y., SANG, L.-C. Microcalorimetric studies of the interactions of lysozyme with immobilized metal ions: effects of ion, pH values, and salt concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 214, p. 373-379, 1999.

MALIK, A., JENZSCH, M., LÜBBERT, A.; RUDOLPH, R.; SÖHLING, B. Periplasmic production of native human proinsulin as a fusion to *E. coli* ecotin. *Protein Expression and Purification*, v. 55, n. 1, p. 100-111, 2007.

MACKIN, R. B. Streamlined procedure for the production of normal and altered versions of recombinant human proinsulin. *Protein Expression and Purification*, v. 15, p.308-313, 1999.

MACKIN, R. B., CHOQUETTE, M. H. Expression, purification and PC1-mediated processing of (H10D, P28K, and K29P)-human proinsulin. *Protein Expression and Purification*, v. 27, p. 210-219, 2003.

MANTOVAARA, T., PERTOFT, H., PORATH, J. Carboxymethylated aspartic acid agarose, a selective adsorbent for calcium-binding proteins, preliminary studies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 13, p. 315-322, 1991.

MERGULHÃO, F. J. M., TAIPA, M. A., CABRAL, J. M. S., MONTEIRO, G. A. Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 109, p. 31-43, 2004.

MONDAL, K., GUPTA, M. N. The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. *Biomolecular Engineering*, v. 23, p. 59-76, 2004.

NILSSON, J., JONASSON, P., SAMUELSSON, E., STAHL, S., UHLÉN, M. Integrated production of human insulin and its C-peptide. *Journal of Biotechnology*, v. 48, p. 241-250, 1996.

O'KEEFE, D. Analysis of protein impurities in pharmaceuticals derived from recombinant DNA. In: *Handbook of separations*. Separation Science and Technology. New York: Academic Press, 2000. v. 2, Cap. 2, p. 23-70.

PETRIDES, D., SAPIDOU, E., CALANDRANIS, J. Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production. A case study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 529-541, 1995.

PITTMAN IV, I., PHILIPSON, L. H., STEINER, D. F. Insulin biosynthesis, secretion, structure and structure-activity relationships. *Diabetes and Carbohydrate Metabolism*. Disponível em: http://www.endotext.org/Diabetes/diabetes3_new/diabetes3.htm. Acesso em: 03 Nov. 2008.

PORATH, J. IMAC - Immobilized metal ion affinity based chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 7, n. 7254, 1988.

PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I., BELFRAGE G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, v. 258, p. 598-599, 1975.

PORATH, J., OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630, 1983.

RIBEIRO, M. B. Purificação de IgG a partir do plasma humano por cromatografia em membranas com íons Cu(II) e Ni(II) imobilizados: efeito dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-Asp. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 148p. Tese (Doutorado).

RIBEIRO, M. B., VIJAYALAKSHIMI, M., TODOROVA-BALVAY, D., BUENO, S. M. A. Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized nickel affinity membranes. *Journal of Chromatography B*, v. 861, p. 64-73, 2008.

SERPA, G. Purificação de anticorpos monoclonais do isotipo IgG1 através de afinidade por quelato metálico. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 106p. Tese (mestrado).

SHARMA, S., AGARWAL, G.P. Interactions of proteins with immobilized metal ions - Role of ionic strength and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 243, n. 1, p. 61-72, 2001.

SHARMA, S., AGARWAL, G. P. Adsorption equilibrium and kinetics of egg-white proteins on immobilized metal ion affinity gels for designing fractionation. *Adsorption*, v. 8, p. 203-213, 2002a.

SHARMA, S., AGARWAL, G. P. Comparative studies on the metal sorption characteristics of chelating gels for immobilized metal ion affinity chromatography. *Separation Science and Technology*, v. 37, p. 3491-3511, 2002b.

SMITH, M. C., FURMAN, T. C., INGOLIA, T. D., PIDGEON, C. Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography, a new concept in affinity chromatography

for recombinant proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 15, p. 7211-7215, 1988.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*. v. 3, p. 1-11, 1985.

SULKOWSKI, E. Immobilized metal-ion affinity chromatography of proteins on IDA-Fe³⁺. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Symposia*, v. 17, p. 334-335, 1988.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. *Bio Essays*, v. 10, p. 170-75, 1989.

TARESTE, D., PINCET, F., PEREZ, E., RICKLING, S., MIOSKOWSKI, C., LEBEAU, L. Energy of Hydrogen Bonds Probed by the Adhesion of Functionalized Lipid Layers. *Journal Biophysical*.v. 83, p. 3675-3681, 2002.

