

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Pré-purificação por eletrocoagulação de
proteína sGFP produzida em folhas de
Nicotiana benthamiana transgênica**

Autor: Goran Robić

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

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

Campinas, SP

setembro de 2009

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

R55p Robic, Goran
Pré-purificação por eletrocoagulação de proteína sGFP
produzida em folhas de *Nicotiana benthamiana*
transgênica / Goran Robic. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Everson Alves Miranda.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Plants - Proteínas. 2. Proteína - Análise. 3. Fumo.
4. Purificação. 5. Eletroquímica. I. Miranda, Everson
Alves. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Pre-purification of recombinant sGFP produced in *Nicotiana benthamiana* leaves by electrocoagulation

Palavras-chave em Inglês: Plants proteins, Proteins analysis, Tobacco, Purification, Electrochemistry

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

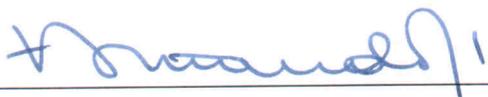
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Ângela Maria Moraes, Marcelo Menossi, Elíbio Leopoldo Rech Filho, Alberdan Silva Santos

Data da defesa: 29/09/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

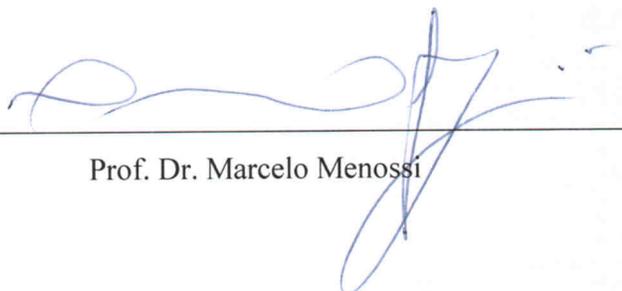
Tese de Doutorado defendida por Goran Robić e aprovada em 29 de setembro de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda – Orientador



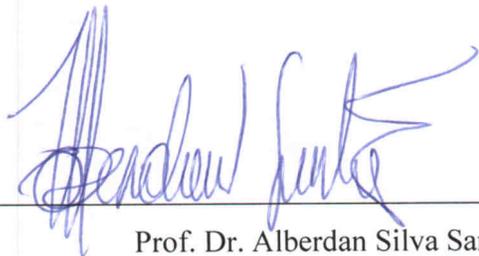
Prof.^a. Dr.^a. Ângela Maria Moraes



Prof. Dr. Marcelo Menossi

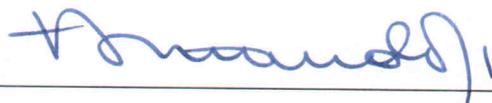


Prof. Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho



Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Goran Robić em 29 de setembro de 2009.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

DEDICATÓRIA

Mojemu sinu Nikoli, koji je za vrijeme stvaranja ovog rada uvijek bio u mojim mislima.

Ao meu filho Nikola, que estava sempre nos meus pensamentos durante a criação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mulher Pérola por me dar apoio durante todos os anos de pesquisa. Também ao Nikola qual chegada marcou fortemente os últimos anos deste trabalho. Meus pais, Marijan e Brigita, por me darem a vida e tudo que sou hoje.

Ao meu orientador Everson Alves Miranda por me aceitar no doutorado. Ao Cristiano Lacorte, por me fornecer e construir o material biológico usado neste trabalho e pelas dicas valiosas. Ao Elibio Rech, pela persistência nesta área, e pela ampla visão que possibilitou a existência do presente trabalho. Ao Živko Nikolov, pelas valiosas sugestões diretas e indiretas. Ao Marcelo Menossi, por todo suporte com o material geneticamente modificado.

Também agradeço todos que ajudaram de uma forma ou de outra, e fizeram parte da minha vida durante os anos de desenvolvimento deste trabalho.

No final faço meus agradecimentos às agências CNPq, Fapesp, CAPES, Embrapa e Faepex-Unicamp pelo apoio financeiro recebido.

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xiii
NOMENCLATURA	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Colocação do problema.....	6
1.2 Objetivo.....	6
1.3 Plano de trabalho.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Sistemas e fatores importantes na produção das proteínas recombinantes em plantas transgênicas.....	9
2.2 Folhas de tabaco usadas como bioreator e comparação com outros sistemas vegetais de expressão.....	11
2.3 Estrutura e proteínas de folha de tabaco.....	13
2.4 Fatores importantes que influenciam o custo de recuperação e purificação de proteínas (RPB) recombinantes produzidas em folhas de plantas.....	16
2.5 Liberação das proteínas recombinantes a partir de folhas de plantas.....	17
2.5.1 Maceração das folhas de plantas frescas.....	17
2.5.2 Extração de proteína recombinante a partir das folhas de tabaco.....	18
2.5.3 Clarificação de extrato ou suco de folhas de plantas.....	19

2.5.4	Eletrocoagulação e seu uso em clarificação de extratos de plantas.....	20
2.6	Propriedades da proteína verde fluorescente de polifenóis e da clorofila.....	23
2.6.1	A proteína verde fluorescente (GFP) – “green fluorescent protein”.....	23
2.6.2	Propriedades dos polifenóis.....	23
2.6.3	Propriedades da clorofila.....	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	Materiais.....	27
3.1.1	Reagentes.....	27
3.1.2	<i>Nicotiana benthamiana</i> e <i>Escherichia coli</i> transgênicas.....	27
3.2	Métodos.....	28
3.2.1	Produção de sGFP(6His) em <i>E. coli</i>	28
3.2.2	Purificação de sGFP(6His) produzida em <i>E. coli</i>	28
3.2.3	Protocolo de extração das folhas.....	29
3.2.4	“Spiking” dos extratos de tabaco.....	29
3.2.5	Protocolo de eletrocoagulação.....	30
3.2.6	Adsorção de compostos biológicos dos extratos de <i>N. benthamiana</i> em gel de hidróxido de alumínio.....	30
3.2.7	Determinação de proteína total, polifenóis e clorofila.....	31
3.2.8	Determinação fluorométrica de sGFP.....	32

3.2.9	Determinação de tamanho das partículas e potencial zeta do gel de hidróxido de alumínio.....	33
3.2.10	Focalização isoeétrica (IEF) e análise densitométrica.....	33
4.	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE GFP.....	35
4.1	Introdução.....	35
4.2	Resultados e discussão.....	37
4.3	Conclusão parcial.....	42
5.	DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE COMPOSTOS BIOLÓGICOS POR ELETROCOAGULAÇÃO.....	44
5.1	Introdução.....	44
5.1.1	Considerações teóricas.....	45
5.2	Resultados e discussão.....	49
5.2.1	Dependência da formação do hidróxido de alumínio pela corrente aplicada.....	49
5.2.2	Verificação experimental da aplicabilidade dos modelos propostos.....	51
5.2.3	Efeito do pH na eletrocoagulação.....	53
5.2.4	Caracterização do gel de hidróxido de alumínio produzido.....	58
5.3	Conclusão parcial.....	60
6.	REMOÇÃO DE CLOROFILA E POLIFENÓIS DE EXTRATOS DA <i>N. benthamiana</i> POR ELETROCOAGULAÇÃO.....	61

6.1	Introdução.....	61
6.2	Resultados e discussão.....	62
6.2.1	Efeito do pH na extração de clorofila, polifenóis e proteína total.....	62
6.2.2	Remoção de clorofila, polifenóis e proteína dos extratos por eletrocoagulação.....	64
6.2.3	Efeito do pH da eletrocoagulação na remoção de proteínas ácidas e básicas de folhas de <i>N. benthamiana</i>	69
6.3	Comclusão parcial.....	76
7.	USO DE ELETROCOAGULAÇÃO COMO MÉTODO DE PRÉ-PURIFICAÇÃO DE sGFP PRODUZIDA EM FOLHAS DE <i>N. benthamiana</i>	77
7.1	Introdução.....	77
7.2	Resultados e discussão.....	78
7.3	Conclusão parcial.....	82
8.	CONCLUSÃO	83
9.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
	Referências bibliográficas	86
	APÊNDICE	100

Resumo

A técnica de eletrocoagulação tem sido usada basicamente em tratamento de água potável e águas residuais. Neste trabalho propusemos o uso desta técnica na recuperação e purificação (RPB) de proteínas recombinantes produzidas em plantas geneticamente modificadas. O desafio principal da RPB de uso de plantas como biorreatores é a presença de clorofila e polifenóis nos seus extratos, que causam precipitação e desnaturação das proteínas de interesse, além de danificarem membranas e géis de separação. Portanto, a remoção destes compostos é essencial. No presente trabalho estudou-se a aplicação de eletrocoagulação para clarificar extratos de folhas de *Nicotiana benthamiana* transgênica removendo a clorofila e polifenóis, sem remover a proteína recombinante sGFP (proteína verde fluorescente sintética).

Primeiramente foi necessário desenvolver um método de determinação e quantificação de sGFP baseado na fluorescência intrínseca desta proteína. Os problemas com a fluorescência de fundo presente nos extratos de folhas de *N. benthamiana* e o aumento de intensidade da fluorescência da sGFP nestes extratos – provavelmente o resultado de dimerização de moléculas de sGFP promovida por composto(s) do extrato – por nós observados, tinham que ser resolvidos. Diluição de 20 vezes dos extratos contendo sGFP com solução de uréia 6 mol/L em fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00 eliminou completamente estas duas interferências.

Os estudos da eletrocoagulação foram iniciados desenvolvendo-se dois modelos de remoção de compostos biológicos de soluções aquosas por esta técnica. Os modelos desenvolvidos são baseados na formação de complexos entre o composto e o gel de hidróxido de alumínio ou a partição do composto entre a fase aquosa e fase do gel de hidróxido de alumínio. Análises teóricas e experimentais revelaram que os parâmetros relevantes na remoção destes compostos são a corrente utilizada – que afeta a taxa de formação de hidróxido de alumínio – e o pH da eletrocoagulação – que afeta a carga tanto do gel formado como dos compostos a serem removidos.

Gel de hidróxido de alumínio produzido a pH 8,0 apresentou alta eficiência em remover clorofila e polifenóis dos extratos de folhas de *N. benthamiana* não-transgênica, ao passo que somente uma pequena porção de proteínas nativas foi removida. Portanto, o gel

de hidróxido de alumínio produzido nesta condição foi adicionado a extratos de *N. benthamiana* transgênica contendo sGFP. A remoção de 99,7% clorofila, de 88,5% dos polifenóis e de 38,4% de proteína total do extrato foi observada sem remoção da sGFP (fator de purificação de 1,6). Portanto, a eletrocoagulação pode também ser usada como técnica de pré-purificação de proteínas recombinantes e ao mesmo tempo como método de clarificação de extratos de folhas.

Abstract

Electrocoagulation is a technique that has been basically applied to water and wastewater treatment. We propose here the extension of this relatively cheap technique to the field of downstream processing (DSP) of plant-derived proteins, in which plants are used as a bioreactor for recombinant protein production. The main problem in the DSP of this plant-based technology is the presence of chlorophyll and phenolic compounds in plant extracts, which tend to precipitate and denature the proteins besides damaging separation membranes and gels. Therefore their removal from the extracts is essential. In the present work we studied the application of a electrocoagulation based technique as a pre-purification technique to clarify transgenic *Nicotiana benthamiana* leaf extracts by removing chlorophyll and phenolic compounds without removing the recombinant protein sGFP (synthetic green fluorescent protein).

First, a method for fluorescence-based quantification of sGFP had to be developed. The background fluorescence of plant extracts and the increased level of sGFP fluorescence in *N. benthamiana* leaves extracts – probably the result of dimerization of sGFP molecules promoted by interaction with some component(s) of tobacco extract – observed by us had to be overcome. Diluting the tobacco extract spiked with sGFP by 20 times with 6 mol/L urea solution in 50 mmol/L sodium phosphate buffer pH 7.00 completely eliminated the two mentioned interferences.

The electrocoagulation studies started with the development of simple time-dependent models for electrocoagulation of biological compounds from solutions. These models are based on either stoichiometric complex formation between aluminium hydroxide gel and the compound or the partition of the compound between the aqueous and the aluminium hydroxide gel phase. Theoretical and experimental analysis demonstrated that a relevant parameters in the process of electrocoagulation of biological materials are the current applied – since it affects the rate of aluminium hydroxide formation – and the pH of electrocoagulation – since it affects the charges of the aluminium hydroxide gel formed and the components to be removed.

Aluminium hydroxide gel produced at pH 8.0 demonstrated a high efficiency of chlorophyll and phenolic compounds removal from non-transgenic *N. benthamiana* leaves

extracts, while removing only relative small portion of the native proteins. Therefore, the aluminum hydroxide gel produced at this pH was added to transgenic *N. benthamiana* leaf extracts containing recombinant sGFP. Removal of 99.7% of chlorophyll and 88.5% of phenolic compounds were observed. Also at this conditions 38.4% of total protein was removed, which resulted in a purification factor of 1.6 with 100% of the sGFP recovered. Therefore the method proposed could also be used as a strategy of pre-purification of recombinant proteins besides at the same time clarifying the tobacco leaf extracts.

NOMENCLATURA

BSA	albumina do soro bovino
$c_{Al^{3+}}$	concentração de íons de alumínio em solução, mol/L
c_{i,H_2O}	concentração molar do composto i na fase aquosa, mol/L
$c_{i,Al(OH)_3}$	concentração molar do composto i na fase de hidróxido de alumínio, mol/L
$c_{i,0}$	concentração molar inicial da componente i , mol/L
CHAPS	3-(3-cholamidopropilo)dimetilamônio-1-propano sulfonato
DTT	ditiotreitól
GFP	proteína verde fluorescente - “green fluorescent protein”
GUS	β -glucuronidase
I	corrente elétrica, A
k_1	constante da reação de formação de gel de hidróxido de alumínio
k_2	constante da reação de formação gel de hidróxido de alumínio com base de corrente elétrica aplicada
k_3	constante da reação de formação de gel de hidróxido de alumínio
$k_{i,est}$	constante de seletividade do modelo estequiométrico para componente i , mol/(L·A ³ ·min)
$k_{i,não-est}$	constante de seletividade do modelo não-estequiométrico para componente i , 1/(A ³ ·min)
K_i	constante de equilíbrio para o componente i entre a fase de hidróxido de alumínio e a fase aquosa
LUC	luciferase
MBS	metabissulfito de sódio
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico

$m_{Al(OH)_3}$	massa total do gel de hidróxido de alumínio formado durante o processo, mg
$n_{i,0}$	moles do composto i no processo, mol
n_{i,H_2O}	moles do composto i na fase aquosa, mol
$n_{i,Al(OH)_3}$	moles do composto i na fase de hidróxido de alumínio, mol
n	ordem de reação de formação de hidróxido de alumínio
$N_{i,eq}$	capacidade equivalente do gel de hidróxido de alumínio para componente i , mol/mg
$\frac{1}{R}$	condutividade da solução, Ω^{-1}
R	resistência da solução, Ω
RPB	recuperação e purificação de bioprodutos
SDS	dodecil sulfato de sódio
sGFP	proteína verde fluorescente sintética – “synthetic green fluorescent protein”
T	temperatura, °C
t	tempo, s
TEMED	N,N,N,N,tetra-metil-etilendiamina
TRIS	tris(hidroximetil)amino metano
U	potencial elétrico entre os eletrodos, V
V	volume, L
$V_{Al(OH)_3}$	taxa de formação do hidróxido de alumínio, mol/(L·min)
$V_{Al(OH)_3}$	taxa de formação do hidróxido de alumínio, mol/(L·min)

1. INTRODUÇÃO

Muitas proteínas são hoje em dia usadas em pesquisa, medicina e na indústria, mas a extração e purificação destas proteínas a partir de suas fontes naturais podem ser difíceis e caras. Usar proteínas a partir das fontes naturais também pode ser perigoso, pois muitas pessoas se contaminaram usando produtos oriundos de sangue como, por exemplo, hormônios (Nikolov e Woodard, 2004). Outras proteínas, como os fragmentos Fv de anticorpos, usados em pesquisa e na medicina, não existem na natureza. Portanto, sistemas simples que possibilitem a produção destas proteínas em grande escala, sem riscos de serem contaminadas com patógenos perigosos para a saúde humana, são muito desejáveis (Ma *et al.*, 2003). Sistemas de produção de proteínas usados hoje em dia, como fermentação microbiana, culturas de células animais e animais transgênicos, são dificilmente escalonáveis, pois envolvem grandes investimentos de capital (Twyman *et al.*, 2003). Esta desvantagem, juntamente com o fato que os produtos finais podem ser contaminados com patógenos, resulta em custo elevado das proteínas transgênicas produzidas nestes sistemas de expressão (Nikolov e Woodard, 2004). No caso de fermentação microbiana, a autenticidade do produto em termos de diferenças na pós-tradução das proteínas quando comparada com células animais – ausência de glicosilação e adição de aminoácidos terminais – também é questionável (Ma *et al.*, 2003).

Plantas, tradicionalmente usadas como fontes de medicamentos, não apresentam perigo de contaminação de humanos por fitopatógenos e seu cultivo é facilmente escalonável (Nikolov e Woodard, 2004; Menkhaus *et al.*, 2004a). Nas últimas duas décadas, avanços na área de biologia molecular possibilitaram o desenvolvimento de técnicas de produção de proteínas recombinantes em plantas que podem, assim, servir como fonte de medicamentos (incluindo proteínas do plasma, enzimas, hormônios de crescimento, vacinas e anticorpos) ou serem usadas em processos industriais

(principalmente as enzimas, como mencionado por Kusnadi *et al.*, 1998 e Woodard *et al.*, 2003) e pesquisa (proteínas usadas em estudos dos mecanismos celulares e análises bioquímicas, de acordo com Hood *et al.*, 1997). Hiatt *et al.* (1989) mostraram que é possível produzir anticorpo funcional usando-se plantas transgênicas como biorreator, sendo este o trabalho que iniciou uma pesquisa ampla de produção de anticorpos em plantas transgênicas. Voss *et al.* (1995) provaram que o anticorpo recombinante contra o vírus mosaico de tabaco produzido em tabaco transgênico tem a mesma especificidade e afinidade que o anticorpo produzido por células híbridas.

Apesar de plantas serem eucariotas e terem maquinaria celular sofisticada para realizar glicosilação, uma desvantagem importante de seu uso como biorreator é que a glicosilação das proteínas recombinantes em plantas usualmente não é a mesma promovida por células animais, o que pode potencialmente mudar a atividade, biodistribuição e meia-vida destas proteínas quando usadas como fármacos (Ma *et al.*, 2003). Portanto, os efeitos negativos destas “estruturas estranhas” são um dos tópicos mais importantes de uso e aceitação das proteínas recombinantes produzidas em plantas e usadas como medicamentos. Os primeiros passos para superar estes problemas já foram dados e acredita-se que em futuro este problema será resolvido (Bakker *et al.*, 2001). Por outro lado, no caso de uso destas proteínas em processos industriais ou em pesquisa, diferenças na glicosilação usualmente não implicam em restrições de uso (Hood *et al.*, 1997; Kusnadi *et al.*, 1997 e Woodard *et al.*, 2003).

Para poder validar a produção de proteínas recombinantes usando vários sistemas como células animais, ovos de galinha transgênicas, leite de cabras transgênicas fermentação microbiana e plantas transgênicas, o custo da produção deve ser comparado (Tabela 1.1). Percebe-se que as plantas transgênicas oferecem o menor custo de produção de proteínas recombinantes (Hood *et al.*, 2002), mas deve-se considerar que o custo da produção é proporcional ao nível de expressão de proteína. Assim, as plantas transgênicas têm que atingir níveis de expressão superiores a 0,1% de proteína total solúvel para poder competir com outros sistemas de expressão (Twyman *et al.*, 2003).

Tabela 1.1 Custo de produção de proteínas recombinantes usando-se diferentes sistemas de expressão (Hood *et al.*, 2002).

Sistema de expressão	Custo (USD/g)
Células de ovário de hamster chinês (CHO)	300
Ovos de galinha transgênica	1-2
Leite de cabra transgênica	1-2
Fermentação microbiana	1,00
Plantas transgênicas*	0,10

*Preço de produção, usando semente de milho com 1% de expressão da proteína recombinante.

A escolha da planta para produção de proteína recombinante vai ditar o processo de produção e purificação e, conseqüentemente, influenciar o preço final do produto. Infelizmente, até hoje não existe consenso entre os pesquisadores sobre qual planta seria a mais adequada para produção de uma certa proteína. Cada grupo de pesquisadores defende uma certa espécie de planta, mas o fato é que o primeiro produto em grande escala (tripsina com nome comercial TrypZean) usando planta como biorreator foi produzido em milho (Woodard *et al.*, 2003). Menkhaus *et al.* (2004a) consideram que as plantas mais prováveis para serem usadas no futuro como biorreatores são canola, milho e soja. Por outro lado, Twyman *et al.* (2003) consideram atraente a produção de proteína recombinante em folhas de alface ou tabaco, pois elas possuem maior produtividade de biomassa. A vantagem de usar estas duas plantas como biorreator é também o fato que estas plantas podem ser colhidas várias vezes por ano (Schillberg *et al.*, 2005) em contraste plantas como canola, milho e soja, as quais são usualmente colhidas uma ou duas vezes por ano. Portanto, as plantas usadas como biorreatores podem ser divididas em dois grupos baseando-se no órgão de produção da proteína: semente ou folha. Quando a proteína é produzida na semente (milho, canola ou soja), ela usualmente tem maior estabilidade, mas tem menor produtividade de biomassa por área (quilograma por hectare) quando comparada com a produção em folhas (tabaco ou alfafa), além de também o tempo para produzir a semente ser maior (Nikolov e Woodard, 2004).

A percepção pública sobre plantas geneticamente modificadas plantadas no campo não tem sido muito favorável devido à possibilidade de intercruzamento destas plantas com outras plantas nativas ou cultivadas, especialmente se a planta em questão é usada como alimento ou ração (Menkhaus *et al.*, 2004a). Para diminuir a possibilidade de intercruzamento as plantas que têm autofecundação podem ser utilizadas (por exemplo, soja e tabaco), pois no caso de escolher estas plantas a polinização entrecruzada é muito reduzida. O uso de estufas para a produção de plantas transgênicas pode superar o problema de intercruzamento, mas, no entanto, com o aumento do custo de produção de proteína recombinante (Ma *et al.*, 2003). Portanto, passa a ser muito importante usar sistemas de expressão com alta produção para compensar o aumento do custo da produção em estufas. Assim, a produção de proteínas recombinantes em tecidos verdes, como por exemplo, em folhas de tabaco, seria uma solução potencial deste problema, pois elas apresentam alta produção de biomassa.

No caso do tabaco, tem-se alta produção de folhas e a possibilidade de obter concentrações de proteína recombinante de até 14,4% de proteína total extraída (Verwoerd *et al.*, 1995), mas existem problemas específicos na recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) produzidos neste sistema, especialmente relacionados à liberação de proteína recombinante no meio aquoso (por extração ou maceração) e à purificação (Valdés *et al.*, 2003). Uma das maiores desvantagens tecnológica da produção de proteínas recombinantes em folhas de plantas é a instabilidade da proteína devido as altas concentrações de polifenóis e clorofila, liberados no extrato durante a maceração ou extração, que podem precipitar ou causar perda da atividade da proteína de interesse. Além disso, a adsorção de polifenóis e de clorofila em diversas resinas cromatográficas diminui a capacidade das colunas e causa entupimentos (Bai e Glatz, 2003; Valdés *et al.*, 2003). Estes fatores levam a diminuição de eficiência das etapas de RPB, o que pode resultar em aumento do custo de processamento (Giddings *et al.*, 2000). Portanto, a remoção ou diminuição da concentração dos compostos indesejáveis durante ou após a liberação da proteína recombinante no meio aquoso e a influência da remoção destes compostos na etapa posterior (captura da proteína recombinante) seriam a chave para a produção comercial de proteínas recombinantes a partir de folhas de plantas (Menkhaus *et al.*, 2004a e Nikolov e Woodard, 2004).

Os métodos convencionais para remover polifenóis e clorofila são extração e cromatografia de fase reversa, sendo relativamente altas as quantidades de um ou mais solventes tóxicos utilizados em ambos os métodos (Stalikas, 2007; Jumpatong *et al.*, 2006). Como o produto a ser purificado é uma proteína, solventes orgânicos não podem ser usados pois a maioria destes solventes causa desnaturação das proteínas. Outros métodos menos convencionais são a separação em duas fases aquosas (Chang e Chase, 1996; Zhi *et al.*, 2005), a adsorção em polivinilpirrolidona (Anderson e Sowers, 1968) e a ultrafiltração.

Uma alternativa à esses métodos seria a eletrocoagulação, método eletroquímico (Koganov *et al.*, 1988) no qual coágulos de hidróxidos de metais são gerados pela eletrodissolução de um eletrodo durante eletrólise (Chen, 2004). Os coágulos formados interagem com os compostos a serem removidos e, em seguida, ocorre a sedimentação dos coágulos, o que resulta em remoção destes compostos da fase aquosa (Mollah *et al.*, 2004). Este método é compatível com etapas cromatográficas posteriores, pois não resulta em aumento de viscosidade da solução e pode ser operado em condições desde neutras a levemente alcalinas (Chen, 2004).

A completa remoção de polifenóis e clorofila dos extratos aquosos das folhas de *Solanum lacinatedum* usando eletrodos de alumínio já foi relatada (Chairungsi *et al.*, 2006). Jumpatong *et al.* (2006), estudando a eletrocoagulação como técnica de remoção da clorofila dos extratos das plantas, mostraram que eletrocoagulação (com alumínio) das folhas secas de quatro espécies de plantas (*Stevia rebaudiana*, *Cássia siamea*, *Solanum lacinatedum*, *Andrographis paniculata* e *Centella asiática*) é até seis vezes mais eficiente em remover clorofila do que a extração com clorofórmio ou benzeno.

Comparando-se precipitação química usando sais ou hidróxido de alumínio com a remoção por hidróxido de alumínio produzido por eletrocoagulação, o processo de eletrocoagulação mostrou-se mais efetivo em remover diferentes tipos de compostos: Avsar *et al.* (2007) removeram o óleo essencial de rosas, largamente produzido na Turquia, da água residual da destilação; Yilmaz *et al.* (2007) estudaram a remoção de boro das águas residuárias provenientes de indústria farmacêutica; e Chen *et al.* (2000) estudaram a remoção de graxa das águas residuárias de restaurantes em Hong Kong (China), aonde isto é um grande problema ambiental. Esta maior eficiência de coagulação por hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente provavelmente deve-se ao fato que, no caso de

eletrocoagulação, o pH no qual as partículas de hidróxido são formadas, é constante; já no caso da produção química a partir de sais de alumínio, esta condição é uma variável, pois a formação deste hidróxido depende da quantidade de base adicionada. Embora muitas aplicações de eletrocoagulação já foram feitas em diversas áreas, seu uso em processos biotecnológicos ainda não foi registrado.

1.1 Colocação do problema

Para que tecnologia de produção de proteínas recombinantes em folhas de plantas transgênicas obtenha sucesso é fundamental a minimização da extração dos compostos indesejáveis durante a extração da proteína recombinante no meio aquoso e a remoção destes compostos na etapa seguinte por uma eficiente clarificação. Além de rendimento em termos de proteína recombinante ativa, os impactos de um processo de liberação e clarificação eficientes no custo de produção de uma proteína recombinante serão diretos – pois até 80% destes custos operacionais podem ser relacionados à RPB, com até metade destes custos referentes à extração e clarificação do extrato (Evangelista *et al.*, 1998) – e indiretos, pois a qualidade do extrato clarificado é de grande influência no desempenho das etapas da purificação. No entanto, não há na literatura registro de estudos sistemáticos de liberação de proteínas recombinantes de extratos de tecidos verdes de plantas seguida da remoção de polifenóis e clorofila.

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar a clarificação de extratos de tabaco transgênico pela remoção de clorofila e polifenóis através do uso de eletrocoagulação como técnica de pré-purificação de proteínas recombinantes. Para tal, utilizou-se folhas de *Nicotiana benthamiana* como biorreator, devido a ser este um sistema bem conhecido e largamente utilizado em estudos com plantas transgênicas, e a proteína verde fluorescente sintética (sGFP, “synthetic green fluorescent protein”) como proteína modelo.

1.3 Plano de trabalho

As etapas realizadas para a condução deste trabalho estão esquematizadas na Figura 1.1. Como não existia um método fluorimétrico confiável para quantificação de sGFP em extratos de folhas de tabaco (Remans *et al.*, 1999), já que tal determinação é dificultada pela fluorescência de componentes de folhas como clorofila e polifenóis (Ruijter *et al.*, 2003), a primeira etapa foi o desenvolvimento desta metodologia. A seguir, a eletrocoagulação foi estudada separadamente com duas proteínas modelo, a albumina do soro bovino (BSA) e a lisozima, e o composto fenólico D-catequina, para melhor entender o processo de remoção destes compostos biológicos por esta técnica.

