

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Desenvolvimento de Processo de Recuperação de
Aprotinina Através de Afinidade por Quelato Metálico**

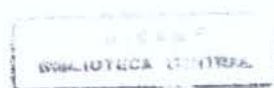
Enga. Rosana Emi Tamagawa
Mestranda

Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Orientador

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

Campinas - São Paulo

Maio de 1999



1250000-06

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
	Unicamp
	T15d
V.	Ex
TOMBO BC/	39979
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	288,11,00
DATA	13/01/00
N.º CPD	

CM-00137788-2

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

T15d

Tamagawa, Rosana Emi

Desenvolvimento de processo de recuperação de aprotinina através de afinidade por quelato metálico. / Rosana Emi Tamagawa.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Everson Alves Miranda

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Inibidores da tripsina. 2. Complexos metálicos. 3. Cromatografia de afinidade. 4. Tripsina. 5. Proteínas - Separação. 6. Adsorção. I. Miranda, Everson Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração:
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Desenvolvimento de Processo de Recuperação de
Aprotinina Através de Afinidade por Quelato Metálico**

Autora: Rosana Emi Tamagawa

Orientador: Everson Alves Miranda



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



Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Universidade Estadual de Campinas – FEQ



Dr. Marco Giuliatti
Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Campinas, 27 de maio de 1999

Esta versão corresponde a redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng^a. Rosana Emi Tamagawa e aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de maio de 1999.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'E. Miranda', is positioned above a horizontal line.

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

Aos meus pais, Osvaldo e Rosa, que, com amor
e compreensão, incentivaram e apoiaram
todas as minhas realizações.

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação com que me educaram e às minhas irmãs que, presentes em tantos momentos, sempre me apoiaram com tanto carinho.

Ao Prof. Everson, pela constante orientação, pelo apoio e amizade, e principalmente pelo incentivo durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Aníbal, pelas boas lembranças deixadas aos colegas da FAENQUIL, e em lembrança do afinho com que participou da elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana, Departamento de Processos Biotecnológicos, que permitiu a realização deste trabalho em seus laboratórios

À Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno, Departamento de Processos Biotecnológicos, pelas valiosas sugestões durante todo o desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Mookambeswaran A. Vijayalakshmi, Universidade de Tecnologia de Compiègne, França, pelo convite e supervisão durante o estágio em seu laboratório.

Ao Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa, pela participação no exame de qualificação no qual fez valiosas sugestões para a finalização do trabalho.

Aos amigos de laboratório, Adriano, Ana, Denise, Eduardo, Elcimar, Fábio, Giuliana, Líbia, Luciana, Marisa, Mirela, Marcelo, Oselys, Paula, Roberta, Sandra, Sérgio, Victor, Vinicius e Zé Antônio, pela amizade e carinho, pelos momentos em que, com paciência, me ajudaram nos trabalhos laboratoriais, pela companhia em longas horas de estudo e por demais bons momentos proporcionados.

A Biobrás S/A, pelo apoio prestado no desenvolvimento deste trabalho e pelo fornecimento de enzima e de amostra de efluente utilizados nos estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro através da Bolsa de Estudo e da Reserva Técnica.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa, FAEP, da UNICAMP, pelo suporte financeiro na compra de um microcomputador.

Aos demais professores e funcionários da FEQ e amigos da UNICAMP, que, de forma direta ou indireta ajudaram na realização deste trabalho.

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. ESCOPO.....	1
1.2. APROTININA E SUA RELEVÂNCIA	2
1.3. OBJETIVO, ESTRATÉGIA E ETAPAS PROPOSTAS.....	3
CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	5
2.2. RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE IMAC.....	8
2.3. APROTININA: PROPRIEDADES E TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO.....	18
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. MATERIAIS.....	25
3.2. PROCEDIMENTOS.....	26
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES.....	33
4.1.1. <i>Determinação de coeficientes de absorção</i>	33
4.1.2. <i>Determinação de atividade enzimática de tripsina</i>	34
4.1.3. <i>Determinação de inibição</i>	35
4.1.4. <i>Quantificação de complexo e aprotinina ou tripsina em excesso</i>	37
4.1.5. <i>Estabilidade de tripsina em temperatura ambiente</i>	39
4.1.6. <i>Influência da concentração de NaCl na estabilidade do complexo</i>	40
4.2. ADSORÇÃO DE TRIPSINA.....	41
4.3. ADSORÇÃO DE APROTININA EM TRIPSINA PREVIAMENTE ADSORVIDA.....	46
4.4. ADSORÇÃO DE COMPLEXO APROTININA-TRIPSINA.....	48
4.4.1. <i>Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção de complexo</i>	48
4.4.2. <i>Influência do pH e concentração de NaCl na adsorção do complexo</i>	48
4.4.3. <i>Influência do pH e concentração de NaCl na dessorção do complexo</i>	50
4.5. DETERMINAÇÃO DE NaCl E PROTEÍNA NO EFLUENTE INDUSTRIAL.....	54
4.6. PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE COM ADSORÇÃO DE IMPUREZAS.....	55
4.6.1. <i>Verificação inicial da adsorção de impurezas na matriz IMAC</i>	56
4.6.2. <i>Estudo das condições de remoção de impurezas do efluente</i>	57
4.6.3. <i>Remoção de impurezas via adsorção em múltiplos estágios</i>	60

4.7.RECUPERAÇÃO DE APROTININA A PARTIR DO EFLUENTE.....	64
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHO.....	71
5.1. CONCLUSÕES.....	71
5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	72
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

Resumo

TAMAGAWA, R. E. *Desenvolvimento de Processo de Recuperação de Aprotinina Através de Afinidade por Quelato Metálico*. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. *Palavras chaves*: 1. Inibidores da tripsina. 2. Complexos metálicos. 3. Cromatografia de afinidade. 4. Tripsina. 5. Proteínas – Separação. 6. Adsorção.

Aprotinina é uma proteína presente em alguns órgãos bovinos (tais como pâncreas, fígado e pulmão). Devido sua propriedade de inibição de serino-proteases possui diversas aplicações, inclusive na área médica. O objetivo deste trabalho foi a recuperação de aprotinina a partir de efluente do processamento industrial de insulina bovina através da técnica IMAC (“Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography”). Uma vez que a aprotinina não possui o requerimento básico para adsorção em matrizes IMAC (resíduos de histidina disponíveis na superfície da molécula) a estratégia deste trabalho baseou-se na formação do complexo do inibidor com tripsina. A primeira etapa do trabalho que consistiu no estudo da adsorção de complexo a partir de solução tampão mostrou a possibilidade do processo utilizando matriz IMAC sílica-IDA- Cu^{2+} . A remoção de complexo a partir de solução tampão não foi influenciada pelo aumento do pH de 7,0 a 8,5. Entretanto, foi significativamente afetada pela força iônica com maiores capacidades de adsorção com o decréscimo da concentração de NaCl de 1,0 para 0,5 M. Capacidades de adsorção de até 20 miligramas de complexo por grama de matriz foram obtidas. A dessorção foi conduzida contactando-se a matriz contendo complexo adsorvido com tampão a baixo pH (2,1). A força iônica teve um efeito significativo nesta etapa: a eficiência de dessorção foi elevada de 40 a cerca de 100% com a adição de 1,0 M de NaCl no tampão de dessorção. O segundo estágio deste trabalho foi o estudo da adsorção de complexo a partir do efluente industrial. Primeiramente, a verificação da adsorção de impurezas (proteínas do efluente) sugeriu baixa especificidade na adsorção do complexo devido intensa adsorção destas impurezas. Esta baixa especificidade foi confirmada com a adsorção de complexo a partir do efluente industrial. Alguma seletividade foi alcançada com a dessorção em duas etapas como verificado através de eletroforese SDS-PAGE: numa primeira etapa eluiu-se com tampão a pH baixo principalmente impurezas e nenhum complexo ao passo que, numa segunda etapa da dessorção, obteve-se eluição significativa de complexo com tampão a pH baixo na presença de NaCl a 1,0 M.

Abstract

TAMAGAWA, R. E. *Desenvolvimento de Processo de Recuperação de Aprotinina Através de Afinidade por Quelato Metálico*. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. *Keywords*: 1. Trypsin Inhibitor. 2. Metal Complex. 3. Affinity Chromatography. 4. Trypsin. 5. Proteins – Separation. 6. Adsorption.

Aprotinin is a small protein present in some bovine organs (pancreas, liver and lung). It is a serine-protease inhibitor that has medical applications. The objective of this work was to recover aprotinin from industrial insulin production effluent by IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography). Since aprotinin does not have the basic requirements for adsorption onto IMAC matrices (available histidine residues on its surface), the approach used for its recovery was to exploit its complex formation with trypsin. The first stage of this work was the study of adsorption of the aprotinin-trypsin complex from buffer solutions. Stirred tank batch type experiments indicated that the complex could be adsorbed onto an IMAC matrix (silica-IDA-Cu²⁺). The increase of pH from 7.0 to 8.5 did not affect the uptake of complex from solution. However, adsorption capacity was significantly affected by ionic strength: higher capacity values were obtained as the ionic strength was decreased in the range from 1.0 to 0.5 M NaCl. Adsorption capacities as high as 20 milligram of complex per gram of matrix were achieved. Desorption was carried out by contacting the complex containing matrix with a low pH buffer (pH 2.1). The ionic strength had a strong effect in this step: the desorption efficiency increased from 40 to virtually 100% when 1 M of NaCl was added to the desorption buffer. The second stage of the work was complex adsorption out of the industrial effluent. First, evaluation of the adsorption of impurities (effluent proteins) suggested low specificity of complex adsorption due to intense adsorption of these impurities. This low specificity was confirmed with complex adsorption after spiking the effluent with stoichiometric amounts of trypsin and aprotinin. Some selectivity was achieved with the desorption step as verified by SDS-PAGE: desorption with buffer at low pH eluted mainly impurities and no complex; addition of 1.0 M NaCl in a second desorption treatment allowed the elution of complex besides some impurities.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. ESCOPO

O escopo deste trabalho é a aplicação de princípios de engenharia química no desenvolvimento de um processo de recuperação de uma molécula biológica, utilizando-se de técnicas de Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB), também conhecida por “Dowstream Processing”.

À etapa de RPB é atribuída a tarefa de se atingir as características do produto final, exigidas pelo mercado. É conhecido que esta tarefa, a de separação e purificação, é uma das mais árduas dentro do processo de produção de biomoléculas, onde na maioria dos casos a molécula de interesse encontra-se numa concentração muito baixa na presença de uma grande variedade de outras espécies normalmente comuns de meios biológicos. Além disso, moléculas biológicas requerem controles rígidos das condições de processamento, devido suas estruturas frágeis susceptíveis de desnaturação.

Além de qualidade do produto, um baixo custo é também exigido pelo mercado. No entanto, devido a um grande número de etapas e diferentes operações necessárias para atingir-se a qualidade exigida, em muitos casos, origina-se da RPB o maior custo dentre as etapas do processo produtivo. No caso de moléculas para aplicações médicas por exemplo, das quais se exige alto grau de pureza, a etapa de RPB pode consumir até 80% dos custos da produção. Com a crescente geração de produtos biológicos decorrente do grande desenvolvimento da biotecnologia nesta década, tem crescido também a necessidade do desenvolvimento das técnicas de RPB, buscando uma maior redução nos custos de processamento e, ao mesmo tempo, elevando-se a qualidade do produto.

Neste trabalho, no qual objetivou-se a recuperação de aprotinina, molécula de aplicação médico-farmacêutica, utilizou-se de uma dentre as diversas técnicas de afinidade, atualmente consideradas ferramentas eficientes em RPB devido às altas seletividades e redução de etapas de separação.

Além do desenvolvimento de base de um processo industrial específico, espera-se que este trabalho possa gerar conhecimentos a serem utilizados em outros estudos de separação de biomoléculas baseados na recuperação de uma molécula alvo através de sua interação com uma segunda molécula de propriedade conhecida.

1.2. APROTININA E SUA RELEVÂNCIA

A aprotinina é um inibidor específico de serino-proteases (entre elas tripsina, quimotripsina, calicreína e plasmina) presente em órgãos bovinos, isolada pela primeira vez por Kunitz e Northrop em 1936 a partir de pâncreas bovino, mais tarde extraída também a partir de tecido linfático, fígado e pulmão bovinos (Kassel, 1970). Trata-se de uma pequena proteína de massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa, constituída de uma cadeia de 58 resíduos de aminoácidos.

A aprotinina tem sido utilizada em estudos sobre conformações protéicas e interações proteína-proteína e na proteção de proteínas recombinantes da ação de proteases produzidas por culturas de células de mamíferos (Norris et al., 1990 e Tscheche et al., 1987). Como fármaco, tem sido utilizada no tratamento de choque hemorrágico-traumático, em situações de hiperfibrinólise e coagulopatia, e principalmente em cirurgias cardíacas, com o objetivo de se reduzir perdas sangüíneas no pós-operatório (Baufreton et al., 1996 e Carrera et al., 1993). A aplicação de aprotinina em cirurgias, no entanto, não se restringe apenas a cirurgias cardíacas: Quereshi et al. (1992) sugeriram aprotinina como anti-coagulante ideal para cirurgias de grande porte em geral.

Por ser encontrada em baixas concentrações em sua fonte natural, aprotinina é um fármaco de alto valor, chegando a custar aproximadamente US\$ 3.000,00/g (preço FOB), não sendo produzida no Brasil apesar da sua disponibilidade em fontes de baixo custo (órgãos bovinos e efluentes de processamento industrial dos mesmos). Além da produção a partir de fontes

naturais, tem-se despertado interesse na expressão de aprotinina em sistemas recombinantes, como nos estudos realizados por Barthel e Kula (1995).

1.3. OBJETIVO, ESTRATÉGIA E ETAPAS PROPOSTAS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de recuperação de aprotinina (presente numa fração dos efluentes do processamento industrial de insulina bovina) utilizando cromatografia de afinidade IMAC, técnica esta, utilizada na separação de proteínas possuidoras de resíduos de aminoácidos cisteína, triptofano e, principalmente, histidina disponíveis na sua superfície. A estratégia para recuperação de aprotinina *via* IMAC, uma vez que esta molécula não possui histidinas, baseou-se na formação do seu complexo com tripsina (possuidora de resíduos de histidina) adquirindo assim, possibilidade de adsorção na matriz.

A razão da utilização da técnica IMAC no presente trabalho deve-se às vantagens por ela apresentadas (discutidas no capítulo a seguir) associadas ao fato de tripsina, responsável pela adsorção, estar também presente em frações do processamento industrial de insulina. Assim, além de vantagens da técnica, o processo, associado à linha de produção de insulina, apresentaria também possibilidade de recuperação de tripsina.

Com a estratégia de adsorção baseada no complexo aprotinina-tripsina, propôs-se inicialmente duas alternativas. A primeira delas seria a adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida na matriz, onde a enzima desempenharia função de ligante. Este tipo de esquema de adsorção é conhecido como cromatografia “piggyback”: uma molécula previamente adsorvida num suporte possibilita a adsorção de uma segunda molécula através de interação entre ambas (Informativo Amicon). Na segunda alternativa, se faria a adsorção do complexo aprotinina-tripsina, previamente formado pela adição de tripsina ao meio contendo o inibidor.

A primeira alternativa, apresenta a princípio maior atratividade, em termos operacionais e econômicos, principalmente tratando-se do desenvolvimento de um processo industrial pois, a tripsina, desempenhando função de ligante, uma vez imobilizada poderia propiciar a realização de cromatografias sequenciais sem necessidade de renovação da enzima. A segunda alternativa teria o potencial de se utilizar a tripsina endógena do pâncreas como o veículo de adsorção, o que por sua vez possibilitaria a recuperação desta tripsina bovina como subproduto da produção de

aprotinina. Caso esta estratégia de uso da tripsina endógena não fosse viável, a opção, não tão interessante em termos de processo quanto a anterior, seria a adição de tripsina exógena ao meio que deveria ser obrigatoriamente reciclada no processo.

Como etapas do trabalho foram propostos:

1. Estudos de adsorção de tripsina livre em matriz IMAC visando, através da determinação da capacidade de adsorção, a estimativa da capacidade de adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida e de adsorção do complexo aprotinina-tripsina.
2. Estudos sobre o efeito do pH e da força iônica na adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida e na adsorção de complexo.
3. Estudos de dessorção, determinando-se condições para uma alta recuperação, nesta etapa, de somente aprotinina (preferencialmente) ou do complexo aprotinina-tripsina.
4. Aplicação das condições básicas do processo então determinadas, na separação de aprotinina a partir do efluente do processamento industrial de insulina, avaliando-se sua viabilidade.
5. Separação do complexo aprotinina-tripsina obtidas após dessorção, no caso da adsorção preferencial de aprotinina não apresentar sucesso, assim como a recuperação de tripsina (a ser reciclada no processo).

A adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida (parte da etapa 2) mostrou-se inviável, tendo-se prosseguido com o plano de trabalho somente com a alternativa de adsorção do complexo. Iniciou-se os estudos utilizando a tripsina suína pois, esta, com quatro resíduos de histidina, apresentaria condições mais favoráveis no início do trabalho que a enzima bovina possuidora de três histidinas. Como ligante metálico optou-se inicialmente por cobre visto que, este, propicia maior intensidade de interação com proteínas que outros metais. Das matrizes IMAC disponíveis, optou-se em utilizar a matriz de sílica devido à facilidade de manipulação deste material frente à agarose, incluindo ser, esta matriz, mais propícia à operação em leito expandido. No entanto, alguns ensaios preliminares foram feitos com a matriz de agarose a título de comparação.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Dentre as diversas técnicas de separação de biomoléculas utilizadas na RPB, a cromatografia de afinidade é uma das mais eficientes na purificação de proteínas pois, devido alta seletividade na etapa separação elevados graus de purificação são atingidos em um pequeno número de etapas.

A cromatografia de afinidade é essencialmente um método de adsorção que explora um reconhecimento entre ligantes imobilizados num suporte sólido e a biomolécula a ser separada a partir de uma solução. A alta especificidade da interação entre as espécies que interagem (ligante e biomolécula) é o que diferencia este método dos demais tipos de cromatografia (Collins et al., 1993). Na maioria dos casos a cromatografia de afinidade é aplicada em etapas finais de purificação onde uma certa concentração do produto a ser separado já foi atingida.

De modo geral a intensidade da interação pode ser manipulada através das condições do meio, como por exemplo pH e força iônica, e assim, uma molécula pode ser adsorvida e dessorvida do ligante sob condições estabelecidas que favorecem ou enfraquecem a associação molécula-ligante.

A cromatografia de afinidade, como ilustra a Figura 2.1, tem como etapas básicas: 1) a adsorção, na qual o produto de interesse passa da solução para a fase sólida, interagindo com a mesma, enquanto demais espécies passam através da matriz sem interagirem; 2) a lavagem da matriz com o tampão de adsorção para remoção de moléculas fracamente adsorvidas através de interações não-específicas; 3) a dessorção do produto, obtida através de variação das condições

do meio de modo a enfraquecer a interação da molécula com o ligante imobilizado e 4) a regeneração da matriz, através de lavagem com a solução de regeneração que pode ser em alguns casos o próprio tampão de adsorção.