THRASH Jr, M. E., PHILLIPS, J. M, PINTO, N. G. An analysis of the interactions of BSA with an anion-exchange surface under linear and non-linear conditions. *Adsorption*, v. 10, p. 299-307, 2004.

TIKHONOV, R. V., PECHENOV, S. E., BELACHEU, I. A., YAKIMOV, S. A., KLYUSHNICHENKO, V. E., BOLDIREVA, E. F., KOROBKO, V. G.; TUNES, H., THIEMANN, J. E., VILELA, L., WULFSON, A. N. Recombinant human insulin. VIII. Isolation of fusion protein-S-sulfonate, biotechnological precursor of human insulin, from the biomass of transformed *Escherichia coli* cells. *Protein Expression and Purification*, v. 21, p. 176-182, 2001.

UEDA, E. K. M., GOUT, P. W., MORAGANTI, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p. 1-23, 2003.

WINTER, J., NEUBAUER, P., GLOCKSHUBER, R., RUDOLPH, R. Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 175-185, 2000.

WINTER, J., LILIE, H., RUDOLPH, R. Renaturation of human proinsulin - A study on refolding and conversion to insulin. *Analytical Biochemistry*, v. 310, n. 2, p. 148-155, 2002.

WONG, J., ALBRIGTH, R. L., WANG N. H. W. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) – chemistry and bioseparation applications. *Separation and Purification Methods*, v. 20 n. 1, p. 49-106, 1991.

Apêndice A

Duplicatas das cromatografias dos experimentos de purificação de PIS a partir de solução clarificada (PIS-C) em géis Sepharose-IDA-Ni(II), Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose -TED-Ni(II), Sepharose -TREN-Ni(II) e HisTrap FF.

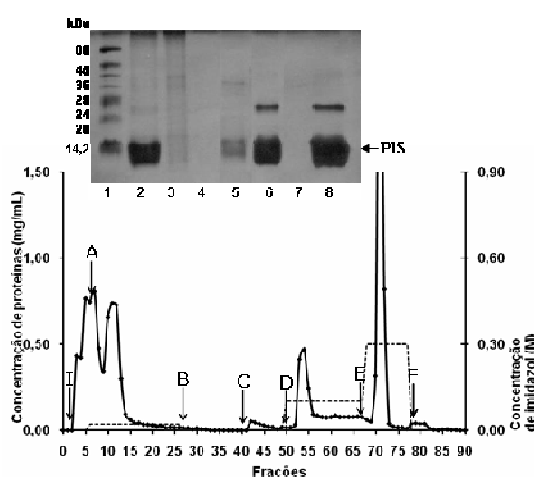


Figura A.1: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-IDA-Ni(II). (I) Injeção: 6,0 mL de solução a 4,1 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-4: “Pool” frações de lavagem. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 7 “Pool” frações de regeneração. Faixa 9: Marcador de PIS (PIS-IMAC).

Tabela A.1: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias Sepharose-IDA-Ni(II).

Fração	imidazol	Exp. 1 ⁽¹⁾	
		(mg)	(%)
Injeção	0 mM	24,6	100,00
Lavagem	20 mM	14,00	56,91
Eluição	100 mM	4,32	17,56
	300 mM	8,57	34,84
Regeneração		0,40	1,63
Total		27,29	110,93

Coluna 3,0 mL Sepharose-IDA-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II): 43,2 $\mu\text{mol/mL}$ de gel. Injeção 6,0 mL a 4,1 mg/mL de solução PIS-C.

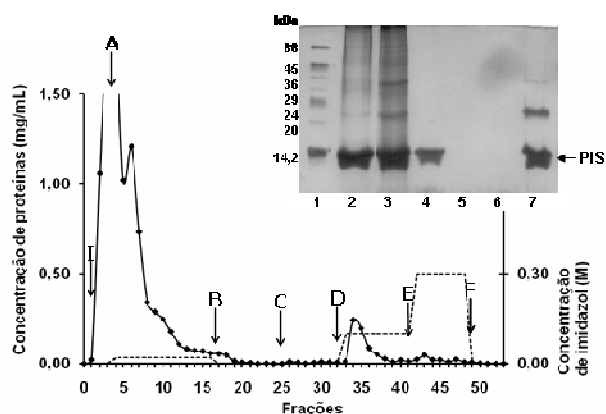


Figura A.2: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-CM-Asp-Ni(II). (I) Injeção: 7,0 mL de solução a 3,2 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3: “Pool” frações de lavagem. Faixa 4: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 6: “Pool” frações da regeneração. Faixa 7: Marcador de PIS (PIS-IMAC).