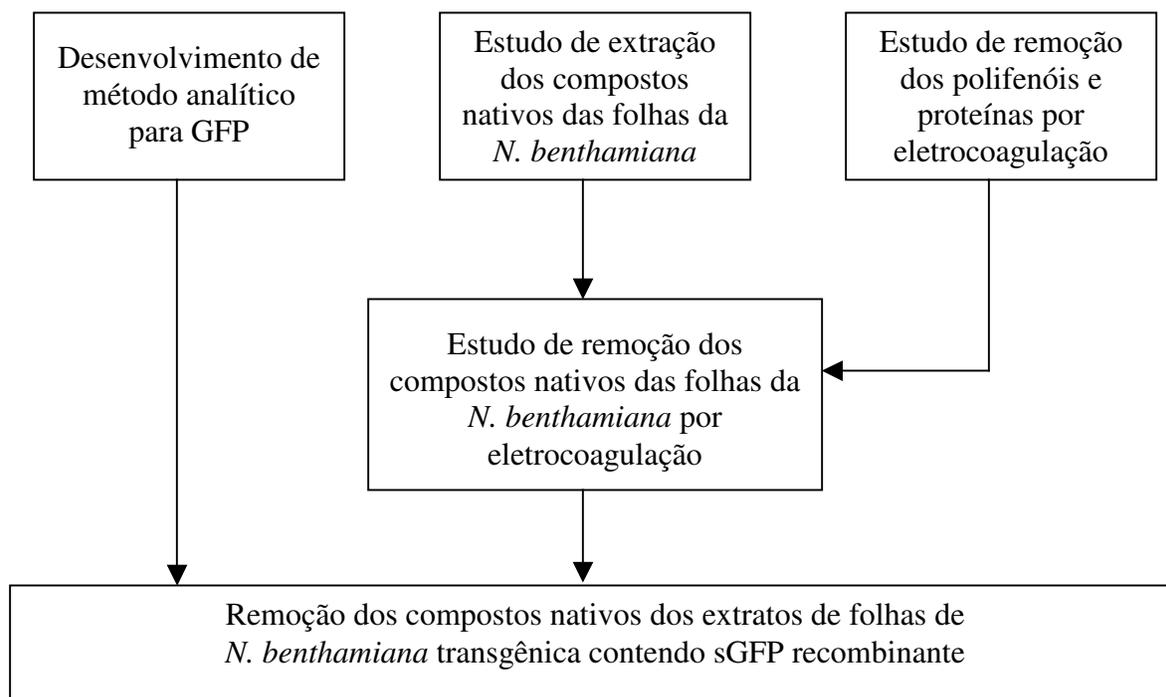


Figura 1.1 Esquema do plano de trabalho para realização deste estudo.

Nesta etapa, modelos matemáticos para a descrição da remoção destes compostos foram também desenvolvidos, uma vez que não se encontram estes estudos na literatura. Nos estudos de extração, folhas de *N. benthamiana* foram maceradas em tampões aquosos com diferentes valores de pH. Em seguida, cada um dos extratos obtidos foi tratado com

hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente sob diferentes condições de pH. A partir destes estudos definiu-se a condição ótima da remoção de clorofila e polifenóis em termos de melhor pH de extração e eletrocoagulação. Por último, a remoção destes compostos dos extratos de *N. benthamiana* transgênica contendo a proteína recombinante sGFP foi feita nestas condições previamente estabelecidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais estudos encontrados na literatura sobre produção e recuperação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas. Inicialmente, a produção destas proteínas em plantas e os fatores relevantes desta produção são apresentados, seguidos da abordagem das principais vantagens e desvantagens do uso de folhas de tabaco como biorreatores. A composição e as características das folhas de tabaco, os fatores importantes na produção de proteínas recombinantes as etapas da recuperação destas são discutidas a seguir, com destaque para a técnica de eletrocoagulação. Por fim, as principais características da GFP, polifenóis e clorofila pertinentes à trabalho são discutidos.

2.1 Sistemas e fatores importantes na produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas

Técnicas de expressão em plantas podem ser divididas em transformação estável (incorporação de gene de proteína recombinante no genoma da planta) e transformação transiente (sem incorporação no genoma da planta). A transformação transiente é rápida quando comparada com a transformação estável e miligramas de proteína podem ser produzidos na planta em alguns dias. O ponto negativo de expressão transiente é o alto custo da produção devido ao custo dos equipamentos, trabalho manual e consumo de reagentes quando comparado com a expressão estável (Stoger *et al.*, 2002). Em casos nos quais as duas técnicas podem ser usadas na mesma planta (exemplo, tabaco), a transformação transiente pode ser usada como avaliação de vetores e da qualidade da proteína produzida antes de se expressar a dita proteína na mesma planta, usando-se transformação estável (Twyman *et al.*, 2003; Schillberg *et al.*, 2005; Stoger *et al.*, 2002).

Assim, também se pode testar as estratégias de purificação de proteínas antes que a transformação estável da planta seja feita, pois esta etapa pode demorar até alguns anos.

Comparando os tempos de produção dos primeiros miligramas de proteínas dos sistemas de expressão de células animais com os para plantas (Figura 2.1), percebe-se que este é bem mais curto no caso de células animais (Twyman *et al.*, 2003). No entanto, como já foi mencionado anteriormente, esta desvantagem pode ser superada usando-se a técnica de expressão transiente infectando-se a planta com vírus ou com a bactéria *Agrobacterium tumerfaciens* (técnica chamada de agroinfiltração) para produzir a proteína de interesse na planta selecionada.

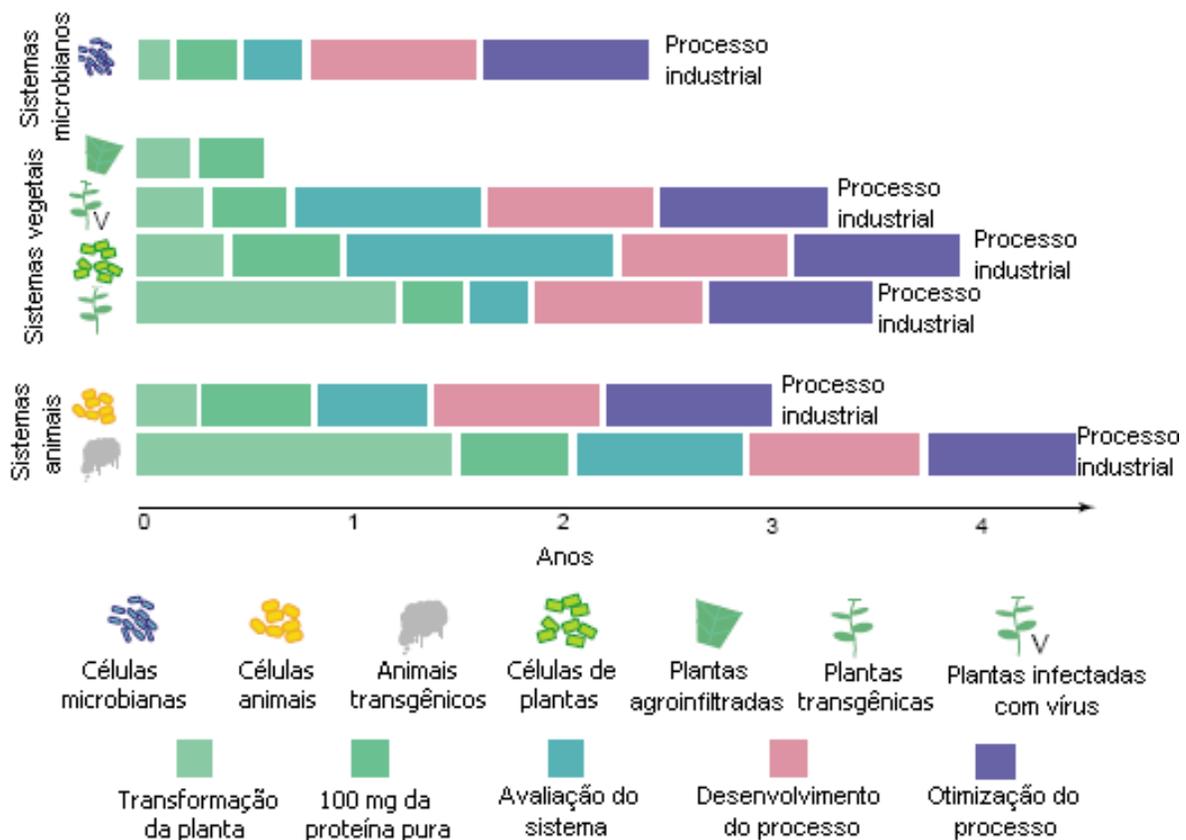


Figura 2.1 Desempenho de sistemas de expressão das plantas em comparação a outros sistemas comerciais para produção de proteínas recombinantes. A figura representa os passos necessários para se estabelecer a produção industrial de proteína recombinante em sistema de expressão específico (Twyman *et al.*, 2003).

As plantas oferecem uma vantagem, pois, além de terem mecanismos de síntese de proteínas praticamente iguais aos dos animais, não contêm patógenos humanos, sequências de DNA oncogênicas e endotoxinas (Ma *et al.*, 2003). Por outro lado, existem diferenças nas modificações pós-tradução. As proteínas humanas recombinantes produzidas em plantas transgênicas usualmente são glicosiladas de forma diferente do que quando produzidas nas células humanas. As diferenças são a adição de xilose e fucose e a impossibilidade de adicionar a galactose e ácido siálico nos N-glicanos (Bakker *et al.*, 2001). Estas dificuldades também podem ser superadas pela adição, por exemplo, no caso de tabaco, da enzima galactosil transferase (GalT) no genoma da planta para poder adicionar a galactose na cadeia de glicano (Bakker *et al.*, 2001). Também foi confirmado que a remoção de N-acetil glucosaminil transferase I da planta *Arabidopsis thaliana* elimina completamente a adição da xilose e fucose nos N-glicanos (Schaeven *et al.*, 1993). Em ambos os casos foi verificado que as modificações nos glicanos das proteínas não têm influência no fenótipo da planta, ou, em outras palavras, a glicosilação modificada não prejudica a planta. Para poder adicionar o ácido siálico, duas enzimas (sintetase de ácido siálico e α -2,3 sialil transferase) deveriam ser adicionadas no aparato de Golgi (Warner, 1998).

2.2 Folhas de tabaco usadas como biorreator e comparação com outros sistemas vegetais de expressão

Os fatores que influenciam o rendimento de proteína recombinante em plantas (expresso em porcentagem de proteína total solúvel) são complexos e dependem muito da atividade do promotor e do local onde o T-DNA (DNA transgênico) vai ser incorporado. O que ficou claro, já na década passada, é que os fatores pós-tradução também têm grande influência na estabilidade de proteína. Fiedler *et al.* (1997) conseguiram a produção de 4,0 a 6,8% da proteína total solúvel em folha de tabaco de dois diferentes anticorpos, quando um peptídeo sinal específico para retenção de proteínas no retículo endoplasmático (ER) foi adicionado. Neste mesmo trabalho, os autores também provaram que, no caso do uso de peptídeo sinal para ER, os anticorpos não perderam sua atividade durante uma semana dentro das folhas secas à temperatura ambiente. Isto pode ser explicado pelo fato que a

maioria das proteases das folhas do tabaco não é ativa em folhas secas (Dai *et al.*, 2005). No caso de tabaco, a proteína, além de ser produzida e depois estocada no ER, pode ser secretada no espaço extracelular. Na produção da enzima fitase usando-se um peptídeo sinal de proteína PR-S extracelular do tabaco para secreção de proteína no apoplasto, até 14,4 miligramas de fitase por grama de proteína total solúvel foi extraída e sua concentração foi de 87 vezes maior no espaço extracelular do que no extrato de folhas inteiras (Verwoerd *et al.*, 1995). No caso de produção de endoglucanase de *Acidothermus cellulolyticus* usando-se peptídeo sinal para ER ou apoplasto, a produção de enzima dentro da folha de tabaco foi em torno de duas vezes mais alta que no caso de secreção (Dai *et al.*, 2005). Um sistema também interessante, mas não muito prático, está sendo desenvolvido pela empresa Phytomedics (<http://www.phytomedics.com/>), em que a fosfatase humana está sendo secretada pelo fenômeno de “gutação” (formação de gotas de xilema nas pontas de folhas, devido à diferença de pressão da água do ar e da terra, em algumas plantas com sistema vascular), onde o xilema da folha de tabaco é secretado por estômatos modificados chamados de hidatódios (Komarnytsky *et al.*, 2000).

O tabaco é a planta mais empregada em estudos de transformação genética e existem várias técnicas de expressão de proteína recombinante nesta planta, como transformação estável de DNA, transformação transiente e também transformação do cloroplastos. Com exceção da transformação de cloroplastos, tratam-se de técnicas bem robustas e de mecanismos bem conhecidos, portanto, o tabaco oferece menor custo e tempo de montagem do processo de produção de proteína recombinante (Stoger *et al.*, 2002). Além disso, o tabaco oferece alta produtividade de biomassa, alta expressão e alta estabilidade de proteína recombinante de até meses como no caso de anticorpo mantido em folhas secas (Schillberg *et al.*, 2005).

Quando compara-se a folha de tabaco com sementes de soja e canola, deve-se levar em conta que as folhas de tabaco não contêm óleos (Tabela 2.1), também conhecidos por interferir nas etapas de cromatografia, pois a adsorção de óleos nas resinas cromatográficas exige limpeza das colunas com mais frequência (Bai e Glatz, 2003). A extração dos óleos a partir das sementes moídas de canola (Bai e Glatz, 2003) ou soja (Robić, 2005), usando hexano como solvente possui seus inconvenientes de custo e periculosidade. Em termos de conteúdo de proteínas e carboidratos, as folhas de tabaco são

parecidas com sementes de canola, milho e soja. Já a quantidade de polifenóis, no caso de folhas de tabaco, é várias vezes maior quando comparada com a das sementes. A presença de clorofila é também um ponto negativo quando a proteína é produzida neste órgão, pois as sementes das plantas usualmente não possuem este composto (Tabela 2.1).

Outra desvantagem de se usar folhas como biorreator é a presença de alcalóides tóxicos no extrato (nicotina no caso de tabaco), mas apesar de muitas variedades de tabaco possuírem altas quantidades de alcalóides tóxicos, existem variedades com baixas concentrações (Twyman *et al.*, 2003). Em contrapartida, as sementes têm lectinas que são tóxicas e, em geral, dificilmente separadas do produto final (Stoger *et al.*, 2002). Como o tabaco não é usado como comida ou ração, e por não existir a possibilidade de contaminação de plantas das cadeias alimentares com intercruzamento de plantas transgênicas, a percepção pública do uso desta planta como biorreator é mais favorável do que no caso de outras plantas (Twyman *et al.*, 2003).

Tabela 2.1 Composição de órgãos das plantas usadas como biorreator como porcentagem mássica do composto no órgão da planta (Menkhaus *et al.*, 2004a).

Órgão da planta	Água (%)	Proteína (%)	Carboidratos (%)	Óleo (%)	Clorofila (%)	Polifenóis (%)
Canola (semente)	12	21	5	40	0	0,640
Milho (semente)	10	11	66	4	0	0,031
Soja (semente)	9	37	30	20	0	0,023
Tabaco (folha) seco		9	30	0	0,1*	3,000

* Kung *et al.* (1980)

2.3 Estrutura e proteínas das folhas de tabaco

A estrutura da folha do tabaco, como também a das outras folhas fotossintetizantes, pode ser dividida em três grupos: epiderme, mesófilo e sistema vascular (Figura 3). A epiderme é um tecido com células dispostas compactamente na superfície da

folha, relativamente não especializadas. As células epidérmicas de modo geral apresentam pouca ou nenhuma clorofila. A presença de material ceroso, a cutina, na superfície da epiderme (cutícula), restringe a respiração e também a saída e entrada de água. A troca de gás entre a folha e atmosfera é feita pelos estômatos (abertura que conecta o sistema vascular da folha com a atmosfera), que estão presentes na face inferior da folha.

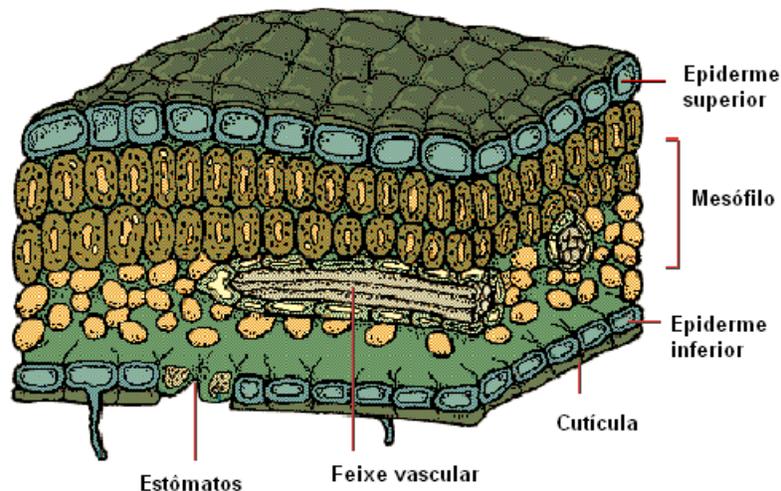


Figura 3. Estrutura de folha mostrando epiderme, mesófilo e sistema vascular (White, 1993).

O mesófilo constitui a maior parte do tecido da folha, sendo caracterizado pela abundância de cloroplastos (organela da célula contendo clorofila). Ele é composto de células de diferentes tamanhos, entrelaçadas por projeções (braços) que se estendem de uma célula à outra. Como entre as células existe um sistema de grandes espaços (sistema vascular da folha), conectado com o ar do ambiente pelos estômatos, a grande parte das superfícies de células no mesófilo fica exposta ao ar. Esta grande superfície de paredes celulares do mesófilo também é chamada de apoplasto. Portanto, quando somente as proteínas presentes no apoplasto precisam ser analisadas, as folhas são cortadas em discos pequenos, para não quebrar as paredes de células do mesófilo, e extração a vácuo é feita para obter o extrato de proteínas presentes no apoplasto (Dai *et al.*, 2005). Os feixes vasculares formam um sistema interligado em posição paralela à superfície da folha. Os

feixes menores, localizados no mesófilo, apresentam-se envolvidos por uma ou mais camadas de células que se dispõem compactamente, constituindo a bainha do feixe. As bainhas envolvem as terminações vasculares de tal maneira que xilema e floema (vasos de transporte e armazenamento de água e alimentos) em seu transcurso na folha não ficam expostos ao ar contido nos espaços intercelulares (Esau, 1976).

As proteínas da folha do tabaco podem ser categorizadas em duas frações, com base nas separações eletroforéticas: fração F1, composta de uma proteína de cloroplasto, e fração F2, que é a mistura de várias proteínas do cloroplasto e do citoplasma (Kung e Tso, 1978).

F1 é a enzima ribulase 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RuBisCo) com massa molecular de 560 kDa composta de 8 subunidades com massa molecular de 55 e 8 subunidades com massa molecular de 12,5 kDa e pI deles de 6,0 e 5,3, respectivamente. Como esta proteína é solúvel somente em concentrações de sal em torno de 2 M de NaCl (Kung e Tso, 1978) e os tampões de extração usualmente empregados na extração de proteínas recombinantes não excedem a concentração de sal acima de 300 mM de NaCl (Bai e Glatz, 2003, Farinas *et al.*, 2005; Kusnadi *et al.*, 1998; Robić, 2005), ela geralmente não é extraída em tampões de extração tipicamente usados em RPB (Menkhaus *et al.*, 2004a).

A fração F2 é composta de várias proteínas de massa molecular de 15 a 100 kDa e pI entre 3 e 10, com a maioria de pI entre 4 a 6. Recentemente, foi criada uma base de dados para as proteínas de *Nicotiana tabacum*, usando-se a técnica de eletroforese de 2D, que pode facilitar a identificação de qualquer destas proteínas (Laukens *et al.*, 2004). Assim, ficaram conhecidas as massas moleculares e pontos isoelétricos das proteínas do tabaco e permitiu-se que a hidrofobicidade destas possa ser estipulada, pois as seqüências dos aminoácidos das proteínas também são conhecidas. Desta forma, pode ser facilitada não somente a escolha das etapas do RPB como também a identificação das impurezas presentes em cada etapa do processo. Por outro lado, nenhuma tentativa foi feita para tentar fracionar as proteínas da folha do tabaco até alguns anos atrás (Menkhaus *et al.*, 2004a).

2.4 Fatores de importância do custo de recuperação e purificação de proteínas (RPB) recombinantes produzidas em folhas de plantas

Quando se compara a RPB de proteínas recombinantes produzidas em diferentes sistemas de expressão, percebe-se que o conjunto das etapas de purificação é quase invariante. O que muda são as etapas da recuperação: extração, clarificação e captura da proteína recombinante (Nikolov e Woodard, 2004). Como já é de amplo conhecimento, o custo da proteína recombinante depende significativamente da demanda da pureza da mesma, pois até 80% do custo de produção pode depender das operações de RPB e não da síntese da proteína. Os métodos de purificação são praticamente independentes do sistema de expressão e, portanto, o custo de produção vai ser praticamente igual para todos os sistemas quando há necessidade de alta pureza do produto final (Twyman *et al.*, 2003). Assim, o baixo custo da produção de plantas transgênicas e alta expressão da proteína recombinante não necessariamente significam baixo custo de produto final (Kusnadi *et al.*, 1997). Uma grande vantagem de se usar folhas como biorreator, além da maior produção de biomassa quando comparada com as sementes, é que se forem utilizadas folhas frescas, não há necessidade da adição de água ou tampões aquosos. No caso do processo de obtenção de rGUS (beta glucuronidase recombinante) de milho transgênico o custo da água representou 50% dos custos operacionais de extração ou 20% dos custos operacionais totais (Evangelista *et al.*, 1998).

A grande desvantagem de usar folhas de plantas como biorreatores em comparação com sementes é a alta concentração de polifenóis e pigmentos (clorofila) que têm que ser removidos, pois estes compostos diminuem a vida útil das colunas cromatográficas utilizadas no processo de purificação (Valdés *et al.*, 2003). Assim, requerendo que a limpeza da coluna seja feita com maior frequência (Bai e Glatz, 2003), o que vai ter como consequência o aumento do custo da produção do produto final. Portanto, quando alta pureza do produto é requerida e, assim, métodos cromatográficos devem ser empregados na purificação da proteína recombinante, processos pré-cromatográficos devem ser desenvolvidos de forma a diminuir as concentrações dos compostos indesejáveis nos extratos (Menkhaus *et al.*, 2004a). No entanto, a literatura não registra este tipo de estudo usando-se folhas de plantas transgênicas como biorreator, inclusive tabaco.

2.5 Liberação das proteínas recombinantes a partir de folhas de plantas

As etapas de RPB para a produção de proteínas recombinantes em folhas de plantas transgênicas são divididas, como em todos os processos biotecnológicos, em recuperação, purificação e tratamento final. As etapas de recuperação, menos a última etapa de captura, são divididas em: liberação de proteína no meio aquoso, clarificação e concentração (Austin *et al.*, 1994). Por liberação se entende obter a proteína recombinante alvo por maceração e prensagem das folhas frescas para obtenção de suco das folhas ou por extração com o uso de uma solução aquosa.

2.5.1 Maceração das folhas de plantas frescas

Austin *et al.* (1994) fizeram a avaliação dos vários tipos de maceradores para obter o suco de alfafa e perceberam que as concentrações de sólidos, proteína e clorofila e atividade de três enzimas nativas não eram afetadas pelo tipo de macerador usado; o que de fato variou foi o rendimento do suco prensado. Isto provou que os métodos de maceração diferem em eficiências de rompimento das células, mas não no conteúdo de suco. Levando em consideração o custo do suco produzido e a eficiência, o preço e a robustez do macerador, os autores concluíram que maceradores de impacto (Figura 2.3) são os equipamentos mais apropriados para a obtenção de suco das folhas. Nesta etapa, antioxidantes, como, por exemplo, ácido ascórbico, são adicionados para prevenir a ligação entre proteínas e polifenóis (Nikolov e Woodard, 2004). O uso de inibidores de proteases foi relatado somente em um caso, onde a GUS extraída a partir de alfafa transgênica não mostrou a estabilidade necessária no extrato (Austin *et al.*, 1994).

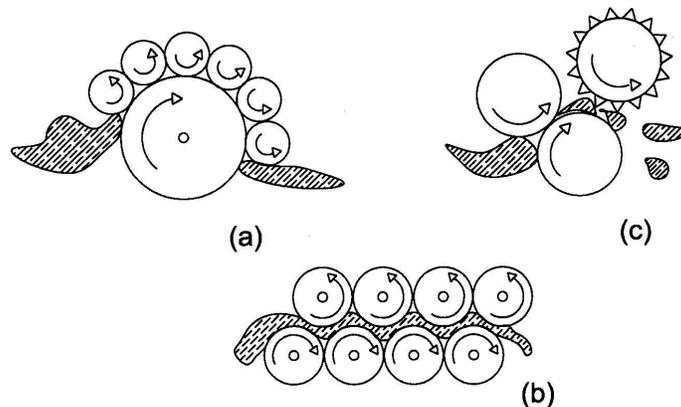


Figura 2.3 Três tipos de maceradores de impacto usados em maceração de folhas em grande escala: (a) macerador periférico; (b) macerador de cambaleamento; (c) macerador de esmagamento (Savoie, 2001).

2.5.2 Extração de proteínas recombinantes a partir das folhas de tabaco

O trabalho mais completo sobre extração aquosa das proteínas nativas de folhas de tabaco encontrado na consulta da literatura, é o trabalho de Balasubramaniam *et al.* (2003) no qual o efeito do pH do tampão de extração na recuperação da proteína total foi estudado. Neste trabalho, no qual a extração foi feita em liquidificador com tampões de citrato, fosfato e Tris 50 mM (pH 3-5, 6-8 e 9, respectivamente), os autores perceberam que a proteína total extraída variou entre 1,0 e 1,6 % em massa com base na folha fresca (Figura 2.4). No entanto, o grupo não analisou quais proteínas foram extraídas para cada valor de pH de tampão de extração. O grupo também percebeu que existem mais proteínas com ponto isoelétrico ácido do que básico e que o pH intracelular das células da folha do tabaco está em torno de 5. Estes dados indicam, que a mudança de solubilidade de proteínas totais com a mudança de pH da solução extratora do tabaco é mais parecida com o observado para proteínas das sementes do milho (Farinas *et al.*, 2005), do que para as proteínas de soja (Robić, 2005) ou de ervilha (Menkhaus *et al.*, 2004b), pois a concentração de proteína total no caso de tabaco e milho não muda tanto com alterações de pH quanto nos casos de soja e ervilha. O ponto isoelétrico da maioria das proteínas da folha do tabaco, por outro lado, parece ser bem parecido com as de milho (pI = 4,5), soja (pI = 4,2) e ervilha (pI = 4,5).

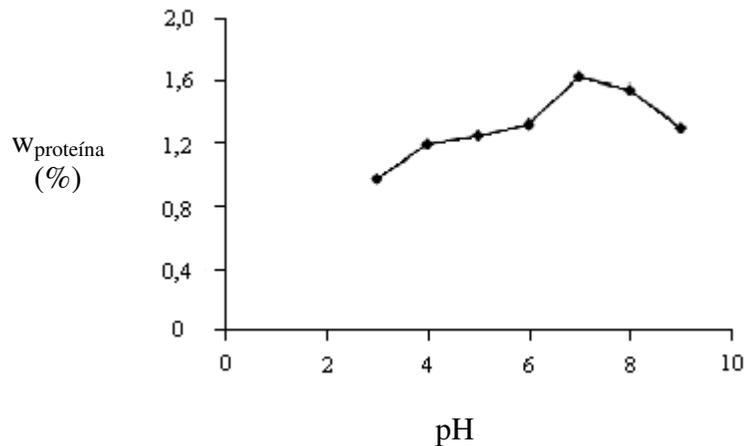


Figura 2.4 Proteína extraída da folha do tabaco em porcentagem da massa seca da folha ($W_{\text{proteína}}$) em função do pH. Agente tamponante na solução extratora (50 mmol/L): citrato, pH 3-5; fosfato, pH 6-8; e Tris, pH 9. Razão massa:volume de 1:10. Cada ponto representa a média de 12 extrações (Balasubramaniam *et al.*, 2003).

Para diminuir os custos de transporte e processamento do suco clarificado, este tem de ser concentrado. Isto pode ser feito usando-se ultrafiltração, por exemplo, com membrana de massa molecular de corte de 10 kDa, pois estas membranas permitem a redução de volume em torno de 5 vezes sem perdas das proteínas do suco (Austin *et al.*, 1994).

2.5.3 Clarificação de extrato ou suco de folhas de plantas

Para clarificar o extrato ou suco de folhas de plantas é necessário que se faça a precipitação de fragmentos de células e das proteínas do cloroplasto (composta principalmente pela proteína F1), como também de polifenóis e clorofila. Este procedimento pode ser feito usando umas das seguintes técnicas: (1) precipitação térmica (Chibnall e Schryver, 1921); (2) partição entre duas fases aquosas (Balasubramaniam *et al.*, 2003); ou (3) eletrocoagulação (Koganov *et al.*, 1988).

A primeira técnica, pode ser aplicada somente no caso de proteínas-alvo termicamente estáveis na temperatura de precipitação ou que não coagulem nesta temperatura. Leelavathi *et al.* (2003) empregaram esta técnica na primeira etapa de

purificação de uma xilanase termoestável. Os autores aqueceram o extrato de folhas de *N. benthamiana* a 70 °C por meia hora. Assim, os autores removeram a maioria das proteínas do extrato, no qual a xilianase restou como a proteína principal. A segunda técnica, partição em duas fases aquosas, seria uma técnica de clarificação ótima, pois, além de purificar, a solução, o produto-alvo pode ser concentrado em até dez vezes, se a proteína recombinante tiver afinidade pela fase com PEG (polietilenoglicol). No trabalho de Balasubramaniam *et al.* (2003) foi relatado um fator de purificação de 4 e recuperação de 87% da proteína lisozima a partir dos extratos de *N. benthamiana* não-transgênica nos quais esta proteína foi adicionada. Infelizmente, a clorofila e polifenóis também têm preferência pela fase de PEG (Miller *et al.*, 2004). Outro ponto negativo deste método é que, além de alto consumo de reagentes (polímeros, tampões, detergentes e sal), a viscosidade da solução é aumentada, o que usualmente prejudica as etapas cromatográficas posteriores (Chang e Chase, 1996; Zhi *et al.*, 2005). A terceira técnica de clarificação, a eletrocoagulação é discutida em detalhes a seguir.

2.5.4 Eletrocoagulação e seu uso em clarificação de extratos de plantas

A segunda técnica, eletrocoagulação, pode ser usada a temperaturas mais baixas e é provavelmente a técnica mais adequada para remover a clorofila e polifenóis dos extratos. Na revisão de Austin *et al.* (1994), os autores sugeriram que o uso da eletrocoagulação na clarificação de suco de folhas de alfafa seria a técnica mais adequada. Esta técnica preferencialmente remove as proteínas do cloroplasto dos extratos, como demonstrado no trabalho de Koganov *et al.* (1988), onde os autores removeram estas proteínas dos extratos da alfafa. Phutdhavong *et al.* (2000), testando esta técnica para remover diferentes tipos de polifenóis, mostraram que a eletrocoagulação também pode ser usada para remover os polifenóis das soluções aquosas.