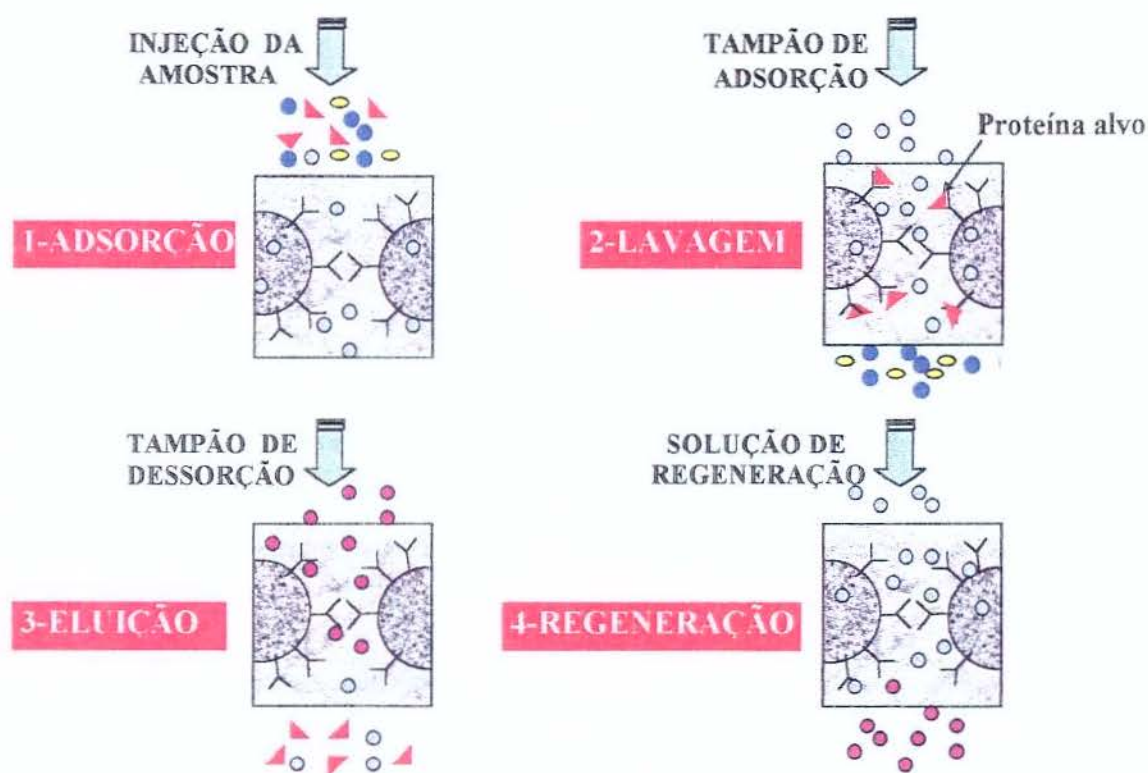


Figura 2.1. Etapas básicas de uma Cromatografia de Afinidade.

A especificidade da interação no processo de separação provém de propriedades características do ligante e da biomolécula responsáveis pelos mecanismos de reconhecimento entre si. A interação entre ligante e biomolécula pode ser bioespecífica ou pseudobioespecífica, dependendo do tipo do ligante e da força que rege a interação. Em ligantes bioespecíficos, a interação entre o ligante e a biomolécula baseia-se geralmente na complementariedade de carga, hidrofobicidade e forma sendo que, em sistemas pseudobioespecíficos, as mesmas forças contribuem na interação, porém em diferentes magnitudes (Vijayalakshmi, 1989). Normalmente, interações bioespecíficas propiciam uma maior seletividade no processo de separação em relação às pseudobioespecíficas, devido maior especificidade das interações.

Os sistemas de interação bioespecífica mais conhecidos são enzima-substrato, inibidor-enzima e antígeno-anticorpo, sendo os ligantes normalmente de origem biológica. No caso de

sistemas de afinidade pseudobioespecífica, os ligantes podem ser tanto moléculas biológicas como moléculas orgânicas ou inorgânicas tais como aminoácidos, ligantes hidrofóbicos, corantes e íons metálicos. Na Figura 2.2 temos uma classificação dos métodos gerais de cromatografia de afinidade com base no tipo do ligante usado. Para um melhor controle do processo para cada sistema de afinidade, tanto para o bioespecífico como para o pseudobioespecífico, é essencial que se estabeleça qual o tipo de interação assim como o mecanismo de reconhecimento entre ligante e biomolécula.

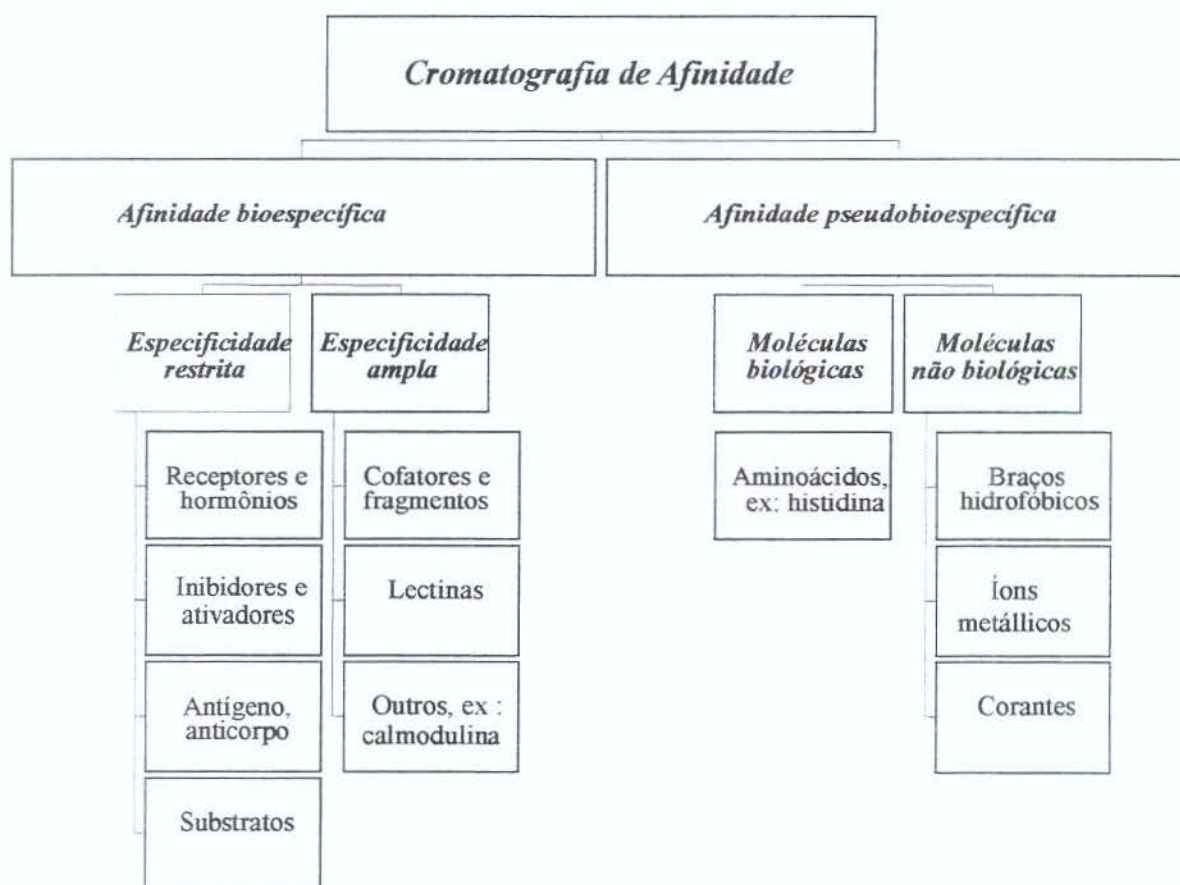


Figura 2.2 - Classificação de técnicas de cromatografia quanto ao tipo de afinidade: bioespecífica ou pseudobioespecífica (Vijayalakshmi, 1989).

Ligantes bioespecíficos, por apresentarem maior seletividade no processo de adsorção em relação aos pseudobioespecíficos, podem ser preferencialmente aplicados em processos em que se requer elevados graus de pureza do produto final. Um inconveniente, no entanto, é o alto custo tanto fixo como operacional pois muitos destes ligantes sendo macromoléculas frágeis,

difíceis de se imobilizar em suportes sólidos e em muitos casos de alto valor agregado, inviabilizam algumas aplicações, especialmente em produções comerciais em larga escala.

Por outro lado, os ligantes pseudobioespecíficos são espécies que, apesar de propiciarem uma menor especificidade nas interações com as moléculas a serem separadas em relação aos bioespecíficos, apresentam seletividade notável, suficiente em muitos casos para atingir o grau de purificação esperado. Ligantes pseudobioespecíficos, além de menor custo fixo em relação aos bioespecíficos, apresentam maior estabilidade química e microbiológica, propiciando menor custo operacional devido à menor necessidade de controle das condições do processo, e ainda apresentam alto potencial de recuperação (Suh et al., 1985 e Vijayalakshmi, 1989).

2.2. RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNAS ATRAVÉS DE AFINIDADE POR QUELATO METÁLICO

A afinidade de proteínas por íons metálicos originou o desenvolvimento da técnica de cromatografia de afinidade conhecida por "Immobilized Metal Affinity Chromatography" (IMAC). A técnica foi inicialmente desenvolvida por Porath em 1975 como uma técnica de fracionamento de proteínas e é atualmente utilizada como um método de cromatografia de afinidade aplicável a uma grande variedade de biomoléculas, embora seu potencial, comparado a cromatografias convencionais, não tivesse, até alguns anos atrás, sido vastamente explorado (Wong et al., 1991).

Em metaloproteínas, vários grupamentos funcionais de proteínas participam da interação da macromolécula com o metal: cadeias laterais da glutamina, tirosina, cisteína, histidina, arginina, lisina, aspartato, metionina, as extremidades N-terminal e os grupamentos amida e carbonila. Porath (1975), no entanto, levantou hipótese que em IMAC, somente resíduos de histidina, cisteína e triptofano localizados na superfície da proteína poderiam formar ligações de coordenação estáveis com os íons metálicos imobilizados. Estudos realizados com proteínas modelos comprovaram que a histidina é de maior importância na retenção de proteínas por IMAC, seguida pela cisteína que também intervêm no fenômeno, mas em menor proporção, e pelo triptofano que, apesar de indicações de seu envolvimento, aparentemente não apresenta afinidade para intervir sozinho no fenômeno de retenção. Do conhecimento da relevância do

resíduo de histidina na associação de proteínas com íons metálicos imobilizados originou-se o desenvolvimento de polipeptídeos modificados, através de acoplamento de uma cauda constituída por resíduos de histidina, para sua possível recuperação através de IMAC (Jonhson e Arnold, 1995).

As interações dos resíduos específicos de aminoácidos, histidina, cisteína e triptofano (em menor intensidade), disponíveis na superfície de proteínas com íons metálicos decorrem de uma coordenação entre um par de elétrons do grupamento aminoácido e o metal. Em associações envolvendo histidina, o nitrogênio do anel imidazol é o grupo doador de elétrons possíveis de coordenação com o metal. Associações entre metais e resíduos cisteína não tiveram verificações experimentais, embora possam ser preditos a partir dos modelos de metais livres em solução, nos quais grupos sulfidril são envolvidos no mecanismo (Wong et al., 1991; Beitle e Atai, 1992 e Vijayalakshmi, 1989). Muitos outros fatores relevantes podem ser observados em interações proteína-metal livre em solução, como o fato de que as cadeias carboxil, imidazol e sulfidril laterais são mais importantes na ligação com o metal, do que as cadeias carboxil e amino terminais (Wong et al., 1991).

É conhecido que a especificidade em IMAC é propiciada essencialmente pela coordenação do par eletrônico do grupo doador de elétrons da proteína com o íon metálico, mas, além da ligação responsável pela associação da proteína com o metal, é necessário o conhecimento de outros tipos de interações presentes no sistema. O quelato metálico imobilizado se encontra altamente solvatado por moléculas de água possuindo assim elevado número de grupos hidroxila na sua vizinhança. No caso de matrizes IDA-Cu²⁺ (matrizes contendo como quelante, o ácido iminodiacético, IDA, e como ligante metálico, o íon cobre) sabe-se que o quelato apresenta uma rede de cargas negativas, sugerindo a participação de interações eletrostáticas ou indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos positivamente carregados, tais como arginina, na associação da proteína com o quelato (Vijayalakshmi, 1989).

Apesar da seletividade da técnica ser atribuída a resíduos específicos de aminoácidos, o papel de um determinado aminoácido no processo de adsorção não é o mesmo para todas as proteínas. Para os grupos de histidina, por exemplo, diferenças nos pK's causam variação na ordem de retenção da proteína pela matriz IMAC. O potencial para coordenação de elétrons da proteína com íons metálicos cresce com o decréscimo do valor de pK dos aminoácidos

específicos e pode também ser influenciada pelo posicionamento destes aminoácidos na estrutura da macromolécula (Wong et al., 1991).

Além do tipo e posicionamento de grupos aminoácidos que podem interagir com o metal, a interação é influenciada por variáveis independentes tais como pH, temperatura, tipo do solvente, tipo e concentração do sal, natureza do metal imobilizado, densidade do ligante na matriz e tamanho da proteína. O efeito das principais variáveis que influenciam a adsorção e dessorção em IMAC são comentadas nos tópicos adiante.

Existe uma série de vantagens da utilização de IMAC em relação a demais métodos de cromatografia por afinidade. Uma delas, é a versatilidade da matriz, uma vez que diferentes metais podem alternadamente ser imobilizados num mesmo suporte podendo ser facilmente removidos através de regeneração permitindo, assim, a separação de diferentes proteínas. Métodos específicos de separação podem ser conduzidos pela escolha do metal, pois diferentes características de interação entre proteína e ligante podem ser averiguadas com diferentes metais utilizados. Os ligantes (íons metálicos) podem ser facilmente removidos da coluna através de uma simples etapa de lavagem utilizando-se EDTA; assim, a matriz pode ser completamente recuperada sem perder funcionalidade (Wong et al., 1991). Uma determinada matriz pode ser regenerada centenas de vezes sem perda substancial da capacidade quelante e sem alto risco de contaminação microbiológica (Porath, 1988).

A técnica IMAC não se restringe apenas à purificação de proteínas mas também é usada como ferramenta em estudos de verificação da existência de aminoácidos, como por exemplo histidinas, cisteínas e triptanos na superfície de proteínas. Esta verificação de aminoácidos específicos é muito útil na verificação da autenticidade de proteínas produzidas *via* DNA recombinante: a adsorção *via* IMAC da proteína nativa e a da recombinante devem apresentar resultados semelhantes (Wong et al., 1991).

Uma variação da técnica IMAC é conhecida como MIT (Metal Ion Transfer) que consiste da transferência de íons metálicos de solução para adsorvente contendo agente quelante sem metal ou de adsorvente contendo ligante metálico para a solução. No primeiro caso a transferência de íons de solução para adsorvente pode ser utilizada para eliminação de traços de íons de metais indesejáveis na amostra. No segundo caso a transferência de metal a partir do

adsorvente para solução é útil como citado por Sulkowski (1989), na modificação de um enzima para produção de uma metaloenzima.

2.2.1. *Agente quelante*

A imobilização dos íons metálicos ocorre através de um agente quelante covalentemente imobilizado ao suporte. As propriedades do centro de adsorção dependem fortemente do agente quelante; em geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os quelatos formados entre o suporte e os íons metálicos e mais fraca é a interação do metal com a proteína (Sulkowski, 1985).

O fato da interação entre agente quelante e íon metálico ser mais forte quanto mais polidentado for o agente quelante, deve-se à maior perda de energia livre produzida pelo maior número de anéis quelatos formados. Quanto à fraca interação da proteína com o metal imobilizado através de um maior número de anéis quelatos, deve-se ao fato de que um menor número de sítios de coordenação do metal estarão disponíveis para interação com a proteína.

Em resumo, sendo os sítios de coordenação do metal, os responsáveis pela adsorção da proteína, o agente quelante deve ser tal que proporcione uma alta estabilidade do complexo com o metal, mas também disponibilize sítios livres de coordenação para ligar-se com a biomolécula.

O agente quelante mais utilizado é o ácido iminodiacético (IDA) que é um quelante tridentado, isto é, forma complexo com o metal ocupando três sítios de coordenação. Assim, no caso de íons metálicos hexacoordenados, com três sítios ocupados, há disponibilidade para a proteína interagir com um dos três sítios restantes (Figura 2.3). Na Figura 2.4 temos outra representação do quelato metálico constituído por IDA assim como a representação do quelato constituído pelo agente quelante tris (carboximetil-etil-diamina) ou TED, que por ser um quelante pentadentado proporciona uma quelação mais forte do metal, diminuindo assim a capacidade do íon metálico de fazer ligações com a proteína. Estas representações esquemáticas são modelos de descrição, pois a estrutura exata do complexo não é conhecida (Davankov e Semechkin, 1977). Além de IDA e TED, tem-se na Figura 2.5 as estruturas de outros agentes quelantes utilizados na imobilização de íons metálicos em matrizes IMAC.

Estudos indicaram que a constante de formação de quelatos metálicos, quando os agentes quelantes estão imobilizados em suportes sólidos, são da mesma ordem de grandeza das constantes obtidas para compostos análogos em solução. A estabilidade dos complexos formados

com IDA com alguns metais decresce na seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+}$, Mg^{2+} (Wong et al., 1991).

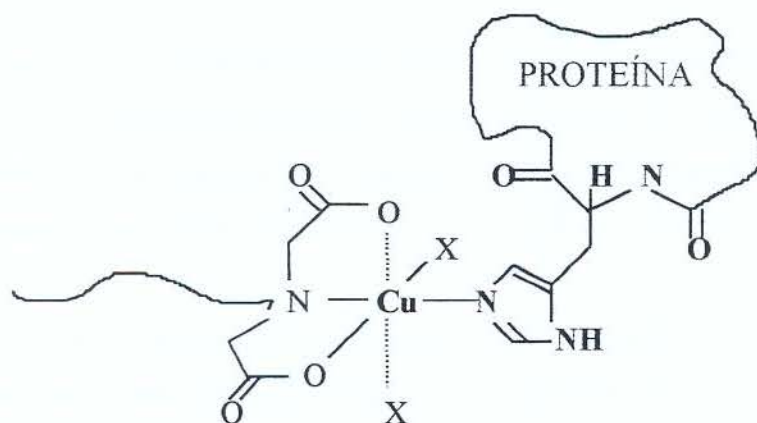


Figura 2.3 - Representação esquemática da interação proteína-IDA- Cu^{2+} em IMAC, através de coordenação do anel imidazol do grupo histidina com o íon metálico. X: sítio de coordenação do metal, susceptível de ligação com a proteína.