Tabela A.2: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias Sepharose-CM-Asp-Ni(II).

Fração	imidazol	Exp. 1 ⁽¹⁾	
		(mg)	(%)
Injeção	0 mM	22,40	100,00
Lavagem	20 mM	18,92	84,09
Eluição	100 mM	1,32	5,87
	300 mM	0,32	1,42
Regeneração		0,02	0,09
Total		20,58	91,47

Coluna 3,0 mL Sepharose-CM-Asp-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II): 37,1 $\mu\text{mol/mL}$ de gel. Injeção 7,0 mL a 3,2 mg/mL de solução PIS-C.

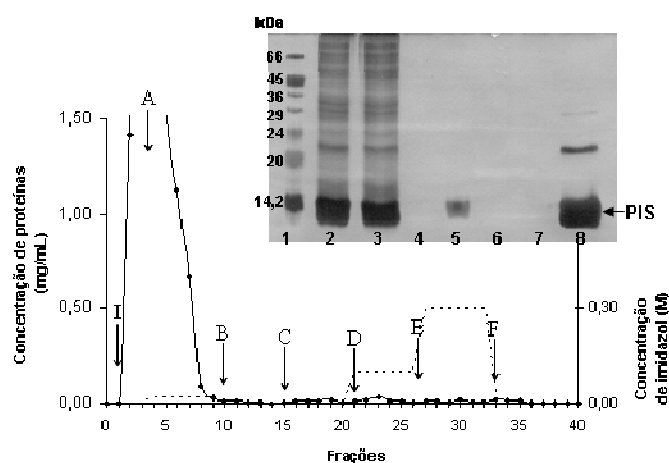


Figura A.3: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-TED-Ni(II). (I) Injeção: 4,9 mL de solução a 3,2 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) NaOH 50 mM pH 12,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-4: “Pool” frações de lavagem. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 7: “Pool” frações da regeneração. Faixa 8: Marcador de PIS (PIS-IMAC).

Tabela A.3: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em Sepharose-TED-Ni(II).⁽¹⁾

Fração	imidazol	Exp 1 ⁽¹⁾	
		(mg)	(%)
Injeção	0 mM	15,69	100,00
Lavagem	20 mM	16,12	102,74
Eluição	100 mM	0,18	1,15
	300 mM	0,05	0,32
Regeneração	0 mM	0,10	0,64
Total		16,45	104,87

Coluna 2,0mL agarose-TED-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II): 10 μ mol/mL gel. Injeção 4,9 mL a 3,2 mg/mL de solução PIS-C.

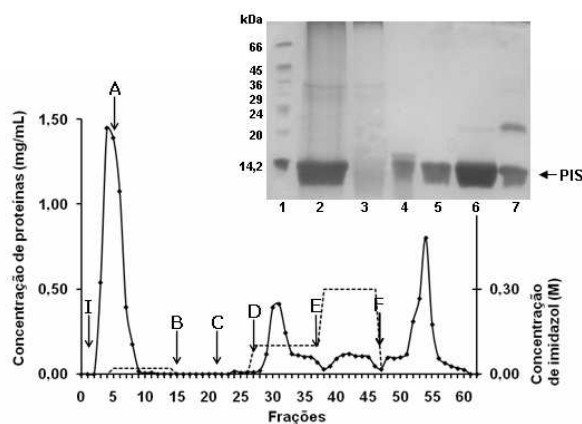


Figura A.4: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em gel Sepharose-TREN-Ni(II). (I) Injeção: 7,1 mL de solução a 3,0 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3: “Pool” frações de lavagem. Faixa 4: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 5: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 6: “Pool” frações da regeneração. Faixa 7: Marcador de PIS (PIS-IMAC).

Tabela A.4: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em Sepharose-TREN-Ni(II).

Fração	Imidazol	Exp 1	
		(mg)	(%)
Injeção	0 mM	21,27	100,00
Lavagem	20 mM	10,20	47,95
	100 mM	3,47	16,31
Eluição	300 mM	1,84	8,65
	0 mM	4,85	22,80
Regeneração	0 mM	4,85	22,80
Total		20,36	95,72

Coluna 3,0 mL agarose-TREN-Ni(II) equilibrada com tampão A. Densidade de ligante Ni(II): 13,3 $\mu\text{mol/mL}$ gel. Injeção 7,1 mL a 3,0 mg/mL de solução PIS-C.