A eletrocoagulação é um método eletroquímico de geração de coágulos pela dissolução elétrica do alumínio de um eletrodo (Figura 2.5). Neste método, a geração de íons de alumínio (Al^{3+}) ocorre no ânodo (Equação 2.1) e a hidrólise da água ocorre no cátodo, onde há a formação de hidrogênio e do íon hidróxido (Equação 2.2). O hidrogênio formado sai da solução em forma de gás e os íons de alumínio reagem com íons hidroxila

formando hidróxido de alumínio (Chen, 2004) que precipita da solução em forma de gel (Equação 2.3).



Os íons de alumínio hidrolisados podem formar grandes redes (Al-O-Al-OH) insolúveis em água, as quais podem adsorver quimicamente as substâncias a serem removidas da solução (Chen, 2004). A eficiência do método, portanto, depende em grande parte da quantidade dos íons alumínio produzidos.

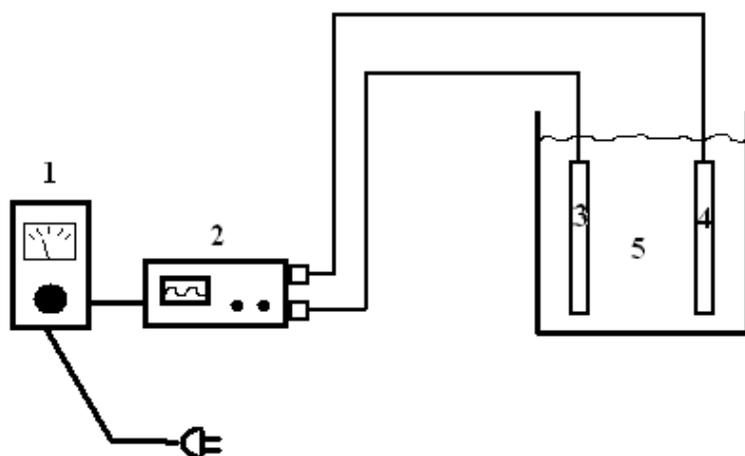


Figura 2.5 Esquema do sistema de eletrocoagulação. 1 – transformador com saída variável; 2 – amperímetro; 3 e 4 – eletrodos de alumínio; 5 – extrato ou suco das folhas de tabaco.

Para evitar o aquecimento desnecessário da solução, deve-se empregar o menor potencial possível entre os eletrodos (Equação 2.4). Um fator que pode influenciar o aquecimento local da solução, especialmente se for utilizada corrente contínua, é a concentração local de eletrólitos mais alta nas proximidades do eletrodo (Amatore *et al.*, 1998). Este fenômeno ocorre devido à formação de dupla camada de íons em volta do eletrodo, tendo como consequência o aumento de condutividade e criação de potencial interfacial, que provoca o aquecimento local da solução. Isto pode ser evitado empregando-se a corrente alternada entre os eletrodos (Amatore *et al.*, 1998). Como a condutividade da solução depende da concentração dos eletrólitos (usualmente o NaCl é adicionado à solução para o aumento da condutividade, Phutdhawong *et al.*, 2000) e em menor grau do pH da solução, estes também terão influência sobre o tempo de processo e o potencial a ser empregado entre os eletrodos (Equação 2.5).

$$P = U^2 \cdot \frac{1}{R} = I^2 \cdot R \quad [\text{W}] \quad [2.4]$$

$$I = \frac{U}{R} \quad [\text{A}] \quad 2.5]$$

I – corrente elétrica	[A]
P – potência dissipada ($P = \frac{Q}{t}$)	[W] ou [J/s]
U – potencial entre os eletrodos	[V]
$\frac{1}{R}$ – condutividade da solução	$[\Omega^{-1}]$
R – resistência da solução	$[\Omega]$
Q – calor dissipado	[J]
t – tempo	[s]

A técnica também é dependente da temperatura, apresentando dois picos de eficiência máxima a 35 e a 60 °C, pois a transmissão de corrente elétrica pelo alumínio é máxima nestas duas temperaturas (Chen, 2004). As vantagens da eletrocoagulação são alta eficiência, robustez, baixo custo (os dois eletrodos são lâminas de alumínio), a

possibilidade de automação do método (Chen, 2004) e, principalmente, o fato de que ela pode ser conduzida sem a adição de sais ao meio (Phutdhavong *et al.*, 2000).

2.6 Propriedades da proteína verde fluorescente de polifenóis e da clorofila

2.6.1 A proteína verde fluorescente (GFP – “green fluorescent protein”)

A GFP selvagem (Figura 2.6) é uma proteína composta de 283 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 26.927 Da e pI de 5,51 originária da *Aequorea victoria* (medusa de cristal) que, devido a sua estrutura única, emite luz verde quando iluminada com a luz UV ou luz azul (Tsien, 1998). Os aminoácidos da proteína formam 11 cadeias-beta, cujo conjunto forma um cilindro, no centro do qual se situa o cromóforo (a parte da molécula responsável pela cor). O cromóforo é formado dos resíduos 65 a 67 (Ser-Tyr-Gly) no caso da GFP selvagem (Prasher *et al.*, 1992). Ela tem sido utilizada como a proteína repórter ou como proteína de fusão, uma vez que não necessita nenhum substrato ou co-fator para a sua fluorescência (Chalfie *et al.*, 1994). Existem também variantes modificadas desta mesma proteína com propriedades espectrais distintas. As variantes de GFP podem ser divididas em sete grupos baseados na composição dos seus cromóforos, cada grupo tendo os comprimentos de onda de excitação entre 360 e 489 nm e da emissão entre 440 e 529 nm (Tsien, 1998). A variante usada neste trabalho é a sGFP, contendo a mutação no cromóforo onde o resíduo serina na posição 65 é substituído pela treonina (S65T), com comprimento de onda de excitação de 480 nm e de emissão 513 nm (Chiu *et al.*, 1996).

2.6.2 Propriedades dos polifenóis

Polifenóis são metabólitos secundários das plantas cuja estrutura pode variar de moléculas simples, como, por exemplo, os ácidos fenólicos, até polímeros de alta massa molecular, até acima de 30 kDa como, por exemplo, os taninos (Bravo, 1998). Harborne (1989) dividiu os polifenóis em 16 grupos baseando-se nas diferenças de estrutura básica: fenóis simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos

hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonóides, lignanas e ligninas. Entre os mais abundantes estão os fenóis simples e flavonóides, que são solúveis em soluções aquosas, mas podem ser também ligados através de ponte de éster nas partes insolúveis das paredes das células vegetais, como alguns polissacarídeos e lignina (Bravo, 1998). Outro grupo abundante de polifenóis são taninos de alta massa molecular, os polímeros de monômero flavan-3-ol. Eles são fracamente solúveis em água e se não ligados ou complexados com proteínas ou polissacarídeos da parede celular, podem ser extraídos com solventes orgânicos (Porter, 1989).

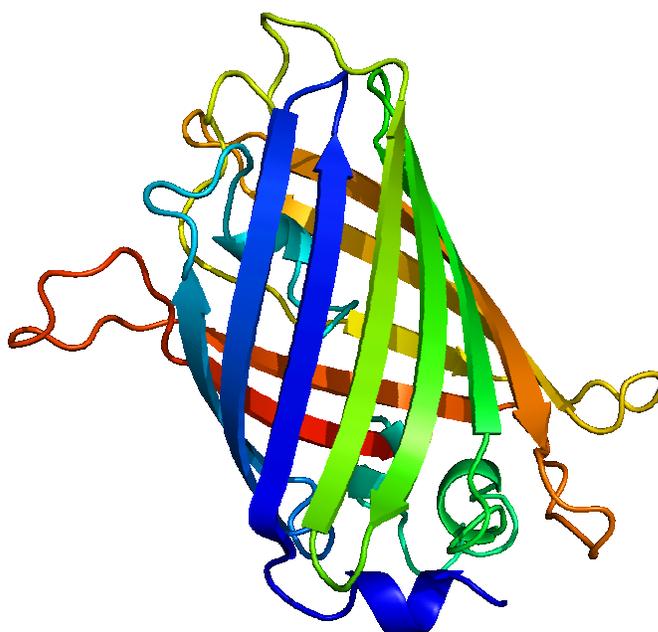


Figura 2.6 Estrutura tridimensional da GFP mostrando o cilindro de cadeias-beta no qual centro está o cromóforo (Wheeler, 2006).

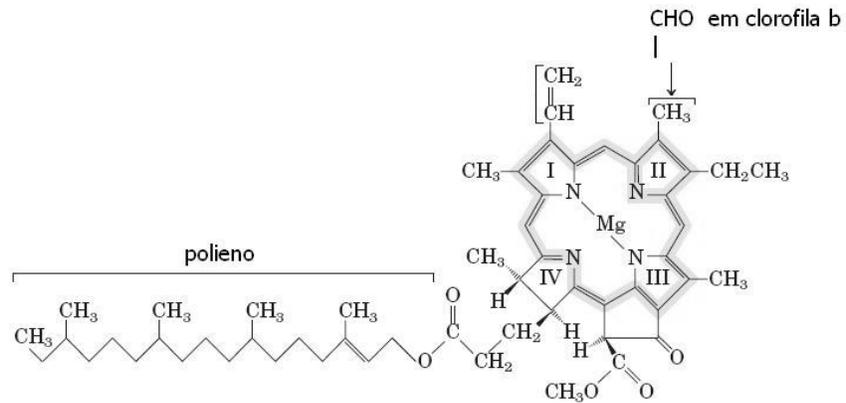
As reações de fenóis com proteínas podem ser divididas em quatro grupos principais (Loomis, 1974):

1. Ponte de hidrogênio, onde o grupo hidroxila forma ligação relativamente forte com átomo de oxigênio da ligação peptídica. Esta ligação é uma das ligações mais fortes de hidrogênio conhecida e não pode se desfazer por diálise ou filtração em gel;
2. Oxidação em quinonas e em seguida formação de ligação covalente com grupos $-SH$ e $-NH_2$ das proteínas;
3. Interações iônicas formadas entre grupos hidróxi dos fenóis, que usualmente têm pK_a acima de 9 e resíduos básicos das proteínas;
4. Interações hidrofóbicas, nas quais o anel aromático é ligado aos resíduos hidrofóbicos das proteínas.

2.6.3 Propriedades da clorofila

A clorofila é o pigmento mais importante de plantas, com estrutura cíclica e planar parecida com protoporfirina da hemoglobina, com a diferença que Mg^{2+} e não Fe^{2+} ocupa a posição central (Figura 2.7a). O anel heterocíclico cercado o íon de Mg^{2+} tem estrutura estendida de polieno que ajuda a molécula a absorver a luz de espectro visível (Nelson e Michael, 2005). Cloroplastos sempre contêm duas formas de clorofila, a clorofila a e clorofila b (Figura 9a). Embora as duas formas sejam verdes, seus espectros de absorção são diferentes (Figura 2.7b). A maioria das plantas contém em torno de duas vezes mais clorofila a do que clorofila b. A clorofila usualmente é extraída usando-se como solventes acetona, álcool ou outros solventes orgânicos (Thompson *et al.*, 1999) devido à sua baixa solubilidade em água (Thornber, 1971).

a)



b)

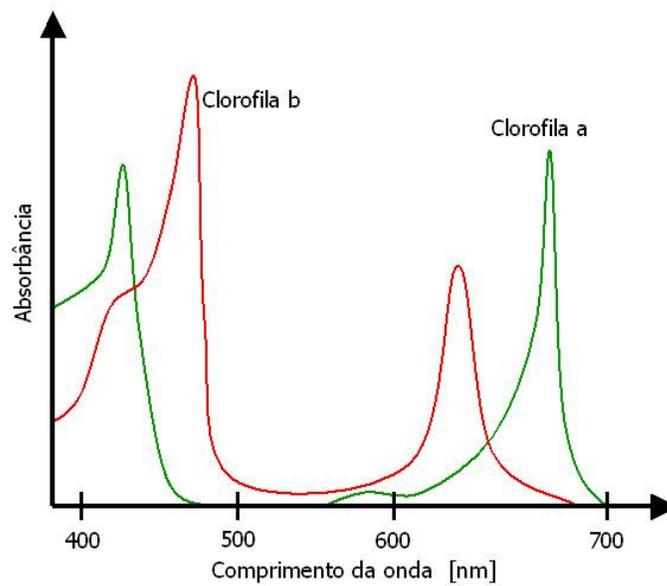


Figura 2.7 Estrutura da clorofila (a) e a absorção de luz visível de suas duas formas (b) (Nelson e Michael, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os materiais utilizados neste trabalho, bem como também os métodos analíticos e protocolos de experimentos.

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

As chapas de alumínio usadas como material dos eletrodos em todos os experimentos eram do tipo 1100 ($\geq 99\%$ puro) com 1 mm de espessura. Os principais reagentes utilizados na preparação dos solventes – NaCl, metabisulfito de sódio (MBS), ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES), ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (MOPS), tris(hidroximetil)amino metano (TRIS) e uréia – eram de grau analítico (Sigma, EUA). Os reagentes usados para eletroforese – glicina, 3-(3-cholamidopropilo)dimetilamônio-l-propano sulfonato (CHAPS), ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, dodecil sulfato de sódio (SDS), N,N,N,N,tetra-metil-etilenendiamina (TEMED), persulfato de amônio, Coomassie blue R250, acrilamida e bis-acrilamida – foram adquiridos da BioRad (EUA), todos apresentando pureza apropriada para eletroforese. Albumina do soro bovino (BSA) e lisozima (ambas com pureza $\geq 98\%$ pureza), como também a D-catequina (pureza $\geq 98\%$) foram adquiridas da Sigma (EUA). Água ultrapura, preparada com sistema Milli-Q (Millipore, EUA) foi usada em todos os experimentos.

3.1.2 *Nicotiana benthamiana* e *Escherichia coli* transgênicas

Todo material geneticamente modificado foi doado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF). Neste trabalho foram utilizadas sementes e folhas liofilizadas de *Nicotiana benthamiana* transgênicas contendo o gene sGFP sob controle do promotor CaMV35S e do terminador t-nos e também contendo o gene da neomicina fosfotransferase II (*nptII*), sob controle do promotor CaMV35S e do terminador t-CaMV35S. Utilizou-se também a linhagem de *E. coli* XL1Blue clonada com vetor de expressão pQE30 (Quiagen, Alemanha) no qual foi inserido o gene de sGFP com cauda de seis resíduos de histidina (sGFP(6His)) nos sítios *Bam*HI e *Pst*I.

3.2 Métodos

3.2.1 Produção de sGFP(6His) em *E. coli*

O cultivo da linhagem de *E. coli* contendo do gene de sGFP(6His) foi realizado em 0,5 L de solução de Lauria Broth (LB) contendo peptona 1% (m/m), extrato de levedura 0,5% (m/m), NaCl 1% (m/m) e 100 µg/mL de ampicilina à temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm, inoculada com 20 mL de cultura fresca crescida durante a noite. Quando a densidade ótica da cultura a 600 nm atingia 0,9 de absorbância (medida em cubeta de plástico de 10 mm), solução concentrada de isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) era adicionada para atingir a concentração final de 1,0 mmol/L de IPTG com a finalidade de induzir a produção da proteína recombinante. Após 2,5 h a cultura induzida era centrifugada em 5.000 g por 10 min a temperatura de 12 °C. O sobrenadante era descartado e as células sonicadas em 20 mL de tampão de fosfato pH 7,40 contendo 300 mmol/L de NaCl e 20 mmol/L de imidazol. As paredes celulares lisadas das células eram removidas por centrifugação (8.000 g por 15 min a 4 °C) e o sobrenadante usado na etapa de purificação da sGFP(6His).

3.2.2 Purificação de sGFP(6His) produzida em *E. coli*

Um volume de 10 mL de extrato de *E. coli* contendo sGFP(6His) em tampão de adsorção (20 mL de tampão de fosfato 50 mmol/L pH 7,40 contendo 300 mmol/L de NaCl e 20 mmol/L de imidazol) foi injetada em coluna HIStrap® de 5 mL (GE Healthcare, EUA). Em seguida, a coluna foi lavada com 100 mL de tampão de adsorção e a eluição foi feita com o mesmo tampão contendo 200 mmol/L de imidazol. Durante todo o experimento, frações de 5 mL foram coletadas. A fração de eluição (contendo 0,45 mg/mL de sGFP(6His) eletroforeticamente pura ($\geq 98\%$)) foi usada para estudos de “spiking” (adição da proteína recombinante ao extrato de folhas de *N. benthamiana* não transgênica).

3.2.3 Protocolo de extração das folhas

A extração de folhas de *N. benthamiana* não-transgênica (como também das transgênicas) foi feita em béquer de 200 mL (5,5 cm de diâmetro) no qual 5 g de folhas frescas ou 500 mg de folhas liofilizadas foram adicionadas e em seguida adicionou-se 50 mL de tampão apropriado (proporção 1:10 sólido para líquido no caso de folhas frescas e 1:100 no caso de folhas liofilizadas). A extração foi feita em temperatura de 25 °C (verificado com termômetro durante a extração) com liquidificador de mão BHB986 (Bluesky, China) durante 2 min. O tampão de extração para o desenvolvimento do método quantitativo de GFP foi o tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Os tampões de extração utilizados para ensaios de eletrocoagulação foram: MES para pH 5,5, MOPS para pH 7,0 ou TRIS para pH 8,0, 9,0 e 10,0, todos na concentração de 10 mmol/L contendo 5 mmol/L de MBS (metabissulfito de sódio). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 15.000 g por 30 min a 25 °C e o sobrenadante filtrado em uma membrana de poro de 3 µm (Inlab, Brasil). Este filtrado (extrato) foi usado imediatamente ou congelado em tubos Eppendorf de 2 mL para análises posteriores.

3.2.4 “Spiking” dos extratos de tabaco

Aos extratos de *N. benthamiana* não-transgênica adicionou-se sGFP(6His) preparada como descrito no item 3.2.3. Os extratos foram preparados de forma que as

concentrações finais da sGFP(6His) fossem de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0% desta proteína em termos de massa de sGFP(6His) por massa de proteína total no extrato ($w_{sGFP(6His)}$) com a finalidade de simular a expressão *in vivo* desta proteína em folhas de *N. benthamiana*.

3.2.5 Protocolo de eletrocoagulação

Uma célula feita de acrílico, similar àquela construída por Carmona *et al.* (2006), com dimensões internas de 40 × 20 × 80 cm sendo duas de suas paredes constituídas pelos eletrodos de alumínio (40 × 80 mm) afastados 20 mm entre si, foi usada em todos os experimentos (Figura 3.1). Um volume de 40 mL de tampão MES (usado em pH 5,5), MOPS (usado em pH 7,0) ou TRIS (usado para pH entre 7,5 e 10,0), na concentração de 100 mmol/L contendo NaCl 200 mmol/L como eletrólito, foi adicionado à célula. O pH entre 5,0 e 10,0 foi escolhido com base em estudos encontrados na literatura (Koporal *et al.*, 2008; Moueden *et al.*, 2008), onde os autores comprovaram que a formação de hidróxido de alumínio não é afetada nesta faixa de pH. Altas concentrações de tampões foram escolhidas não somente para manter o pH da solução constante, mas também para complexar os íons de cloro liberados durante o processo, prevenindo, assim, a oxidação indireta dos compostos biológicos. Corrente alternada (60 Hz) foi usada em todos os experimentos e a solução agitada com barra magnética (1.000 rpm) para garantir homogeneização e prevenir aquecimento local da solução. A corrente desejada foi atingida pelo ajuste da potência da saída do transformador variável tipo 2553 (Varivolt, Brasil). No caso dos compostos modelos estudados isoladamente (BSA, lisozima e catequina), o gel foi produzido durante uma hora e no caso da remoção dos compostos do extrato de tabaco, o gel foi produzido durante duas horas.

3.2.6 Adsorção de compostos biológicos dos extratos de *N. benthamiana* em gel de hidróxido de alumínio

A remoção de compostos biológicos (proteínas, polifenóis e clorofila) de extratos de *N. benthamiana* transgênica e não-transgênica foi feita misturando-se extratos de folhas (obtidos como descrito no item 3.2.4) com a suspensão de gel de hidróxido de alumínio (obtido como descrito no item 3.2.6) na proporção 1:1 v/v (se não descrito diferente). Os

valores de pH das soluções obtidas eram iguais aos das suspensões de gel, como confirmado experimentalmente. As soluções foram agitadas levemente durante 1 h e o coagulado foi removido por centrifugação a 12.000 g por 20 min a 25 °C. O sobrenadante foi removido e utilizado imediatamente para análise ou congelado em tubos Eppendorf de 2 mL para análise posterior.

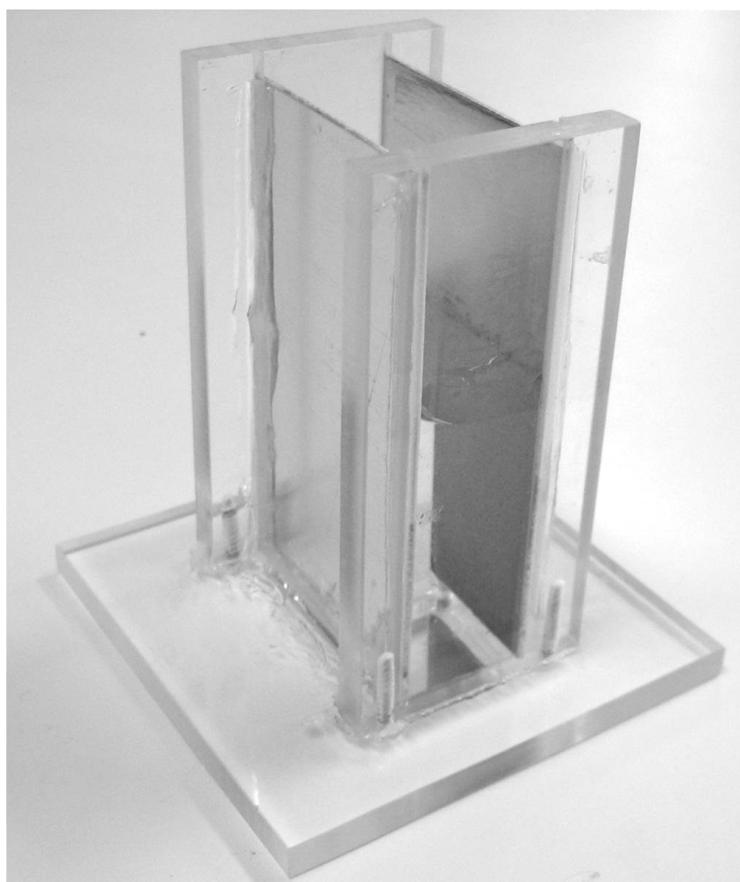


Figura 3.1 Célula eletrocoaguladora usada para remoção de catequina e BSA por eletrocoagulação e para produzir gel de hidróxido de alumínio feita de acrílico com dois eletrodos de alumínio (tipo 1100) contendo 40 mL de tampão.

3.2.7 Determinação de proteína total, polifenóis e clorofila

As concentrações de proteína total nas amostras foram determinadas utilizando o método de Bradford (1976), com BSA como referência para a obtenção da curva padrão. O procedimento se constituiu em adicionar 200 µL de amostra em 1000 µL de solução contendo azul de Coomassie com posterior agitação da mistura em vórtex. Após 10 min fazia-se a medida de absorvância da mistura reacional a 595 nm.

Polifenóis em solução foram quantificados utilizando o método colorimétrico azul da Prússia (Price e Butler, 1977) usando-se $K_3Fe(CN)_6$ como reagente e D-catequina para a construção de uma curva padrão. O procedimento de análise consiste em adicionar 250 µL de solução de $FeCl_3$ 0,1 mol/L (preparada em solução de HCl 0,1 mol/L) e 250 µL de $K_3Fe(CN)_6$ 0,1 mol/L a 5,0 mL da amostra. Após 10 min da adição do último reagente, fez-se a medida da absorvância da mistura reacional a 720 nm.

A concentração de clorofila nos extratos foi determinada pelo método de Arnon (1949) onde a absorvância da solução é medida em comprimentos de onda de 645 e 663 nm, referentes a clorofila b e clorofila a, respectivamente. A concentração da clorofila presente em solução é calculada pela Equação 6.

$$c_{clorofila} = 8,02 \cdot A_{645} + 20,20 \cdot A_{663} \quad [6]$$

$c_{clorofila}$ – concentração de clorofila [mg/L]

A_{645} – absorvância de luz no comprimento de onda de 645 nm

A_{663} – absorvância de luz no comprimento de onda de 663 nm

Utilizou-se um espectrofotômetro DU 650 (Beckman, EUA) para medir a absorvância em todos os métodos.

3.2.8 Determinação fluorométrica de sGFP

Um fluorímetro F-4500 (Hitachi, Japão) foi configurado em comprimento de onda de excitação de 480 nm com abertura de 5 nm e comprimento de onda de emissão de 513 nm com abertura de 20 nm. Uma unidade de fluorescência de sGFP foi determinada como sendo a fluorescência de 1 ng/mL de sGFP em tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L em pH 7,0.

3.2.9 Determinação do tamanho das partículas e potencial zeta do gel de hidróxido de alumínio

O tamanho de partícula do gel de hidróxido de alumínio formado durante a eletrocoagulação foi medido pela técnica de espalhamento de luz. Esta técnica baseia-se na dependência das flutuações do espalhamento de luz em função do tempo devido ao movimento Browniano das partículas em suspensão. O movimento Browniano é a consequência de colisões das partículas com as moléculas do líquido. Este movimento é maior para partículas menores do que para maiores. Assim, a luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão e o tamanho da partícula pode ser determinado através de sua velocidade em solução.

O potencial zeta das partículas dos géis de hidróxido de alumínio foi determinado pela medida da sua de mobilidade eletroforética em um campo elétrico. A essência do método utilizado para se medir este parâmetro é a aplicação da amostra num capilar, no qual o potencial é aplicado. Devido ao potencial, as partículas migram para o eletrodo com carga oposta à delas, e a velocidade da partícula no capilar é medida pela técnica de espalhamento de luz, e expressa em termos de potencial da partícula (mV).

O tamanho e o potencial zeta das partículas foram medidos no equipamento Zetasizer Nano (Malvern, Reino Unido).

3.2.10 Focalização isoeétrica (IEF) e análise densitométrica

A preparação das amostras utilizadas para esta análise foi feita como descrito por Laukens *et al.* (2004). Uma quantidade de 400 µL de extrato foi adicionado em tubos

Eppendorf de 2 mL e 1600 µL de solução de ácido tricloroacético 10% (m/v) a -20°C contendo 0,07% de β-mercaptoetanol em acetona foi adicionada em seguida. A mistura foi agitada em vortex e guardada no congelador (-20°C) de um dia para o outro. No dia seguinte, a mistura foi centrifugada a 15.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e 1600 µL da mesma solução sem a presença de ácido tricloroacético foi adicionada ao precipitado e guardada no congelador (-20°C) por mais uma hora. Assim, os polifenóis, como também outras substâncias que interferem na qualidade deste método, foram removidos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 15.000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante descartado. O restante de solução ainda presente na amostra foi deixado a evaporar à temperatura ambiente por 1 h.

Os precipitados obtidos foram ressolubilizados em 300 µL de tampão de re-hidratação (uréia 8 mol/L, CHAPS 2% (m/v), DTT 50 mmol/L, anfolitos Bio-Lyte 3/10 (Bio-Rad, EUA) e azul de bromofenol 0,002%), agitados no vortex, deixados a temperatura ambiente por 30 min, agitados no vortex novamente e deixados mais 30 min à temperatura ambiente para que proteínas precipitadas fossem completamente dissolvidas.

Em seguida, as amostras foram aplicadas em tiras com gradiente de pH (3 a 10) imobilizadas (tiras de IPG – gel de acrilamida com gradiente de pH imobilizado) e deixadas por 12 h para o gel absorver completamente a amostra. A focalização isoeletrica foi feita em equipamento Protean IEF cell (Bio-Rad, EUA) seguindo o protocolo padrão do fabricante: 1 h de gradiente linear até 250 V, 2 h de gradiente linear até 4.000 V e 10.000 V/h de gradiente rápido a 4.000 V.

As tiras com as amostras focalizadas foram deixadas sob agitação por 1 h em solução de ácido tricloroacético para precipitar as proteínas e remover os anfólitos da solução. Em seguida as frações protéicas foram coloridas com solução de azul de Coomassie 1% m/v e o excesso deste removido com solução de metanol 40%. As tiras foram escaneadas com densitômetro calibrado GS-800 (Bio-Rad, EUA) usando resolução 36,3 µm por pixel. A análise das imagens obtidas foi feita com software Quantity One 6.4.7 (Bio-Rad, EUA). A detecção das bandas foi feita sob os seguintes ajustes: “background method, disk; background radius, 100; band sensitivity, 10,0; band width, 2,5; band density, 0,0; band filter, 4,0; band shoulder, 1,0; band size, 5”.

4. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO DE GFP

Neste capítulo está descrito o desenvolvimento do método de análise quantitativa de GFP baseada em sua fluorescência intrínseca. As limitações de uso desta proteína para determinar sua concentração foram estudadas e o método analítico definido. No plano de trabalho (Figura 1), esta etapa é apresentada como “Desenvolvimento de método analítico para GFP”.

4.1 Introdução

Proteínas como a proteína verde fluorescente (“green fluorescent protein”, GFP), β -glucuronidase (GUS) e luciferase (LUC), largamente usadas em estudos de sistemas de expressão de genes e também como proteínas de fusão para monitorar a localização da proteína de interesse em células, são comumente denominadas proteínas repórteres (Ruijter *et al.*, 2003). A seleção da proteína mais apropriada para este tipo de estudo deve ser baseada na estabilidade da proteína sob diversas condições (temperatura, pH, concentração de sal, concentração de desnaturantes, etc) como também na reprodutibilidade do seu método analítico. Portanto, para interpretar a atividade de uma proteína repórter é fundamental conhecer suas propriedades intrínsecas.