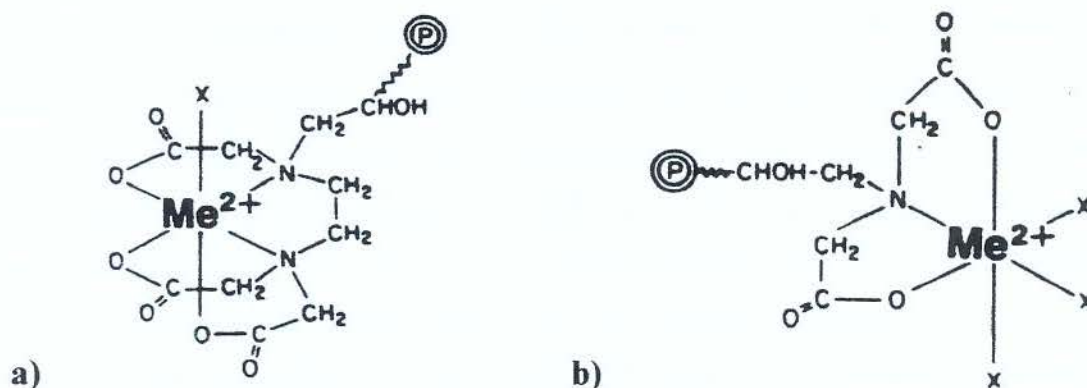


Figura 2.4 - Representação esquemática dos complexos a) IDA- Me^{2+} e b) TED- Me^{2+} (Vijayalakshmi, 1989). P: matriz à qual o agente quelante está imobilizado. X: sítio de coordenação do metal, susceptível de ligação com a proteína.

$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{-N} \\ \\ \text{CH}_2\text{-COO}^- \end{array} $ IDA (ácido iminodiacético)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \\ \quad \quad \\ \text{-NH} \quad \quad \text{CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{-COO}^- \end{array} $ TED (tris carboximetil etilenodiamina)
$ \begin{array}{c} \text{-CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{N-CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{-COO}^- \end{array} $ NTA (ácido nitrilotriacético)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{-N-CH-COO}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{-COO}^- \end{array} $ CM-Asp (ácido carboximetil aspártico)
$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \quad \text{HN}-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2 \\ \quad \quad \\ (\text{CH}_2)_2 \quad (\text{CH}_2)_2 \\ \quad \quad \\ \text{-N}-(\text{CH}_2)_2\text{-NH} \end{array} $ TEPA (tetraetilenopentamina)	$ \begin{array}{c} \text{-CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{-N-CH}_2\text{-COO}^- \\ \\ \text{HN-CHCOO}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{-COO}^- \end{array} $ CM-DASA (ácido carboximetil α,β diamino succínico)

Figura 2.5 – Principais agentes quelantes utilizados em IMAC.

2.2.2. Seleção do íon metálico

A princípio todos os metais susceptíveis de interagir com as proteínas podem ser utilizados em IMAC. No entanto, os íons metálicos mais utilizados são Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+} . Os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} são conhecidamente utilizados por apresentarem interação com histidina, triptofano e cisteína enquanto que íons Fe^{3+} e Al^{3+} são utilizadas para separar fosfoproteínas e o íon Ca^{2+} , com preferência de ligação com oxigênio, pode ser selecionado para a separação de proteínas contendo grupamentos carboxílicos.

Em 1989, visto a relevância de histidina, Sulkowski determinou regras, apresentadas abaixo, que governam a interação histidina-IDA com os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} . Tais regras foram determinadas utilizando-se tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0 e NaCl 1,0 M.

⇒ A presença de pelo menos um resíduo de histidina disponível para a coordenação é suficiente para a retenção da proteína em uma matriz IDA- Cu^{2+} .

- ⇒ A presença de dois resíduos de histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma retenção mais forte da proteína em uma matriz IDA- Cu^{2+} .
- ⇒ A presença de dois resíduos de histidina é requerida para a retenção em uma matriz IDA- Ni^{2+} .
- ⇒ A presença de dois resíduos de histidina espacialmente localizadas em uma α -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em matrizes IDA- Zn^{2+} e IDA- Co^{2+} .
- ⇒ A retenção de uma proteína possuidora de dois resíduos de histidina vicinais (efeito quelato) será mais forte, em todas as matrizes IDA- Me^{2+} em relação a retenção de uma proteína que possui dois resíduos de histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.
- ⇒ A força de retenção das proteínas segue a seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Co}^{2+}$.

2.2.3. Matrizes

Há uma variedade de suportes usados em cromatografia de afinidade. A matriz pode ter considerável efeito na estabilidade do complexo formado entre um metal imobilizado e a proteína. Algumas propriedades gerais são requeridas na escolha de um suporte cromatográfico, como tamanho e forma de partículas uniformes para um bom empacotamento da coluna e área superficial adequada para se ter uma alta capacidade. Suportes com pequeno tamanho de partículas tem efeito difusivo mais baixo, mas, por outro lado, aumentam a eficiência na imobilização de ligantes devido maior área superficial disponível para a ativação.

Normalmente polímeros contendo grupos hidroxil possuem maior preferência pela versatilidade, uma vez que podem ser facilmente ativados e suas propriedades químicas são bem caracterizadas (Porath, 1988). A primeira matriz usada em IMAC foi preparada por imobilização covalente de IDA à agarose ativada por grupos oxirana. Matrizes de agarose são hidrofílicas, mecanicamente e quimicamente estáveis e relativamente inertes. Sequencialmente foram estudados o uso de outros tipos de suporte, como a sílica e polímeros orgânicos. O acoplamento de agentes quelantes em matrizes de sílica para utilização em IMAC foi inicialmente demonstrado por Small et al. e Vijayalakshmi, seguidos por Horvath, Karger e colaboradores (Small et al. (1983); Vijayalakshmi (1983); El-Rassi e Horvath (1986) e Figueroa et al. (1986)).

Em 1986, Kato et al. desenvolveram um novo suporte imobilizando IDA em um polímero orgânico, TSK-gel G500 PW, resina hidrofílica com poros de tamanhos elevados, da ordem de 1000 Å e tamanhos de partículas da ordem de 10 µm (25). Esta fase estacionária é comercialmente conhecida por TSK gel chelate e PW (Toyo Soda).

Os materiais baseados em polímeros sintéticos e sílicas apresentam vantagens sobre matrizes de agarose devido maior estabilidade mecânica, maior rigidez e menores variações de volume durante empacotamento e uso. As desvantagens são a formação de grupos silanóis tanto a pH alto ou baixo nos suportes de sílica e a fraca interação entre o metal e IDA na resina TSK (Wong et al., 1991).

2.2.4. Condições de adsorção

Adsorção de proteínas em IMAC é normalmente conduzida a um pH no qual o grupo doador de elétrons (na superfície da proteína) responsável pela interação com o íon metálico esteja parcialmente desprotonado. Para proteínas possuidoras de histidinas e cisteínas, por exemplo, a seletividade para adsorção é favorecida a uma faixa de pH de 6,0 a 8,0. Usualmente a adsorção é feita em condições alcalinas, pois estas propiciam maior efetividade, embora algumas proteínas particulares adsorvam em valores baixos de pH (Krishnan, 1986). A adsorção de proteína na matriz IMAC utilizando íon Fe^{2+} por exemplo ocorre a pH em torno de 5,0.

Além de pH, a força iônica é também uma variável importante na adsorção em IMAC. Concentrações altas de sal (normalmente NaCl 1,0 M) devem ser consideradas para evitar interações não-específicas do tipo eletrostáticas e aumentar a seletividade, uma vez que é dito que a presença de sal aumenta a estabilidade do complexo proteína-metal (Vijayalakshmi, 1989 e Beitle e Atai, 1992). A presença de eletrólitos, além de diminuir interações não-específicas, diminui o efeito da solvatação do íon metálico por moléculas de água, facilitando o processo de adsorção da proteína. Quanto ao sal utilizado, tanto a concentração como o tipo irão influenciar a seletividade da adsorção (Beitle e Atai, 1992). A adsorção, pode ser seletiva mesmo sem adição de sal ou em tampões de baixa força iônica desde que resíduos de arginina, particularmente aquelas na extremidade N-terminal, sejam os grupos interagindo com o íon metálico (Porath, 1983).

2.2.5. Condições de dessorção

Executada a etapa de adsorção, faz-se normalmente a remoção de moléculas retidas nos interstícios ou adsorvidas não especificamente, através de uma lavagem da matriz com o próprio tampão de adsorção. Após etapa de lavagem, a molécula de interesse, sendo idealmente a única retida na matriz, pode então ser deslocada do complexo metálico através de três principais procedimentos: 1) reduzindo-se a constante de afinidade entre o íon metálico e a proteína por variação das condições do meio, na maioria dos casos através de um gradiente contínuo ou descontínuo de pH; 2) adicionando-se um agente competitivo com estrutura similar à do resíduo de aminoácido da proteína envolvido na interação com o ligante e 3) deslocando-se o complexo metal-proteína, através de adição de um agente quelante mais forte do que o utilizado na imobilização do metal na fase estacionária.

No primeiro dos referidos métodos, a protonação é o mais utilizado e consiste no abaixamento de pH do meio. Com a presença de íons H^+ , ocorre uma protonação dos grupos doadores de elétrons na superfície da proteína e assim sua interação com o ligante metálico é enfraquecida e a proteína é deslocada para a fase móvel (Figura 2.6.a). Alguns cuidados devem ser tomados neste procedimento: 1) com respeito a estabilidade da biomolécula, pois proteínas podem sofrer perda irreversível de atividade em condições ácidas; 2) com respeito a precipitação isoeletrica que deve ser evitada na cromatografia; e 3) quanto a interação IDA- Me^{2+} que pode ser afetada com o abaixamento de pH do meio, como são os casos de IDA- Zn^{2+} e IDA- Co^{2+} (Sulkowski, 1985). É conhecido que tampão acetato é a solução mais utilizada nesta etapa.

No segundo método, adição de um agente competidor, as proteínas são eluídas em pH quase neutro através da adição de agentes competidores (espécies doadoras de elétrons). Estes competem com a proteína pela ligação com o ligante deslocando a biomolécula da matriz (Figura 2.6.b). Histidina e imidazol são agentes competitivos bastante comuns usados na etapa de eluição das proteínas a partir da matriz IMAC. Alguns cuidados devem ser tomados no procedimento de eluição por competição, no caso da utilização de imidazol. Como o imidazol forma um complexo relativamente estável com o quelato IDA- Me^{2+} , se a coluna possuir muitos quelatos livres, o agente competidor é adsorvido liberando-se prótons e, consequentemente causando um abaixamento do pH que pode chegar até a valores de 1,0 a 2,0. Dessa maneira, a eluição deixa de ser seletiva, perdendo-se o conhecimento do processo quanto ao fato de esta ter ocorrido por

competição ou por abaixamento de pH. Para evitar-se este inconveniente, a coluna deve a princípio ser saturada e equilibrada com solução a uma alta concentração de imidazol, por exemplo 10 mM. A seguir a coluna deve ser equilibrada com solução a uma concentração mais baixa de imidazol, 1,0 mM por exemplo, a qual é utilizada na etapa de eluição. Quando a coluna é carregada com solução de proteína, na etapa de adsorção, o imidazol adsorvido não interfere na adsorção da molécula adicionada, uma vez que, esta, apresentando alta afinidade pelo metal, consegue deslocar o imidazol e se adsorver na matriz (Sulkowski, 1985).

No terceiro método, regeneração, faz-se passar através da coluna uma solução de agente quelante capaz de excluir o complexo metal-proteína da fase estacionária (Figura 2.6.c). O agente quelante mais utilizado é o ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA). O método da regeneração, embora seja efetivo no deslocamento da proteína da matriz, não é seletivo pois a interação desestabilizada pelo quelante adicionado é aquela entre suporte e metal e não entre metal-proteína. Sendo assim, o método é utilizado somente quando a proteína de interesse é a única espécie adsorvida, pois do contrário pode se obter um baixo grau de purificação com a dessorção de todas as espécies adsorvidas no ligante. Ainda assim, sendo a proteína de interesse a única espécie envolvida, há uma desvantagem considerável, que é a necessidade da etapa adicional de separação dos íons metálicos presentes na solução eluída. Na etapa de regeneração é importante a presença de alta força iônica com a adição de NaCl ou outro sal de modo a evitar interações não-específicas de algum resíduo de aminoácido básico e o agente quelante imobilizado (Beitle e Ataai, 1992).

Assim como na adsorção, a força iônica na dessorção é um fator importante: a capacidade de adsorção e seletividade crescem com o aumento da concentração de sal no tampão de equilíbrio, e por outro lado, uma diminuição da concentração de sal pode resultar na dessorção de algumas proteínas. Uma vez que a força iônica aumenta a seletividade da adsorção, deve ser possível uma eluição parcial e seletiva de proteínas através de decréscimo de concentração de sal no eluente (Wong et al., 1991).

Além destes principais procedimentos de dessorção, gradiente de pH, competição ou regeneração, cita-se ainda a eluição isocrática que consiste da eluição a condições constantes, isto é mantendo-se mesmo pH, força iônica e temperatura. Este método, no entanto, é limitado à

separação de proteínas com massa molecular baixa de até 30,0 kDa pois na separação de proteínas com massas moleculares maiores ocorre expansão dos picos de eluição.

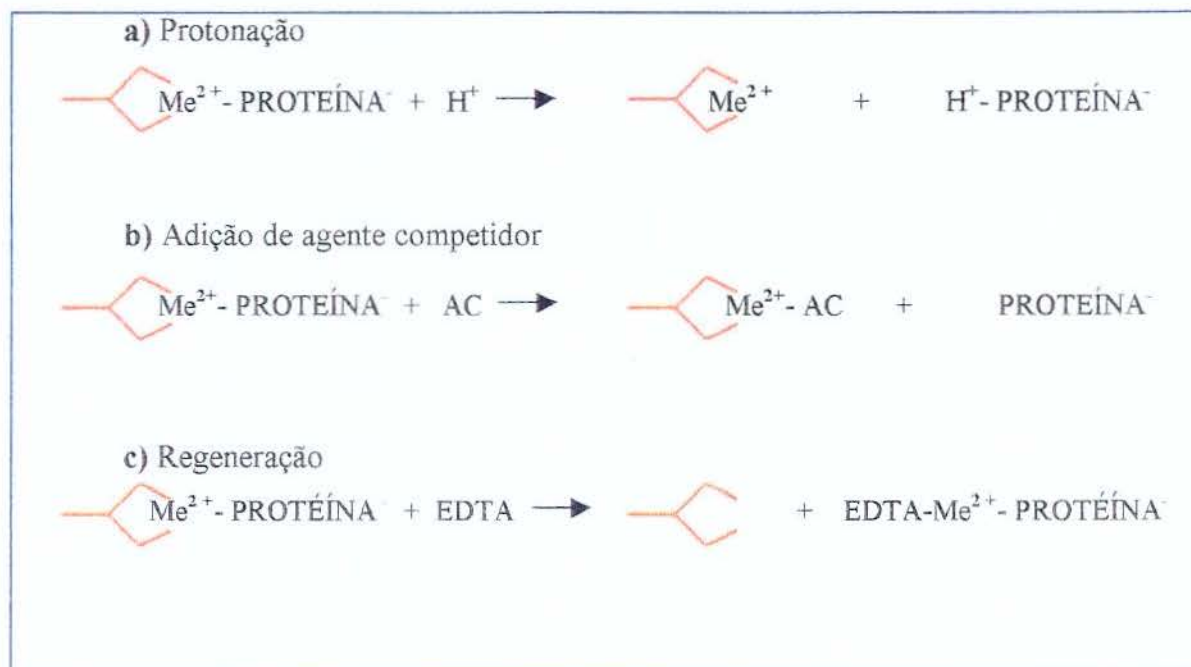


Figura 2.6 - Mecanismos de deslocamento da proteína a partir da matriz IMAC na etapa de dessorção.

2.3. APROTININA: PROPRIEDADES E TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO

2.3.1. Propriedades gerais de aprotinina

A aprotinina é um inibidor de serino protease presente em órgãos bovinos, isolada pela primeira vez por Kunitz e Northrop em 1936 a partir de pâncreas bovino. É designada de maneira genérica com o nome de inibidor de Kunitz, inibidor polivalente de órgãos bovinos ou ainda "basic" ou "bovine pancreatic trypsin inhibitor" (BPTI) (Kassel, 1963 e Quereshi et al., 1992). É também distribuído comercialmente como Iniprol (Laboratório Choay, França); Trasysol (Farbenfabriken Bayer AG, Alemanha) e BPTI (Worthington Biochemical, EUA).

Trata-se de uma pequena proteína de massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa, composta por uma cadeia polipeptídica de 58 resíduos de aminoácido. Sua estrutura tridimensional (Figura 2.7) é bastante estável e compacta, 29 x 19 x 19 Å, devido a presença de

três ligações dissulfeto o que lhe confere resistência a valores extremos de pH e temperatura (Informativo Bayer, 1996). A composição de aminoácidos pode ser melhor observada na Tabela 2.1.

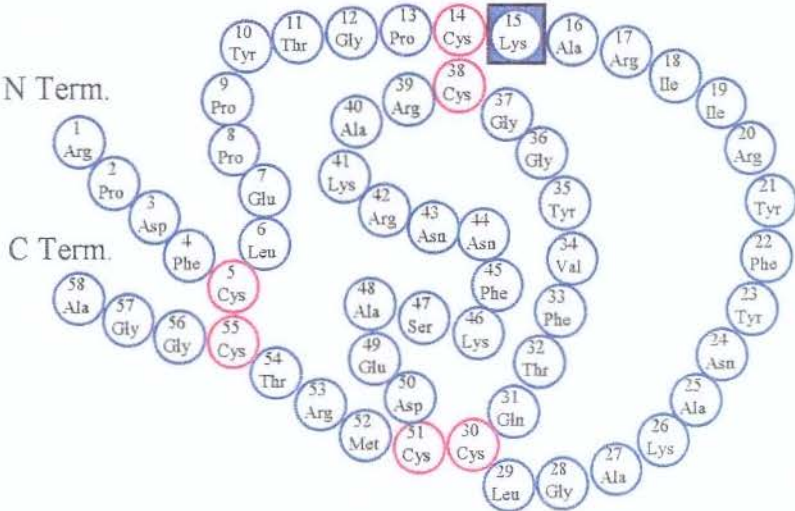


Figura 2.7 - Sequência de aminoácidos da aprotinina e localização das ligações dissulfeto (Informativo Bayer, 1996).

Tabela 2.1 - Composição de aminoácidos da molécula de aprotinina (baseada na sequência de aminoácidos apresentada na Figura 2.7).

Aminoácidos	Resíduos por Molécula	Aminoácidos	Resíduos por Molécula
Alanina	6	Metionina	1
Arginina	6	Fenilalanina	4
Ácido aspártico	2	Prolina	4
Cisteína	6	Serina	1
Ácido glutâmico	2	Treonina	3
Glicina	6	Tirosina	4
Isoleucina	2	Valina	1
Leucina	2	Asparagina	3
Lisina	4	Glutamina	1

Aprotinina é uma proteína básica devido sua composição de aminoácidos constituída por 10 resíduos básicos (6 argininas e 4 lisinas) contra 4 resíduos ácidos (2 resíduos de ácido aspártico e 2 resíduos de ácido glutâmico). Seu ponto isoeletrico situa-se entre 10,0 a 10,5 e é solúvel em água, metanol 70%, etanol 70% e acetona 50%. A sua molécula é bastante estável a altas temperaturas, a condições ácidas ou alcalinas e em soluções enzimáticas: pode ser aquecida até 100 °C em soluções diluídas de ácidos e até 80 °C em ácido tricloroacético 2,5% sem perda de atividade. Pode ser mantida por 18 meses a temperatura ambiente em solução de NaCl 0,14 M e sua atividade permanece constante por 24 horas à temperatura ambiente em pH 12,6, sofrendo no entanto um decréscimo em pH 12,8. Sabe-se que aprotinina não é inativada em soluções contendo pepsina, elastase, carboxipeptidase A ou B, papaína entre outras enzimas, inclusive de origem bacteriana (Kassel, 1970).