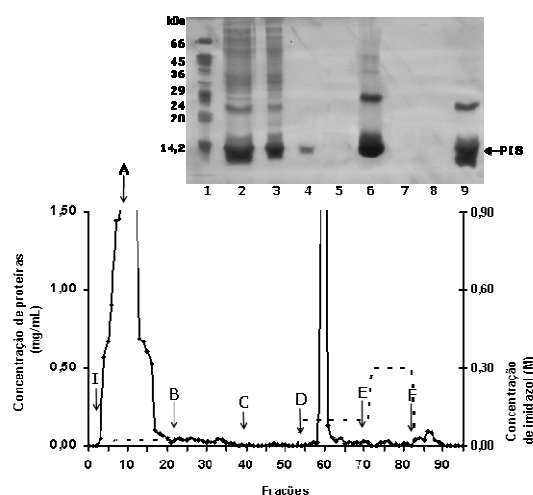


Figura A.5: Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de PIS, a partir de solução PIS-C, em coluna HisTrap-Ni(II). (I) Injeção: 11,9 mL de solução a 3,7 mg/mL de proteína total. Vazão: 0,5 mL/min. Lavagem: (A) Tampão B; (B) Tampão A; (C) Tampão C. Eluição: (D) Tampão D; (E) Tampão E. Regeneração: (F) EDTA 50 mM pH 8,0. Eletroforese SDS-PAGE em gel a 15%. Revelação com nitrato de prata. Amostras nas condições desnaturantes e redutoras. Faixa 1: Marcadores de massa molecular (Sigma, EUA). Faixa 2: PIS-C. Faixas 3-5: “Pool” frações de lavagem. Faixa 6: “Pool” frações de eluição imidazol 100 mM. Faixa 7: “Pool” frações de eluição imidazol 300 mM. Faixa 8: “Pool” frações da regeneração. Faixa 9: Marcador de PIS (PIS-IMAC).

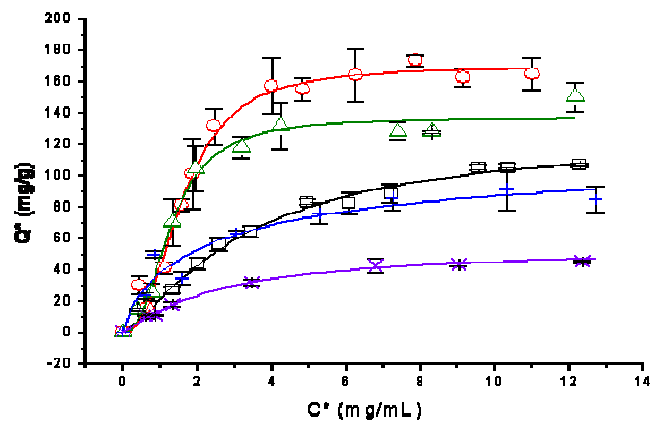
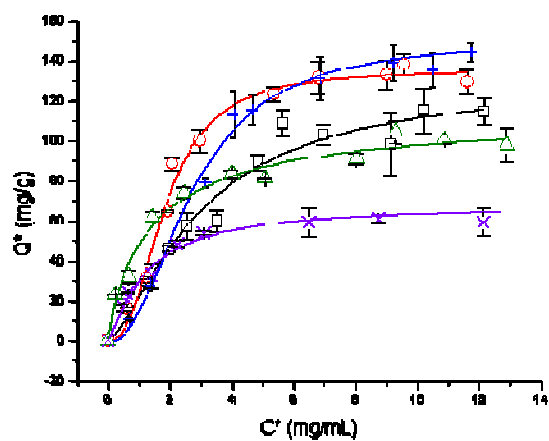
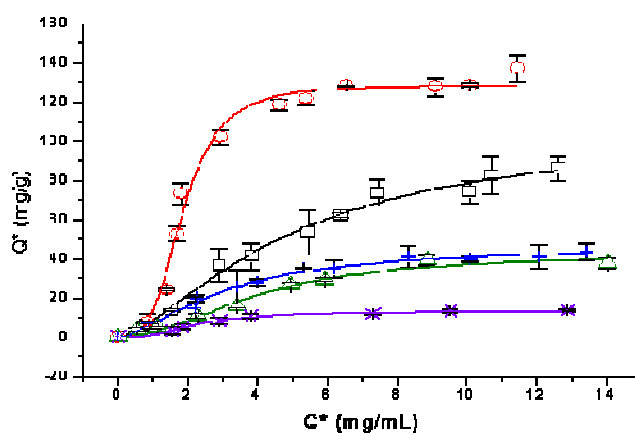
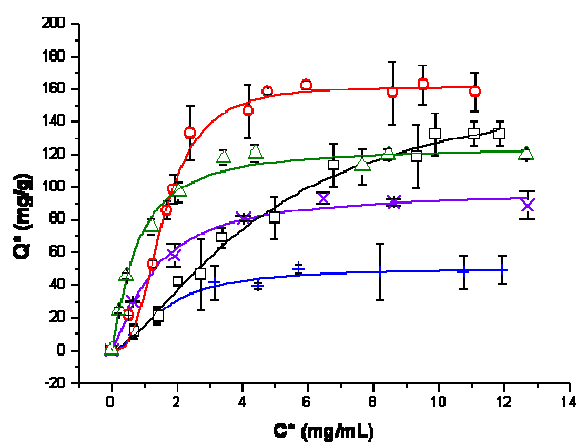
Tabela A.5: Quantidades de proteína total obtidas nas etapas de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias em coluna HisTrap-Ni(II).