Embora a GUS seja uma proteína estável sob diversas condições e, portanto, uma boa escolha para este tipo de aplicação, sua quantificação pode ser afetada pela presença de inibidores de diversos grupos químicos especialmente açúcares e polifenóis, que são compostos abundantes em extratos de plantas (Kusnadi *et al.*, 1998; Robić *et al.*, 2006). A LUC pode ser usada somente em estudos de dinâmica da expressão da proteína *in planta* desde que a proteína formada seja rapidamente inativada (Ruijter *et al.*, 2003). Por causa

destas características, as proteínas GUS e LUC são somente parcialmente aplicáveis em estudos como proteínas repórteres.

Já a proteína GFP da *Aequorea victoria* não possui as limitações citadas para GUS e LUC, pois não requer substratos para a medida de sua atividade, além de ser uma proteína estável (Tsien, 1998). A GFP é considerada útil para ser aplicada tanto como proteína repórter como também como proteína de fusão. Outra vantagem da GFP é que sua propriedade fluorescente não é afetada pelas fusões de seus grupamentos N- ou C-terminais com outros peptídeos ou proteínas (Lewis *et al.*, 1999; Miyawaki *et al.*, 1997). A expressão, de GFP em plantas foi otimizada pelas diferentes melhorias das técnicas de expressão incluindo a remoção de introns crípticos que dificultavam a expressão de GFP selvagem em organismos transgênicos (Haselhoff *et al.*, 1997). As modificações da proteína na região do cromóforo resultaram em variantes de GFP com mudanças nos comprimentos de ondas de excitação de 360 a 489 nm e de emissão de 440 a 529 nm (Tsien, 1998; Dobbie *et al.*, 2008). Estas variantes, usadas com genes repórter e fusões, se tornaram ferramentas muito importantes em estudos biológicos incluindo a localização subcelular das proteínas, atividade de proteases, fator de transcrição, dimerização, sensibilidade a concentração de Ca^{2+} *in vivo*, alteração de pH celular, difusão de proteínas e organelas dentro das células e interações proteína-proteína pela transferência da energia da fluorescência (Tsien, 1998; Miyawaki *et al.*, 1997; Dobbie *et al.*, 2008; Chalfie *et al.*, 1994; Hanson e Kohler, 2001). Além disso, variantes sGFP (as vezes referida como EGFP – “enhanced green fluorescent protein”), GFP172 e GFP157 (Paramban *et al.*, 2004) e também GFP selvagem (Lewis *et al.*, 1999) foram usadas com sucesso como proteínas de fusão com a finalidade de monitorar e purificar proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*.

Entretanto, o uso de GFP como repórter ou proteína de fusão em sistemas de plantas *in vivo* também tem suas desvantagens. Partes das células vegetais contém componentes fluorescentes (como por exemplo paredes celulares, lignina e clorofila), que produzem uma fluorescência comumente chamada de fluorescência endógena, ou fluorescência de fundo, que pode mascarar a fluorescência da GFP (Billinton e Knight, 2001; Blumenthal *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2005). Por outro lado, os extratos das plantas usualmente contém baixo teor destas substâncias, por elas serem fracamente solúveis em soluções aquosas e,

portanto, a fluorescência endógena não é um grande problema como no caso de se detectar a GFP *in vivo* por microscopia de fluorescência (Ruijter *et al.*, 2003). Outra desvantagem de usar fluorescência de GFP para monitorar a concentração de proteína em extrato das plantas é o aumento de fluorescência em consequência de associação desta com outras proteínas e também pela formação de dímeros em concentrações altas de proteínas (Ward *et al.*, 1982).

Estas duas limitações – a fluorescência endógena das plantas e o aumento de fluorescência da GFP devido à associação desta – são as desvantagens importantes do uso de GFP, especialmente no caso de desejar avaliar a concentração desta proteína durante um processo de purificação. Nesta etapa do trabalho o objetivo foi definir um método analítico quantitativo para a GFP baseado em sua fluorescência intrínseca em extratos de *N. benthamiana*.

4.2 Resultados e discussão

Primeiramente, foi necessário escolher a variante de GFP com comprimento de onda de excitação e emissão apropriados para a aplicação em extratos de *N. benthamiana*. Portanto, o extrato do tabaco feito com tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L (1:10 razão massa:volume) foi escaneado no espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda de 300 a 700 nm (Figura 4.1). Como a GFP selvagem apresenta o pico de excitação no comprimento de onda de 395 nm e pico de emissão em 508 nm (Dobbie *et al.*, 2008), não a consideramos apropriada para os fins mencionados, uma vez que os compostos nativos do tabaco absorvem luz fortemente em 395 nm, o que iria diminuir a precisão e a reprodutibilidade das medidas de fluorescência. Por outro lado, o uso da variante sGFP, com picos de excitação em 480 nm e emissão em 513 nm (como determinados experimentalmente neste trabalho) diminuiria em grande parte o problema de absorção de luz (Chiu *et al.*, 1996) dos compostos nativos da *N. benthamiana*. Além disso, a intensidade da fluorescência desta variante é 8 vezes maior quando comparada com a da GFP selvagem (Billinton e Knight, 2001). Portanto, a variante sGFP foi selecionada para ser usada neste trabalho. Além disso, a fluorescência de fundo de extratos de *N. benthamiana* diluídos no

mínimo 20 vezes não apresentou efeitos negativos na determinação de sGFP em extratos de folhas desta planta (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Fluorescência endógena dos extratos de *N. benthamiana* em comprimento de onda de excitação de 480 nm com abertura de 5 nm e comprimento de onda de emissão em 513 nm com abertura de 20 nm.

Diluição do extrato*	Unidades de fluorescência
1	331,5
10	33,2
20	0
100	0
1000	0

* Extratos feitos com fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7.00 e razão 1:10 massa:volume e diluídos com mesmo tampão.

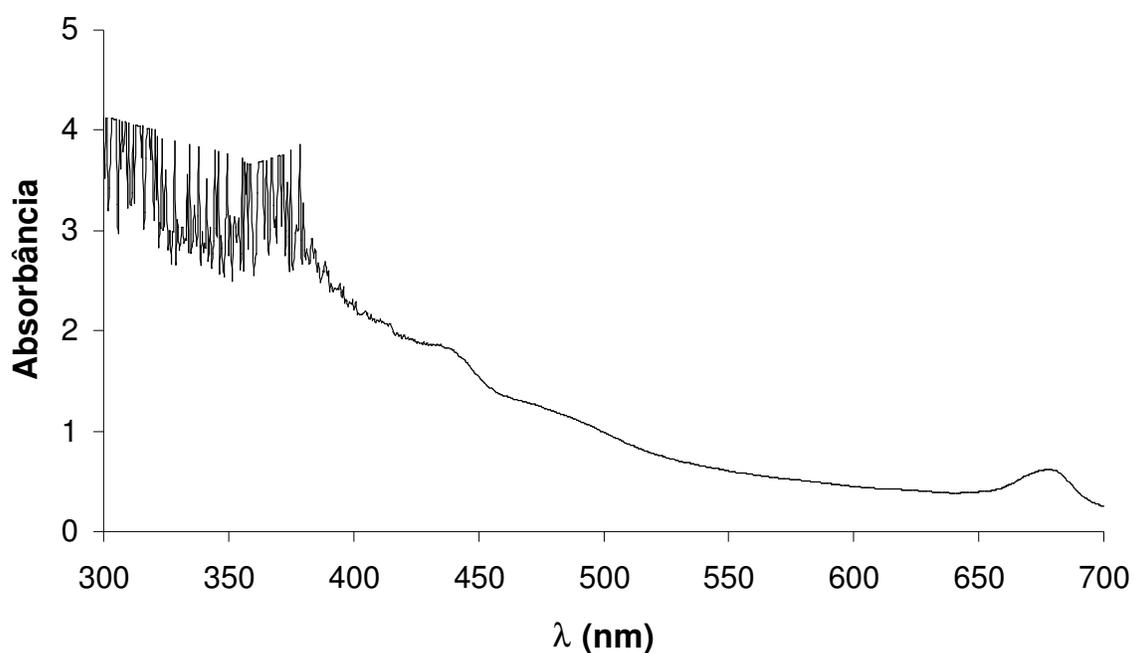


Figura 4.1 Espectro de absorção do extrato de *N. benthamiana* obtido com tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00 com razão massa:volume de 1:10.

O trabalho de Remans *et al.* (1999) mostrou que a variante mGFP5-ER (excitação em 395 nm e emissão em 510 nm) tem os níveis de fluorescência mais baixos nos extrato de *N. tabacum* do que quando somente em tampão de extração. Portanto, verificamos se fenômeno similar ocorria também com uso da variante sGFP. Para fazer esta verificação, adicionou-se sGFP de alta pureza nos extratos de *N. benthamiana* e os níveis de fluorescência foram medidos e comparados com as das obtidos com a mesma quantidade de sGFP adicionada somente em tampão de extração (Figura 4.2). Os níveis de fluorescência dos extratos contendo sGFP foram aproximadamente duas vezes maiores do que os obtidos somente com tampão, efeito oposto ao que foi observado com mGFP-5ER (Remans *et al.*, 1999).

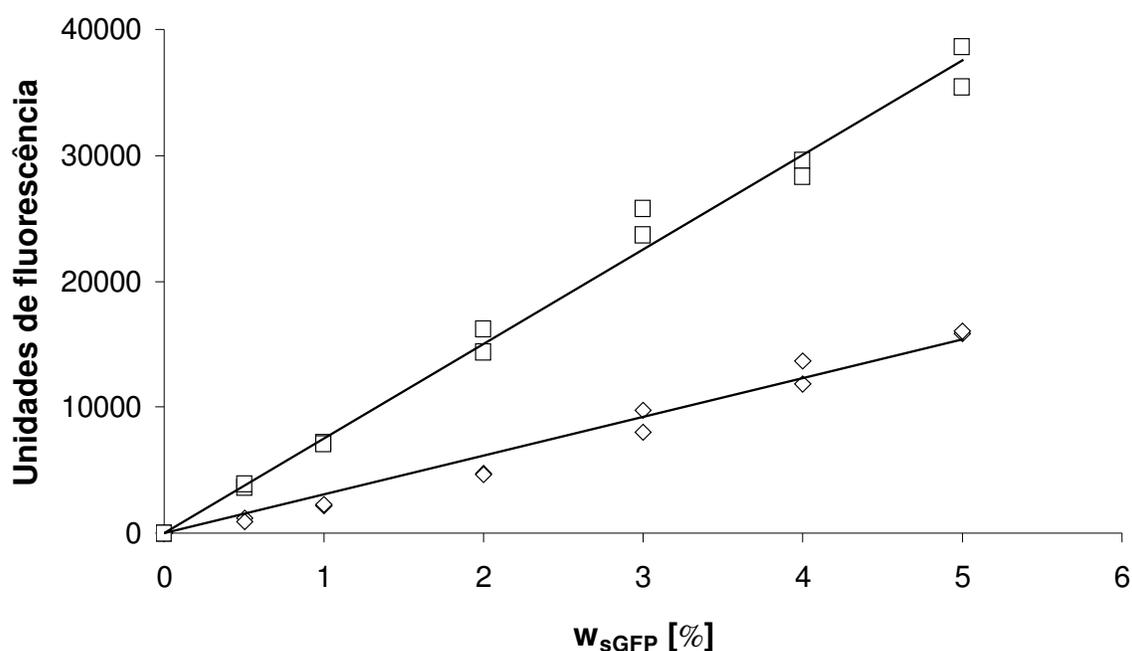


Figura 4.2 Fluorescência de sGFP em diferentes concentrações nos extratos de folhas de *N. benthamiana* (□: inclinação = 7509; $R^2 = 0,99$) e da sGFP somente em tampão de extração (◇: inclinação = 3074; $R^2 = 0,98$). Todas as amostras foram diluídas 20 vezes com tampão de extração. Condições de extração: tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00; razão massa:volume, 1:10; concentração de proteína total, 0,40 mg/mL. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. w_{sGFP} – porcentagem mássica da sGFP em extrato de *N. benthamiana*.

Ward *et al.* (1982), usando GFP selvagem de *Aequorea*, mostraram que em concentrações altas a GFP forma dímeros, o que resulta em aumento de fluorescência. Efeito parecido foi demonstrado no trabalho de Morise *et al.* (1974), no qual os autores observaram que quando a GFP foi adsorvida em resina de DEAE-Sephadex, o que levou as moléculas estarem mais perto uma das outras, o aumento de fluorescência também pode ser observado. Portanto, acreditamos que o aumento de fluorescência observada no caso de sGFP em extratos de *N. benthamiana* pode ser resultado de dimerização e/ou aproximação das moléculas de sGFP promovidas pela interação de sGFP com compostos presentes no extrato. O motivo comum de mudança da atividade de uma proteína em extratos de plantas é a sua associação com outras proteínas, bem como também a formação de multímeros ou sua interação com polifenóis (Charlton *et al.*, 2002; Pripp *et al.*, 2005).

Portanto, diferentes tampões de extração foram usados para verificar se as ligações responsáveis pelo o aumento de fluorescência poderiam ser desfeitas. O pH de extração foi variado, além de se adicionar sais e agentes redutores ao tampão de extração. O aumento da fluorescência da sGFP não foi afetado pela mudança do pH (valores de pH usados: 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ou 12,2) ou pela adição de sais (NaCl 300 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L ou MgCl₂ 2 mmol/L) ou agentes redutores (β -mercaptoetanol 10 mmol/L, metabisulfito de sódio 10 mmol/L ou ácido ascórbico 10 mmol/L).

O próximo passo foi simular a presença dos principais compostos presentes nos extratos de folhas para tentar detectar qual tipo de composto é responsável pelo aumento de fluorescência da sGFP. Soluções de açúcares (D-glicose 4 mg/mL, sacarose 3 mg/mL ou dextrana 1 mg/mL), polifenol (D-catequina 0,05 mmol/L) e proteína (BSA 0,4 mg/mL) – em concentrações similares às presentes em extratos de tabaco – foram preparadas e as fluorescências destas soluções com sGFP adicionada foram comparadas com as fluorescências de sGFP em tampão de extração (as soluções de açúcares, D-catequina e BSA sem sGFP não apresentaram fluorescência detectável).

A presença de açúcares ou D-catequina não alterou a intensidade de fluorescência da sGFP. Por outro lado, a adição de BSA no tampão de extração resultou no aumento considerável de fluorescência de sGFP (Figura 4.3), sugerindo interação (agregação e/ou

dimerização) de sGFP com moléculas de BSA. Uma vez que a BSA não é fluorescente, o aumento de fluorescência provavelmente é o resultado da aproximação das moléculas de sGFP que estão interagindo com a BSA. Portanto, concluímos que interação de sGFP com proteínas ou um outro tipo de composto presente em extrato de folhas de *N. benthamiana* é a responsável pelo aumento de intensidade de fluorescência e que esta interação deveria ser anulada para poder definir um método viável de determinação de sGFP baseado em sua fluorescência intrínseca.

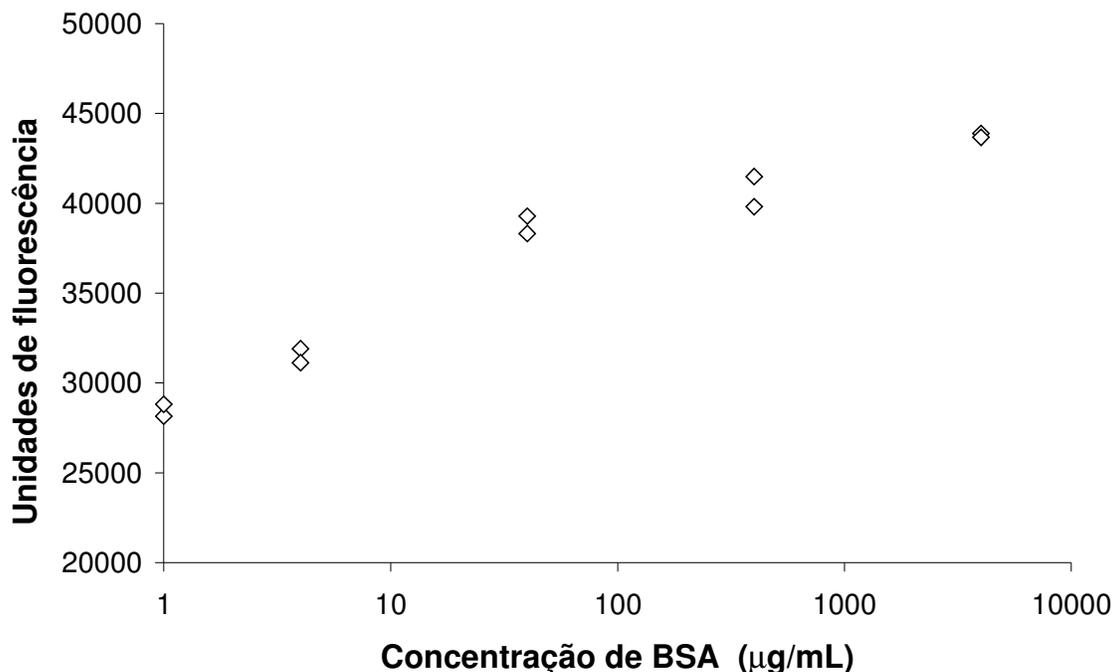


Figura 4.3 Fluorescência de sGFP em tampão de extração (fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00) diluído 20 vezes com diferentes concentrações de BSA em tampão de extração. As soluções de sGFP continham 28.000 unidades de fluorescência antes de adição de BSA.

Yang *et al.* (1996) provaram que ligações hidrofóbicas e hidrofílicas são responsáveis pela formação de dímeros de GFP de *Aequorea*, uma vez que estas interações são também as principais responsáveis pela agregação de proteínas em geral (Fink, 1998). Uma alternativa de impedir as interações de sGFP com outras proteínas, bem como também a formação de dímeros, poderia ser a exploração da tolerância de GFP para os agentes

desnaturantes como guanidina, SDS e uréia (Alkaabi *et al.*, 2005). Experimentos feitos em concentrações diferentes de uréia de até 6 mol/L não mostraram nenhum efeito sob fluorescência de sGFP. Por outro lado, já concentrações de SDS baixas, de 0,25% (m/v), causaram perda total da fluorescência. Portanto, a adição de uréia em concentrações altas no tampão de extração poderia desnaturar as proteínas nativas de *N. benthamiana* sem desnaturar a sGFP e resultar em impedimento de aumento de fluorescência desta proteína em extratos.

Realizou-se um novo conjunto de experimentos no qual a fluorescência de soluções de sGFP adicionadas a extratos de *N. benthamiana* e a fluorescência das soluções de sGFP em tampão de extração, previamente diluídas 20 vezes com 6 mol/L de uréia, foram comparadas (Figura 4.4). A diluição das soluções com uréia anulou completamente o aumento de intensidade de sGFP em extratos de folhas de *N. benthamiana* antes observado. O efeito da presença da uréia pode não ter sido somente consequência da desnaturação das proteínas do tabaco, mas também o conhecido efeito da uréia em soluções de proteínas, que promove o rompimento das ligações hidrofóbicas e hidrofílicas (Zou *et al.*, 1998) e, assim, impossibilita a formação de dímeros de sGFP (Yang *et al.* 1996).

4.3 Conclusão parcial

A diluição de 20 vezes dos extratos de folhas de *N. benthamiana* contendo sGFP com tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00 contendo uréia a 6 mol/L eliminou completamente a interferência dos componentes do extrato de tabaco na fluorescência de sGFP. Esta diluição específica, pela desagregação de GFP com proteínas das folhas do tabaco e/ou dímeros de GFP, possibilitou uma quantificação relativamente barata, rápida e reprodutível de sGFP baseada em sua fluorescência intrínseca. Embora este método de quantificação tenha sido desenvolvido usando-se extratos de *N. benthamiana*, ele provavelmente pode também ser usado para outros extratos de plantas ou soluções protéicas. O método de quantificação também pode ser usado para outras variantes de GFP se a solução na qual a GFP a ser quantificada não absorver a luz no comprimento de onda de excitação ou emissão da variante usada.

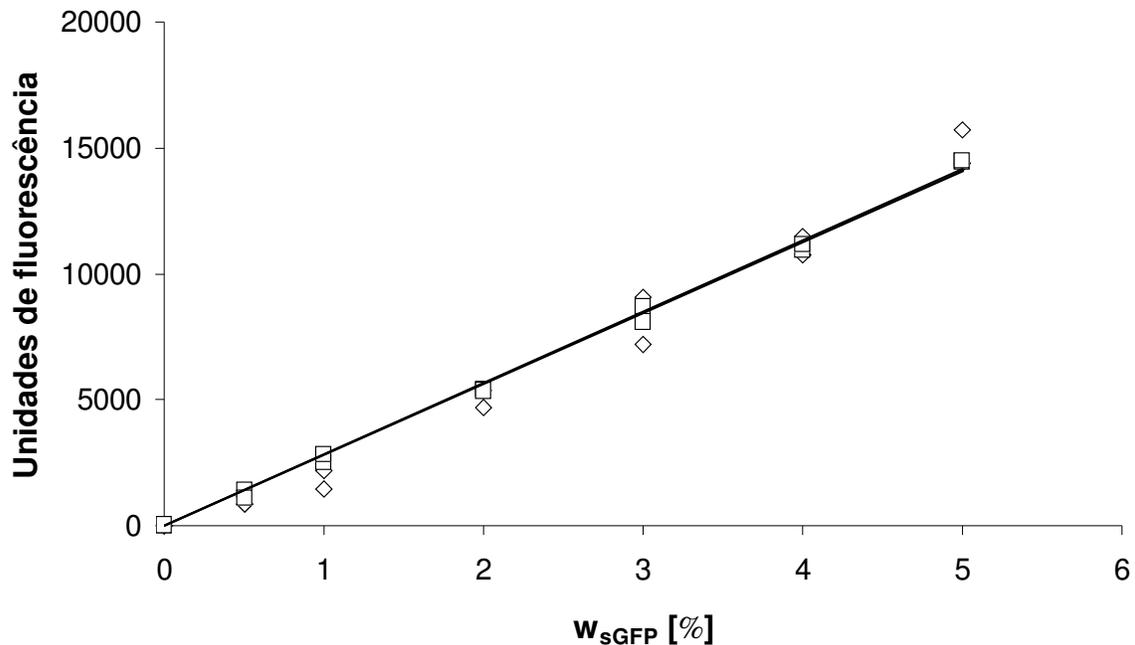


Figura 4.4 Fluorescência de sGFP em diferentes concentrações nos extratos de folhas de *N. benthamiana* (□: inclinação = 2819; $R^2 = 0,99$) e de sGFP somente em tampão de extração (◇: inclinação = 2831; $R^2 = 0,98$). Todas as amostras foram diluídas 20 vezes com tampão de extração contendo uréia 6 mol/L. Condições de extração: tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00; razão massa:volume de 1:10; concentração de proteína total de 0,37 mg/mL. Todos os experimentos foram feitos em duplicata. w_{sGFP} – porcentagem mássica da sGFP em extrato de *N. benthamiana*.

5. DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE REMOÇÃO DE COMPOSTOS BIOLÓGICOS POR ELETROCOAGULAÇÃO

Neste capítulo aborda-se os estudos realizados referentes aos mecanismos da remoção de polifenóis e proteínas por eletrocoagulação. Foram desenvolvidos modelos simples que relacionam a remoção destes compostos com a corrente aplicada entre os eletrodos. Estes modelos, embora desenvolvidos usando polifenóis e proteínas, poderiam também ser aplicados à remoção de outros compostos biológicos, como, por exemplo, pigmentos e carboidratos. No plano de trabalho (Figura 1), esta etapa é apresentada como “Estudo de remoção dos polifenóis e proteínas por eletrocoagulação”.

5.1 Introdução

Métodos convencionais de remover clorofila e polifenóis, como extração com solventes e métodos cromatográficos de fase reversa (Stalikas, 2007), envolvem uso de grandes quantidades de solventes orgânicos e são, portanto, considerados caros. Na maioria dos casos nos quais uma proteína é purificada, os solventes orgânicos em geral não podem ser usados pois promovem a desnaturação do composto-alvo. Uma alternativa para estes métodos seria o uso de eletrocoagulação, um método eletroquímico no qual coágulos de hidróxidos de metais são gerados a partir de dissolução química do metal usado como eletrodo durante eletrólise (Chen, 2004). A remoção de pigmentos, como também de polifenóis, a partir de extratos de plantas já foram relatados (Jumpatong *et al.*, 2006; Phutdhawong *et al.*, 2000).

As reações que ocorrem nos eletrodos envolvem a geração de íons de alumínio no anodo ($\text{Al} \rightarrow \text{Al}^{3+} + 3\text{e}^-$) e a hidrólise de água no catodo ($\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$), como proposto pelo Chen *et al.* (2002). Como o hidrogênio sai do sistema em forma de gás e o

hidróxido de alumínio formado durante o processo precipita, a reação geral do processo pode ser descrita pela Equação 2.7.



Como já mencionado no item 2.5.4, a alta concentração de eletrólitos na proximidade dos eletrodos contribui para o aquecimento local da solução. Este efeito pode ser evitado usando corrente alternada (Amatore *et al.*, 1998) e agitação da solução durante o processo, uma vez que temperaturas altas podem desnaturar a proteína alvo. Já que a condutividade da solução depende da concentração do eletrólito e, em menor grau, do pH (Phutdhawong *et al.*, 2000), estes parâmetros também irão influenciar a corrente e o potencial aplicado entre os eletrodos durante o processo de eletrocoagulação. Por outro lado, foi provado que a formação de íons de alumínio é praticamente constante na faixa de pH entre 4 a 10 (Koparal *et al.*, 2008; Moueden *et al.*, 2008) e, portanto, nesta faixa o efeito do pH pode ser desconsiderado. Relativamente poucos trabalhos foram feitos na área de entender os mecanismos fundamentais responsáveis pela eficiência e mecanismos envolvidos durante a eletrocoagulação (Carmona *et al.*, 2006; Cañizares *et al.*, 2008a; Cañizares *et al.*, 2008b), especialmente na área de modelagem do processo (Carmona *et al.*, 2006; Mollah *et al.*, 2004).

Nesta etapa do trabalho estudou-se a correlação da corrente alternada aplicada entre os eletrodos no desempenho da remoção de polifenol (D-catequina) e proteínas (BSA e lisozima) pela eletrocoagulação e desenvolveu-se os modelos matemáticos de remoção destes compostos biológicos a partir de soluções aquosas. Além de construir os modelos, o efeito do pH na eficiência do método também foi avaliado.

5.1.1 Considerações teóricas

Uma vez que o gel insolúvel de hidróxido de alumínio é gerado durante a eletrocoagulação, pode-se considerar que o sistema é composto, em menor parte, pela fase de gel de hidróxido de alumínio e pela fase principal aquosa. Se a corrente aplicada durante

todo o processo é constante, a taxa de formação de hidróxido de alumínio também é constante (Cañizares *et al.*, 2005) e pode ser expressa na forma de taxa de reação de ordem n (Equação 5.1).

$$v_{Al(OH)_3} = \frac{dc_{Al^{3+}}}{dt} = k_1 \cdot c_{Al^{3+}}^n \quad [5.1]$$

$v_{Al(OH)_3}$ – taxa de formação de hidróxido de alumínio, mol/(L·min)

n – ordem de reação da formação de hidróxido de alumínio

k_1 – constante da reação

$c_{Al^{3+}}$ – concentração de íons alumínio em solução, mol/L

A concentração de íons alumínio, que é o reagente na reação de formação de hidróxido de alumínio (Equação 2.1), é constante durante todo processo e é dependente da corrente aplicada entre os eletrodos (Equação 5.2) (Bagotsky, 2006). Substituindo a concentração de íon de alumínio pela corrente aplicada na Equação 9, a taxa (Equação 5.3), como também a massa formada de hidróxido de alumínio durante o processo (Equação 5.4), podem ser expressas em função da corrente aplicada.

$$c_{Al^{3+}} \propto I \quad [5.2]$$

$$v_{Al(OH)_3} = k_2 \cdot I^n \quad [5.3]$$

$$m_{Al(OH)_3} = k_3 \cdot I^n \cdot t \quad [5.4]$$

I – corrente aplicada entre os eletrodos, A

k_2 – constante de reação

k_3 – constante de Equação 5.4

$m_{Al(OH)_3}$ – massa de hidróxido de alumínio formado durante o processo, mg

Consideramos que o mecanismo principal do processo é parecido com o mecanismo de troca iônica, ou, em outras palavras, a formação do complexo entre o composto biológico e o gel de hidróxido de alumínio pode ser descrita por modelos estequiométricos ou não-estequiométricos (Marcus, 1966).

Os modelos não-estequiométricos são baseados no equilíbrio químico entre as duas fases e são aplicáveis quando a quantidade de composto a ser removido é bem menor do que a fase no qual eles serão adsorvidos, uma vez que eles ocupam pequena parte dos sítios disponíveis na superfície do adsorvente. Em outras palavras, a partição do composto entre as duas fases pode ser observada durante todo o processo, como descrito pela Equação 5.5. Desde que o composto a ser removido não seja gerado ou consumido durante o processo, a quantidade inicial do composto está distribuída entre as duas fases: fase de hidróxido de alumínio e fase aquosa (Equação 5.6) (Marcus, 1966).

$$K_i = \frac{c_{i,Al(OH)_3}}{c_{i,H_2O}} \quad [5.5]$$

K_i – constante de equilíbrio para o componente i entre a fase de hidróxido de alumínio e fase aquosa

$c_{i,Al(OH)_3}$ – concentração do composto i na fase de hidróxido de alumínio, mol/L

c_{i,H_2O} – concentração do composto i na fase aquosa, mol/L

$$n_{i,0} = n_{i,H_2O} + n_{i,Al(OH)_3} \quad [5.6]$$

$n_{i,0}$ – moles de composto i no processo, mol

$n_{i,Al(OH)_3}$ – moles de composto i na fase de hidróxido de alumínio, mol

n_{i,H_2O} – moles de composto i na fase aquosa, mol

Substituindo as Equações 5.4 e 5.6 na Equação 5.5, pode-se chegar à Equação 5.7, que relaciona a concentração do composto na fase aquosa durante o processo em função da corrente aplicada, no qual $k_{i,não-est}$ é a constante de seletividade do modelo não-estequiométrico para o composto estudado.

$$C_{i,H_2O} = \frac{C_{i,0}}{1 + I^n \cdot k_{i,não-est} \cdot t} \quad [5.7]$$

A constante de formação de hidróxido de alumínio, os efeitos das condições nas quais a eletrocoagulação é feita (pH, temperatura, tipo de eletrólito, etc.) e as dimensões da célula, como também a afinidade do composto pela fase de gel, estão todos contidos dentro da constante de seletividade $k_{i,não-est}$. De uma forma mais geral, pode-se dizer que esta constante representa a seletividade do processo pelo composto estudado. A Equação 5.7 também mostra que a remoção do componente em questão é afetada pela corrente aplicada entre os eletrodos.