Mesmo sendo a aprotinina uma molécula bastante simples, cuja estrutura cristalina tem servido de sistema modelo em diversos estudos teóricos e experimentais de proteínas, seu comportamento em solução não é ainda muito elucidado, especialmente quanto às propriedades de agregação. Kassel (1970) cita que soluções de aprotinina podem apresentar um equilíbrio monômero-dímero com predominância de dímeros em soluções neutras, com massa molecular entre 11,60 e 11,70 kDa em solução de NaCl 0,9% e entre 10,30 e 11,80 kDa em solução de NaCl 0,8% , ambos os casos a pH 7,3. Estudos posteriores utilizando análises por espalhamento de luz comprovaram a existência de dímeros sugerindo que o processo de agregação era governado por interações não específicas, propiciadas por forças tais como as de Van der Waals, até que Zielenkiewicz (1991) apresentou evidências de que a molécula de aprotinina possui uma superfície de auto complementação capaz de gerar um grande número de contatos entre suas moléculas monoméricas.

Sendo a aprotinina um inibidor específico de serino-proteases, apresenta uma grande afinidade por uma variada gama destas enzimas, como tripsinas suína, bovina e humana, quimotripsinas bovina e suína, calicreínas suína e bovina e plasminas suína, humana e de coelho entre outras. Algumas enzimas conhecidamente não inibidas pela aprotinina são: pepsina, elastase, estearase de pulmão, trombina, carboxipeptidase A e B, renina, ribonuclease, lisozima, proteases A e B de *Bacillus subtilis*, proteases de *Aspergillus oryzae* e papaína (Kassel, 1970).

2.3.2. Interação aprotinina-tripsina

Kassel (1970) cita que a interação aprotinina-tripsina é estequiométrica e do tipo competitiva ou pseudocompetitiva com valores de constantes de dissociação entre 10^{-4} M e 3×10^{-11} M para a interação aprotinina-tripsina em soluções com pH variando de 2,0 a 7,8 sendo a constante proporcionalmente maior quanto maior o pH. Antonini e Ascenzi (1983) relatam constantes de dissociação nas interações entre aprotinina e tripsina da ordem de 10^{-13} . Vincent e Lazdunski (1972) relatam uma associação com interação ainda mais forte, com constante de dissociação do complexo de $6,0 \times 10^{-14}$ a pH 8,0 a 25 °C, uma das mais baixas até então observadas em interações proteína-proteína. Isso deve-se principalmente à taxa de dissociação de 1ª ordem do complexo muito baixa, $6,6 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, a qual corresponde a um tempo de meia vida de aproximadamente 17 semanas. Uma característica marcante do complexo aprotinina-tripsina é que, mesmo em soluções desnaturantes como uréia 8,0 M e guanidina-HCL 6,0 M, ela não sofre dissociação durante até 2 horas. Uma constante de dissociação tão baixa e resistência a condições desnaturantes não são usualmente observadas em interações entre proteínas; sabe-se que proteínas oligoméricas facilmente se dissociam em soluções como uréia 8,0 M e guanidina-HCL 6,0 M.

Lazdunski et al. (1974) propuseram um possível mecanismo para as interações aprotinina-tripsina e aprotinina-quimotripsina. Na interação de aprotinina com a tripsina, acredita-se que um primeiro reconhecimento entre inibidor e proteína é realizado através da interação entre o grupo amino (carregado positivamente) da lisina 15 da aprotinina com o grupo carboxila (carregado negativamente) do ácido aspártico 177 da tripsina (Figura 2.8). Após esta formação da ponte salina, existe a formação de duas pontes dissulfeto entre as cisteínas 14 e 38 da aprotinina e cisteínas 203 e 179 da tripsina. Huber et al. (1974) através de análise cristalográfica do complexo aprotinina-tripsina mostraram ainda a presença de 11 pontes de hidrogênio além de 36 contatos entre outros resíduos, constituindo mais de 200 interações de Van der Waals.

A importância da ponte salina foi observada inicialmente com base no fato de que a pseudotripsina, uma tripsina derivada de uma desconexão da cadeia lateral carboxila do sítio específico presente no ácido aspártico 177 da tripsina, apresentava uma constante de dissociação na interação com aprotinina da ordem de 9×10^{-9} M, $1,4 \times 10^5$ vezes maior que na interação de tripsina nativa, e o tempo de meia vida diminuía de 17 semanas para 18 minutos. Posteriormente

foi comprovada a importância da ponte salina, substituindo-se a tripsina pela quimotripsina que possui um resíduo serina no lugar do ácido aspártico: observou-se uma constante de dissociação tão alta quanto à da interação da pseudotripsina com a aprotinina, sendo que apesar da ausência do ácido aspártico, demais interações foram semelhantes à da interação com tripsina.

Quanto a contribuição das pontes dissulfeto, Lazdunski et al. (1974) demonstraram que ocorria uma considerável diminuição, cerca de 30.000 vezes, na estabilidade do complexo aprotinina-tripsina, caso houvesse uma redução na ligação entre as cisteínas 14 e 38 da aprotinina.

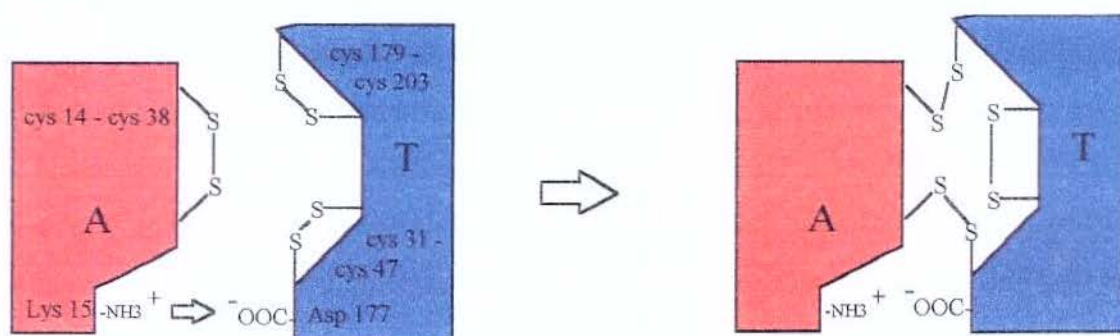


Figura 2.8 – Representação esquemática de um dos prováveis mecanismos de interação entre aprotinina (A) e tripsina (T) (Lazdunski et al., 1974).

2.3.3. Recuperação de aprotinina

A literatura traz relatos de recuperação e purificação de aprotinina em escala de bancada por métodos cromatográficos mais convencionais (Norris et al., 1990), assim como por afinidade (Fioruci et al., 1995; Kassel, 1970 e Barthel e Kula, 1995). Apesar de relatos de recuperação de aprotinina através de métodos convencionais, é conhecido que métodos de adsorção por afinidade são os mais utilizados devido a sua especificidade e existência de ligantes de relativo baixo custo, além de propiciarem significativa concentração do produto. Os ligantes utilizados nestas separações são as enzimas inibidas pela aprotinina (serino-proteases), em especial, tripsina e quimotripsina. Os trabalhos encontrados na literatura, de forma geral não apresentam claramente os fatores de purificação obtidos, possivelmente por se desconhecer a concentração exata do

inibidor no meio originário, de composição complexa.

Norris et al. (1990) utilizaram troca iônica em S-Sepharose na purificação de aprotinina e moléculas recombinantes análogas expressas em levedura. Fiorucci et al. (1995) demonstraram a recuperação de aprotinina a partir de pulmão bovino utilizando como matriz cromatográfica Sepharose contendo quimotripsina imobilizada, tendo sido a adsorção realizada em tampão Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0 e NaCl 0,25 M e a dessorção em HCl 10 mM. Também Barthel e Kula (1995), para recuperar aprotinina recombinante, utilizaram quimotripsina imobilizada em Sepharose, tendo sido as condições de adsorção semelhantes às utilizadas por Fiorucci et al., ao passo que a eluição foi realizada utilizando tampão citrato a pH 3,0. Kassel (1970) descreve um método de recuperação de aprotinina a partir de pulmão bovino, onde tripsina foi o ligante imobilizado. A adsorção de aprotinina a partir de extrato de pulmão se deu em pH 7,8 após uma clarificação do extrato e uma etapa de precipitação com ácido tricloroacético. A eluição se deu a pH ácido, como realizado por Fiorucci et al. (1995).

Não foram encontrados na literatura, além dos estudos de Azzoni (1998), trabalhos envolvendo recuperação de aprotinina presente em frações de processo ou efluentes do processo de produção de insulina bovina. Contudo, sendo a insulina um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 5,8 kDa (muito próxima da massa molecular de aprotinina) também produzido pelo pâncreas bovino, há uma grande possibilidade de ambos permanecerem nas mesmas frações durante o processamento a partir do extrato pancreático. Além do mais, as etapas de extração da insulina são bastante semelhantes às apresentadas na literatura para a extração de proteínas, inclusive aprotinina, a partir de órgãos de animais (Burck, 1970).

Talvez a maior dificuldade da recuperação de aprotinina a partir do pâncreas bovino deve-se a presença de um outro inibidor de proteases, conhecido por inibidor ácido de tripsina (“Acid Pancreatic Trypsin Inhibitor” ou APTI). Ambos possuem massa molecular, condições ótimas de ligação e constantes de dissociação com a tripsina muito semelhantes. Contudo, a aprotinina possui ponto isoelétrico distinto (pH 10,5) e possui capacidade inibitória sobre uma maior gama de serino-proteases, como por exemplo a quimotripsina e a calicreína, características que podem ser exploradas visando sua purificação.

Azzoni (1998), utilizando colunas de Sepharose contendo quimotripsina ou tripsina imobilizadas, recuperou e purificou parcialmente a aprotinina a partir de uma fração do

processamento industrial de insulina, sobrenadante de uma precipitação isoelétrica. Através de determinações de inibição, constatou-se nas frações após eluição na coluna cromatográfica com tripsina, a presença de inibidores, sendo um deles provavelmente o APTI e o outro, a aprotinina. O APTI, apresentando afinidade por tripsina, foi juntamente com a aprotinina selecionado na coluna contendo esta enzima. No entanto, entre estes dois inibidores, somente aprotinina pôde ser selecionada na coluna contendo quimotripsina: resultados de eletroforese e ensaios de inibição de tripsina e quimotripsina indicaram que o inibidor obtido após separação nesta coluna, era a aprotinina.

Não foram encontrados na literatura estudos sobre recuperação de aprotinina envolvendo cromatografia IMAC, como no trabalho aqui apresentado.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Efluente industrial

Amostra liofilizada de fração do processamento industrial de insulina bovina, sobrenadante de uma precipitação isoeletrica, identificado neste trabalho como SPI, foi gentilmente doada pela Biobrás S/A (Montes Claros, MG). A liofilização foi utilizada para fornecimento do material com maior comodidade de manipulação, além de se evitar degradação proteica. O efluente liofilizado foi estocado a -20°C até o momento do uso.

3.1.2. Reagentes

Tripsina, utilizada para formação de complexo com aprotinina, foi gentilmente doada pela Biobrás S/A (Montes Claros, MG). Aprotinina e o substrato Benzoil-Arginina-Etil-Éster (BAEE) foram produzidos pela Sigma (EUA). Solução estoque de acrilamida, solução SDS 10%, β -mercaptoetanol e N,N,N',N' -tetrametiletilenodiamino (TEMED) utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram produzidos pela Bio-Rad (EUA). Demais reagentes utilizados em procedimentos gerais como no preparo de soluções tampões foram todos de grau analítico.

3.1.3. Adsorventes

As matrizes IMAC utilizadas foram: "Prosep Chelating-I", sílica derivatizada da Bioprocessing (Inglaterra), neste trabalho identificado como PC-I, e "Chelating Sepharose Fast

Flow”, agarose derivatizada da Pharmacia (Suécia), aqui identificada como CSFF. Ambas possuíam ácido iminodiacético (IDA) como agente quelante imobilizado.

3.1.4. Principais equipamentos

Para obtenção de água de alta pureza no preparo de soluções em geral utilizou-se um purificador de água modelo Milli-Q System da Milipore, (EUA). Nas determinações de proteína total e ensaios de atividade enzimática e de inibição, realizou-se medidas de absorbância utilizando espectrofotômetro UV/Visível modelo U 2000 da Hitachi (Japão). A determinação de NaCl no efluente foi conduzida através de medidas de condutividade das soluções através do sistema de cromatografia modelo Biologic System da Bio-Rad (EUA). Para controle de temperatura nos ensaios de adsorção-dessorção utilizou-se estufa incubadora modelo “shaker” da Nova Técnica (Brasil). Nos estudos de recuperação de complexo a partir do efluente, o sistema de eletroforese da Bio-Rad (EUA) foi utilizado para análise das frações de adsorção-dessorção.

3.2. PROCEDIMENTOS

3.2.1. Determinação de proteína total

As determinações de proteína total em solução foi feita através de medidas de absorbância a 280 nm e pelo microensaio do método apresentado por Bradford (1976). No primeiro caso, determinou-se coeficientes de absorção para soluções de tripsina, aprotinina e também para o complexo aprotinina-tripsina, e no segundo caso, determinou-se como referências, curvas de calibração utilizando tripsina suína e albumina bovina como proteína padrão.

3.2.2. Determinação de atividade enzimática de tripsina

A determinação de atividade enzimática de tripsina, baseada no método de determinação de inibição de tripsina descrito por Burck (1970), consistiu no acompanhamento da taxa de hidrólise do substrato BAEE pela tripsina, através do monitoramento da variação da densidade ótica a 253 nm (DO_{253}) causado pela formação do produto de hidrólise. Adicionou-se 933 μ l de solução 250 mM de BAEE em tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0, NaCl 1,0 M a 66,6 μ l da amostra contendo tripsina, e registrou-se o aumento de absorbância da mistura. Sendo a variação da densidade ótica imediata após a adição do substrato, este ensaio foi conduzido na cubeta do

espectrofotômetro para ser possível a medição em tempo hábil. Para controle da temperatura, utilizou-se cubeta de quartzo de 1,0 ml termostatizada com circulação de água a 25 °C. Neste procedimento o coeficiente angular da curva de DO_{253} *versus* tempo forneceu o valor da atividade em termos de unidades de densidade ótica por minuto (DO_{253}/min), sendo a definição de unidade de atividade enzimática, a atividade que causa a hidrólise de 1,0 μmol de substrato por mililitro por minuto.

3.2.3. Determinação de atividade de aprotinina na inibição de tripsina

A detecção de aprotinina livre em solução foi feita através da determinação de sua atividade de inibição de tripsina. O método foi o apresentado por Burck (1970) e quantificou a inibição causada pela aprotinina na hidrólise de BAEE pela tripsina. Um volume de 100 μl de solução de aprotinina foi adicionada à 100 μl de solução de tripsina na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incubado à 25 °C durante 5 minutos. Desta solução foi pipetado um volume de 66,6 μl em 933 μl de solução de BAEE a 250 mM dentro da célula do espectrofotômetro a 25 °C. Registrou-se a variação da absorbância a 253 nm e determinou-se a taxa de formação do produto de hidrólise: esta taxa é menor que a taxa da reação na ausência de aprotinina. A diferença entre as taxas da hidrólise sem e com a presença do inibidor forneceu a diminuição da atividade de tripsina em termos de densidade ótica por minuto. Determinou-se a inibição em termos de percentual de atividade de tripsina inibida pela presença de aprotinina, podendo a mesma ser também expressa em termos de unidades de inibição.

3.2.4. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com protocolo convencional descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado na concentração de 15% e com espessura de 1 mm. As amostras foram preparadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol e foram aquecidas por sete minutos a 100 °C (condição desnaturante). A separação das proteínas foi conduzida utilizando cuba vertical da Bio-Rad com voltagem constante de 200 V. O procedimento de coloração foi realizado com solução de nitrato de prata segundo protocolo descrito por Morrysey (1981).

3.3.5. Preparação da matriz IMAC

A preparação da matriz, baseada em protocolos convencionais de manuseio de adsorventes IMAC, consistiu em: lavar a matriz com cinco volumes de água deionizada, para eliminar contaminantes ou solução de regeneração, em seguida, saturá-la com solução do íon metálico requerido, lavá-la com cinco volumes de água deionizada para extrair traços de metal, lavá-la com cinco volumes de tampão de dessorção para eliminar traços de proteína e por último lavá-la novamente com no mínimo dez volumes de tampão de adsorção para acondicionamento do adsorvente com as condições de adsorção. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada e estas foram degaseificadas previamente ao uso.

3.2.6. Regeneração e conservação da matriz IMAC

A regeneração da matriz, também baseada em protocolos convencionais, consistiu de lavagens sequenciais com solução 50 mM de EDTA, até eluição total dos íons metálicos da matriz. Utilizou-se 10 a 20 volumes de solução de EDTA para cada volume de matriz e após eluição total dos íons metálicos, lavou-se a matriz com 10 volumes de água deionizada para remoção do EDTA. Para estocagem da matriz, evitando contaminação microbiológica, manteve-se a mesma em a 4 ° C em solução de álcool etílico a 20 %.

3.2.7. Determinação dos tempos de equilíbrio das adsorções

As determinações dos tempos de equilíbrios de adsorção de tripsina e de complexo foram determinadas através de adsorções em bateladas com massas da ordem de 25 mg de matriz por mililitro de solução. Bateladas em série foram conduzidas sob mesmas condições, e após variados intervalos de tempo mediu-se a concentração protéica em cada batelada determinando-se o intervalo de tempo necessário para a adsorção atingir o equilíbrio, isto é, o intervalo de tempo a partir do qual a concentração do sobrenadante fosse invariável. Para maior facilidade na troca de soluções durante lavagem da matriz e nas etapa de adsorção, utilizou-se como reatores, seringas de 3,0 ml contendo filtros acoplados no seu interior, de maneira a se reter as partículas do adsorvente e permitir a passagem das soluções por sucção e ejeção. A agitação foi feita através de movimentos rotacionais, das seringas acopladas a um rotor girando a 10 rpm encaixado ao eixo de uma bomba peristáltica. Para manutenção da temperatura, os experimentos foram conduzidos em estufa incubadora com temperatura controlada em 25°C. A determinação das

concentrações das soluções foram realizadas através de medidas de absorbância a 280 nm ou através do microensaio do método de Bradford (1976). Como tampão de adsorção utilizou-se tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M.