Fração	Imidazol	Exp 1 (mg)	(%)
Injeção	0 mM	43,94	100,00
Lavagem	20 mM	33,17	75,49
Eluição	100 mM	13,31	30,29
	300 mM	0,24	0,55
Regeneração	0 mM	0,71	1,62
Total		47,44	107,97

Coluna HisTrap-Ni(II) 5,0 mL equilibrada com tampão A. .Densidade de ligante Ni (II): 15 $\mu\text{mol/mL}$ gel
Injeção 11,9 mL a 3,7 mg/mL de solução PIS-C.

Apêndice B

Isotermas de adsorção de PIS em Sepharose-IDA-Ni(II), Sepharose-TED-Ni(II), Sepharose-CM-Asp-Ni(II), Sepharose-TREN-Ni(II), HisTrap-Ni(II), ajuste não-linear segundo modelo de Langmuir-Freundlich.



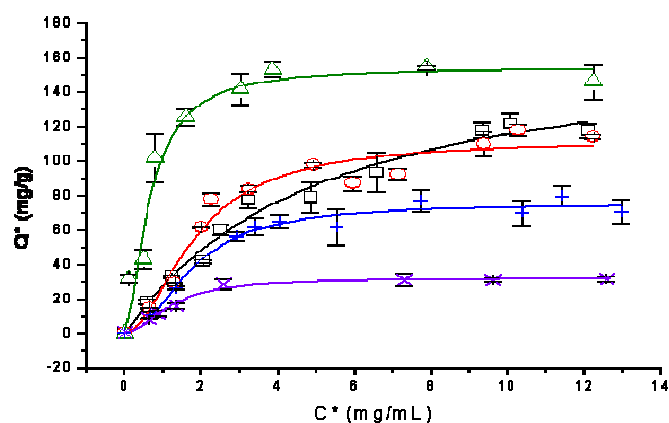


Figura B.1: Isoterma de adsorção de PIS em (a) Sepharose-IDA-Ni(II), (b) Sepharose-TED-Ni(II), (c) Sepharose-CM-Asp-Ni(II), (d) Sepharose-TREN-Ni(II), (e) HisTrap-Ni(II). Símbolos correspondem aos dados experimentais de equilíbrio ($\square$) 4°C, ($\circ$) 15°C, (Δ) 25°C, (+) 37°C e (x) 45°C e as linhas contínuas, as curvas ajustadas segundo modelo de Langmuir-Freundlich.

Tabela B.1:Parâmetros obtidos a partir do ajuste não linear do modelo de Langmuir-Freundlich aos dados de adsorção de PIS