Os modelos estequiométricos são baseados na capacidade equivalente da resina, onde a quantidade do composto removido é proporcional à quantidade do gel presente no processo (Equação 5.8) (Marcus, 1966):

$$N_{i,eq} = \frac{n_{i,Al(OH)_3}}{m_{Al(OH)_3}} = \frac{n_{i,Al(OH)_3}}{k_3 \cdot I^n \cdot t} \quad [5.8]$$

onde $N_{i,eq}$ representa a capacidade equivalente do gel de hidróxido do alumínio para o componente i em mol/mg.

Se o composto não é gerado ou consumido durante o processo, a quantidade do composto adsorvido no gel e a concentração do composto na fase aquosa podem ser descritas pela Equação 5.9, na qual V é o volume de fase aquosa que por ser bem maior do

que o da fase gel, é considerado constante, embora a parte de água ser consumida durante o processo.

$$c_{i,0} \cdot V = n_{i,Al(OH)_3} + c_{i,H_2O} \cdot V \quad [5.9]$$

Portanto, a concentração do composto na fase aquosa durante a eletrocoagulação, se baseada no modelo estequiométrico, pode ser expressa pela Equação 5.10, gerada pela substituição da Equação 5.8 na Equação 5.9:

$$c_{i,H_2O} = c_{i,0} - \frac{N_{i,eq} \cdot k_2}{V} \cdot I^n \cdot t \quad [5.10]$$

ou

$$c_{i,H_2O} = c_{i,0} - k_{i,est} \cdot I^n \cdot t \quad [5.11]$$

sendo $k_{i,est}$ a constante de seletividade do modelo não-estequiométrico para o composto estudado. A constante de formação de hidróxido de alumínio, efeito das condições nas quais a eletrocoagulação é feita (pH, temperatura, tipo de eletrólito, etc.) e as dimensões da célula, como também a afinidade do composto pela fase de gel, estão todos contidos dentro da constante de seletividade $k_{i,est}$.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Dependência da formação do hidróxido de alumínio pela corrente aplicada

Para determinar a dependência da formação do hidróxido de alumínio pela corrente aplicada, realizou-se um conjunto de experimentos utilizando-se o tampão TRIS 100 mmol/L contendo NaCl 200 mmol/L a pH 8,0 no qual variou-se a corrente aplicada entre os eletrodos e mediou-se massa de gel produzido durante 1 h. O gel formado foi separado da solução por filtração em membrana de poro de 0,22 μm e o gel seco em estufa na

temperatura de 100 °C durante 30 min. A massa seca do gel produzido foi determinada e os resultados obtidos foram ajustados pela Equação 5.4 (Figura 5.1). O coeficiente de taxa de formação do hidróxido de alumínio obtido foi de 46,8 e a ordem da reação, de 3,0 com ajuste de $R^2 = 0,923$. Portanto, $n = 3,0$ deveria ser usado em ambos os modelos, estequiométrico e não-estequiométrico (Equação 5.11 e 5.7, respectivamente), pois este parâmetro é somente dependente da reação de formação do hidróxido de alumínio e não do componente a ser removido.

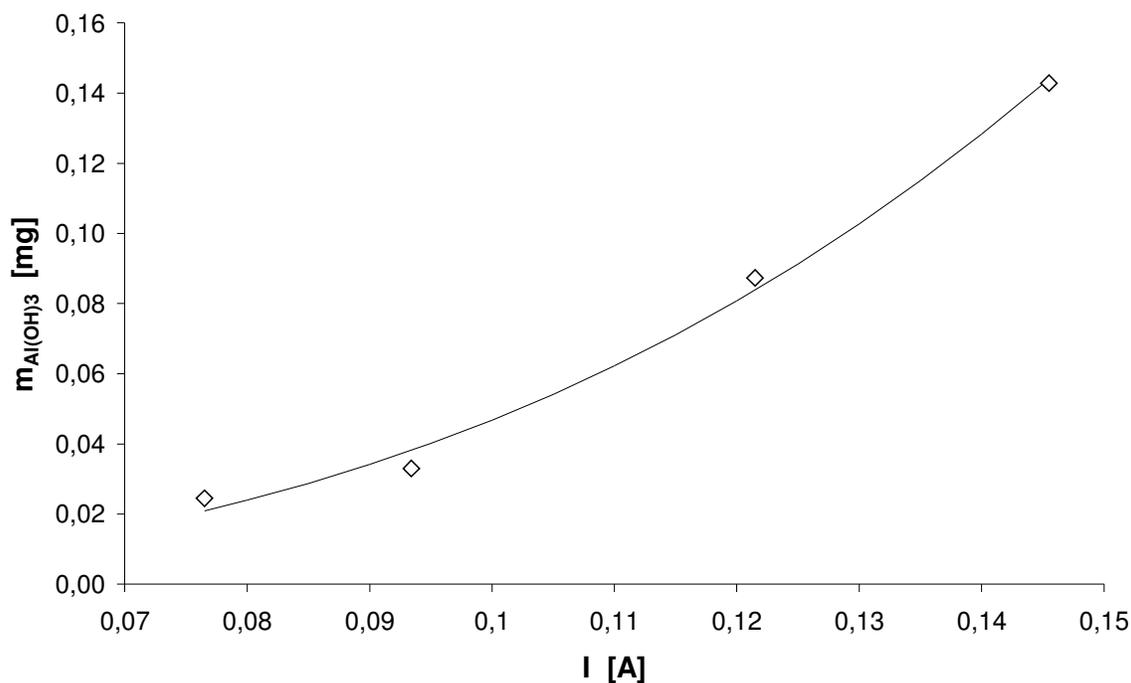


Figura 5.1 Massa seca do gel de hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente durante 1 h em tampão TRIS 100 mmol/L NaCl 200 mmol/L pH 8,0 a 25 °C variando a corrente aplicada entre os eletrodos de alumínio tipo 1100. \diamond , dados experimentais; —, modelo ajustado.

5.2.2 Verificação experimental da aplicabilidade dos modelos propostos

Para poder validar os modelos construídos, dois experimentos foram realizados a pH 8,0 usando-se compostos modelos a serem removidos: catequina e BSA. A corrente aplicada nos dois experimentos foi variada e os resultados experimentais em termos de concentração de composto dentro da fase aquosa durante o processo, foram comparados com os previstos pelos modelos. O modelo não-estequiométrico apresentou bom ajuste somente para os dados obtidos com catequina (Figura 5.2), com a constante de seletividade calculada por regressão não-linear de 247,0 (coeficiente de regressão global de 0,912) (Equação 5.12).

$$c_{catequina} = \frac{c_{catequina,0}}{1 + I^3 \cdot 247,0 \cdot t} \quad [5.12]$$

Por outro lado, o modelo estequiométrico se ajustou bem somente aos dados obtidos com BSA (Figura 5.3) com constante de seletividade igual a 2,66 (coeficiente de regressão global de 0,912) (Equação 5.13).

$$c_{BSA} = c_{BSA,0} - 2,66 \cdot I^3 \cdot t \quad [5.13]$$

Nos dois casos observou-se boa concordância entre os dados experimentais e os obtidos pelos modelos para catequina e BSA. Como a catequina mostrou bons resultados usando-se o modelo não-estequiométrico, concluiu-se que ela ocupa somente pequena parte de sítios ativos de gel de hidróxido de alumínio. No caso da formação do complexo hidróxido de alumínio – BSA, o mecanismo estequiométrico foi observado, significando, provavelmente, que este composto ocupe a maior parte dos sítios de gel de hidróxido de alumínio disponíveis. Isto pode ser explicado pelo fato que a proteína BSA é uma macromolécula e, portanto, ocupa uma fração bem maior quando ligada ao gel do que a catequina, apesar da concentração molar de BSA ser bem menor do que da catequina.

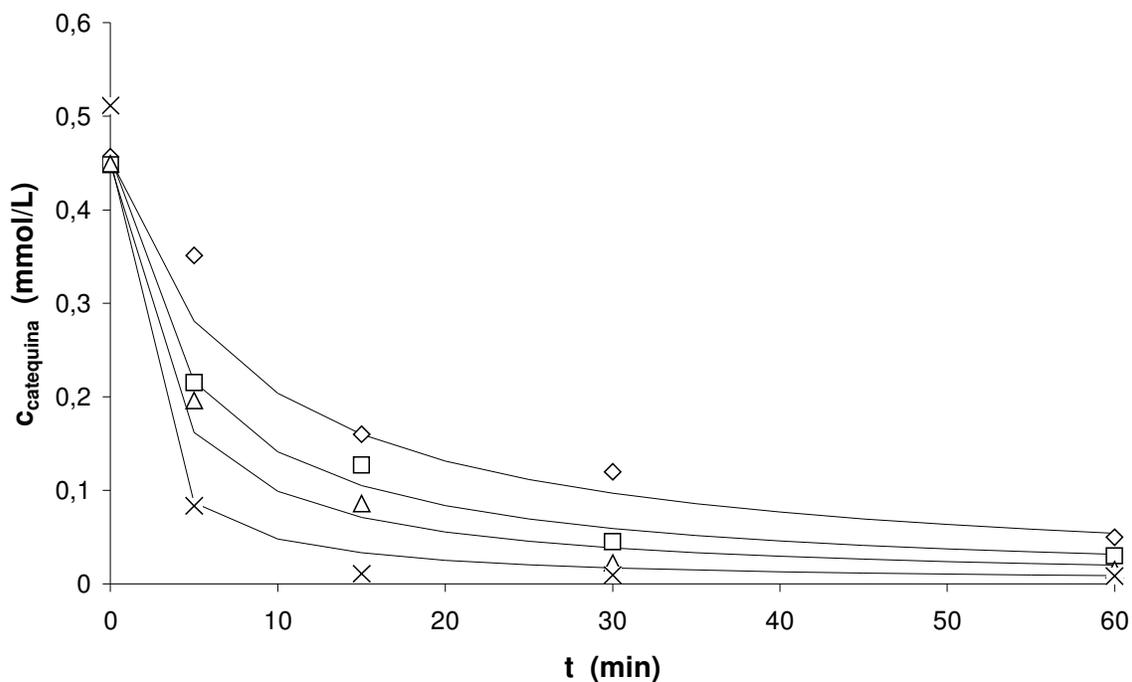


Figura 5.2 Concentração de catequina durante a eletrocoagulação em solução de NaCl 200 mmol/L pH 8,0 a 25 °C variando-se a corrente aplicada entre os eletrodos. ◇ – 0,0765 A (3,825 mA/cm²), R² = 0,912; □ – 0,0934 A (3,825 mA/cm²), R² = 0,919; △ – 0,1089 A (5,445 mA/cm²), R² = 0,917; × – 0,1455 A (7,275 mA/cm²), R² = 0,9109.

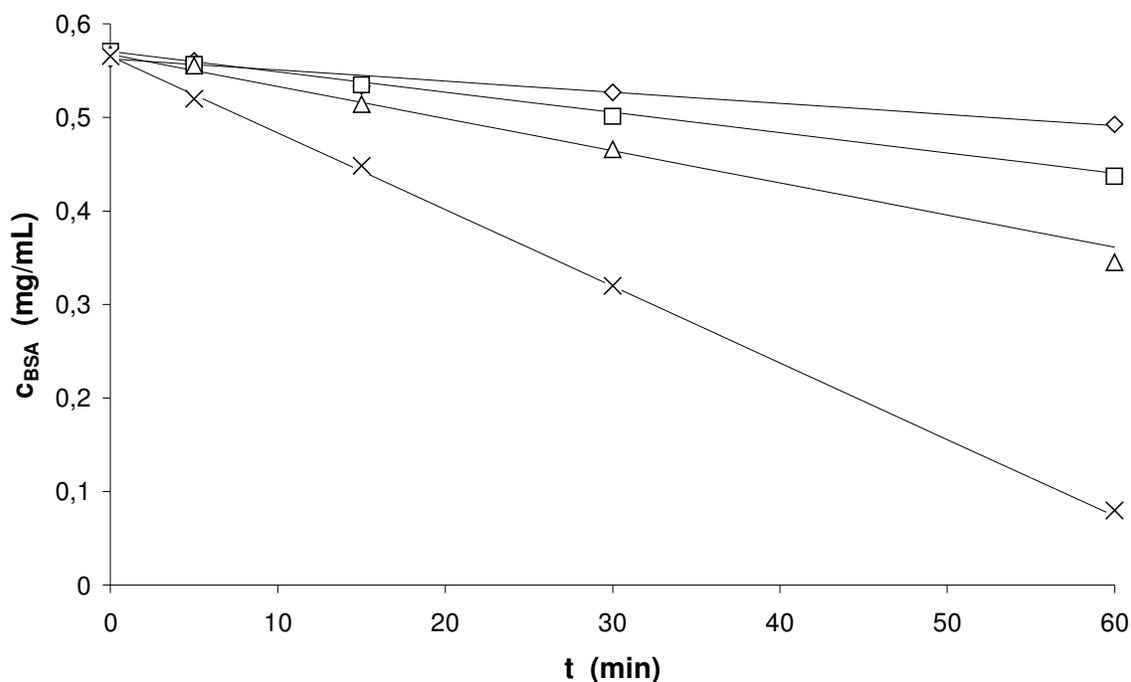


Figura 5.3 Concentração da BSA durante a eletrocoagulação em solução de NaCl 200 mmol/L pH 8,0 a 25 °C variando-se a corrente aplicada entre os eletrodos. ◇ – 0,0765 A (3,825 mA/cm²), R² = 0,920; □ – 0,0934 A (3,825 mA/cm²), R² = 0,928; △ – 0,1089 A (5,445 mA/cm²), R² = 0,928; × – 0,1455 A (7,275 mA/cm²), R² = 0,976.

5.2.3 Efeito do pH na eletrocoagulação

Experimentos de eletrocoagulação com catequina e BSA em soluções de NaCl 200 mmol/L variando-se o pH entre 5,0 e 10,0 mostraram que o pH tem forte influência na eficiência do processo (Figura 5.4 e 5.5). Os modelos se ajustaram bem aos resultados experimentais nas condições de pH estudadas tanto para a catequina quanto para a BSA (Tabela 5.1). Uma vez que o pH não afeta a taxa de formação de Al³⁺ a partir da dissolução de alumínio do eletrodo na faixa de pH estudada (Koparal *et al.*, 2008; Moueden *et al.*, 2008), o efeito do pH na eficiência do método é, provavelmente, relacionado à carga dos compostos sendo removidos e à carga superficial do gel de hidróxido de alumínio formado. A eficiência da remoção de catequina (Figura 5.3) foi maior quando o pH da eletrocoagulação era alto, sendo máxima em pH 8,0. No caso da BSA (ponto isoelétrico

igual a 4,80) as maiores eficiências, foram atingidas a valores de pH baixos (Figura 5.4), porém sua remoção máxima foi também observada em pH 8,0. Por outro lado, a proteína lisozima (ponto isoelétrico igual a 11,35) não foi removida por este método na faixa de pH estudada.

A valores de pH acima de 8,5, o gel hidróxido de alumínio formado perde a carga positiva e se torna com carga superficial mais próxima a neutralidade (Koparal *et al.*, 2008; Moueden *et al.*, 2008; Marcus, 1966). Sob estas condições, a proteína e o gel de hidróxido de alumínio formado não possuem mais cargas opostas e, portanto, a adsorção de BSA no gel é reduzida. No caso da catequina, o efeito do pH na remoção deste composto é de certa forma oposto quando comparado com a BSA. A remoção deste polifenol foi maior em valores de pH de eletrocoagulação de 8,0, 9,0 e 10,0, condições nas quais também o hidróxido de alumínio de carga negativa (solúvel em água) é formado, o que deve facilitar de uma forma a adsorção de catequina no gel. A diminuição da eficiência de remoção da catequina a pH acima de 8,0 (Tabela 5.1) pode ser explicada pelo fato que os compostos fenólicos têm o pK em torno de 10, o que poderia diminuir sua reatividade com hidróxido de alumínio quando o pH operacional se aproxima a este valor. A remoção máxima de BSA e catequina em pH 8,0 (perto do pI de hidróxido de alumínio) confirma os resultados dos trabalhos de Avsar *et al.* (2007), Yilmaz *et al.* (2007) e Chen *et al.* (2000) que também relataram maiores eficiências de remoção de óleo essencial de rosas, boro e graxa, respectivamente, neste valor de pH.

Os resultados obtidos sugerem que a eletrocoagulação poderia ser usada para purificar proteínas, pois a lisozima não foi removida por esta técnica e a BSA, sim. Pode-se considerar também a separação de polifenóis de proteínas, uma vez que a catequina pode ser removida a valores de pH altos, condição na qual praticamente a BSA não é removida. Uma estimativa das cargas de gel de hidróxido de alumínio, como também da BSA e catequina, é apresentada na Tabela 5.2.

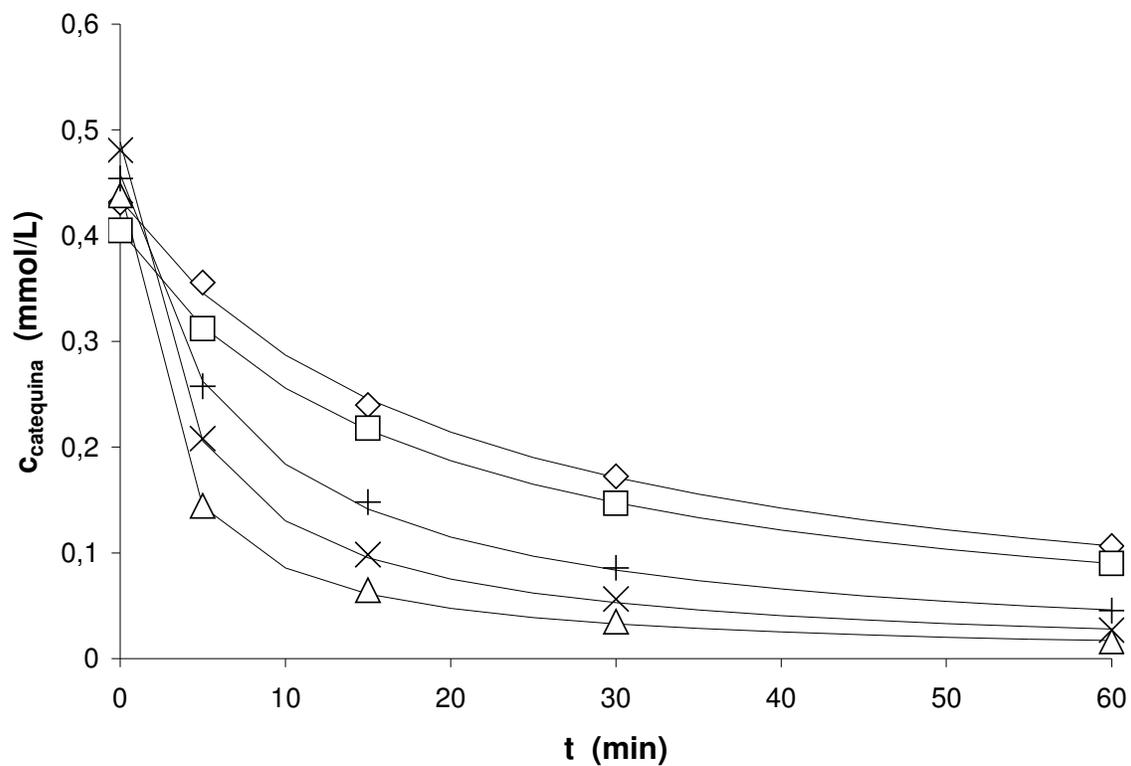


Figura 5.4 Concentração de catequina durante a eletrocoagulação em soluções de NaCl 200 mmol/L variando-se o pH ($I = 0,1150 \text{ A}$ ($5,750 \text{ mA/cm}^2$) e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). \diamond – pH 5,5; \square – pH 7,0; Δ – pH 8,0; \times – pH 9,0; $+$ – pH 10,0.

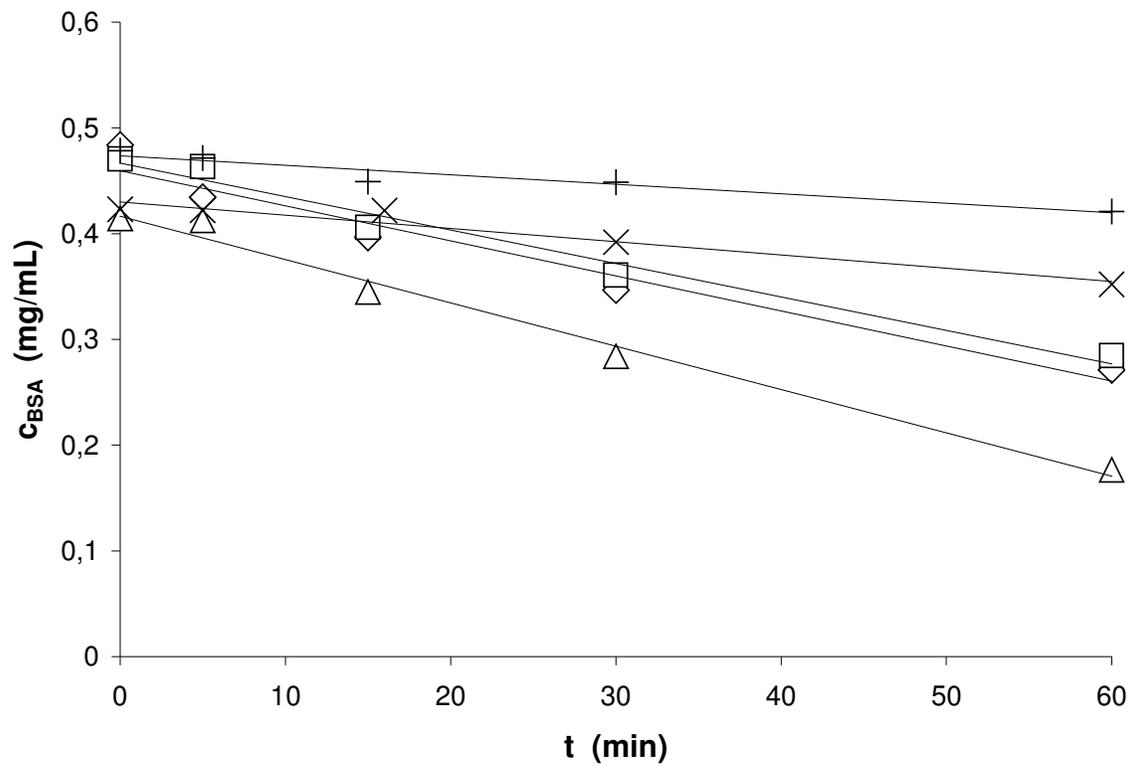


Figura 5.5 Concentração da BSA durante a eletrocoagulação em soluções de NaCl 200 mmol/L variando-se o pH ($I = 0,1150 \text{ A}$ ($5,750 \text{ mA/cm}^2$) e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$). ◇ – pH 5,5; □ – pH 7,0; △ – pH 8,0; × – pH 9,0; + – pH 10,0.

Tabela 5.1 Constantes de seletividade para catequina e BSA para diferentes valores de pH de eletrocoagulação em solução de NaCl 200 mmol/L 25 °C e 0,115 A (5,75 mA/cm²).

Modelo aplicado			pH				
			5,5	7,0	8,0	9,0	10,0
Catequina	Não-estequiométrico	$k_{\text{catequina}}$					
		$\left[\frac{1}{A^3 \cdot \text{min}} \right]$	33,7	38,3	274,0	180,9	98,1
		R^2	0,963	0,992	0,984	0,977	0,978
BSA	Estequiométrico	k_{BSA}					
		$\left[\frac{\text{mol}}{A^3 \cdot L \cdot \text{min}} \right]$	2,17	2,10	2,70	0,85	0,59
		R^2	0,958	0,977	0,987	0,948	0,924

Tabela 5.2 As cargas do gel de hidróxido de alumínio, BSA e catequina em pH utilizados para estudos de efeito do pH na eletrocoagulação destes compostos.

pH	Carga da espécie		
	Hidróxido de alumínio*	BSA**	Catequina**
5,5	+	-	+
7,0	+	-	+
8,0	+	-	+
9,0	0	-	+
10,0	0	-	0

*Carga superficial do gel prevista em termos do potencial zeta.

**Carga estimada da molécula.

5.2.4 Caracterização do gel de hidróxido de alumínio produzido

Para poder melhor entender o mecanismo da remoção dos compostos biológicos, caracterizou-se o gel formado. Para tal, determinaram-se o diâmetro médio das partículas e o potencial zeta para os géis formados na faixa entre pH 7,5 e 9,5, pois nesta faixa de pH maiores mudanças da eficiência da eletrocoagulação foram observadas. Primeiramente tentou-se medir o tamanho do gel formado pelo uso de microscópio ótico mas sem sucesso, pois as partículas do gel medidas eram menores do que 10 μm em diâmetro, encontrando-se abaixo de limite de detecção por este método, embora pode-se perceber a agregação destas partículas em estruturas maiores (Figura 5.6). Assim, o tamanho das partículas foi determinado usando-se a técnica de espalhamento de luz. Os resultados obtidos (Tabela 5.3) mostraram que o tamanho das partículas não é afetado pelo pH da eletrocoagulação (diâmetro médio, 636 μm ; desvio padrão, 24 μm).

Em seguida determinou-se a carga superficial das partículas obtidas nesta mesma faixa de pH (7,5 a 9,5). Os resultados indicam que as partículas obtidas abaixo de pH 8,5 possuem carga positiva, já em pH acima ou igual deste valor a carga superficial das partículas foi próxima a zero (Tabela 5.3). Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Koparal *et al.* (2008) que explicaram a diminuição de potencial zeta com o aumento de pH da eletrocoagulação pelo efeito de adsorção dos íons de OH^- na superfície de gel de hidróxido de alumínio. Estes resultados confirmam que a carga de hidróxido de alumínio formado e não o tamanho do gel influencia na eficiência do método de remoção de compostos por eletrocoagulação.

Tabela 5.3 Diâmetro das partículas e potencial zeta do gel de hidróxido de alumínio formadas pela técnica de eletrocoagulação em soluções de NaCl 200 mmol/L variando o pH da solução.

	pH da eletrocoagulação				
	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
Diâmetro médio das partículas (μm)	597	632	659	646	646
Potencial zeta (mV)	21,3	13,8	7,1	5,1	3,6

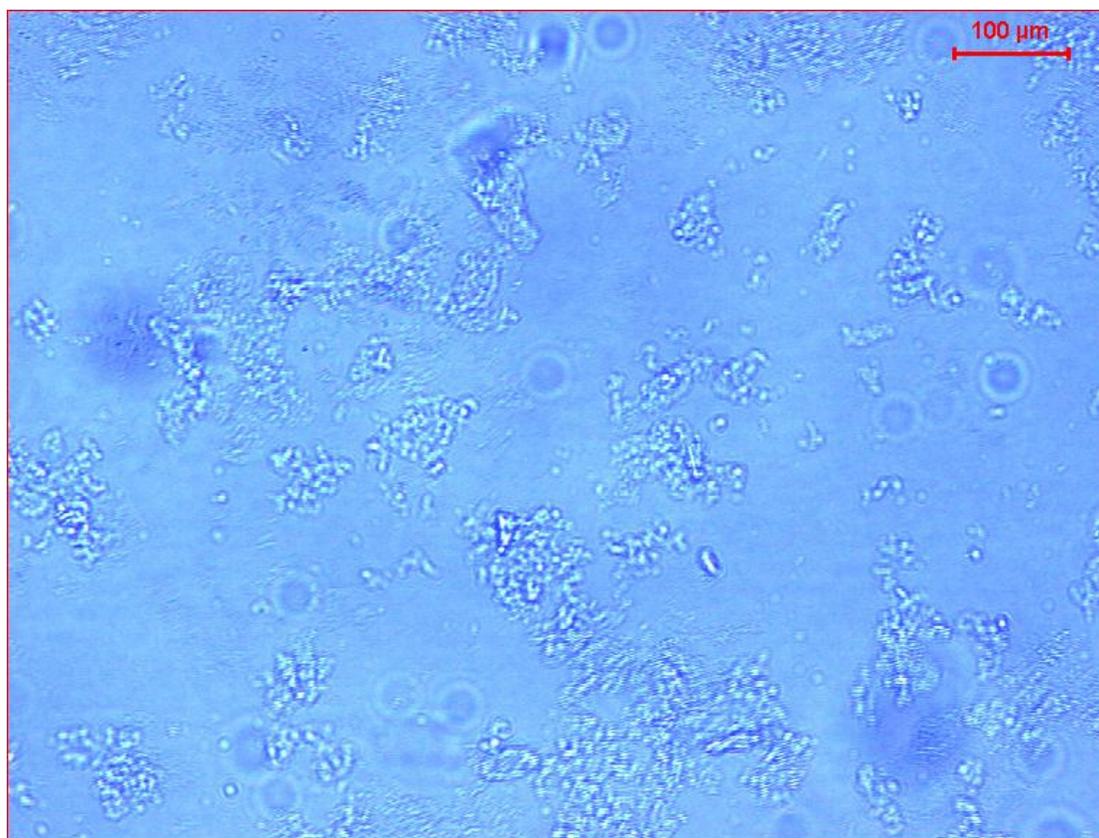


Figura 5.6 Imagem do gel de hidróxido de alumínio formado em solução de NaCl 200 mmol/L pH 8,0 obtido com microscópio óptico.