3.2.8. *Isotermas de adsorção*

As isotermas de adsorção de tripsina e de complexo foram determinadas através de adsorções em bateladas, mantendo-se as mesmas condições utilizadas na determinação das cinéticas. Em várias seringas, massas idênticas de matriz foram suspensas em soluções de concentrações crescentes de proteína e agitadas durante o tempo de equilíbrio do sistema a temperatura de 25 °C. Pela variação entre as concentrações iniciais e finais dos sobrenadantes calculou-se as massas de proteína total adsorvidas. Determinou-se as concentrações de proteína através de medidas de absorbância a 280 nm e pelo microensaio do método de Bradford (1976). Nas isotermas de adsorção de tripsina e de complexo aprotinina-tripsina determinou-se, além das massas de proteína total, as massas de proteína fortemente adsorvidas desconsiderando-se as quantidades de proteína facilmente removidas da matriz: Após ejeção das soluções de equilíbrio, lavou-se as matrizes por seguidas vezes com tampão de adsorção até que a toda a proteína fracamente adsorvida ou remanescente nos interstícios fossem eliminados. Seguidamente desorveu-se a proteína retida na matriz através de eluição com tampão acetato de sódio 100mM a pH 4,0 e NaCl 1,0 M, e assim determinou-se as massas de proteína especificamente adsorvidas. No caso de tripsina, determinou-se as massas de proteína dos efluentes de lavagem e subtraiu-se as mesmas das massas totais adsorvidas, o que também foi uma forma de determinação de massa protéica especificamente adsorvida. Assim determinou-se isotermas de adsorção indicando as capacidades de adsorção total e de adsorção específica.

3.2.9. *Estudo das condições de dessorção do complexo*

Nos estudos de dessorção, para avaliação do efeito do pH e concentração de NaCl, comparou-se as recuperações de complexo obtidas em valores decrescentes de pH (6,0 ; 5,5 ; 4,0 ; 3,5 e 2,1) na presença e ausência de NaCl 1,0 M. Os eluentes de dessorção consistiram de tampões fosfato de sódio 20 mM a pH 6,0 e pH 5,5; tampão acetato de sódio 100 mM a pH 4,0 e pH 3,5 e tampão glicina/HCl 20 mM a pH 2,1.

3.2.10. Preparação das soluções de efluente

O preparo das soluções de efluente, consistiu na solubilização do material, obtido em forma liofilizada, e no ajuste da concentração de NaCl e pH das soluções. O pH das soluções de efluente foi ajustado através de adição de NaOH 0,6 M. Uma vez que o efluente continha grande quantidade de NaCl, fez-se inicialmente a determinação da sua concentração de sal, e a seguir, o ajuste foi realizado com devidas adições do eletrólito ou diluição das amostras de acordo com condições requeridas na etapa de adsorção.

A determinação da concentração de NaCl no efluente foi realizada através de medidas de condutividade de suas soluções, baseando-se em uma curva de calibração relacionando condutividade *versus* concentrações conhecidas do sal. As medidas foram obtidas através de passagem das soluções por um detector de condutividade do ao sistema de cromatografia Biologic System.

3.2.11. Verificação da adsorção de impurezas de SPI na matriz IMAC

Para verificação inicial da adsorção, massas de 20 mg de adsorvente foram contactadas com volumes de 1,0 ml de solução de SPI, a diferentes concentrações, em tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0 e NaCl 1,0 M. Após 1,0 h, tempo requerido para o equilíbrio na adsorção do complexo, quantificou-se a variação de concentração protéica dos sobrenadantes. As determinações de proteína total foram realizadas através do microensaio do método azul de comassie. Para certificação da permanência de aprotinina no sobrenadante determinou-se as atividades de inibição presentes nas soluções iniciais e de equilíbrio.

3.2.12. Estimativa das massas de matriz para remoção de impuras em múltiplos estágios

O estudo do pré-tratamento consistiu na verificação de remoção de impurezas através de adsorção em múltiplos estágios, utilizando a matriz IMAC. Devido simplicidade de se dispensar o uso do sistema de cromatografia em colunas, optou-se pela adsorção em tanques agitados e sendo assim, fez-se neste estudo a estimativa de relações massa/volume de adsorvente e solução a serem utilizados.

Para determinação aproximada das relações entre massa de adsorvente e volume de solução em cada batelada, ajustou-se o conjunto de dados da adsorção através da Equação de Freundlich (Equações 4.2 e 4.4). Observa-se que ambas as equações se equivalem, no entanto

na equação 4.4, fez-se uma substituição com termo da Equação 4.3.

$$C_{eq} = k [V (C_0 - C_{eq})]^n \quad \text{Equação 4.2}$$

$$q = V (C_0 - C_{eq}) \quad \text{Equação 4.3}$$

$$q = [C_{eq} / k]^{1/n} \quad \text{Equação 4.4}$$

Considera-se na equações acima: V como sendo o volume da solução, C_0 e C_{eq} as concentrações iniciais e de equilíbrio e q a capacidade de adsorção ou massa protéica adsorvida por unidade de massa do adsorvente. As constantes k e n são parâmetros do sistema, calculados através da isoterma de adsorção ajustada pelo modelo.

Para determinação de massa de adsorvente necessária para adsorção em um único estágio, considerou-se nas Equações 4.5 e 4.6 (equações de balanço de massa na adsorção em único estágio), V como sendo o volume de solução, M a massa de adsorvente, C_0 e C_1 as concentrações iniciais e de equilíbrio da solução, e q_0 e q_1 as capacidades de adsorção no início e no equilíbrio da adsorção. Observa-se que, como q_0 é igual a zero, este termo foi excluído da Equação 4.6, onde observa-se ainda que q_1 foi substituído pela sua expressão dada pela Equação 4.4.

$$V (C_0 - C_1) = M (q_1 - q_0) \quad \text{Equação 4.5}$$

$$M/V = (C_0 - C_1) / (C_1 / k)^{1/n} \quad \text{Equação 4.6}$$

Para determinação das razões entre massa de adsorvente e volume de solução necessárias na adsorção em duplo-estágio, considerou-se nas Equações 4.7 e 4.8 (balanço de massa na adsorção em duplo estágio), V o volume de solução, C_0 e C_1 as concentrações inicial e de equilíbrio após o primeiro estágio de adsorção, C_2 a concentração de equilíbrio após segundo estágio de adsorção, M_1 e M_2 , as massas de adsorvente requeridas em cada estágio de adsorção e q_0 , q_1 e q_2 as capacidades de adsorção no início, após o primeiro estágio e após o segundo estágio de adsorção, respectivamente.

$$V (C_0 - C_1) = M_1 (q_1 - q_0) \quad \text{Equação 4.7}$$

$$V (C_1 - C_2) = M_2 (q_2 - q_0) \quad \text{Equação 4.8}$$

A partir de substituição de termo da equação 4.4, nas equações 4.7 e 4.8 originou-se as

Equações 4.9 e 4.10 que estabelecem as relações de massa de matriz por volume de solução a serem utilizados em cada um dos dois estágios de adsorção. A derivada da soma das Equações 4.7 e 4.8 apresentada na Equação 4.11, quando igualada a zero estabelece a massa mínima de adsorvente necessária nos dois estágios.

$$M_1/V = (C_0 - C_1) / (C_1 / k)^{1/n} \quad \text{Equação 4.9}$$

$$M_2/V = (C_1 - C_2) / (C_2 / k)^{1/n} \quad \text{Equação 4.10}$$

$$d/[(M_1 + M_2)/V] dC = 0 \quad \text{Equação 4.11}$$

Desenvolvendo-se a derivada acima, e considerando que k , n , C_0 e C_2 são constantes, originou-se a Equação 4.12 através da qual fez-se a determinação de C_1 que era valor desconhecido. A partir de C_1 fez-se determinação de q_1 através da Equação 4.4, e assim com determinação dos valores desconhecidos determinou-se as relações M_1/V e M_2/V .

$$(C_1/C_2)^{1/n} - C_0 / n C_1 = 1 - 1/n \quad \text{Equação 4.12}$$

3.2.13. Recuperação de complexo a partir do efluente

Os ensaios de adsorção de complexo a partir do efluente foram também conduzidos em sistema de bateladas. Verificou-se a recuperação do complexo aprotinina-tripsina a partir do efluente fazendo-se inicialmente um “spiking”, isto é, uma adição do complexo ao efluente seguida de sua adsorção e dessorção em condições de pH e força iônica pré-selecionadas.

A concentração de complexo adicionado ao efluente foi 10 mg/ml, valor este, equivalente à concentração protéica estimada do efluente. O monitoramento quantitativo da adsorção fez-se através do método de Bradford (1976) o que permitiu a determinação de proteína adsorvida. O monitoramento da recuperação de complexo foi qualitativo, com análise das soluções antes e após a adsorção, assim como das frações de eluição, com utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condição desnaturante.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

4.1.1. Determinação dos coeficientes de absorção a 280 nm

Para a dosagem de proteína total em solução através de medidas de absorbância a 280 nm, determinou-se o coeficiente de absorção específica para cada espécie (tripsina, aprotinina e complexo aprotinina-tripsina). O coeficiente de absorção relaciona a concentração da proteína em solução com a fração de uma luz incidente absorvida pela mesma, através da equação abaixo:

$$A = a \times C \times d$$

Equação 4.1

na qual entende-se como “A” a fração de luz absorvida também conhecida como absorbância; “C” a concentração de proteína em solução em mg/ml; “d” o caminho ótico, distância que a luz percorre através da solução de amostra, que usualmente é 1 cm e “a” o coeficiente de absorção específica na faixa linear da curva “A” versus “C” em unidades de $\text{cm}^2\text{mg}^{-1}$.

Na Figura 4.1 tem-se, como exemplo, a curva de absorção de tripsina suína a 280 nm em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, e NaCl 1,0 M. O coeficiente de absorção foi $1,26 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$. Na Tabela 4.1 estão listados, além do coeficiente de absorção de tripsina, os coeficientes para aprotinina e o complexo aprotinina-tripsina, assim como as respectivas faixas de linearidade de “A” versus “C”. Estes coeficientes foram determinados em solução tampão fosfato de sódio 20 Mm, pH 7,0, NaCl 1,0 M.

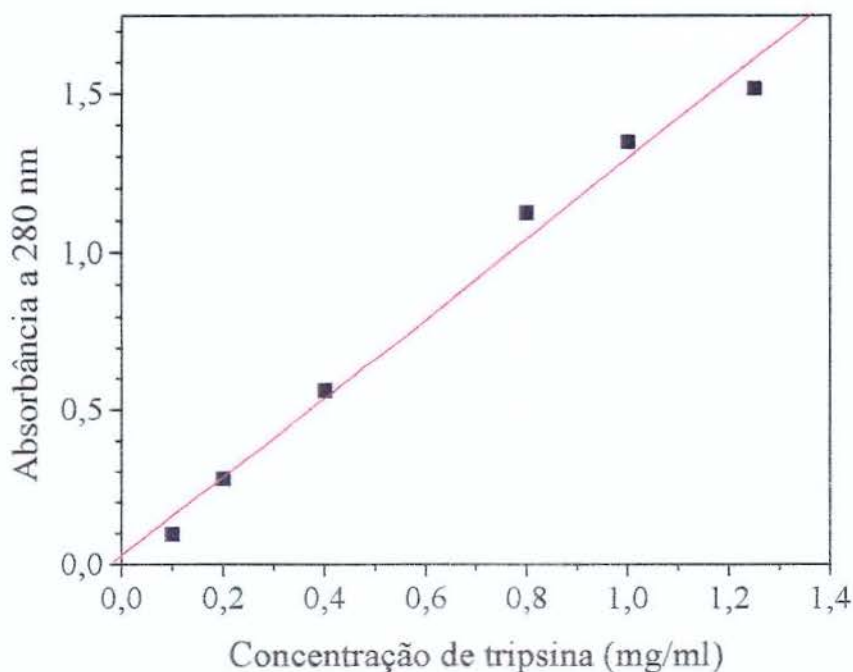


Figura 4.1 - Curva de absorção de soluções de tripsina suína a 280 nm com 1 cm de caminho ótico. Solução: tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M.

Tabela 4.1 - Coeficientes de absorção a 280 nm para soluções de tripsina, aprotinina e complexo aprotinina-tripsina em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0M.

<i>Espécie</i>	<i>Coeficiente "a"</i> <i>(cm²mg⁻¹)</i>	<i>Faixa de concentração</i> <i>na linearidade (mg/ml)</i>	<i>Fator de correlação</i>
Tripsina	1,26	0,2 - 1,2	0,998
Aprotinina	0,66	0,1 - 1,2	0,999
Complexo	1,12	0,1 - 1,0	0,999

4.1.2. Determinação de atividade enzimática de tripsina

Este método consistiu no acompanhamento da hidrólise do substrato BAEE pela tripsina, através do registro da variação da densidade ótica a 253 nm (DO_{253}) causada pela formação do produto de hidrólise. Neste procedimento o coeficiente angular da curva de DO_{253} versus tempo

forneceu o valor da atividade em termos de unidades de densidade ótica por minuto (DO_{253}/min). Na Figura 4.2 tem-se uma curva típica de determinação de atividade de tripsina na hidrólise do substrato BAEE. Na Figura 4.3 é apresentada uma faixa de linearidade da relação atividade enzimática de tripsina *versus* a sua concentração.

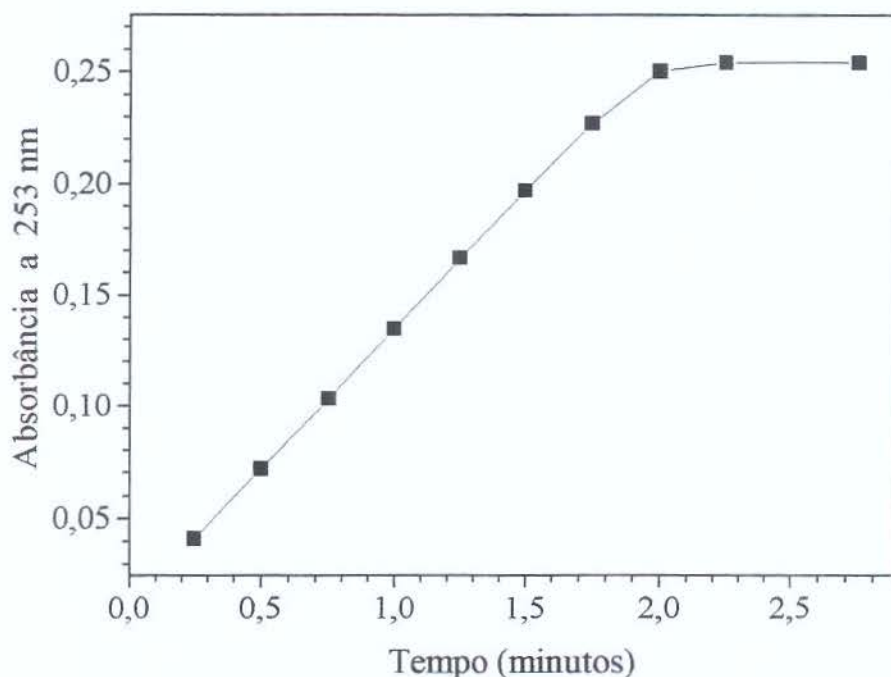


Figura 4.2 - Ensaio típico de determinação de atividade de tripsina na hidrólise do substrato BAEE 25 °C. Concentração de tripsina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e de BAEE, 250 mM em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M. Atividade determinada: 0,088 DO_{253}/min .

4.1.3. Determinação de atividade de aprotinina na inibição de tripsina

Para quantificação de aprotinina em solução, utilizou-se de um procedimento baseado no método de Burck (1970), no qual quantifica-se a diminuição que este inibidor causa na atividade enzimática da tripsina na hidrólise do substrato BAEE.

A reação de hidrólise do BAEE catalisada pela tripsina, pode ser observada, como descrito anteriormente, através do aumento da densidade ótica da solução a 253 nm com a formação do produto de hidrólise. Com a presença de aprotinina, um inibidor natural de tripsina, a hidrólise é

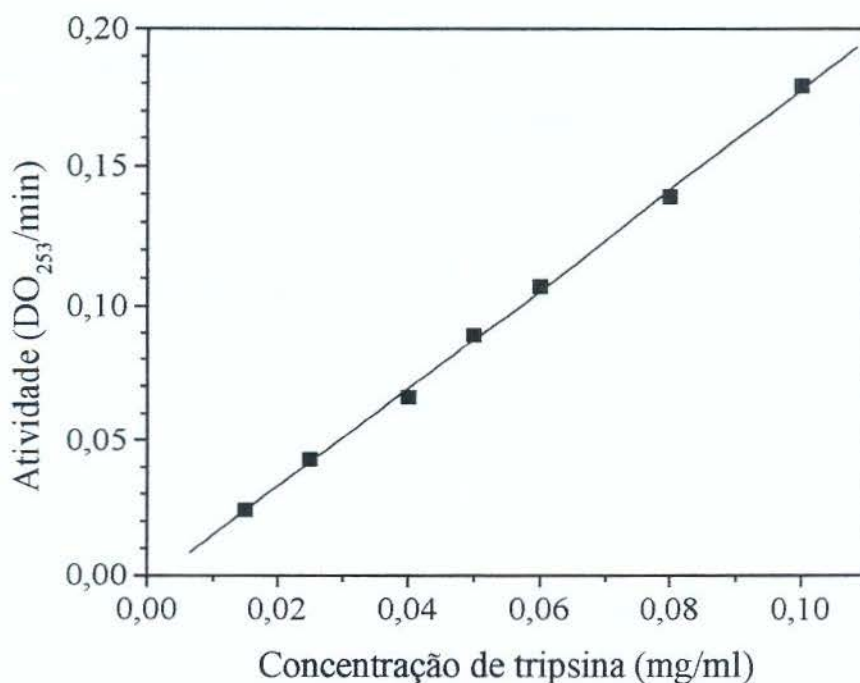


Figura 4.3 - Linearidade do ensaio de determinação de atividade de tripsina. Coeficiente angular, $1,81\text{mg}^{-1}\text{ml}$; fator de correlação, 0,999.

inibida causando uma diminuição na taxa de formação do produto de hidrólise e, conseqüentemente, na taxa de variação da densidade ótica.

Segundo Kassel (1970), a inibição da tripsina pela aprotinina é estequiométrica e do tipo competitiva ou pseudo-não-competitiva. Portanto, a presença de inibidor em solução pode ser detectada pela diminuição do coeficiente angular da curva obtida no ensaio. Na Figura 4.4 tem-se uma curva típica do determinação de inibição de tripsina pela presença de aprotinina e na Figura 4.5 é apresentada uma faixa de linearidade da relação inibição *versus* a concentração de inibidor.

Na Figura 4.4 a curva com símbolos em vermelho foi obtida pela reação de hidrólise do substrato sem a presença de inibidor e a curva com símbolos em preto representa a reação de hidrólise com inibição. A inclinação da curva sem inibição foi de 0,147 e a da curva com inibição foi de 0,124, ambos em unidades de densidade ótica por minuto ($\text{DO}_{253}/\text{min}$). A variação entre os dois coeficientes ($0,023 \text{ DO}_{253}/\text{min}$) representa a diminuição da atividade de

tripsina causada pela presença de aprotinina e forneceu o valor da inibição em termos de percentual de atividade inibida (15,6%).