Parâmetros		4°C	15 °C	25 °C	37 °C	45 °C
Sepharese- IDA-Ni(II)	Q _m (mg/g gel)	169,23 ± 18,60	162,22 ± 3,56	125,76 ± 5,09	50,64 ± 2,40	98,00 ± 5,91
	K _{dLF} (M)	(1,01 ± 1,46) x 10 ⁻⁵	(3,69± 0,77) x 10 ⁻⁶	(0,68 ± 0,13) x 10 ⁻⁶	(2,27 ± 0,46) x 10 ⁻⁶	(1,38 ± 0,24) x 10 ⁻⁶
	n	1,49 ± 0,21	2,81 ± 0,39	1,25 ± 0,18	1,82 ± 2,4	1,30 ± 0,26
	R ²	0,991	0,989	0,988	0,984	0,991
	Desvio padrão	5,31	6,62	5,62	2,73	4,18
Agarose-TED- Ni(II)	Q _m (mg/g gel)	106,51 ± 11,27	128,55 ± 3,23	43,14 ± 4,05	46,76 ± 2,51	13,38 ± 0,60
	K _{dLF} (M)	(11,28 ± 1,98) x 10 ⁻⁶	(8,77 ± 2,77) x 10 ⁻⁶	(16,57 ± 7,27) x 10 ⁻⁶	(5,88 ± 0,99) x 10 ⁻⁶	(8,09 ± 2,13) x 10 ⁻⁶
	n	1,50 ± 0,21	3,48 ± 0,56	2,01 ± 0,41	1,60 ± 0,21	2,45 ± 0,37
	R ²	0,991	0,986	0,981	0,989	0,992
	Desvio padrão	3,23	6,64	2,35	1,66	0,53
Sepharese- CM-Asp- Ni(II)	Q _m (mg/g gel)	131,17± 15,74	135,63 ± 4,11	114,56 ± 10,73	147,92 ± 4,76	68,17 ± 7,63
	K _{dLF} (M)	(4,98 ± 1,11) x 10 ⁻⁶	(4,68 ± 1,12) x 10 ⁻⁶	(1,38 ± 0,28) x 10 ⁻⁶	(7,81 ± 1,78) x 10 ⁻⁶	(1,28 ± 0,32) x 10 ⁻⁶
	n	1,45 ± 0,33	2,46 ± 0,38	0,91 ± 0,17	2,13 ± 0,23	1,24 ± 0,25
	R ²	0,969	0,987	0,983	0,994	0,988
	Desvio padrão	7,86	6,47	5,14	4,99	2,93
Sepharese- TREN-Ni(II)	Q _m (mg/g gel)	126,35 ± 8,01	169,83 ± 5,08	136,98 ± 4,79	119,10 ± 53,77	54,50 ± 6,42
	K _{dLF} (M)	(4,89 ± 0,43) x 10 ⁻⁶	(3,12 ± 0,56) x 10 ⁻⁶	(1,87 ± 0,35) x 10 ⁻⁶	(2,14 ± 1,42) x 10 ⁻⁶	(2,91 ± 0,49) x 10 ⁻⁶
	n	1,33 ± 0,14	2,44 ± 0,34	2,41 ± 0,41	0,76 ± 0,43	1,15 ± 0,18
	R ²	0,994	0,985	0,984	0,936	0,995
	Desvio padrão	3,15	8,62	7,81	9,30	1,46
HisTrap-Ni(II)	Q _m (mg/g gel)	172,62 ± 39,36	112,44 ± 7,30	154,56 ± 10,74	75,42 ± 2,95	32,16 ± 1,46
	K _{dLF} (M)	(5,19 ± 1,08) x 10 ⁻⁶	(3,14 ± 0,88) x 10 ⁻⁶	(0,49 ± 0,21) x 10 ⁻⁶	(3,11 ± 0,75) x 10 ⁻⁶	(1,40 ± 0,21) x 10 ⁻⁶
	n	1,02 ± 0,23	1,85 ± 0,45	1,63 ± 0,57	2,03 ± 0,33	1,92 ± 0,34
	R ²	0,982	0,961	0,958	0,980	0,989
	Desvio padrão	6,27	8,63	10,06	4,28	1,58

A partir das análises dos parâmetros do modelo de Langmuir-Freundlich, verifica-se que para IDA-Ni(II) n variou entre 1,25 a 2,81, sempre maior que 1, indicando cooperatividade positiva, a adsorção de uma molécula favorece a adsorção de outra. Para TREN-Ni(II) n cresce de 1,33 a 2,44 até a temperatura de 25°C , após isso com o aumento da temperatura para 37°C e 45°C apresentou n igual a 0,75 e 1, respectivamente, mostrando que a cooperatividade sofre um inversão, desfavorecendo a interação proteína-proteína. Para TED-Ni(II), CM-Asp-Ni(II) e Histrap-Ni(II) os valores de n foram maiores que 1 indicando a existência da cooperatividade positiva, onde a adsorção de uma proteína favorece a adsorção de outra, mostrando também maiores desvios da isoterma de Langmuir.