5.3 Conclusão parcial

Neste capítulo, relatou-se o desenvolvimento e teste de dois modelos simples de remoção de compostos biológicos, como polifenóis e proteínas, baseados na formação de complexos entre o hidróxido de alumínio e os compostos em questão (Equação 5.14) ou a partição deste conjunto entre a fase aquosa e a fase de gel de hidróxido de alumínio (Equação 5.15).

$$c_{i,H_2O} = c_{i,0} - k_i \cdot I^3 \cdot t \quad [5.14]$$

$$c_{i,H_2O} = \frac{c_{i,0}}{a + I^3 \cdot k_i \cdot t} \quad [5.15]$$

Análises teóricas e experimentais mostraram que o parâmetro importante no processo de eletrocoagulação dos compostos biológicos, como o polifenol catequina e a proteína BSA, é a corrente aplicada, porque é o parâmetro que afeta a formação de hidróxido de alumínio durante o processo. Outro fator igualmente importante é o pH da eletrocoagulação, porque afeta não somente a carga dos compostos a serem removidos como também a carga do gel de hidróxido de alumínio formado. Este estudo também mostrou que a separação de proteínas e/ou de polifenóis de proteínas é possível porque estes compostos reagem de maneira diferente com hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente, e estas interações podem ser facilmente manipuladas pelo pH do processo.

6. REMOÇÃO DE CLOROFILA E POLIFENÓIS DE EXTRATOS DA *N. benthamiana* POR ELETROCOAGULAÇÃO

Nesta etapa do trabalho, os conhecimentos obtidos da técnica de eletrocoagulação foram aplicados para clarificar os extratos de folhas de tabaco ou, mais especificamente, para remover polifenóis e clorofila. A remoção destes compostos dos extratos das folhas de plantas é necessária logo depois da extração e, portanto, o processo “integrado” de extração seguido da remoção destes compostos por técnica de eletrocoagulação foi estudado. No plano de trabalho (Figura 1), esta etapa é apresentada pelo “Estudo de extração dos compostos nativos das folhas da *N. benthamiana*” e “Estudo de remoção dos compostos nativos das folhas da *N. benthamiana* por eletrocoagulação”.

6.1 Introdução

Neste capítulo relata-se a avaliação da aplicação de eletrocoagulação como operação unitária de RPB ou, mais especificamente, de clarificação, de extratos de folhas de *N. benthamiana* não-transgênica. Os experimentos relatados aqui foram feitos com folhas não-transgênicas uma vez que o material geneticamente modificado utilizado neste trabalho foi escasso e, assim, não seria possível realizar todos os experimentos necessários para se obter as condições de melhor remoção de clorofila e polifenóis com plantas transgênicas. Para poder definir estas condições ótimas de remoção de polifenóis e clorofila, a etapa de extração foi estudada junto com etapa de eletrocoagulação. Acredita-se que somente assim se pode obter um resultado ótimo de remoção destes compostos, pois o pH da extração afeta a composição de extrato o que, conseqüentemente, pode afetar a eficiência da

eletrocoagulação. Este tipo de aplicação desta técnica é, pelo, nosso conhecimento, a primeira na área de RPB.

6.2 Resultados e discussão

6.2.1 Efeito do pH na extração de clorofila, polifenóis e proteína total

Estudos do efeito do pH na extração de polifenóis e proteínas das sementes de soja (Robić *et al.*, 2006) mostraram que este parâmetro afeta tanto a quantidade quanto a qualidade dos compostos extraídos. Portanto, para poder interpretar melhor os resultados de remoção de clorofila, polifenóis e proteínas por eletrocoagulação, primeiramente o efeito de pH na extração destes compostos de folhas de tabaco foi avaliado.

Os níveis mais baixos para estes três compostos nos extratos foram obtidos a pH igual a 5,5 e os mais altos a pH 8,0 para clorofila e proteína total e 7,0 para polifenóis (Figura 6.1). O efeito do pH na extração destes compostos foi diferente, sendo maior no caso da extração de clorofila e menor no caso de polifenóis. O efeito do pH sob a extração de clorofila, especialmente sob condições ácidas, é a consequência de interação de íons de hidrogênio que interagem com íon de magnésio no centro da molécula de clorofila, assim, removendo-o da molécula e transformando-a na forma menos solúvel, o feofitina (Koca *et al.*, 2006). No caso de proteínas, o efeito de pH na extração pode ser explicada como consequência de dois fenômenos: rompimento das ligações entre a proteína e material insolúvel das plantas como lignina e paredes celulares (Bravo, 1998) e/ou pela carga da proteína em determinado pH, sendo onde a menor solubilidade usualmente é encontrada no pI da proteína. No caso de polifenóis, o efeito de pH em sua extração não é tão expressivo uma vez que, na sua maior parte, eles não possuem grupos ionizáveis ou carregados (Harborne, 1989).

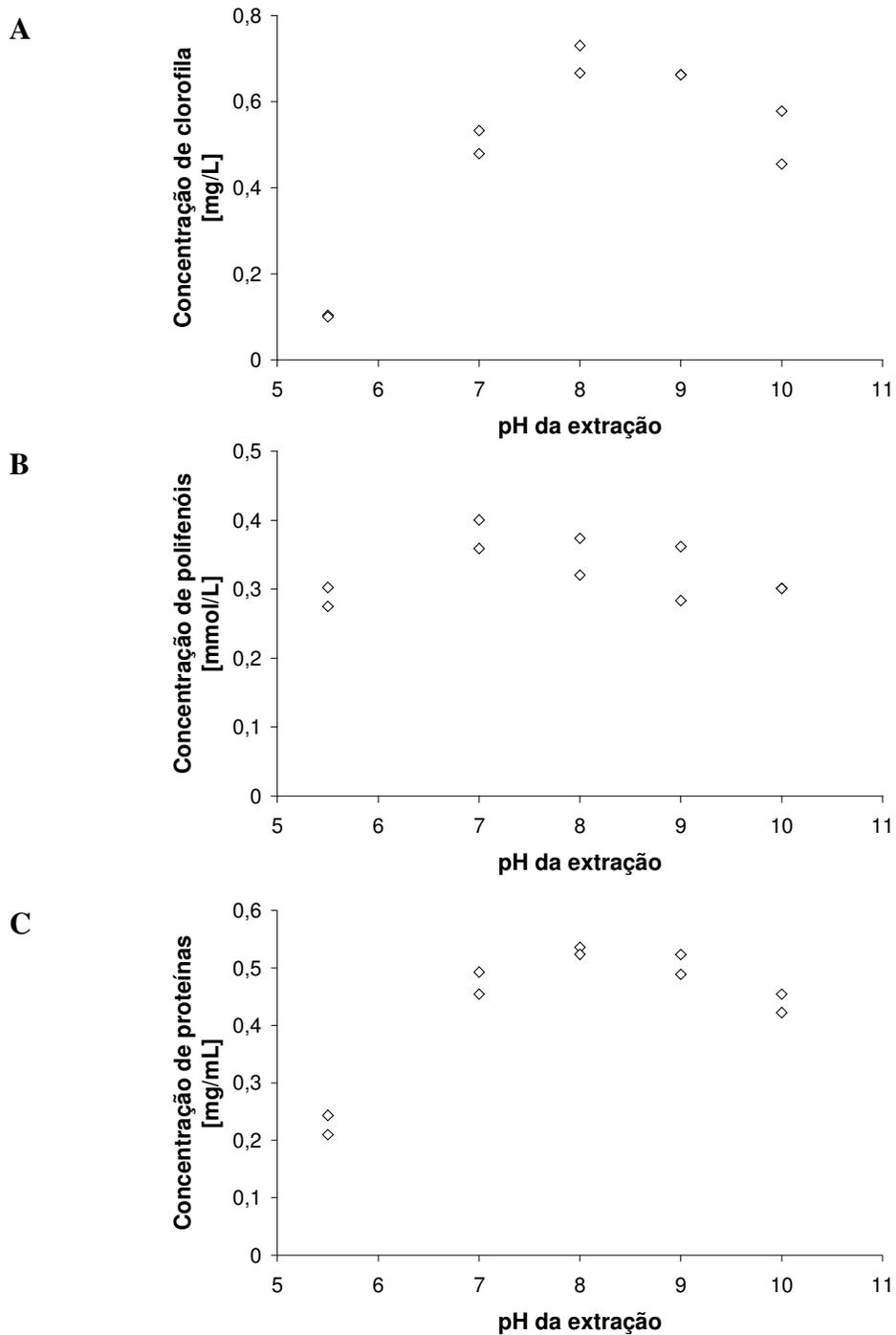


Figura 6.1 Concentrações de clorofila (A), polifenóis (B) e proteínas (C) presentes em extratos de *N. benthamiana* obtidos em valores de pH distintos. Tampões de extração utilizados (todos contendo MBS 5,0 mmol/L): MES 100 mmol/L para pH 5,5; MOPS 100 mmol/L para pH 7,0; e TRIS 100 mmol/L para pH 8,0, 9,0 e 10,0. Razão massa:volume, 1:10; T = 25°C.

6.2.2 Remoção de clorofila, polifenóis e proteína dos extratos por eletrocoagulação

Nos estudos anteriores com o polifenol catequina e a proteína BSA, determinou-se que o pH tem grande efeito sobre a eficiência da remoção destes compostos por eletrocoagulação. Isto deve-se ao fato que a carga do gel de hidróxido de alumínio formado como também a carga das substâncias a serem removidas da solução, variam em função deste parâmetro. A eficiência máxima de remoção destes compostos foi observada em torno de pH 8,0 e, portanto, nesta etapa de estudo de remoção de clorofila, polifenóis e proteínas de extrato de *N. benthamiana* não-transgênico, o pH da eletrocoagulação foi variado de 7,5 a 9,5.

Os estudos feitos de forma que os extratos obtidos fossem tratados na célula eletrocoaguladora não geraram resultados satisfatórios, pois não houve remoção de clorofila, polifenóis nem proteínas. Isto deve-se ao fato que substâncias não identificadas dos extratos de *N. benthamiana* adsorveram nas superfícies dos eletrodos de alumínio (Figura 6.2), formando uma camada isolante que impediu a formação do hidróxido de alumínio. Os compostos do extrato não identificados permaneceram adsorvidos mesmo depois de tratar os eletrodos com NaOH 2 mol/L, HCl 2 mol/L, HNO₃ 3 mol/L, detergente Triton X-100, acetona e etanol absoluto isoladamente. Uma queda drástica da corrente aplicada também foi observada logo após o começo dos experimentos.

Portanto, nos experimentos seguintes realizados, tanto com extratos de plantas não-transgênicas como de plantas transgênicas, o gel de hidróxido de alumínio foi produzido em tampão separadamente e as suspensões de géis obtidas em valores de pH entre 7,5 e 9,5 foram adicionadas aos extratos de *N. benthamiana* na proporção 1:1 (volume:volume), sendo o pH da mistura igual ao das suspensões dos géis sem necessidade de ajuste.

A análise da remoção de clorofila obtida nestes experimentos pode ser feita em termos de duas faixas de pH da eletrocoagulação (Figura 6.3). O nível máximo de remoção de clorofila – em torno 90% – foi obtido quando o gel usado foi produzido em pH 7,5 e 8,0 independente do pH de extração. Por outro lado, os níveis mais baixos de remoção – em torno de 30% de clorofila removida – foram obtidos em valores de pH da eletrocoagulação de 8,5 a 9,5, exceto para os extratos obtidos em pH 5,5 que tiveram as remoções elevadas

mantidas. Isto provavelmente deve-se ao fato que nesta condição de extração de pH 5,5 os níveis de clorofila presentes no extrato são baixos quando comparados com os obtidos com valores de pH de extração mais altos (em torno de 5 a 8 vezes).

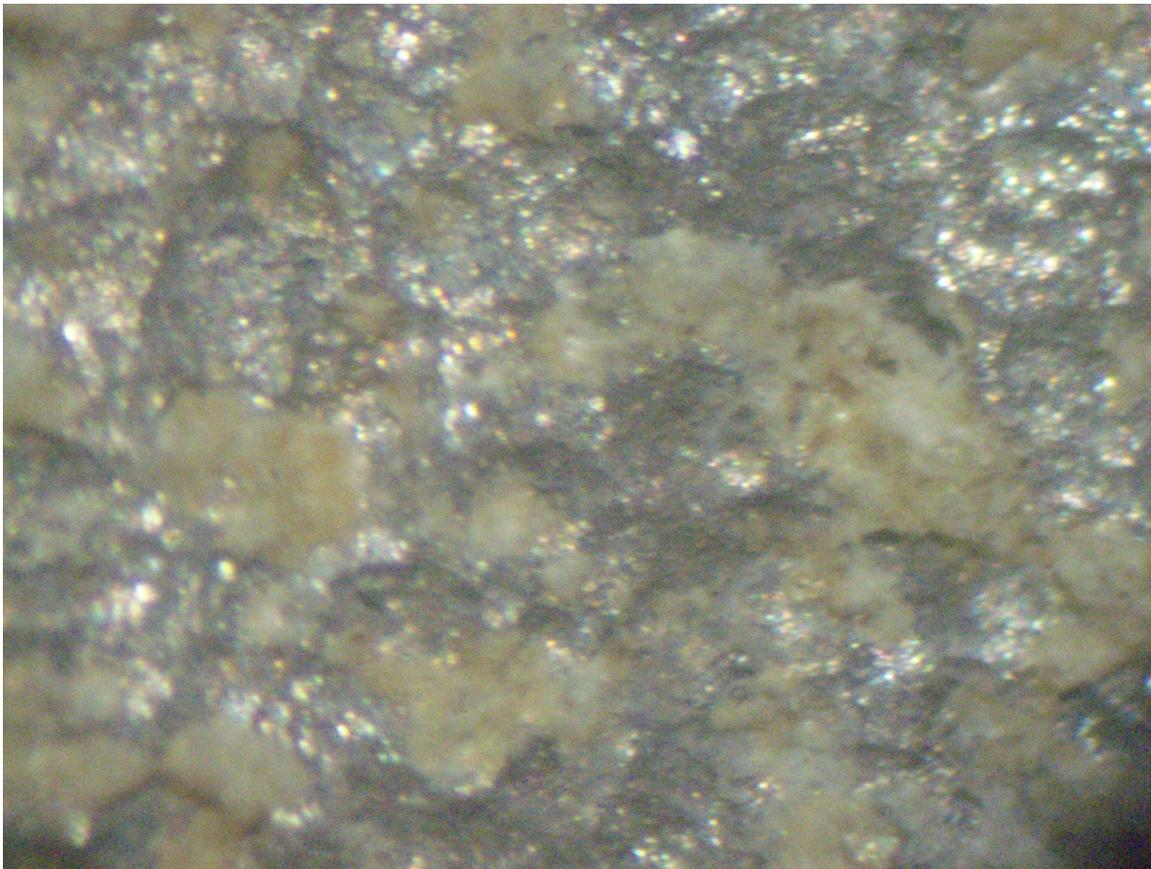


Figura 6.2 Superfície de eletrodo de alumínio tipo 1100 depois de eletrocoagulação de extrato de *N. benthamiana*. Foto obtida com microscópio ótico com aumento de 60 vezes.

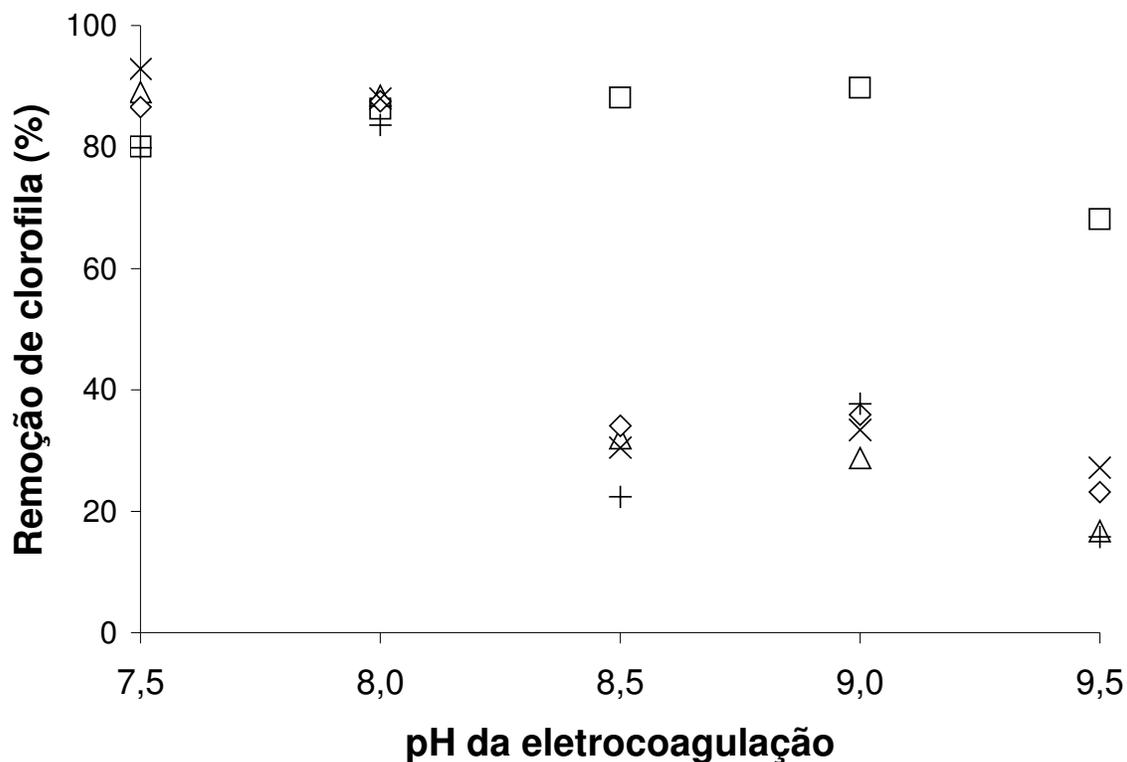


Figura 6.3 Remoção de clorofila dos extratos de *N. benthamiana* com gel de hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente. pH da extração: 5,5 (□); 7,0 (Δ); 8,0 (◇); 9,0 (+); 10,0 (×). Todos os pontos representam a média de dois experimentos.

As remoções de polifenóis (Figura 6.4) e proteínas (Figura 6.5) dos extratos não apresentaram níveis distintos de eficiência. Nos dois casos foi observada a diminuição da eficiência com o aumento do pH da eletrocoagulação. A remoção dos polifenóis variou entre 75% e 50%, para a faixa de pH 7,5 a 9,5, respectivamente. No caso da remoção de proteínas a eficiência variou entre 45% e 10% para esta mesma faixa de pH. Estes dados corroboram com os obtidos nos estudos com compostos isolados, pois a eficiência de remoção tanto de catequina (polifenol) quando de BSA (proteína) foi maior em pH 8,0 e diminuiu para valores de pH maiores, sendo a queda mais drástica no caso de proteína BSA.

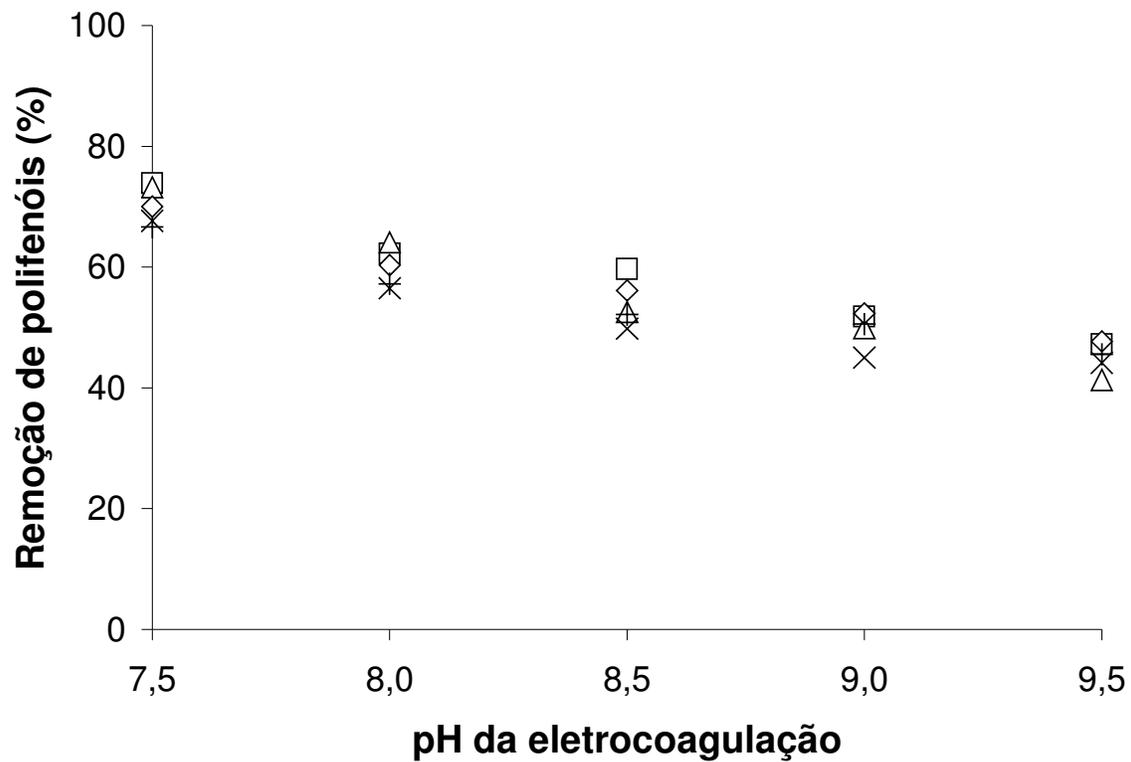


Figura 6.4 Remoção de polifenóis dos extratos de *N. benthamiana* com gel de hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente. pH da extração: 5,5 (□); 7,0 (Δ); 8,0 (◇); 9,0 (+); 10,0 (×). Todos os pontos representam a média de dois experimentos.

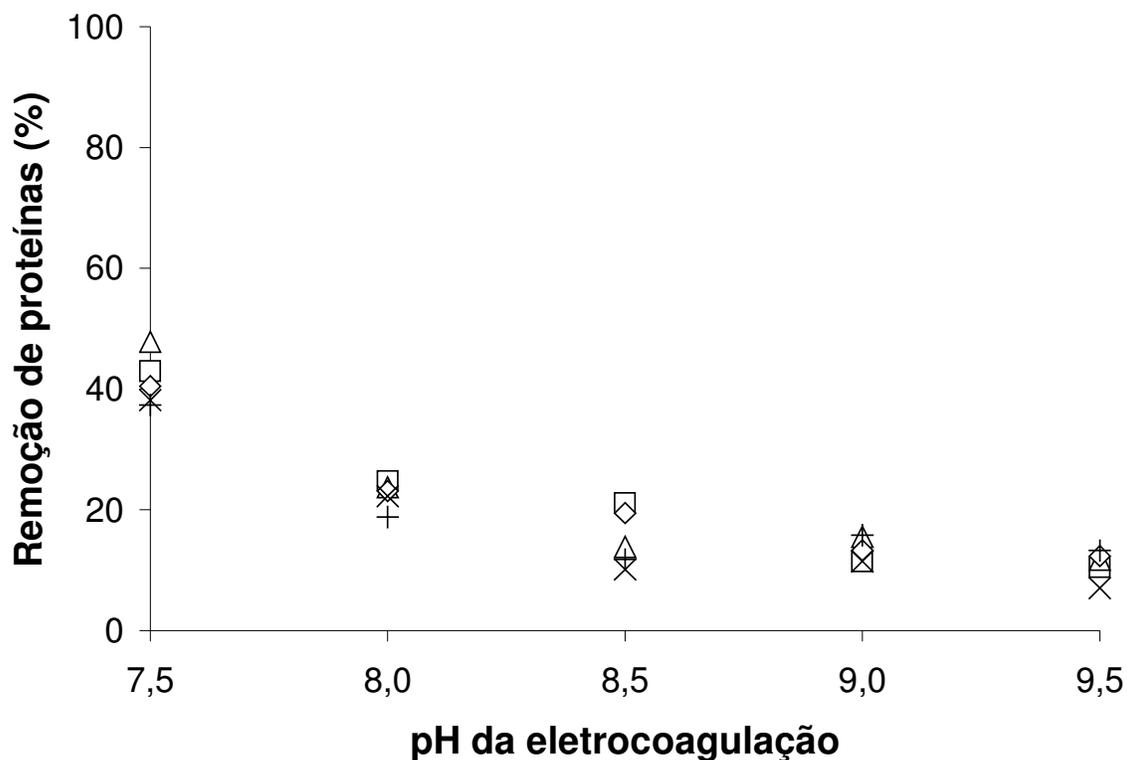


Figura 6.5 Remoção de proteínas dos extratos de *N. benthamiana* com gel de hidróxido de alumínio produzido eletroquimicamente. pH da extração: 5,5 (□); 7,0 (Δ); 8,0 (◇); 9,0 (+); 10,0 (×). Todos os pontos representam a média de dois experimentos.

De forma geral, conclui-se que o pH da extração de folhas de *N. benthamiana* não afeta diretamente a eficiência de remoção de clorofila, polifenóis e proteínas, uma vez que os resultados obtidos na faixa de pH de extração estudada praticamente não influenciaram a eficiência de remoção de clorofila, polifenóis e proteína. Por outro lado, o pH da eletrocoagulação mostrou maior eficiência em remover os três grupos de compostos se o gel de hidróxido de alumínio é carregado positivamente (pH de eletrocoagulação 7,5 e 8,0). Os melhores resultados obtidos em termos relativos foram a extração em pH 7,0 e eletrocoagulação em pH 8,0. Nestas condições a eficiência de remoção de clorofila foi de 90%, polifenóis de 65% e proteína de 25%. Já em termos absolutos, o pH de extração de

8,0 e da eletrocoagulação de 8,0 foram os melhores, pois nestas condições as concentrações de proteína foram 15% mais altas (0,41 mg/mL) e as concentrações de polifenóis (0,14 mmol/L) e clorofila (0,087 mg/L), iguais às obtidas a pH 7,0.

6.2.3 Efeito do pH da eletrocoagulação na remoção de proteínas ácidas e básicas de folhas de *N. benthamiana*

Para poder determinar as eficiências de remoção de proteínas das folhas de *N. benthamiana* em função do pH dos extratos clarificados, foram feitas análises de focalização isoeletrica das proteínas presentes nos extratos antes e depois de eletrocoagulação (Figuras A1 a A5 do Apêndice). De forma geral, o pH da extração não afetou a composição de extratos protéicos obtidos (Tabela 6.1). Entretanto, o extrato obtido a pH 5,5 continha maiores quantidades das frações de pI de 5,74, 5,92 e 6,03. Além disso, a quantidade das proteínas com pI inferior de 5,00 foi maior para o pH de extração igual ou superior a 8,0 e a quantidade da fração com pI 7,56 foi maior para o pH da extração igual ou maior que 9,0.

Independente do pH da extração e da eletrocoagulação, as proteínas com pI ácido (abaixo de 6,03) foram preferencialmente removidas pelo gel de hidróxido de alumínio (Figuras 6.6 a 6.10). Entretanto, a eficiência de remoção destas proteínas é menor com o aumento do pH de eletrocoagulação. Por outro lado, a eficiência da remoção das proteínas com pI acima de 6,03 foi menor com aumento de pH de eletrocoagulação, exceto para a fração protéica com pI 7,56 que não é afetada por este parâmetro. Portanto, a eficiência de remoção de algumas proteínas pode ser manipulada até certo nível pela mudança de pH da eletrocoagulação. Os resultados obtidos sugerem que o método descrito poderia ser usado também como etapa de pré-purificação de proteínas, além de ser aplicável para remoção de clorofila e polifenóis.

Tabela 6.1 Composição (em porcentagem mássica) das principais frações protéicas em termos de pI, presentes nos extratos de *N. benthamiana* conforme análise por eletroforese de focalização isoeétrica.

pI da fração protéica	<u>Composição por fração proteica de diferentes pI</u> pH da extração				
	5,5	7,0	8,0	9,0	10,0
4,30	–	–	2,2	1,0	2,2
4,67	–	–	4,3	4,0	4,6
5,00	–	–	3,5	5,3	3,7
5,13	2,1	8,2	5,3	7,4	6,5
5,32	5,7	12,2	9,5	5,1	10,5
5,74	6,1	0,1	0,4	0,4	0,5
5,92	20,1	0,9	4,5	1,7	2,9
6,03	19,1	0,3	2,7	1,2	1,7
6,24	4,5	5,0	5,0	3,2	9,9
6,33	3,1	7,5	2,3	4,0	4,3
6,51	2,5	9,5	5,7	3,4	6,6
6,70	7,0	11,2	5,4	5,4	4,4
6,91	4,3	3,2	0,9	1,2	0,7
7,56	0,9	0,5	0,3	10,1	8,0

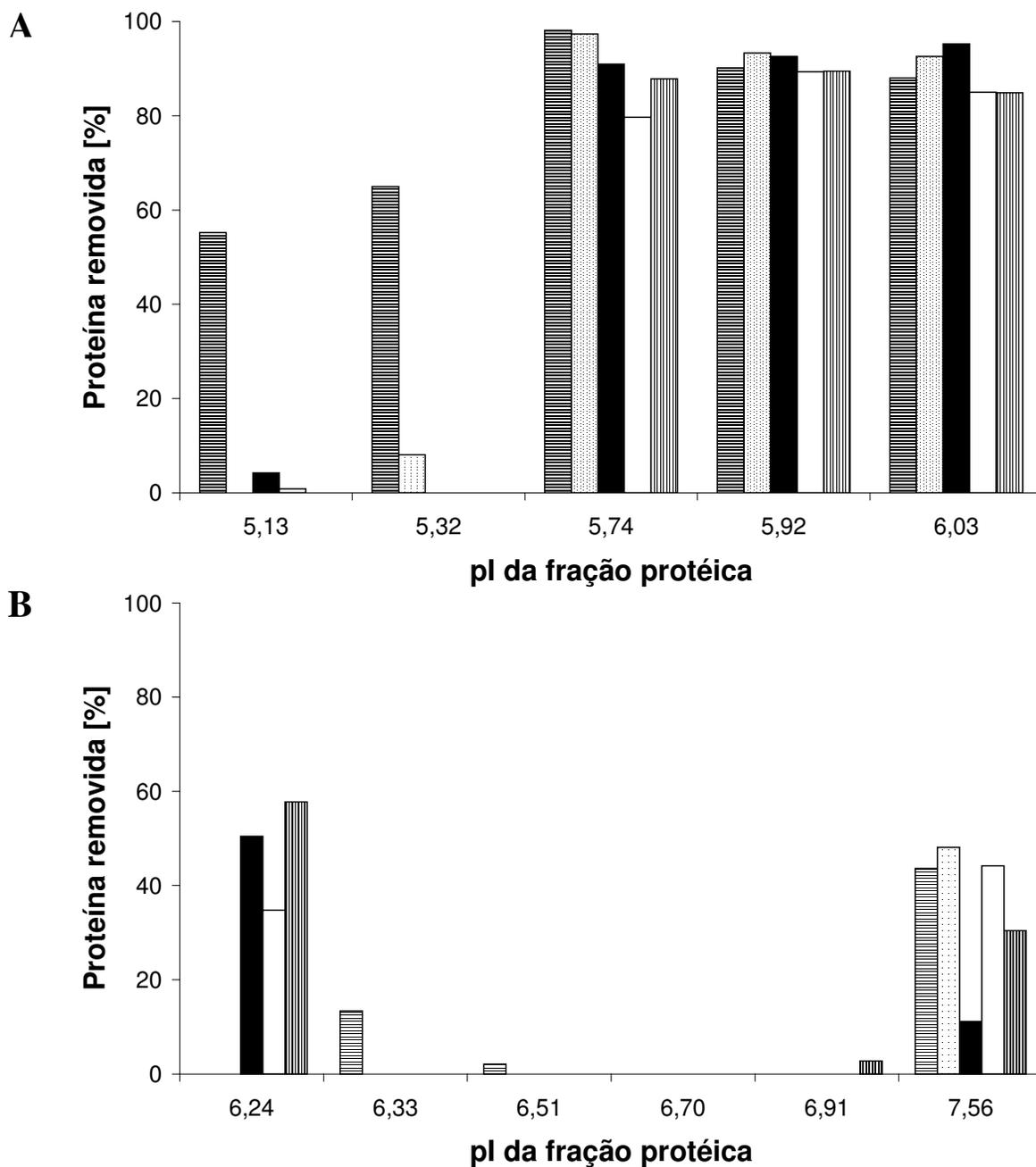


Figura 6.6 Eficiência de remoção de proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana* obtido em pH 5,5 (MES 100 mmol/L MBS 5 mmol/L) por adsorção em gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente. **A** – frações protéicas com pI ácido (4,67 to 6,03). **B** – frações com pI neutro e básico (6,24 – 7,56). pH da eletrocoagulação: 7,5 – ▨ ; 8,0 – ▩ ; 8,5 – ■; 9,0 – □; 9,5 – ▤.