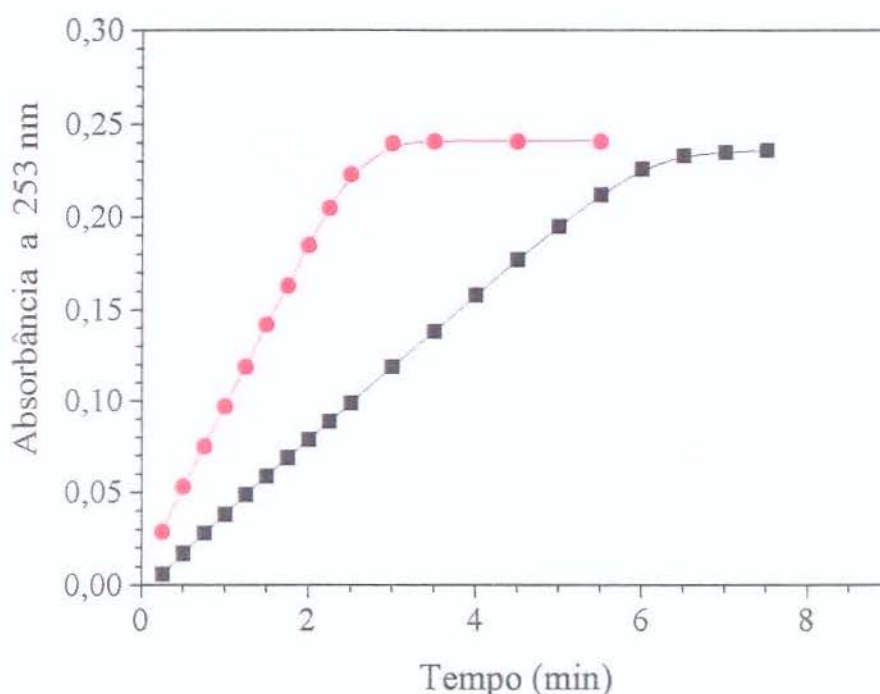


Figura 4.4 - Ensaio típico de determinação de inibição para quantificação de aprotinina: inibição de tripsina na hidrólise de BAEE a 25°C. Concentração de tripsina, 50 $\mu\text{g/ml}$; de aprotinina, 7,5 $\mu\text{g/ml}$; e de BAEE, 250 mM em solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M. ●, hidrólise de BAEE sem inibição ; ■, hidrólise de BAEE com inibição. Atividade de tripsina sem e com inibição: 0,0868 $\text{DO}_{253}/\text{min}$ e 0,0412 $\text{DO}_{253}/\text{min}$, respectivamente.

4.1.4. Quantificação de complexo e aprotinina ou tripsina em excesso

Uma vez que o complexo aprotinina-tripsina é formado na proporção estequiométrica 1:1, soluções com ambas as espécies em diferentes proporções estequiométricas apresentam, além do complexo, um determinado excesso de um dos dois componentes. Era conhecido, nestas soluções, como quantificar aprotinina ou tripsina em excesso, pois estes apresentam atividade enzimática, no caso de enzima e propriedade de inibição no caso do inibidor. No entanto, não conhecia-se um método de quantificação do complexo na presença de uma das espécies em excesso, uma vez que o complexo não apresenta propriedade particular detectável por técnicas

disponíveis, e a presença de outra espécie não permite a determinação do complexo através de simples medida de absorvância.

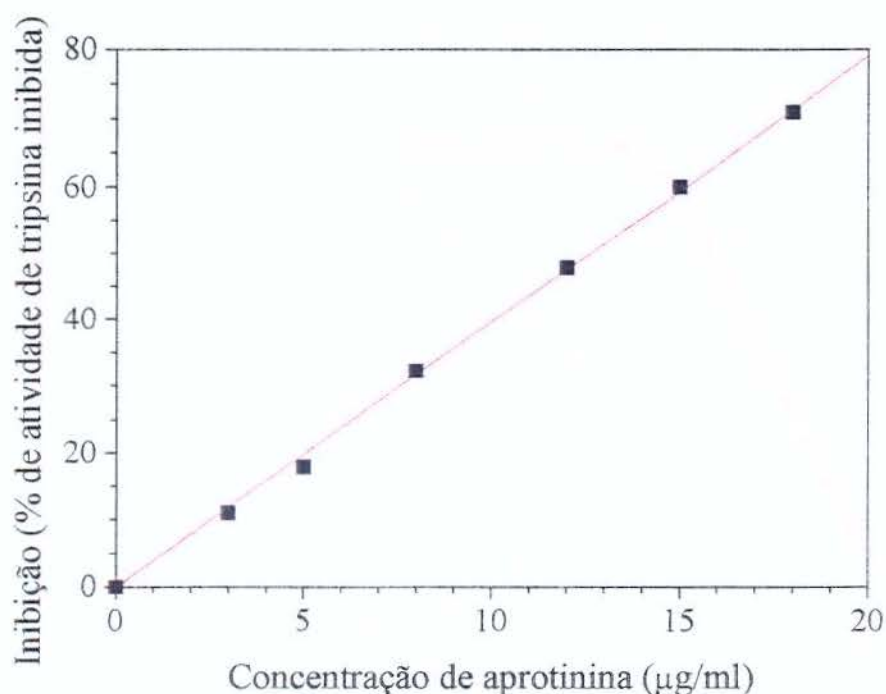


Figura 4.5 - Linearidade do ensaio de determinação de inibição, pela aprotinina, na hidrólise do substrato BAEE pela tripsina. Coeficiente angular, $3,96 \mu\text{g}^{-1}\text{ml}$; fator de correlação, 0,999.

Com o início no manuseio de soluções contendo a mistura de tripsina e aprotinina, fez-se necessário o desenvolvimento de um método que nos permitisse as quantificações de cada componente: complexo aprotinina-tripsina e espécie em excesso. Assim, desenvolveu-se um método de quantificação baseando-se em medidas de atividade enzimática ou inibição e medidas de absorvância das amostras contendo as espécies. Avaliou-se a eficácia do método analisando-se soluções de concentrações conhecidas e comparando estes valores com os valores das concentrações determinadas através do método.

Preparou-se soluções contendo aprotinina e tripsina em diferentes proporções estequiométricas em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e NaCl 1,0 M e mediu-se suas absorvâncias a 280 nm assim como as atividades enzimática e de inibição presentes nos meios. Baseando-se em curvas de calibração preestabelecidas de atividade enzimática *versus*

concentração de tripsina e inibição *versus* concentração de aprotinina, estimou-se as quantidades de enzima ou inibidor livre em cada solução. Uma vez estimadas as concentrações de enzima ou de inibidor, multiplicou-se as mesmas pelos respectivos coeficientes de absorção e fatores de diluição, estimando-se suas absorbâncias na referida solução. Subtraindo-se cada uma dessas absorbâncias da absorbâncias totais das soluções, obteve-se as absorbâncias referentes às concentrações de complexo, e dividindo-se as mesmas pelos coeficientes de absorção de complexo, estimou-se as concentrações de complexo nas misturas.

Na Tabela 4.2, tem-se concentrações estimadas com o método e o erro em relação aos valores esperados. Os resultados indicam, apesar de erros da ordem de até 15%, que as concentrações estimadas foram próximas dos valores esperados. Enfim, o método permitiu uma estimativa das concentrações de complexo em solução com excesso de enzima ou inibidor.

Tabela 4.2 - Determinação de complexo na presença de aprotinina ou tripsina em excesso.

Relação molar aprotinina/tripsina		0,5	0,6	0,7	1,1	1,7	2,2	2,5
Concentração de complexo (mg/ml)	Conhecida	0,26	0,29	0,35	0,47	0,36	0,29	0,26
	Determinada	0,28	0,29	0,37	0,49	0,40	0,33	0,30
Erro (%)		5,7	2,0	5,6	6,1	12,8	14,3	14,7
Concentração de tripsina em excesso (mg/ml)	Conhecida	0,17	0,14	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
	Determinada	0,17	0,16	0,11	--	--	--	--
Erro (%)		1,7	12,9	15,7	--	--	--	--
Concentração de aprotinina em excesso (mg/ml)	Conhecida	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05	0,07	0,07
	Determinada	--	--	--	0,01	0,05	0,07	0,07
Erro (%)		--	--	--	9,0	12,2	15,1	8,3

4.1.5. Estabilidade de tripsina em temperatura ambiente

Tripsina é normalmente manuseada em soluções a baixas temperaturas, cerca de 4 °C, de modo a evitar-se possível desnaturação em temperaturas mais elevadas. A ocorrência dessa desnaturação é, no entanto, dependente, além do pH, do período em que sua solução é submetida a temperaturas altas.

Neste trabalho, cujo objetivo a princípio foi o desenvolvimento de um processo possível de aplicação em escala industrial, investigou-se a estabilidade de tripsina em temperatura ambiente com relação ao tempo, visando-se um processo sem necessidade de resfriamento o que significa, em termos industriais, uma considerável retenção de custos operacionais.

Um volume de 1,0 ml de solução de tripsina 1,0 mg/ml em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M foi mantida, em um tubo Eppendorf de 1,5 ml, a 25 °C sob agitação constante. Após intervalos de 2, 4, 6 e 24 horas, analisou-se alíquotas da solução, diluídas para uma concentração de 40 µg/ml, para verificação da atividade. Os resultados mostraram que a atividade de tripsina manteve-se relativamente constante na referida solução a 25 °C no período de pelo menos 24 horas. O valor médio da atividade foi de 0,0662 DO₂₅₃/min com um desvio padrão de 0,0048.

4.1.6. Influência da concentração de NaCl na estabilidade do complexo

Neste trabalho, para a recuperação de aprotinina através de IMAC, explora-se a interação aprotinina-tripsina uma vez que, a tripsina com seus resíduos de histidina possibilitam a adsorção em íons metálicos imobilizados.

Azzoni (1998), tendo utilizado as enzimas tripsina e quimotripsina como ligantes de afinidade na recuperação de aprotinina, verificou que a adsorção de aprotinina em tripsina imobilizada era maior a concentrações mais baixas de NaCl. Devido tal verificação, estudou-se o efeito da concentração deste sal na interação aprotinina-tripsina em solução, visto que na técnica IMAC se aplica altas forças iônicas, sendo NaCl o eletrólito mais utilizado, para eliminação de interações não-específicas.

Soluções de 100 µg/ml de tripsina em diferentes concentrações de sal (40, 500 e 1000 mM em NaCl) tiveram suas atividades determinadas com e sem a presença de aprotinina (15µg/ml). Este estudo objetivou somente verificar a variação da inibição em soluções a diferentes forças iônicas. Observou-se, no entanto, além da variação da inibição, uma variação da atividade enzimática de tripsina. De acordo com os resultados (Tabela 4.3), a atividade enzimática da tripsina diminuiu com o aumento da concentração de NaCl. A inibição foi reduzida proporcionalmente à redução da atividade enzimática. No entanto, o percentual de atividade

inibida manteve-se constante nas diferentes concentrações de sal. Foi portanto concluído que a interação enzima-inibidor em solução não é afetada pela concentração de NaCl na faixa estudada.

Tabela 4.3 – Atividades enzimáticas e de inibição em diferentes forças iônicas.

Concentração de NaCl	40 mM	200 mM	1000 mM
Atividade sem inibição (DO/min): A_1	0,111	0,104	0,087
Atividade com inibição (DO/min): A_2	0,046	0,046	0,039
Inibição (DO/min): $A_3 = (A_1 - A_2)$	0,065	0,057	0,048
Fração da atividade total inibida: A_3/A_1	0,058	0,055	0,055

4.2. ADSORÇÃO DE TRIPSINA

Verificadas a estabilidade de tripsina a 25 °C e a manutenção da interação inibidor-enzima em alta concentração de sal, iniciou-se os estudos de adsorção da enzima de modo a estimar a capacidade de adsorção do complexo. Determinou-se inicialmente o tempo de equilíbrio da adsorção seguida da determinação de capacidades de adsorção.

4.2.1. Determinação do tempo de equilíbrio de adsorção de tripsina

Em tanques agitados, 50 mg de adsorvente Prosep Chelating-I (PC-I) ou Chelating Sepharose Fast Flow (CSFF) foram quelatados com íons Cu^{2+} através de saturação com solução de sulfato de cobre. Adicionou-se às mesmas 2,0 ml de solução 3 mg/ml de tripsina em tampão de adsorção fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M e, após intervalos crescentes de tempo, determinou-se as concentrações de tripsina nos sobrenadantes através de absorbância a 280 nm. As Figuras 4.6 e 4.7 mostram que os tempos de equilíbrio para adsorção de tripsina suína nas matrizes PC-I e CSFF quelatadas com cobre foram de aproximadamente 10 e 60 minutos. O maior tempo de equilíbrio observado para a adsorção em CSFF em relação à PC-I, deve-se talvez à maior porosidade e menor densidade de sua base, agarose, em relação à sílica, constituinte de PC-I. Estas características possivelmente teriam proporcionado uma maior difusividade da fase líquida entre os interstícios das partículas, e assim, um maior tempo para se atingir o equilíbrio.

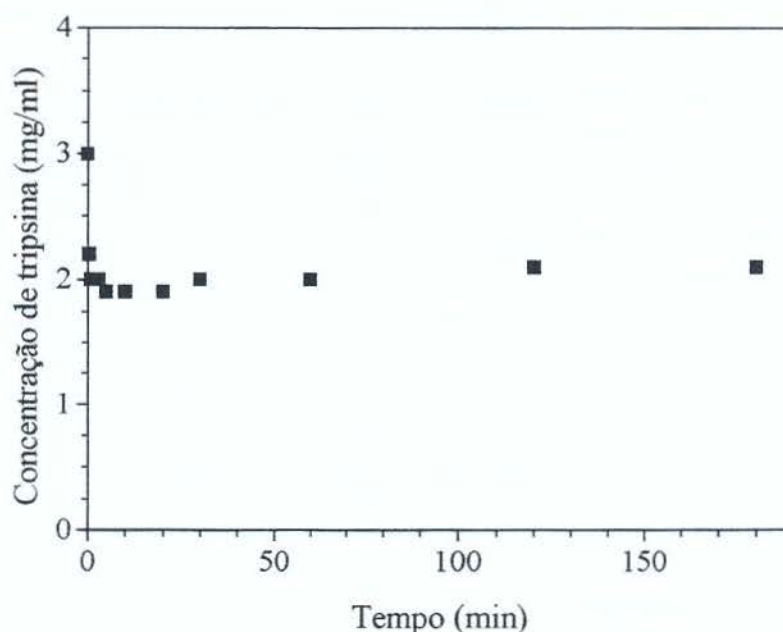


Figura 4.6 – Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção de tripsina suína em PC-I-Cu²⁺ a 25 °C em solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M.

4.2.2. *Isoterma de adsorção de tripsina*

Determinados os tempos de equilíbrio para adsorção de tripsina nas matrizes PC-I e CSFF, determinou-se a seguir as isotermas de adsorção de tripsina suína para ambas as matrizes. Massas de 25 mg de adsorvente (massa seca no caso de PC-I e massa úmida, drenada à vácuo, no caso de CSFF) foram quelatadas com cobre em tanques agitados e acondicionadas em tampão de adsorção. Adicionou-se às mesmas, 1,0 ml de soluções com concentrações de tripsina de 1,0 a 20,0 mg/ml no tampão de adsorção. Após tempo suficiente para se atingir o equilíbrio, 60 e 90 minutos para PC-I-Cu²⁺ e CSFF-Cu²⁺, respectivamente, determinou-se as concentrações de tripsina dos sobrenadantes de cada seringa. A seguir a lavou-se as matrizes por seguidas vezes com volumes de 1,0 a 2,0 ml de tampão de adsorção até que os efluentes de lavagem não apresentassem concentração significativa de proteína, determinando-se também as concentrações de proteína nos efluentes. Finalmente, a proteína remanescente na matriz foi eluída através de lavagem da matriz com volumes de 1,0 ml de tampão de dessorção: acetato de sódio 20 mM, pH 4,0, NaCl 1,0 M.

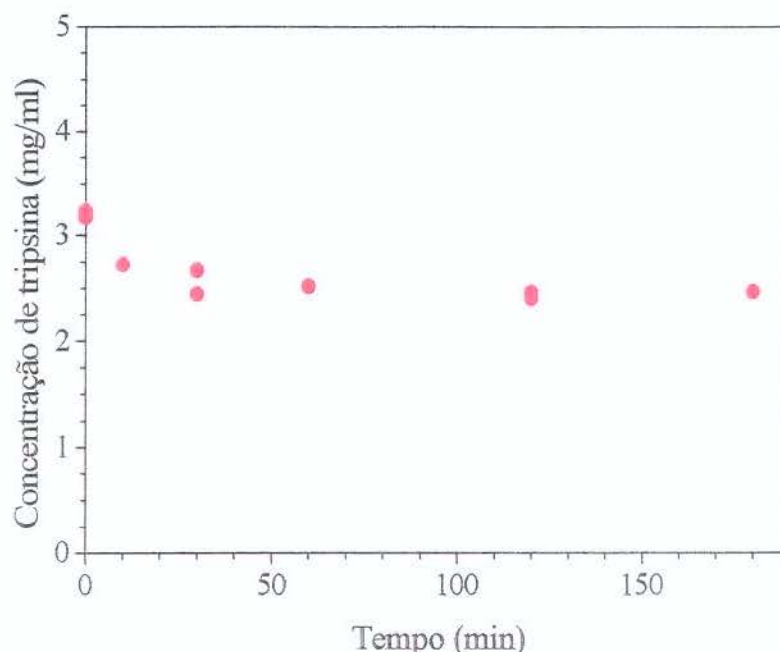


Figura 4.7 – Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção de tripsina suína em CSFF-Cu²⁺ a 25 °C em solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M.

Com o procedimento acima determinou-se as massas de tripsina totais adsorvidas, de acordo com a diferença entre as concentrações iniciais e finais dos sobrenadantes, e as massas remanescentes na matriz, calculadas com base nas massas totais adsorvidas menos as massas de tripsina removidas durante as lavagens. As massas de tripsina remanescentes no suporte foram também determinadas baseando-se nas concentrações protéicas das frações de dessorção.

Para ambas as matrizes ocorreu, na lavagem, considerável eliminação de massa protéica retida na matriz durante a adsorção. A massa protéica removida durante a lavagem corresponde à proteína retida nos espaços intersticiais e adsorvida na fase sólida através de interações não-específicas com a matriz. Nas Figura 4.8 e 4.9 estão indicadas as capacidades de adsorção total e as capacidades de adsorção determinadas após eliminação de proteína durante a lavagem. As capacidades de adsorção determinadas após remoção de proteína fracamente retida na matriz foram da ordem de 50% a 70% das capacidades de adsorção total para as duas matrizes. Uma possível causa destas fracas interações seria a presença de grupos eletrostáticos nos braços espaçadores nos quais se ligou o IDA. Como se trata de produtos comerciais, não se tem

informações quanto a natureza química destes braços. Pode-se ainda especular como fonte destas interações não-específicas interações do tipo proteína-proteína. A hipótese da presença de interações proteína-proteína é também uma possível explicação para o fato da isoterma de adsorção apresentar um desvio do modelo de Langmuir, normalmente utilizada para descrever adsorção de proteínas: não observou-se a existência de um “plateau” para altas concentrações de equilíbrio. A presença de interações proteína-proteína propiciaria formação de multicamadas provocando o desvio deste modelo uma vez que nele assume-se a adsorção limitada à formação de monocamadas (Ruthven, 1984). A isoterma pode ainda ter apresentado desvio do modelo de Langmuir devido limitação da faixa de concentrações iniciais de tripsina

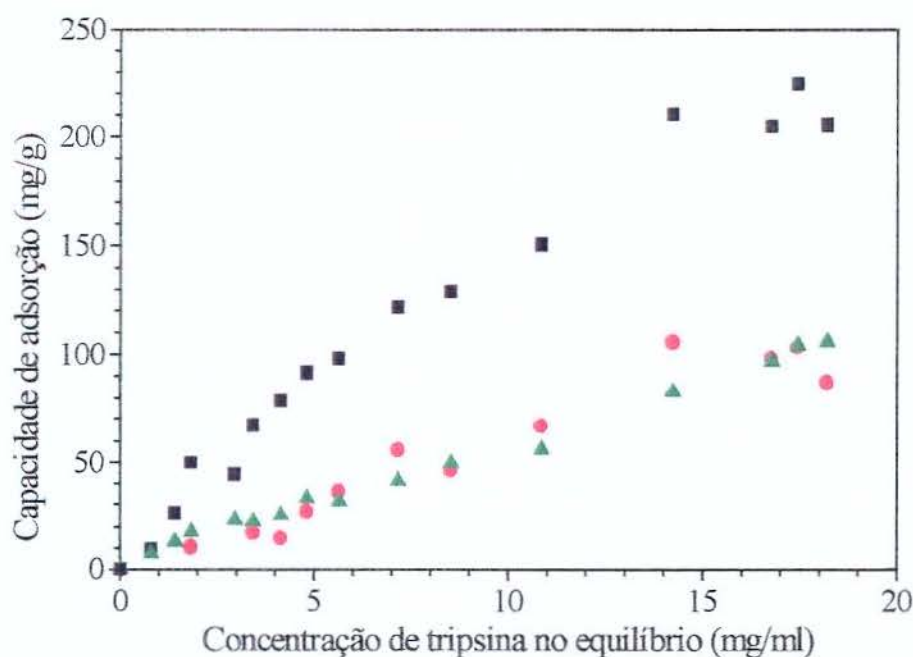


Figura 4.8 – Isotherma de adsorção de tripsina suína na matriz PC-I-Cu²⁺ a 25 °C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M. ■, capacidade de adsorção total determinada através de variação da concentração protéica do sobrenadante; ●, capacidade de adsorção específica, calculada pela diferença entre a massa de proteína total adsorvida e a massa protéica eluída na lavagem; ▲, capacidade de adsorção com base na massa de proteína nas frações de dessorção.

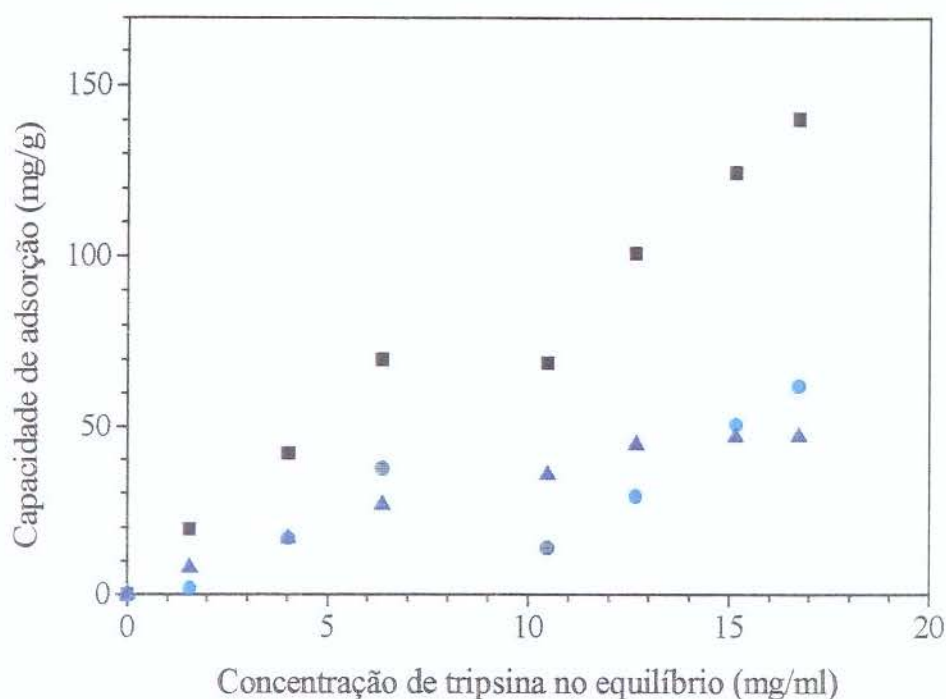


Figura 4.9 – Isoterma de adsorção de tripsina suína na matriz CSFF-Cu²⁺ a 25 °C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M. ■, capacidade de adsorção total determinada através de variação da concentração protéica do sobrenadante; ●, capacidade de adsorção específica, calculada pela diferença entre a massa de proteína total adsorvida e a massa protéica eluída na lavagem; ▲, capacidade de adsorção com base na massa de proteína nas frações de dessorção.

utilizada. Talvez o uso de concentrações iniciais de tripsina mais altas possibilitasse a verificação de uma isoterma do tipo Langmuir. No entanto, isto não foi possível visto que já se trabalhava de soluções mais concentradas no referido tampão era inviável, uma vez que a solubilização era duvidosa. Este fato das isotermas não serem, a princípio, curvas típicas do modelo de Langmuir, não é preocupante pois, apesar de muitos pesquisadores terem caracterizado adsorção de proteínas usando este modelo, segundo Vunnum et al. (1995) ele nem sempre é ajustável à adsorção em matrizes IMAC.

4.3. ADSORÇÃO DE APROTININA EM TRIPSINA PREVIAMENTE ADSORVIDA

A possibilidade da recuperação de aprotinina poderia a princípio ser conduzida de duas maneiras: a adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida na matriz IMAC ou a adsorção do complexo previamente preparado em solução. A primeira possibilidade foi averiguada no seguinte ensaio, realizado em tanques agitados. Uma massa de 200 mg de matriz PC-I- Cu^{2+} foi colocada em contato sob agitação constante durante uma hora com 8,0 ml de solução de tripsina suína (15 mg/ml) em tampão de adsorção fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M. A matriz, então carregada com tripsina, foi lavada com tampão de adsorção até que no efluente de lavagem não houvesse mais proteína. Considerando-se as concentrações de tripsina na solução no início e no equilíbrio da adsorção e ainda nos efluentes de lavagem, determinou-se a massa de tripsina remanescente na matriz. Através de filtração a vácuo em funil de Büchner, fez-se a drenagem de toda a massa de matriz, possibilitando a pesagem de massas de 25 mg dentro das seringas de 3,0 ml. Com base na massa de tripsina adsorvida por massa de matriz, preparou-se soluções de aprotinina em tampão de adsorção correspondentes as proporções de 0,3 a 2,6 moles de aprotinina por mol de tripsina adsorvida. Adicionou-se tais soluções de aprotinina às seringas contendo adsorvente carregado de tripsina e, após uma hora, avaliou-se as absorvâncias a 280 nm e a inibição dos sobrenadantes para determinação das massas de aprotinina adsorvidas. Observa-se que o tempo de equilíbrio de uma hora foi considerado suficiente baseando-se no tempo da reação completa de formação do complexo inibidor-enzima, de dez minutos (Kassel, 1970).

O acompanhamento da adsorção de aprotinina, feito através de quantificação de proteína através de medida de absorvância a 280 nm e de inibição das soluções iniciais e de equilíbrio, supostamente indicaria com a adsorção de aprotinina, um decréscimo na absorvância a 280 nm assim como um decréscimo de inibição. No entanto, como visto na Figura 4.10, observou-se um aumento de absorvância a 280 nm destas soluções, indicando um aumento da concentração protéica das soluções após o equilíbrio, embora as inibições tivessem diminuído indicando queda de concentração de aprotinina.

Concluiu-se que a tripsina pré-adsorvida, sofreu um deslocamento a partir da matriz, passando a formar complexo com a aprotinina presente no sobrenadante. Esse fenômeno

provocaria justamente um aumento de absorvância, com o aumento de concentração protéica, assim como a diminuição da inibição presente nas soluções, com a complexação de aprotinina.

Sabe-se que aprotinina interage com tripsina suína com envolvimento de pelo menos uma histidina, a do sítio ativo da enzima (Boden, 1992), restando ainda outras três disponíveis para possível interação com o ligante metálico. Supõe-se que, se a tripsina previamente adsorvida estiver interagindo com o metal através da histidina do sítio ativo, tal interação pode ser enfraquecida com a presença do inibidor posteriormente adicionado devido à maior afinidade da enzima com o inibidor do que com o ligante metálico. Uma outra hipótese é de tripsina, possivelmente adsorvida em multicamadas, estar sendo deslocada com a adição de aprotinina, o que também provocaria o aumento de proteína do meio e diminuição da inibição.

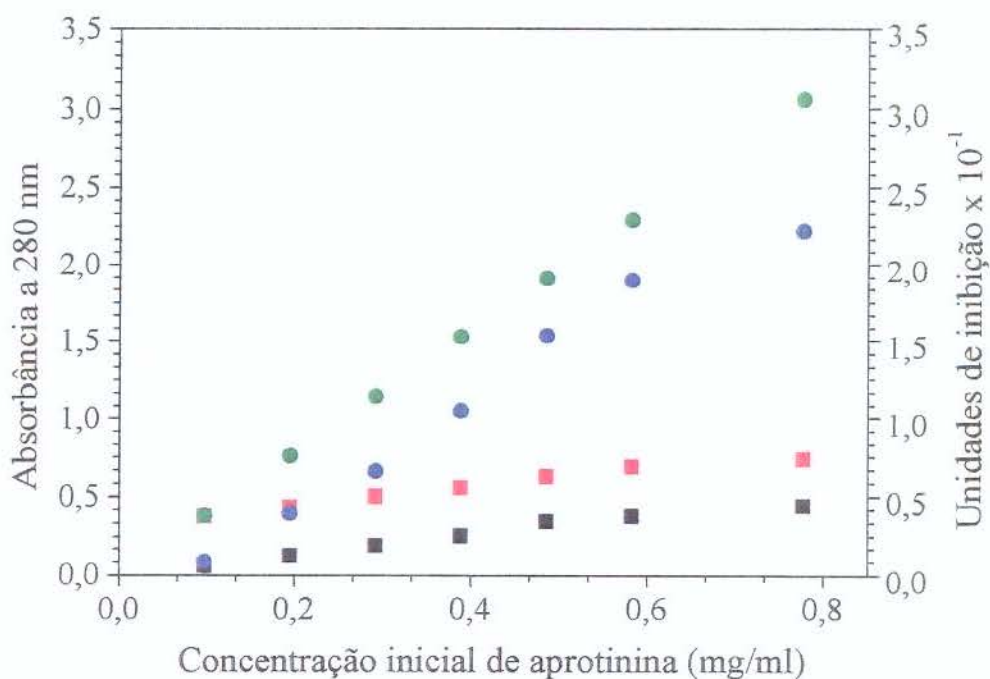


Figura 4.10 - Adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida a 25 °C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e NaCl 1,0 M. ■, absorvâncias das soluções antes da adsorção; ■, absorvâncias das soluções após adsorção; ●, inibições das soluções antes da adsorção; ●, inibições das soluções após adsorção.

Devido ao insucesso na aplicação deste método passou-se então a estudar o segundo método: adsorção do complexo previamente formado, no qual a interação inibidor-enzima estaria preestabelecida antes do contanto com o adsorvente, com disponibilidade somente das histidinas da enzima não participantes do seu sítio ativo. Optou-se ainda em não mais utilizar a tripsina bovina como formador de complexo, uma vez que este apresenta uma histidina a menos em relação à enzima suína, tornando menor a estabilidade da interação do complexo com o ligante. Devido à verificação de a interação da enzima com o metal não ser tão forte decidiu-se também não utilizar outros metais como ligante pois, estes, propiciam interações mais fracas que o cobre.

4.4. ADSORÇÃO DO COMPLEXO APROTININA-TRIPSINA

4.4.1. Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção do complexo aprotinina-tripsina

Seringas contendo 25 mg de matriz PC-I-Cu²⁺ com 1,0 ml de solução de 6,3 mg/ml de aprotinina-tripsina em tampão de adsorção fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0, NaCl 1,0 M foram mantidas sob agitação constante a 25 °C durante intervalos de tempo entre 30 e 180 minutos. O sobrenadante de cada seringa foi coletado e analisado quanto à concentração de proteína através de absorbância a 280 nm e quanto à inibição que, como esperado, foi nula. Através deste experimento, comprovou-se a possibilidade de adsorção do complexo aprotinina-tripsina na matriz IMAC com adsorção de 60 mg de complexo por grama de matriz, e determinou-se o tempo de equilíbrio da adsorção em 30 minutos (Figura 4.11).

4.4.2. Influência do pH e concentração de NaCl na adsorção do complexo

Avaliou-se a influência do pH e da concentração de NaCl na adsorção do complexo na matriz PC-I-Cu²⁺ comparando-se as capacidades de adsorção da matriz em diferentes valores de pH e concentrações do sal. Para averiguação do efeito do pH comparou-se capacidades de adsorção a pH 7,0, 8,0 e 8,5 mantendo-se a concentração de NaCl em 1,0 M e, para avaliação da influência do sal comparou-se as capacidades de adsorção a pH 7,0 e concentrações de 1,0, 0,50 e 0,04 M de NaCl. As capacidades de adsorção foram determinadas com base na proteína remanescente na matriz após lavagem e eluídas segundo Boden (1992) com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0, NaCl 1,0 M. Utilizou-se nos ensaios massas de 20 mg de adsorvente e

volumes de 1,0 ml de solução de complexo.

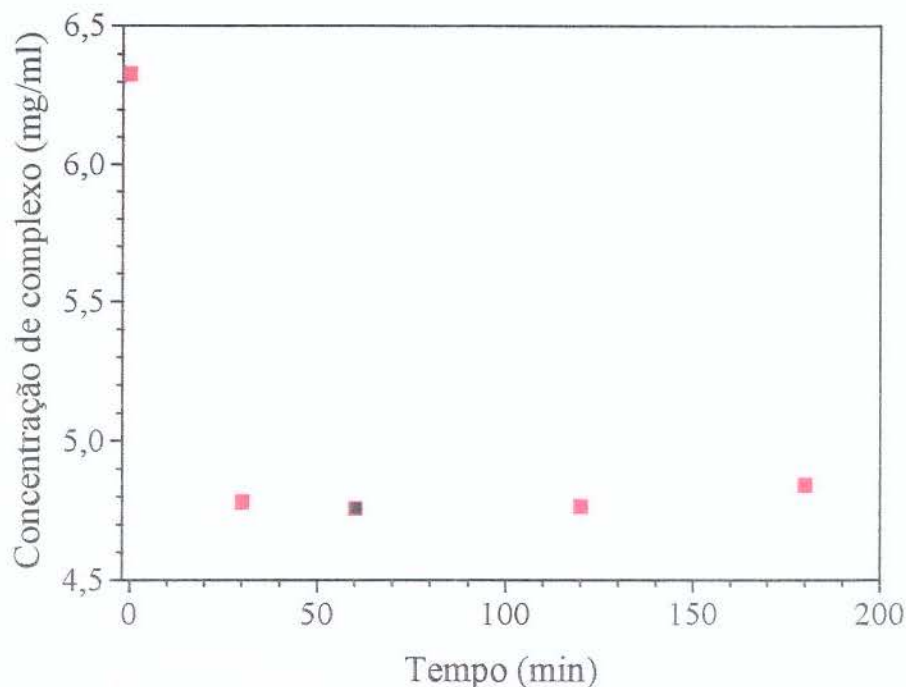


Figura 4.11- Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção do complexo aprotinina-tripsina na matriz PC-I-Cu²⁺ a 25 °C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM , pH 7,0 , NaCl 1,0 M.

Segundo os resultados (Figura 4.12), não houve variação significativa das capacidades de adsorção nos diferentes valores de pH estudados. Quanto a concentração de NaCl, esta sim, causou influência na adsorção do complexo, sendo as capacidades de adsorção da matriz maiores quanto mais baixas as concentrações do sal (Figura 4.13).

Observa-se que nas concentrações de 0,04 M e 0,50 M as capacidades foram mais altas que aquelas determinadas a 1,0 M. No entanto, as capacidades determinadas a 0,04 e 0,50 M não foram significativamente diferentes entre si. O efeito da concentração de NaCl verificado contradiz o comportamento clássico da adsorção em IMAC, onde na presença de eletrólitos, que contribuem na solvatação de moléculas de água adjacentes ao quelato metálico, a interação do metal com a proteína é favorecida. Sendo assim, este comportamento indica, corroborando com o verificado anteriormente no caso de adsorção de tripsina, a possível presença de interações não-específicas do tipo eletrostáticas.

A mais alta capacidade de adsorção determinada nestes ensaios na presença de NaCl 1,0 M foi da ordem de 12,0 miligramas de complexo por grama de matriz PC-I, o que representa cerca de 2,4 miligramas de aprotinina por grama de matriz. Este valor é da ordem de dez vezes menor que o mais alto valor estimado pela capacidade de adsorção específica de somente tripsina. Deve-se notar que estes valores são apenas ilustrativos das capacidades: eles são os valores mais altos obtidos nos ensaios realizados e não as capacidades máximas possíveis, uma vez que as isotermas não apresentaram um “plateau” a altas concentrações de equilíbrio.

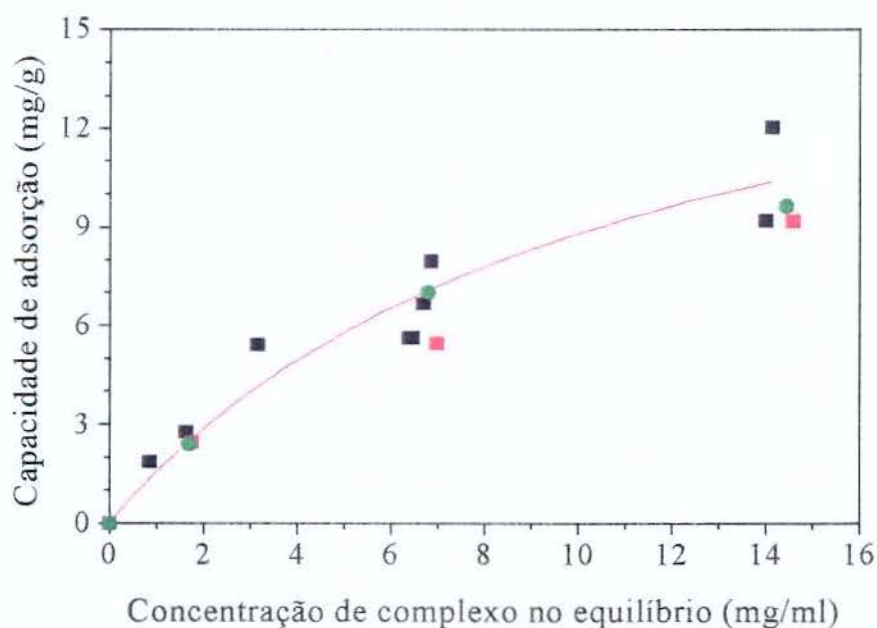


Figura 4.12- Influência do pH na adsorção do complexo aprotinina-tripsina na matriz PC-I-Cu²⁺ a 25 °C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M. Capacidades de adsorção a ■, pH 7,0; ●, pH 8,0 e ■, pH 8,5.