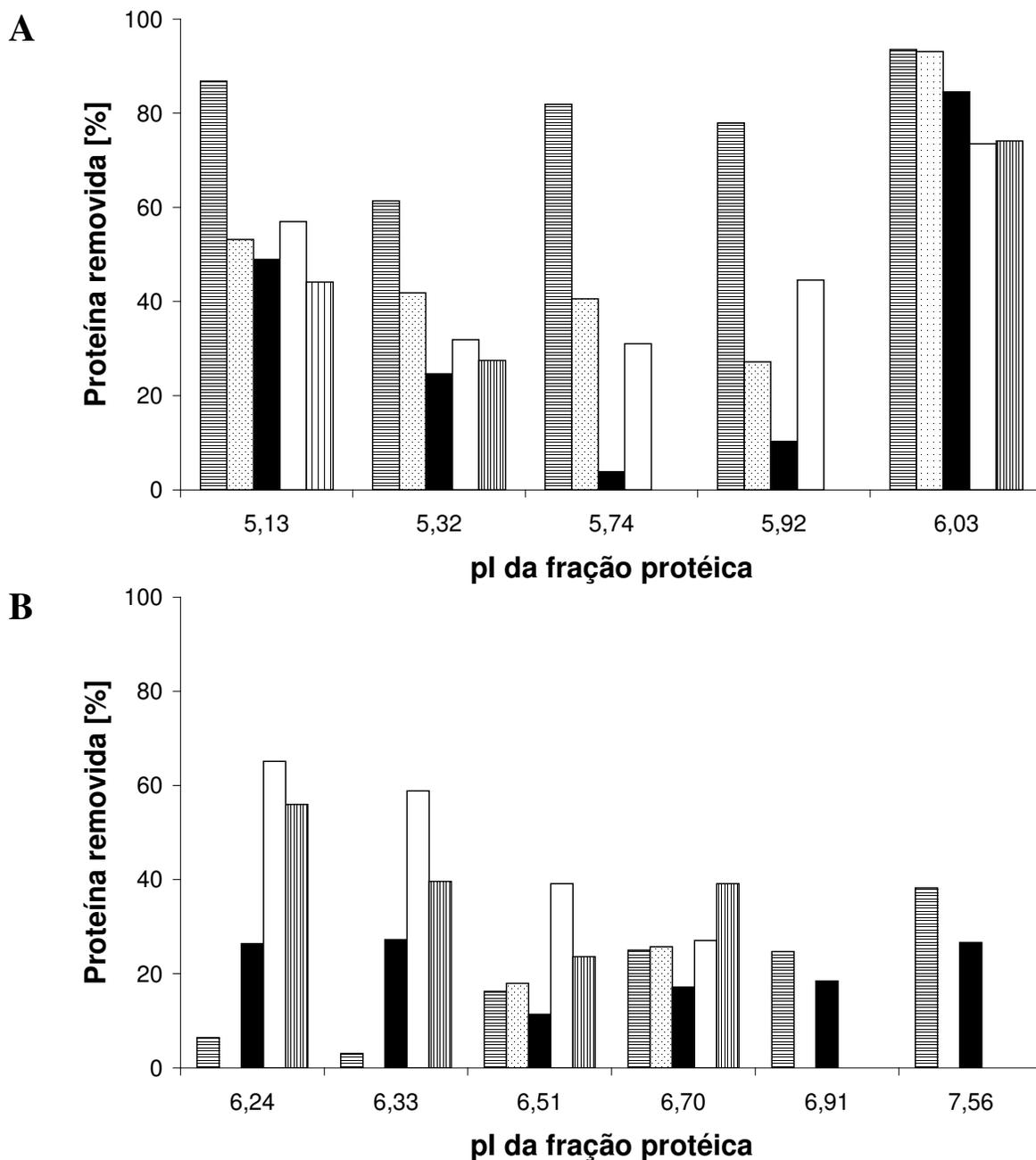


Figura 6.7 Eficiência de remoção de proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana* obtido em pH 7,0 (TRIS 100 mmol/L MBS 5 mmol/L) por adsorção em gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente. **A** – frações protéicas com pI ácido (4,67 to 6,03). **B** – frações com pI neutro e básico (6,24 – 7,56). pH da eletrocoagulação: 7,5 –  ; 8,0 –  ; 8,5 –  ; 9,0 –  ; 9,5 – .

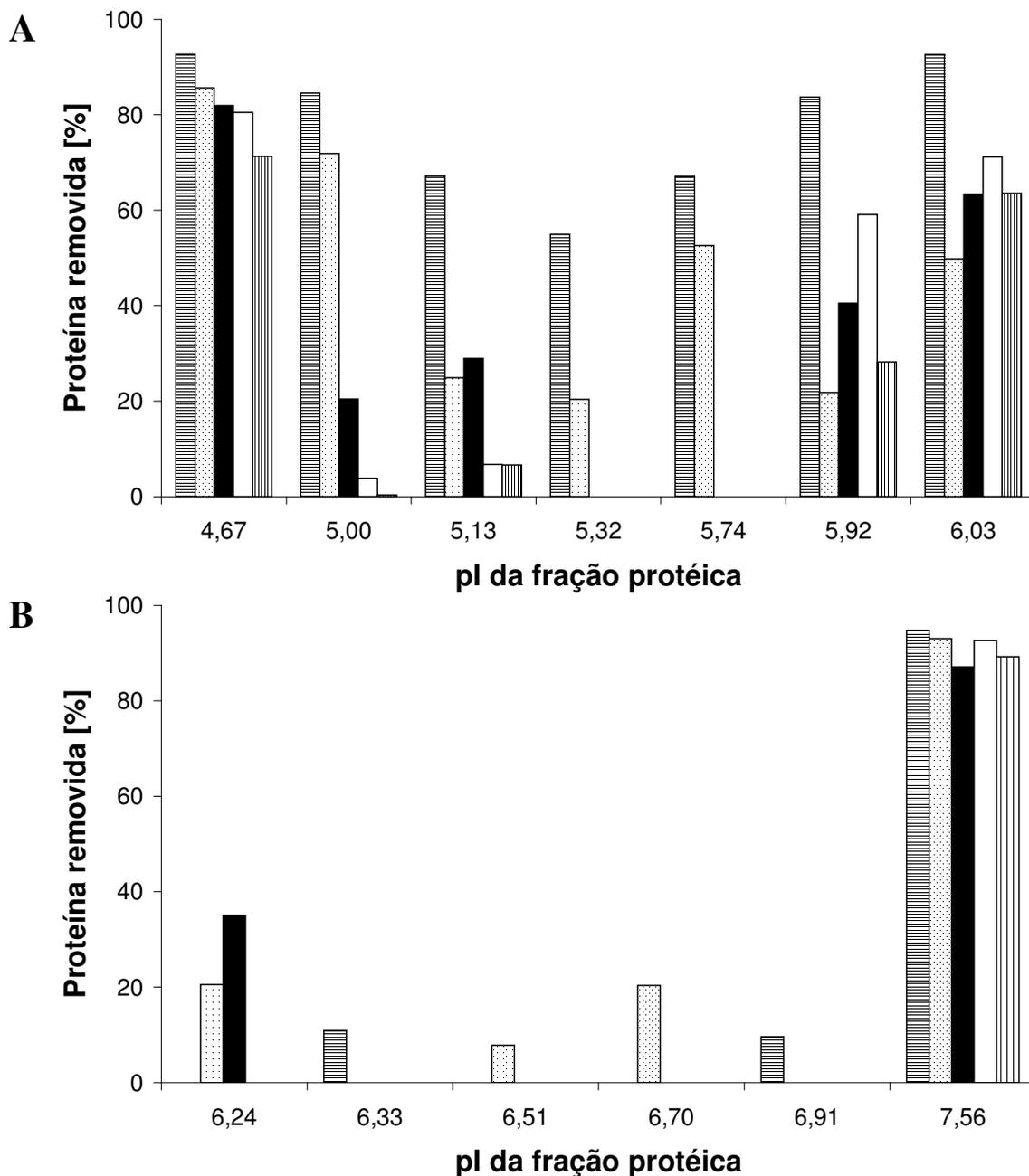


Figura 6.8 Eficiência de remoção de proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana* obtido em pH 8,0 (TRIS 100 mmol/L MBS 5 mmol/L) por adsorção em gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente. **A** – frações protéicas com pI ácido (4,67 to 6,03). **B** – frações com pI neutro e básico (6,24 – 7,56). pH da eletrocoagulação: 7,5 – ▨ ; 8,0 – ▩ ; 8,5 – ■ ; 9,0 – □ ; 9,5 – ▤.

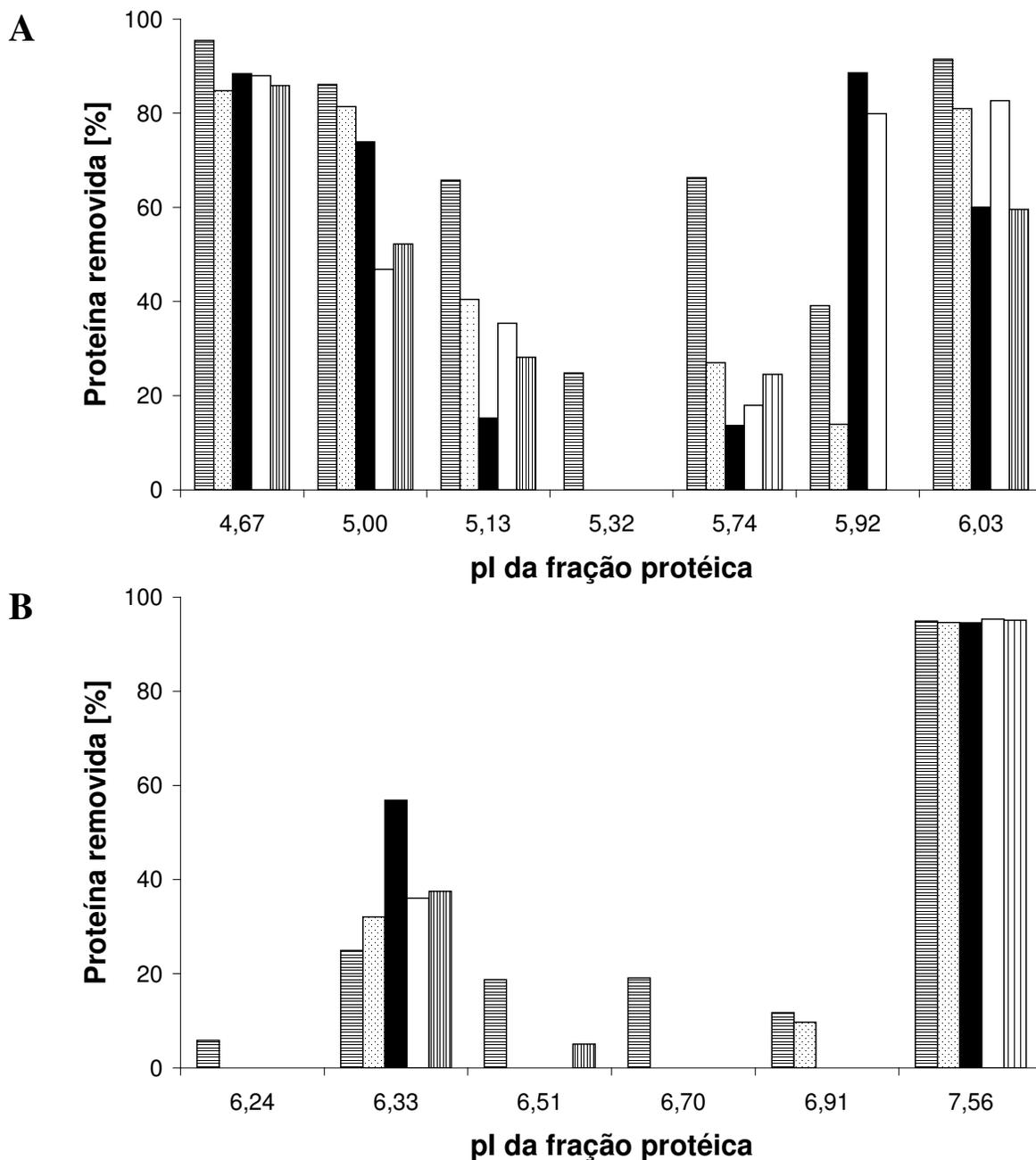


Figura 6.9 Eficiência de remoção de proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana* obtido em pH 9,0 (TRIS 100 mmol/L MBS 5 mmol/L) por adsorção em gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente. **A** – frações protéicas com pI ácido (4,67 to 6,03). **B** – frações com pI neutro e básico (6,24 – 7,56). pH da eletrocoagulação: 7,5 –  ; 8,0 –  ; 8,5 –  ; 9,0 –  ; 9,5 – .

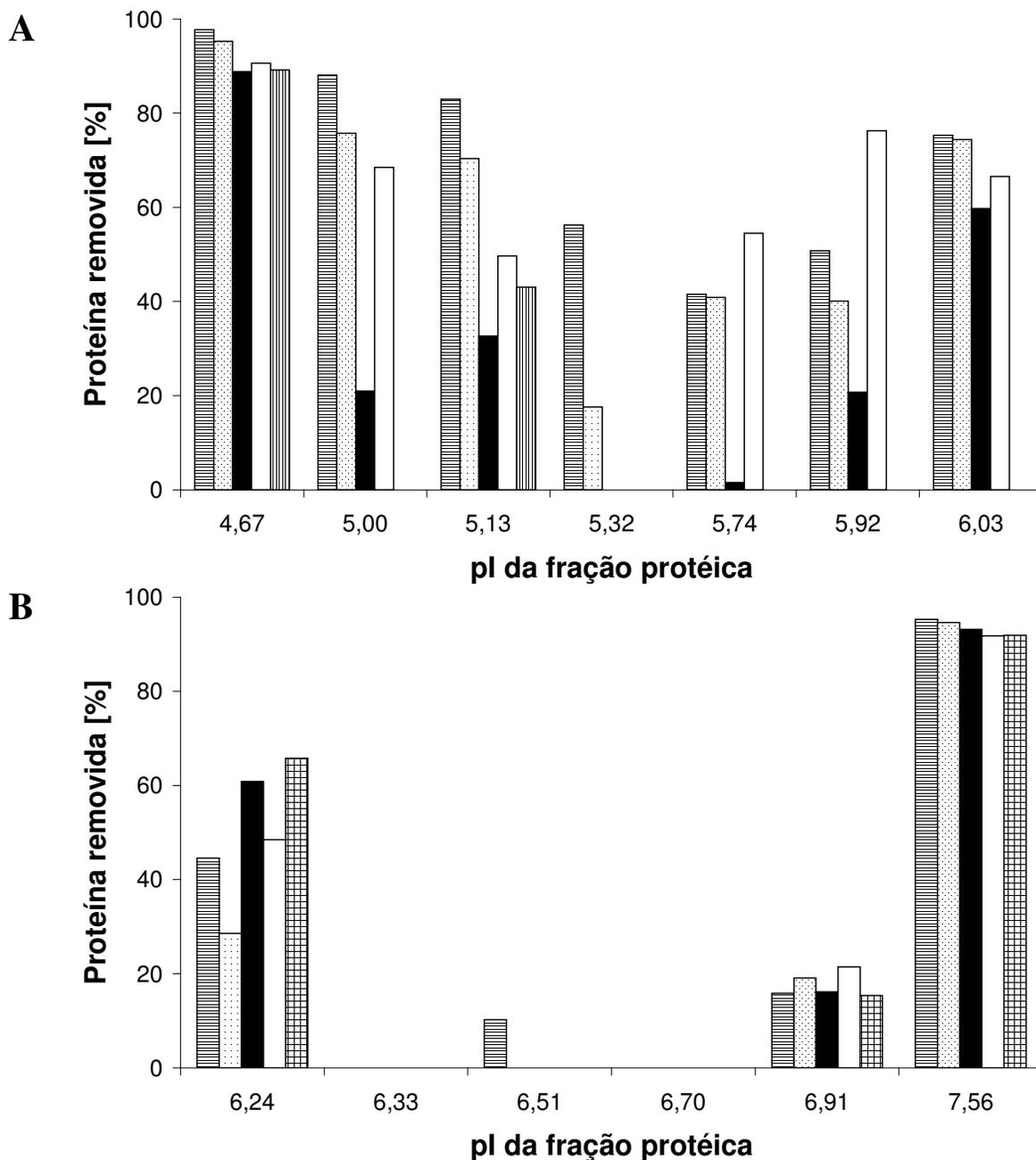


Figura 6.10 Eficiência de remoção de proteínas do extrato de folhas de *N. benthamiana* obtido em pH 10,0 (TRIS 100 mmol/L MBS 5 mmol/L) por adsorção em gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente. **A** – frações protéicas com pI ácido (4,67 to 6,03). **B** – frações com pI neutro e básico (6,24 – 7,56). pH da eletrocoagulação: 7,5 – ▨ ; 8,0 – ▩ ; 8,5 – ■ ; 9,0 – □ ; 9,5 – ▤.

6.3 Conclusão parcial

Neste capítulo, o potencial do uso de eletrocoagulação como operação de clarificação e pré-purificação em RPB de extratos de folhas de *N. benthamiana* foi avaliado. Altas eficiências de remoção de clorofila e polifenóis dos extratos foram obtidas, enquanto a perda de proteínas dos extratos foi relativamente pequena. O processo se mostrou mais eficiente em remover proteínas com pI ácido (abaixo de 6,03) independentemente do pH da eletrocoagulação utilizado. A remoção destas proteínas também foi menor com o aumento do pH da eletrocoagulação; já a remoção das proteínas com pI neutro ou básico foi maior com o aumento deste parâmetro. De forma geral, os melhores resultados, em termos de maior quantidade de proteínas e menor quantidade de polifenóis e clorofila presentes no extrato depois de tratamento, foram obtidos em pH de extração e pH da eletrocoagulação de 8,0. Nesta condição 23% da proteína foi removida enquanto a remoção de polifenóis e clorofila foi de 60 e 88%, respectivamente. Estes resultados mostraram que a eletrocoagulação pode ser usada como método de clarificação e pré-purificação das proteínas recombinantes produzidas em folhas de *N. benthamiana*, pois bons resultados foram obtidos, mesmo sem se ter otimizada a relação massa de gel/volume de extrato.

7. USO DE ELETROCOAGULAÇÃO COMO MÉTODO DE PRÉ-PURIFICAÇÃO DE sGFP PRODUZIDA EM FOLHAS DE *N. benthamiana*

Na etapa do trabalho relatada neste capítulo, os conhecimentos de eletrocoagulação obtidos com extratos de folhas de *N. benthamiana* não-transgênica foram aplicados para clarificar os extratos de folhas de *N. benthamiana* transgênica removendo polifenóis e clorofila e, ao mesmo tempo, fazer uma pré-purificação da proteína recombinante sGFP. No plano de trabalho (Figura 1), esta etapa é apresentada como “Remoção dos compostos nativos de folhas de *N. benthamiana* transgênica contendo sGFP recombinante”.

7.1 Introdução

Dentre diversas plantas, o tabaco, devido a seu largo uso como modelo e sua alta produtividade de biomassa (Twyman *et al.* 2003), é uma das plantas mais empregadas nos estudos de uso de plantas como biorreatores, sendo que várias proteínas já foram expressas em suas folhas. A maior desvantagem tecnológica da produção de proteínas recombinantes em folhas de plantas é a instabilidade da proteína devido às altas concentrações de polifenóis e clorofila, liberados no extrato durante a maceração ou extração, que podem precipitar ou degradar as proteínas. Portanto, a remoção destes compostos logo após a liberação da proteína recombinante no meio aquoso seria a chave para a produção comercial de proteínas recombinantes a partir de folhas de plantas (Menkhaus *et al.*, 2004a).

As condições ótimas para remover clorofila e polifenóis dos extratos obtidos com folhas não-transgênicas envolviam extração e eletrocoagulação em pH 8,0. Embora a

condição de pH afete a extração de proteínas de uma forma geral, o pH 8,0 foi considerado boa escolha de extração já que a proteína sGFP é estável nesta condição (Tsien, 1998) e vários trabalhos encontrados na literatura empregam esta mesma condição (Remans *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006). Portanto nesta etapa o pH da extração e o da eletrocoagulação não foi variado.

Assim, o objetivo desta última parte do trabalho foi estudar a aplicação de eletrocoagulação para remover a clorofila e os polifenóis dos extratos de folhas de tabaco transgênico e, ao mesmo tempo, minimizar a perda de proteína recombinante, a proteína verde fluorescente sintética (sGFP) pela técnica de eletrocoagulação.

7.2 Resultados e discussão

Primeiramente um extrato das folhas de tabaco transgênico liofilizadas foi obtido com tampão TRIS 10 mmol/L MBS 5 mmol/L pH 8,0 usando razão massa:volume de 100:1. Esta razão massa:volume mais alta no caso de folhas liofilizadas é devido ao fato que as folhas frescas contêm alto teor de água (em torno de 90%). Assim, a concentração dos componentes em folhas depois da liofilização é 10 vezes maior. Portanto, para poder trabalhar com extrato contendo níveis de proteínas similares aos obtidos no caso de folhas frescas, a proporção massa:volume foi aumentada para 100:1.

Os níveis de clorofila, polifenóis como também da proteína total no extrato foram parecidos com os obtidos no Capítulo 6 para as folhas de *N. benthamiana* não-transgênica (Tabela 7.1). A quantidade de sGFP recombinante presente no extrato, determinada pelo método desenvolvido neste trabalho (Capítulo 4), foi de 1,02% em termos de porcentagem mássica de proteína total dentro do extrato.

Logo após a extração, uma quantidade de gel de hidróxido de alumínio foi adicionada ao extrato. A quantidade de gel adicionado aos extratos foi variada para verificar-se se esta afetava a remoção de clorofila, polifenóis, proteínas totais e sGFP. Assim, para 1000 µL de extrato de folhas de *N. benthamiana*, volumes de 250, 333, 500, 750 e 1000 µL de suspensões de gel de hidróxido de alumínio obtidos em pH 8,0 foram adicionados (razões volumétricas volume de suspensão de gel : volume de extrato de 1:4,

1:3, 1:2, 1:1,3 e 1:1). Foi determinado que para até 750 μL da suspensão de gel adicionado para 1000 μL de extrato (razão volumétrica de 1:1,3) a sGFP não era removida dos extratos, já altas remoções de clorofila e polifenóis foram observadas nesta condição (Tabela 7.1). Assim, conseguiu-se remover praticamente toda a clorofila e diminuir a concentração dos polifenóis para níveis menores do que os presentes em extratos de sementes da soja (Robić *et al.*, 2006). Além da remoção destes compostos, observou-se uma remoção considerável das proteínas nativas das folhas com um fator de purificação em termos de sGFP de 1,6, na mesma ordem de grandeza que aqueles obtidos com sulfato de amônio (Menkhaus *et al.*, 2004a). Em termos relativos, nesta condição ocorre remoção de 100% de clorofila, 89% de polifenóis e 38% de proteínas nativas sem ocorrer remoção de sGFP dos extratos. Isto implica que o método pode ser usado para fazer-se uma pré-purificação da proteína recombinante.

Tabela 7.1 Concentrações (e porcentagem de remoção) de clorofila, polifenóis, proteína total e sGFP em extratos de *N. benthamiana* transgênica em função da adição de suspensão de gel de hidróxido de alumínio produzido por eletrocoagulação.

V_{GEL}^* [μL]	Concentração de clorofila [mg/L] e Remoção [%]		Concentração de polifenóis [mmol/L] e Remoção [%]		Concentração de proteínas [mg/mL] e Remoção [%]		Concentração de sGFP [$\mu\text{g/mL}$] e Remoção [%]	
0	4,17	(0)	0,71	(0)	0,46	(0)	4,73	(0)
250	0,75	(82,1)	0,36	(50,2)	0,38	(17,5)	4,68	(1,0)
333	0,46	(89,4)	0,26	(64,5)	0,35	(25,2)	4,73	(0)
500	0,17	(96,2)	0,16	(76,7)	0,34	(26,3)	4,67	(1,2)
750	0	(99,7)	0,08	(88,5)	0,29	(38,4)	4,73	(0)
1000	0	(99,7)	0,08	(89,0)	0,24	(47,4)	4,20	(19,1)

* Volume da suspensão contendo o gel de hidróxido de alumínio adicionado a 1000 μL de extrato. Os resultados representam a média de dois experimentos com o desvio padrão médio de 0,5% para clorofila, 1,1% para polifenóis, 1,4% para proteínas e 0,5% para sGFP.

Analisando a remoção de compostos pela quantidade de gel adicionado aos extratos percebeu-se que a remoção de polifenóis foi mais afetada do que a de proteínas, o que está em concordância com os resultados obtidos no estudo de modelos de remoção destes compostos (Capítulo 5). Isto deve-se ao fato que o mecanismo de interação entre o gel e os polifenóis é diferente do que no caso do gel e das proteínas. Na Figura 7.1 pode-se verificar, como concluído nos estudos com BSA isoladamente, que a quantidade de proteína removida é proporcional à quantidade do gel de hidróxido de alumínio presente na solução. A clorofila foi pouco afetada pela quantidade de gel adicionado, o que pode ser resultado da afinidade mais alta deste composto pelo gel quando comparando com outros compostos. A sGFP interage fracamente com o gel de hidróxido de alumínio nesta condição, embora apresente pI ácido. Entretanto, como determinado no estudo de remoção de compostos de folhas de *N. benthamiana* (Capítulo 6), a fração protéica com pI de 5,32 (Figuras 6.6 a 6.10) – pI parecido com o da sGFP (5,51) – também é fracamente removida nesta condição de eletrocoagulação (pH 8,0).

7.3 Conclusão parcial

Nesta última etapa de trabalho testou-se a aplicação de eletrocoagulação para remover clorofila, polifenóis e proteínas nativas dos extratos das folhas de *N. benthamiana* que expressa uma proteína recombinante, a sGFP. Conseguiu-se remover toda a clorofila e diminuir a concentração dos polifenóis para níveis menores do que os presentes em extratos de sementes da soja (Robić *et al.*, 2006). As sementes da soja são um dos sistemas vegetais promissores para produção de proteínas recombinantes que, o entre as plantas mais apropriadas para serem usadas como biorreatores (canola, milho, soja e tabaco), contém menor conteúdo de polifenóis (Menkhaus *et al.*, 2004a). Além disso, o método poderia ser usado também como etapa de pré-purificação, uma vez que a proteína recombinante a sGFP foi também purificada, observando-se um fator de purificação de 1,6. Assim, a metodologia proposta poderia ser uma alternativa para a técnica de precipitação de proteínas por adição de sulfato de amônio, comumente usada em processos de RPB das plantas.

8. CONCLUSÃO

A principal conclusão deste trabalho foi que a técnica eletrocoagulação pode ser usada como etapa de pré-purificação de proteína recombinante sGFP de extratos de *N. benthamiana* transgênica. Assim, acredita-se que problemas como precipitação de proteínas por complexação com clorofila e polifenóis e a adsorção destes compostos em resinas cromatográficas e o entupimento destas possam ser contornados. Embora muitas aplicações de eletrocoagulação já foram feitas em diversas áreas, este é o primeiro estudo visando aplicação desta técnica em processos biotecnológicos.

Os estudos da remoção dos compostos por eletrocoagulação revelaram que as substâncias testadas foram removidos por dois mecanismos diferentes. Um baseia-se na partição do composto entre duas fases, a fase aquosa e fase do gel de hidróxido de alumínio, sendo dependente da concentração do gel presente em solução. Já no outro a quantidade do composto removido é proporcional à quantidade total presente em solução.

De forma geral, a maior eficiência do método, quando aplicado para fim de clarificar extrato de folhas do tabaco, na eletrocoagulação foi observada em pH 8,0, pois nesta condição o gel proporciona uma boa remoção de clorofila e polifenóis e, ao mesmo tempo, a remoção das proteínas é relativamente baixa. Observou-se também que o método é seletivo para as proteínas, já que o gel produzido em condições diferentes valores de pH removeu proteínas dependendo do pI destas. No caso de proteínas ácidas, a remoção foi menor com o aumento do pH da eletrocoagulação. Em contrapartida, a remoção de proteínas com pI neutro ou básico foi maior com o aumento deste parâmetro.

O estudo de eletrocoagulação usando o extrato de folha de *N. benthamiana* transgênica indicou que o método desenvolvido pode ser usado também como etapa de pré-purificação em processos de RPB de plantas transgênicas. Um fator de purificação de

sGFP de 1,6 foi obtido, além de se atingir a remoção completa de clorofila e de grande parte dos polifenóis presentes no extrato. Pelo nosso conhecimento este é o primeiro estudo que aborda a proposição de metodologia para resolver o problema de polifenóis e clorofila em processos de RPB de plantas.

A diluição de 20 vezes com tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,00 contendo uréia 6 mol/L dos extratos de folhas de *N. benthamiana* com sGFP adicionada eliminou completamente a interferência dos componentes do extrato de tabaco na fluorescência de sGFP. Esta diluição específica, pela provável desagregação de GFP com proteínas das folhas do tabaco e/ou dímeros de GFP, portanto, possibilitou uma quantificação relativamente barata, rápida e reprodutível de sGFP baseada em sua fluorescência intrínseca.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros:

1. Aprofundamento do conhecimento das características dos géis produzidos em termos de carga superficial, estrutura química, estrutura tridimensional das partículas, porosidade, área superficial como também de densidade.
2. Estender os estudos de eletrocoagulação para outros compostos biológicos tais como óleos, carboidratos e alcalóides. Estudar a aplicação do método desenvolvido também para outros sistemas recombinantes de produção de proteínas.
3. Estudos aprofundados da adsorção de proteínas com gel, já que estudos com proteínas de *N. benthamiana* indicam que o pI da proteína não é o único parâmetro importante na sua remoção. Portanto, o efeito de parâmetros como, por exemplo, hidrofobicidade superficial e presença de resíduos de aminoácidos específicos na remoção de proteínas das soluções poderiam ser estudados. Da maneira parecida, estudar também os parâmetros importantes na adsorção de polifenóis em gel de hidróxido de alumínio.
4. Estudar a aplicação de eletrocoagulação para remover polifenóis dos sucos de plantas usados como meio de crescimento de bactérias ou fungos, como por exemplo, extratos de frutas contendo alto teor de açúcares, mas também alto teor de polifenóis que podem inibir o crescimento destes organismos.

Referências bibliográficas

Adduci J., Buddhasukh D., Ternai B., *Improved isolation and purification of stevioside*, Journal of Scientific Society of Thailand, 13, 179-183, 1987

Alkaabi K. M., Yefa A., Ashraf S., *Effect of pH on thermal and chemical-induced denaturation of GFP*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 126, 149-156, 2005

Amatore C., Berthou M., Hébert S., *Fundamental principles of electrochemical ohmic heating of solutions.*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 457, 191-203, 1998

Anderson R. A., Sowers J. A., *Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinylpyrrolidone*, Phytochemistry, 7, 293-301, 1968

Arnon D. I., *Copper enzymes in isolated chloroplasts; polyphenol-oxidase in Beta vulgaris*, Plant Physiology, 24, 1-15, 1949

Avsar Y., Kurt U., Gonullu T., *Comparison of classical chemical and electrochemical processes for treating rose processing wastewater*. Journal of Hazardous Materials, 148, 340-345, 2007

Austin S., Bingham E. T., Koegel R. G., Mathews D. E., Shanan M. N., Straub R. J., Gurgess R. R., *An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa*, Annals of New York Academy of Science, 721, 234-244, 1994

Bagotsky V. S., *Reactions involving metals*, Editor: Bagotsky V. S., Fundamentals of electrochemistry, 297-315, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2006

Bai Y., Glatz C. E., *Bioprocess considerations for expanded-bed chromatography of canola extract: Sample preparation and adsorbent reuse*, Biotechnology and Bioengineering, 81, 775-782, 2003

Bakker H., Bardor M., Molthof J. W., Gomrod V., Elbers I., Stevens L. H., Jordi W., Lommen A., Faye L., Lerouge P., Bosch D., *Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 2899-2904, 2001

Balasubramaniam D., Wilkinson C., Cott K. V., Zhang C., *Tobacco protein separation by aqueous two-phase extraction*, Journal of Chromatography A, 989, 119-129, 2003

Billinton N., Knight A. W., *Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence*, Analytical Biochemistry 291, 175-97, 2001

Blumenthal A., Kuznetzova L., Edelbaum O., Raskin V., Levy M., Sela I., *Measurement of green fluorescence protein in plants: Quantification, correlation to expression, rapid screening and differential gene expression*, Plant Science, 142, 93-99, 1999

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

Bravo L., *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*, Nutrition Reviews, 56, 317-333, 1998

Cañizares P., Carmona M., Lobato J., Martinez F., Rodrigo M. A., *Electrodissolution of aluminium electrodes in electrocoagulation processes*, Industrial and Engeneering Chemical Research, 44, 4178-4185, 2005

Cañizares P., Martinez F., Rodrigo M. A., Jiménez C., Sáez C., Lobato J., *Modelling of wastewater electrocoagulation processes Part I: General description and application to kaolin-polluted wastewaters*, Separation and Purification Technology, 60, 155-161, 2008a

Cañizares P., Martinez F., Rodrigo M. A., Jiménez C., Sáez C., Lobato J., *Modelling of wastewater electrocoagulation processes Part II: Application to dye-polluted wastewaters and oil-in water emulsions*, Separation and Purification Technology, 60, 147-154, 2008b

Carmona M., Khemis M., Leclerc J. P., Lapicque F., *A simple model to predict the removal of oil suspensions from water using the electrocoagulation technique*, Chemical Engineering Science, 61, 1237-1246, 2006

Chairungsi N., Jumpatong K., Phutdhawong W., Duang B., *Solvent effects in electrocoagulation of selected plant pigments and tannin*, Molecules, 11, 309-317, 2006

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*, Science, 263, 802-805, 1994

Chang Y. K., Chase H. A., *Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption*, Biotechnology and Bioengineering, 49, 204-216, 1996

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

Chen G., *Electrochemical technologies in wastewater treatment*, Separation and Purification Technology, 38, 11-41, 2004

Chen X., Chen G., Yue P. L., *Separation of pollutants from restaurant wastewater by electrocoagulation*, Separation and Purification Technology, 19, 65-76, 2000

Chen W., Chen G., Yue P. L., *Investigation on the electrolysis voltage of electrocoagulation*, Chemical Engineering Science, 57, 2449-2455, 2002

Chibnall A. C., Schryver S. B., *VIII Investigations on the nitrogenous metabolism of the higher plants Part I. Isolation of proteins from leaves*, Biochemical Journal, 15, 60-75, 1921

Chiu W. L., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. *Engineered GFP as vital reporter in plants*, Current Biology, 6, 325-330, 1996

Dai Z., Hooker B. S., Queesenberry R. D., Thomas S. R., *Optimization of Acidothermus cellulolyticus endoglucanase (E1) production in transgenic tobacco plants by transcriptional, post-transcription and post-translational modification*, Transgenic Research, 14, 627-643, 2005

Dobbie I. M., Lowndes N. F., Sullivan K. F., *Autofluorescent Proteins*, Methods in Cell Biology, 85, 1-22, 2008

Esau K., *Anatomia das plantas com sementes*, Tradução: Berta Lange de Morretes, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1976

Evangelista R. L., Kusnadi A. R., Howard J. A., Nikolov Z. L., *Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant β -glucuronidase from transgenic corn*, Biotechnology Progress, 14, 607-614, 1998

Farinas C. S., Leite A., Miranda E. A., *Aqueous extraction of recombinant human proinsulin from transgenic maize endosperm*, Biotechnology Progress, 21, 1466-1471, 2005

Fiedler U., Phillips J., Artsaenko O., Conrad U., *Optimization of scFV antibody production in transgenic plants*, Immunotechnology, 3, 205-216, 1997

Fink A. L., *Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid*, *Folding and Design*, 3, 9-23, 1998

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

Hanson M. R., Kohler R. H., *GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants*, *Journal of Experimental Botany*, 52, 529-539, 2001

Harborne J. B., *Methods in plant biochemistry*, Editor: Harborne J. B., Vol. 1: Plant phenolics, 1-28, Academic Press, London, 1989

Haselhoff J., Siemering K. R., Prasher D. C., Hodge S., *Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly*, *Proceeding of the National Acadademy of Science of the USA*, 94, 2122-2127, 1997

Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K., *Production of antibodies in transgenic plants*, *Nature*, 342, 76-78, 1989

Hood E. E., Witcher D. R., Maddock S., Baszczyński C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov., Wooge C., Mehig R. J., Hernan R., Kappel W. K., Ritland D., Li C. P., Howard J. A., *Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification*, *Molecular Breeding*, 3, 291-306, 1997

Hood E. E., Woodard S. L., Horn M. E., *Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants*, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 630-635, 2002

Jumpatong K., Phutdhawong W., Buddhasukh D., *Dechlorophyllation by electrocoagulation*, *Molecules*, 11, 156-462, 2006

Koca N., Karadeniz F., Burdurlu H. S., *Effect of pH on chlorophyll degradation and color loss in blanched green peas*, Food Chemistry, 100, 609-615, 2006

Koganov M. M., Shivaiko L. V., Kuznetsov N. I., Shaperenko L. V., Lobach G. A., *The influence of alternating current on alfalfa chloroplast coagulation*, Physiology and Biochemistry of Cultural Plants, 20, 195-200, 1988

Komarnytsky S., Borisjuk N. V., Borisjuk L. G., Alam M. Z., Raskin I., *Production of recombinant proteins in tobacco guttation fluid*, Plant Physiology, 124, 927-933, 2000

Koparal A. S., Yildiz Y. Ş., Keskiner B., Demircioğlu N., *Effect of initial pH on the removal of humic substances from wastewater by electrocoagulation*, Separation and Purification Technology, 59, 175-182, 2008

Kung S. D., Tso T. C., *Tabaco as a potencial food source and smoke material: soluble protein content, extraction, and amino acid composition*, Journal of Food Science, 43, 1844-1847, 1978

Kung S. D., Saunde J. A., Tso T. C., Vaughan D. A., Womack M., Staples R. C., Beecher G. R., *Tabacco as a potencial food source and smoke material: Nutritional evaluation of tabaco leaf protein*, Journal of Food Science, 45, 320-322, 1980

Kusnadi A. R., Nikolov Z. L., Howard J. A., *Production of recombinant proteins in transgenical plants: Practical considerations*, Biotechnology and Bioengineering, 5, 473-484, 1997

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

Laukens K., Deckers P., Esmans E., Van Oneckelen H., Witters E., *Construction of a two-dimensional gel electrophoresis protein database for the Nicotiana tabacum cv. Bright Yellow-2 cell suspension culture*, Proteomics, 4, 720-727, 2004

Leelavathi S., Gupta N., Maiti S., Ghosh A., Reddy V. S., *Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplast and efficient recovery of the enzyme*, Molecular Breeding, 11, 59-67, 2003

Lewis J. C., Feliciano J., Daunert S., *Fluorescence binding assay for a small peptide based on a GFP fusion protein*, Analytica Chimica Acta 397, 279-286, 1999

Loomis W. D., *Methods in enzymology*, Editores: Fleischer S., Packer L., Vol XXXI: Biomembranes Part A, 528-544, Academic Press, London, 1974

Ma J. K. C., Drake P. M. W., Christou P., *The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants*, Nature Reviews: Genetics, 4, 794-805, 2003

Marcus Y., *Ion exchange studies of complex formation*, Editor: Marinsky J. A., Ion exchange Volume 1, 101-135, Marcel Dekker, Inc., New York, 1966

Menkhaus T. J., Bai Y., Zhang C., Nikolov Z. L., Glatz C. E., *Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants*, Biotechnology Progress, 20, 1001-1014, 2004a

Menkhaus T. J., Pate C., Krech A., Glatz C. E., *Recombinant protein purification from pea*, Biotechnology and Bioengineering, 84, 108-114, 2004b

Miller K. D., Gao J., Hooker B. S., *Initial clarification by aqueous two-phase partitioning of leaf extracts from Solanum tuberosum plants expressing recombinant therapeutics proteins*, Bioprocessing Journal, 3, 47-51, 2004

Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J. M., Adams J. A., Ikura M., Tsien R. Y., *Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin*, Nature, 388, 882-7, 1998

Mollah M. Y. A., Morkovsky P., Gomes J. A. G., Kesmez M., Parga J., Cocke D. L., *Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation*, Journal of Hazardous Materials, 114, 199-210, 2004

Morise H., Shimomura O., Johnson F. H., Winant J., *Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*, Biochemical Engineering Journal, 13, 2656-2662, 1974

Moueden G., Feki M., Wery M. P., Ayedi H. F., *Behaviour of aluminium electrodes in electrocoagulation process*, Journal of Hazardous Materials, 150, 124-135, 2008

Nelson D. L., Michael M. C., *Lehninger principles of biochemistry, 4th ed.*, W. H. Freeman & Co., New York, 2005, 1119 p

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

Phutdhawong W., Chowwanapoonpohn S., Buddhasukh D., *Electrocoagulation and subsequent recovery of phenolic compounds*, Analytical Sciences, 16, 1083-1084, 2000

Porter L. W., *Methods in plant biochemistry*, Editor: Harborne J. B., Vol. 1: Plant phenolics, 389-419, Academic Press, London, 1989

Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J., *Primary structure of Aequorea victoria green-fluorescent protein*, Gene, 111, 229-233, 1992

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

Pripp A. H., Vreeker R., Duynhoven J., *Binding of olive phenolics to food proteins*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 354-362, 2005

Remans T., Schenk P. M., Manners J. M., Grof C. P. L., Elliott A. R. *A protocol for the fluorometric quantification of mGFP5-ER and sGFP(S65T) in transgenic plants*, Plant Molecular Biology Reporter 17, 385-395, 1999

Robić G., *Soja como biorreator: estudo de extração e purificação de proteína recombinante utilizando β -glucuronidase*, Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005

Robić G., Farinas C. S., Rech E. L., Bueno M. A., Miranda E. A., *Downstream process engineering evaluation of transgenic soybean seeds as host for recombinant protein production*, Biochemical Engineering Journal, 32, 7-12, 2006

Ruijter N. C. A., Verhees J., van Leeuwen W., van der Krol A. R. *Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants*, Plant Biology 5, 103-115, 2003

Savoie P., *Intensive mechanical conditioning of forages: A review*, Canadian Biosystems Engineering, 43, 2.1-2.12, 2001

Schaewen A., Sturm A., O'Neil J., Chrispeels M. J., *Isolation of a mutant arabidopsis plant that lacks N-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex N-linked glycans*, Plant Physiology 102, 1109-1118, 1993

Schillberg S., Twyman R. M., Fischer R., *Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants – technology assesement*, Vaccine, 23, 1764-1769, 2005

Stalikas C. D., *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*, Journal of Separation Science, 30, 3268-3295, 2007

Stoger E., Sack M., Perrin Y., Vaquero C., Torres E., Twyman R. M., Christou P., Fischer R., *Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems*, Molecular Breeding, 9, 149-158, 2002

Thompson R. C., Tobin M. L., Hawkins S. J., Norton T. A., *Problems in extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll from epilithic microbial biofilms: towards a standard method*, Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 79, 551-558, 1999

Thornber J. P., *Methods in enzymology*, Editor: Pietro A. S., Vol XXIII: Photosynthesis Part A, 682-687, Academic Press, London, 1971

Tsien R. Y., *The green fluorescent protein*, Annual Review of Biochemistry, 67, 509-544, 1997

Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R., *Molecular farming in plants: host systems and expression technology*, Trends in Biotechnology, 21, 570-578, 2003

Valdés R., Gómez L., Padilla S., Brito J., Reyes B., Álvarez T., Mendoza O., Herrera O., Ferro W., Pujol M., Leal V., Hevia L. Y., García C., Milá L., García O., Sánchez R., Acosta A., Geada D., Paez R., Vega J. L., Borrota C., *Large-scale purification of an antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants*, Biochemical and Biophysical Research Communication, 308, 94-100, 2003

Verwoerd T. C., Paridon P. A., Ooyen A. J. J., Lent J. W. M., Hoekema A., Pen J., *Stable accumulation of Aspergillus niger phytase in transgenic tobacco leaves*, Plant Physiology, 109, 1199-1205, 1995

Voss A., Nersbach M., Hain R., Hirsch H., Liao Y., Kreuzaler F., Fischer R., *Reduced virus infectivity in N. tabacum secreting a TMV-specific full size antibody*, Molecular Breeding, 1, 39-50, 1995

Yang F., Moss L. G., Phillips G. N., *The molecular structure of green fluorescent protein*, Nature Biotechnology, 14, 1246-51, 1996

Yilmaz A. E., Bonckukcuoglu R., Kocakerim M. M., *A quantitative comparison between electrocoagulation and chemical coagulation for boron removal from boron-containing solution*, Journal of Hazardous Materials, 149, 475-481, 2007

Ward W. W., Prentice H. J., Roth A. F., Cody C. W., Reeves S.C., *Spectral perturbations of the Aequorea green-fluorescent protein*, Photochemistry and Photobiology 35, 803-808, 1982

Warner T. G., *Sweet success with tethered enzyme catalysis*, Nature Biotechnology, 16, 720-721, 1998

Wheeler R., http://en.wikipedia.org/wiki/File:GFP_structure.png, 2006, acessado em 3/7/2009

White J., Photo researches, Inc., <http://www.kwic.com/~pagodavista/schoolhouse/species/plants/leaf.htm>, 1993, acessado em 15/8/2006

Woodard S. L., Mayor J. M., Bailey M. R., Baker D. K., Love R. T., Lane J. R., Delaney D. E., McComas-Wagner J. M., Mallubhotla H. D., Hood E. E., Dangott L. J., Tichy S. E.,

Howard J. A., *Maize-derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale commercial protein product from transgenic plants*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38, 123-130, 2003

Zhang L., Patel H. N., Lappe J. W., Wachter R. M., *Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein*, *Journal of American Chemical Society*, 128, 4766-4772, 2006

Zhi W., Song J., Ouyang F., Bi J., *Application of response surface methodology to the modeling of α -amylase purification by aqueous two-phase systems*, *Journal of Biotechnology*, 118, 157-165, 2005

Zhou X., Carranco R., Vitha S., Hall T. C., *The dark side of green fluorescent protein*, *New Phytology*, 168, 313-322, 2005

Zhou X., Shi Q., Xing X., Sun Y., *Rapid purification of enhanced green fluorescent protein from *Escherichia coli**, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14, 229-234, 2006

Zou Q., Habermann-Rottinghaus S. M., Murphy K. P., *Urea effects on protein stability: hydrogen bonding and the hydrophobic effect*, *Proteins*, 31, 107-115, 1998

APÊNDICE

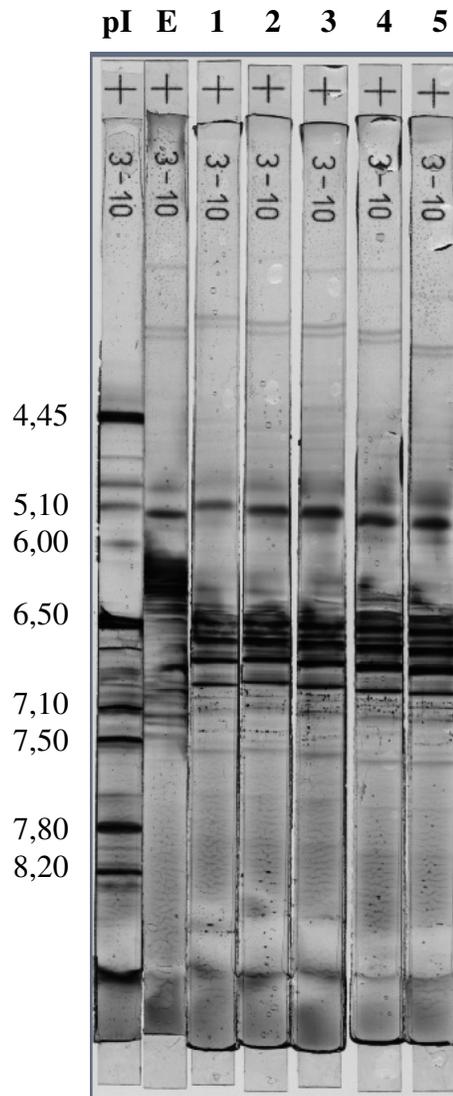


Figura 25 Eletroforese de focalização isoeétrica das proteínas do extrato de *N. benthamiana* (obtido com tampão MES 10 mmol/L MBS 5 mmol/L pH 5,5) antes e depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente em valores distintos de pH. **pI** – marcador IEF de pI. **E** – extrato antes de tratamento. Extrato depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio produzido em: pH 7,5 (1); pH 8,0 (2); pH 8,5 (3); pH 9,5 (4); pH 9,0 (5).

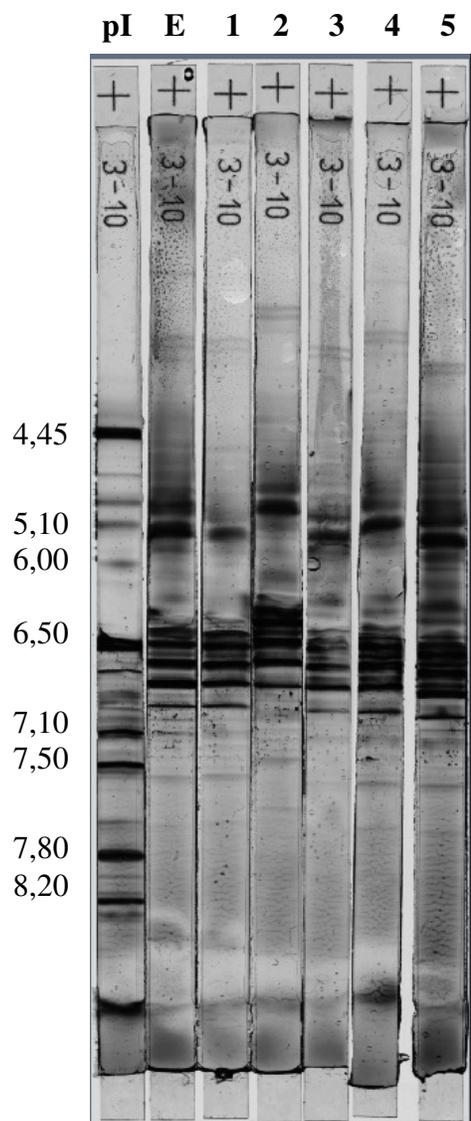


Figura 26 Eletroforese de focalização isoelétrica das proteínas do extrato de *N. benthamiana* (obtido com tampão MOPS 10 mmol/L MBS 5 mmol/L pH 7,0) antes e depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente em valores distintos de pH. **pI** – marcador IEF de pI. **E** – extrato antes de tratamento. Extrato depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio produzido em: pH 7,5 (**1**); pH 8,0 (**2**); pH 8,5 (**3**); pH 9,5 (**4**); pH 9,0 (**5**).

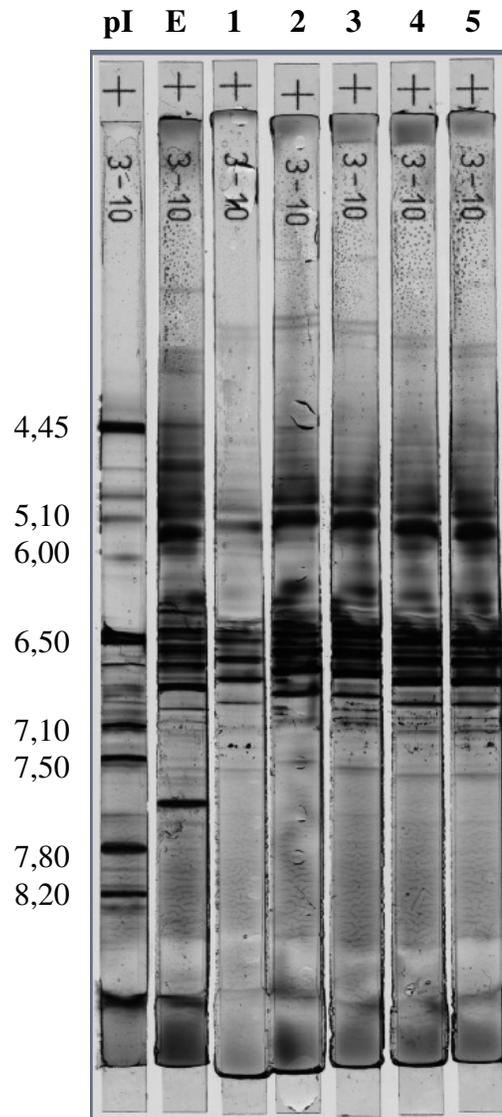


Figura 27 Eletroforese de focalização isoeétrica das proteínas do extrato de *N. benthamiana* (obtido com tampão TRIS 10 mmol/L MBS 5 mmol/L pH 8,0) antes e depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente em valores distintos de pH. **pI** – marcador IEF de pI. **E** – extrato antes de tratamento. Extrato depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio produzido em: pH 7,5 (**1**); pH 8,0 (**2**); pH 8,5 (**3**); pH 9,5 (**4**); pH 9,0 (**5**).

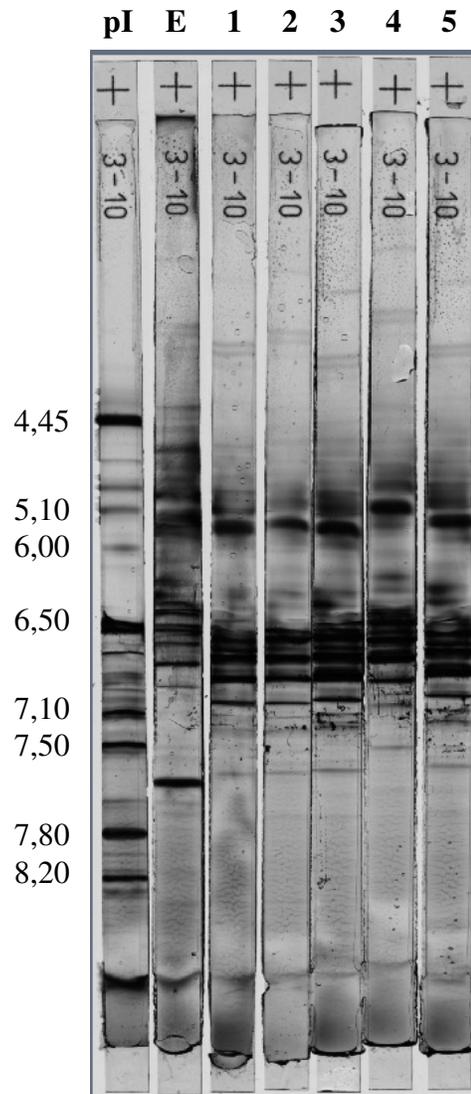


Figura 28 Eletroforese de focalização isoeétrica das proteínas do extrato de *N. benthamiana* (obtido com tampão TRIS 10 mmol/L MBS 5 mmol/L pH 9,0) antes e depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente em valores distintos de pH. **pI** – marcador IEF de pI. **E** – extrato antes de tratamento. Extrato depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio produzido em: pH 7,5 (**1**); pH 8,0 (**2**); pH 8,5 (**3**); pH 9,5 (**4**); pH 9,0 (**5**).

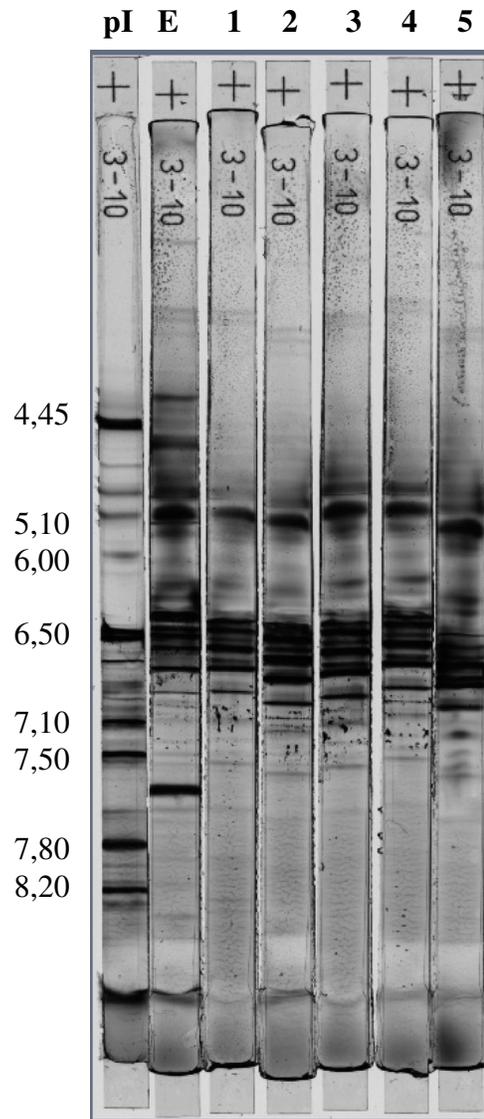


Figura 29 Eletroforese de focalização isoelétrica das proteínas do extrato de *N. benthamiana* (obtido com tampão TRIS 10 mmol/L MBS 5 mmol/L pH 10,0) antes e depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio obtido eletroquimicamente em valores distintos de pH. **pI** – marcador IEF de pI. **E** – extrato antes de tratamento. Extrato depois de tratamento com gel de hidróxido de alumínio produzido em: pH 7,5 (**1**); pH 8,0 (**2**); pH 8,5 (**3**); pH 9,5 (**4**); pH 9,0 (**5**).