4.4.3. Influência do pH e concentração de NaCl na dessorção do complexo

Os estudos de dessorção foram feitos de modo a investigar o efeito do pH e da presença de NaCl na etapa de eluição do complexo a partir da matriz IMAC. Nestes estudos comparou-se os

valores de recuperação de proteína obtidos através da eluição em diferentes valores de pH na ausência de sal ou na presença de NaCl 1,0 M.

Uma massa de 1,68 g de matriz PC-I-Cu²⁺ foi suspensa em 10 ml de solução de complexo 10 mg/ml em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e NaCl 1,0 M e mantida em agitação durante 1,0 hora. Após remoção da solução de equilíbrio, a matriz foi lavada até eliminação total de proteínas fracamente adsorvidas (lavou-se quatro vezes com volumes de 10 ml). Em seringas de 3,0 ml, massas de 80 mg de matriz contendo complexo aprotinina-tripsina adsorvido, foram suspensas em 1,0 ml de tampão de dessorção de variados valores de pH (6,0; 5,0; 4,0; 3,5 e 2,1) com ou sem presença de NaCl 1,0 M. Após 1,0 hora, renovou-se a solução de dessorção e as seringas foram mantidas sob agitação por mais uma hora. Por último, fez-se a regeneração da matriz através de eluição com EDTA, removendo-se a proteína remanescente através do deslocamento do complexo metal-proteína da matriz. Através de determinação de proteína por medidas de absorbância a 280 nm e pelo método de Bradford, determinou-as recuperações

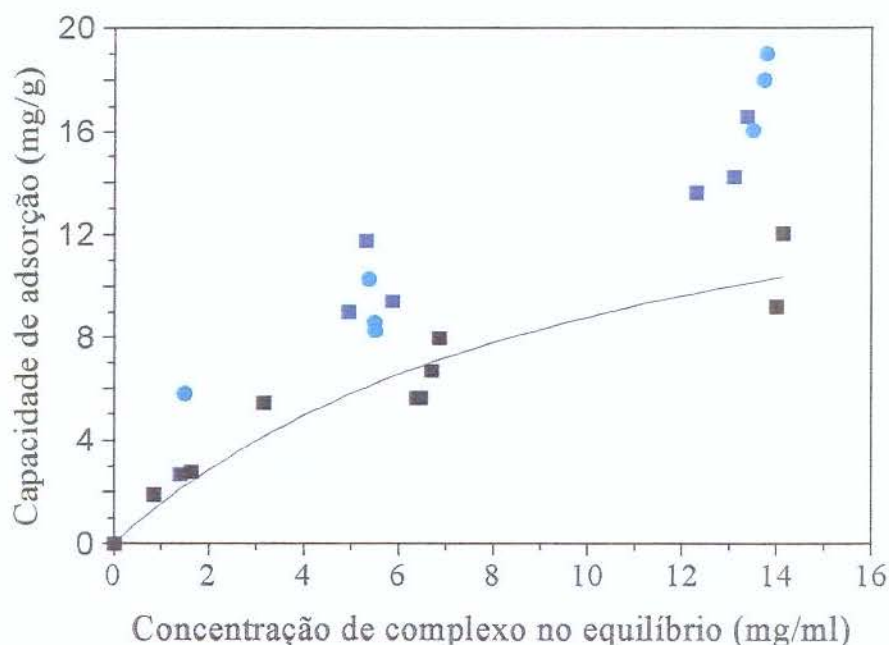


Figura 4.13 - Influência da concentração de NaCl na adsorção do complexo aprotinina-tripsina na matriz PC-I-Cu²⁺ a 25 °C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. Capacidades de adsorção a concentrações de NaCl ■, 1,00 M; ■, 0,50 M e ●, 0,04 M.

obtidas na dessorção em cada pH, assim como nas frações de regeneração. Utilizou-se tampão fosfato de sódio 20 mM para os valores de pH 6,0 e 5,0; tampão acetato de sódio 100 mM para os valores de pH 4,0 e 3,5 e tampão glicina 20 mM para o pH 2,1.

Análise das frações eluídas, através de ensaios de inibição e atividade enzimática, não indicaram a eluição preferencial da aprotinina. Eluiu-se, assim, em todas as condições estudadas o complexo aprotinina tripsina ou tripsina e aprotinina na proporção molar de 1:1. Os resultados (Figura 4.14 e 4.15) mostraram que a dessorção foi mais eficiente quanto mais baixo o pH do tampão de dessorção e na presença de sal, tendo se atingido uma recuperação de 40 % em pH 2,1 na ausência de sal e de virtualmente 100% no mesmo pH na presença de NaCl 1,0 M. Vê-se que a adição do eletrólito foi essencial para uma completa dessorção do complexo. Este comportamento se mostra coerente com o observado durante estudo da adsorção, a qual foi favorecida em concentrações mais baixas do eletrólito, indicando possivelmente a presença de interações eletrostáticas.

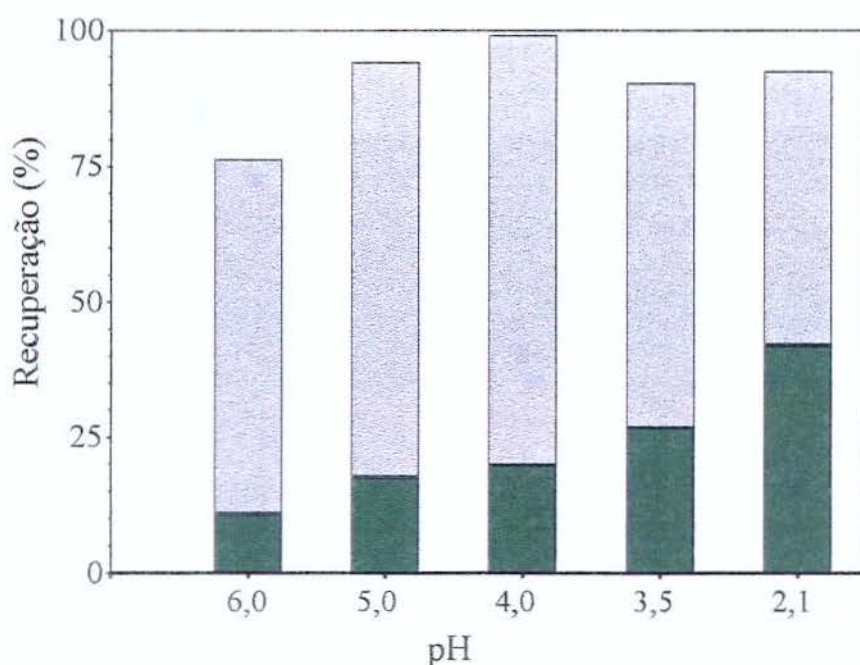


Figura 4.14 - Efeito do pH na dessorção do complexo aprotinina-tripsina a 25°C a partir da matriz PC-I-Cu²⁺. Soluções de dessorção: fosfato de sódio 20 mM a pH 6,0 e 5,0; acetato de sódio 100 mM a pH 4,0 e 3,5; e glicina 20 mM a pH 2,1. ■, proteína recuperada através de abaixamento de pH; ■, proteína remanescente eluída com EDTA.

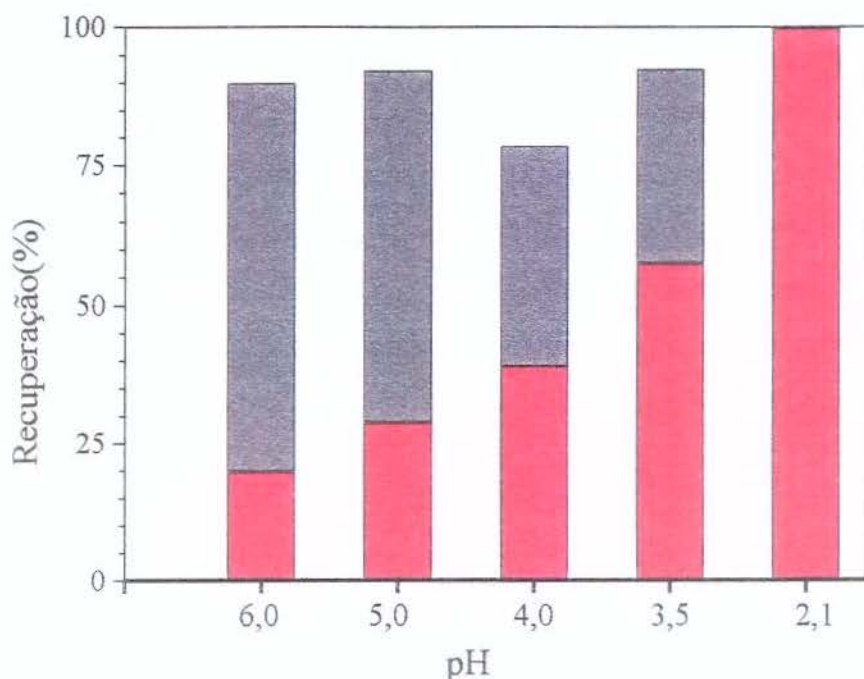


Figura 4.15 - Efeito do pH na dessorção do complexo aprotinina-tripsina a 25°C a partir da matriz PC-I-Cu²⁺ na presença de NaCl 1,0 M. Soluções de dessorção: fosfato de sódio 20 mM a pH 6,0 e 5,0; acetato de sódio 100 mM a pH 4,0 e 3,5; e glicina 20 mM a pH 2,1. ■, proteína recuperada através de abaixamento de pH; ■, proteína remanescente eluída com EDTA.

A necessidade de uso de alta concentração de NaCl favorece o processo uma vez que propicia alta recuperação do complexo adsorvido. No entanto, a presença do sal na fração contendo o produto não é um fator positivo. Este problema pode ser resolvido uma vez que se prevê a filtração em gel ou ultrafiltração como meio de se separar a aprotinina da tripsina eluída como complexo: estas operações podem eliminar também sal do produto final. Por outro lado, a presença de NaCl passa a não ser deletéria ao processo global na eventualidade de se cristalizar a aprotinina purificada. Segundo Veessler et al. (1996) NaCl é adicionado a soluções de aprotinina visando sua cristalização.

O pH para eluição eficiente do complexo (2,1) apesar de baixo, não apresenta problemas quanto a estabilidade. Tripsina é notoriamente estável a baixos valores de pH e Azzoni (1998) eluiu aprotinina em cromatografia de afinidade a pH 2,1 sem perda de inibição.

Tendo verificado que a eluição completa da proteína adsorvida somente foi obtida em pH 2,1 deve-se salientar que, as capacidades de adsorção do complexo determinadas anteriormente, nos estudos do efeito de pH e concentração de NaCl na adsorção, estão na realidade abaixo das capacidades reais de adsorção. Em tais estudos determinou-se as capacidades de adsorção de complexo com base na proteína obtida na dessorção a pH 4,0, pH no qual notamos posteriormente que a dessorção é de apenas cerca de 50% do complexo adsorvido. No entanto, como o propósito dos experimentos foi a avaliação do efeito de variáveis no processo de adsorção e não essencialmente a determinação das capacidades de adsorção, acredita-se que as conclusões sobre o efeito de pH e concentração de NaCl na adsorção então obtidas sejam válidas.

4.5. DETERMINAÇÃO DE NaCl E PROTEÍNA NO EFLUENTE INDUSTRIAL

Uma vez que o efluente SPI era proveniente de uma etapa do processo industrial onde havia grande quantidade de NaCl, era muito provável a presença do eletrólito no mesmo. Sendo a força iônica um fator relevante em IMAC, fez-se necessária a determinação da concentração do eletrólito no efluente, o que possibilitaria o ajuste de força iônica das suas soluções.

Para determinação da concentração do sal no efluente, SPI, determinou-se inicialmente uma curva padrão relacionando concentrações conhecidas de NaCl em tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0 com as respectivas condutividades (Figura 4.16). A seguir, mediu-se a condutividade de uma solução de efluente preparada no mesmo tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0 na concentração de 50 miligramas de material liofilizado por mililitro de solução. O valor medido de condutividade, (0,844 mS/cm) indicou, de acordo com a curva de referência, uma força iônica de 0,38 M em NaCl e uma concentração de 0,45 gramas de NaCl por grama de material liofilizado.

Uma vez determinada a concentração do sal no efluente, a preparação das soluções de SPI nos ensaios de adsorção e dessorção consistiu da solubilização do material liofilizado e ajuste da força iônica com devidas diluições ou adição de NaCl e do ajuste de pH das soluções através de adição de NaOH a 0,6 M.

A determinação da concentração de proteína no efluente pelo método azul de comassie (Bradford, 1976) tendo albumina de soro bovino como padrão indicou uma concentração de 0,4 gramas de proteína por grama de SPI liofilizado.

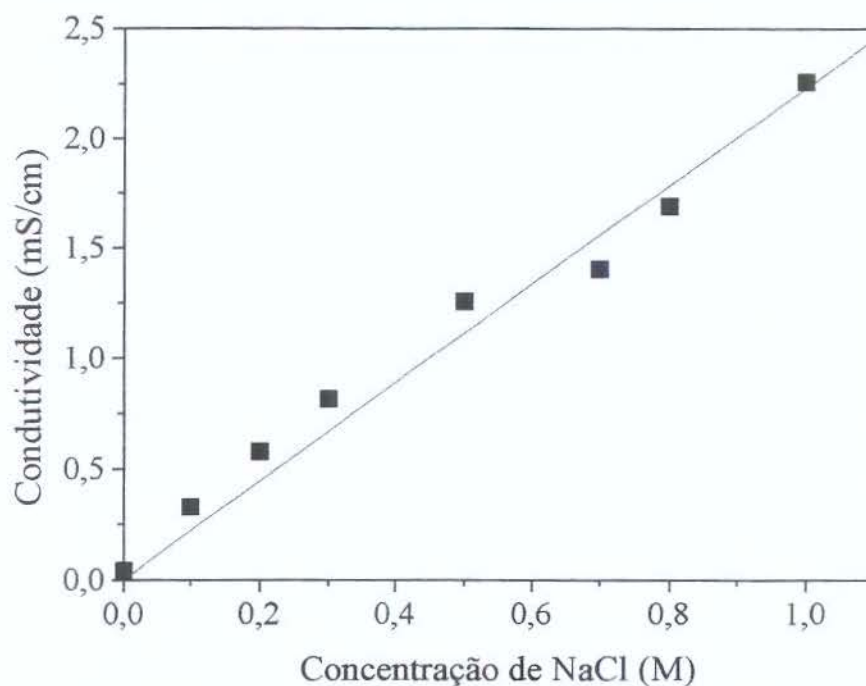


Figura 4.16 – Relação entre condutividade e concentração de NaCl em solução fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0. Coeficiente angular: 2,2. Coeficiente de correlação: 0,99.

4.6. PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE COM ADSORÇÃO DE IMPUREZAS

Determinadas as condições de adsorção e dessorção do complexo a partir de solução tampão, iniciou-se os estudos de aplicação do processo na recuperação de complexo a partir do efluente SPI. No entanto, antecedendo as etapas de formação de complexo e de sua adsorção a partir do efluente, fez-se necessário um estudo sobre a adsorção de impurezas.

Conhecida a complexidade do efluente (Azzoni, 1998), previa-se a existência de impurezas que pudessem adsorver na matriz IMAC e que assim acarretariam uma baixa seletividade e capacidade da matriz na etapa de adsorção do complexo aprotinina-tripsina. Era então necessário

a verificação da adsorção destas impurezas em PC-I-Cu²⁺ em condições utilizadas na adsorção do complexo aprotinina-tripsina, no entanto, na ausência do mesmo.

4.6.1. Verificação inicial da adsorção de impurezas na matriz IMAC

A verificação da adsorção de impurezas foi realizada pelo monitoramento da diminuição de proteína total do efluente colocado em contato com o adsorvente. Utilizou-se massas de 20 mg de matriz contactadas com volumes de 1,0 ml de solução de SPI a diferentes concentrações em tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0 e NaCl 1,0 M.

Os resultados indicaram altas capacidades de adsorção de impurezas, da ordem de até 200 mg/g de PC-I-Cu²⁺ (Figura 4.17). Estas capacidades de adsorção, indicadas na isoterma, foram determinadas com base nas diferenças entre as concentrações iniciais e de equilíbrio dos sobrenadantes. Não houve, neste caso, eliminação de proteína fracamente adsorvida durante etapa de lavagem como nas determinações de isotermas de tripsina e de complexo.

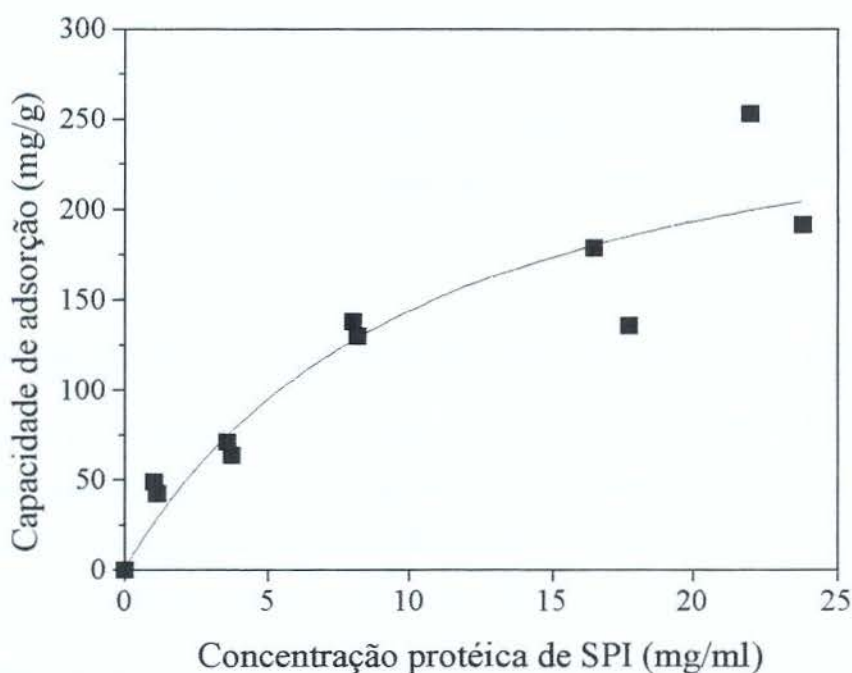


Figura 4.17 – Isotherma de adsorção de impurezas presentes no SPI na matriz PC-I-Cu²⁺, a 25°C, em tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0; NaCl 1,0 M.

As altas capacidades de adsorção de impurezas na matriz PC-I-Cu²⁺ mostraram que grande parte dos constituintes de SPI interagem com a matriz, sendo retidas na fase sólida. Estas interações poderiam ser do tipo não-específicas ou do tipo específicas no caso de alguma proteína possuidora de histidina. De qualquer forma, esta alta adsorção não contribuiria, a princípio, com o processo em desenvolvimento, devido baixa seletividade que o mesmo proporcionaria na recuperação do complexo.

No entanto, percebeu-se que esta alta adsorção de impurezas, fenômeno aparentemente negativo, poderia ser explorado positivamente com a implementação de uma etapa de pré-purificação de SPI utilizando a própria matriz IMAC. Neste procedimento, em uma primeira etapa de adsorção, a aprotinina, na forma não complexada, permaneceria na fase líquida enquanto que grande parte de impurezas seria removida com a adsorção no suporte cromatográfico. Na etapa posterior, formaria-se o complexo pela adição de tripsina e se faria a sua adsorção com maior seletividade, uma vez que grande parte de impurezas teria sido eliminada na etapa anterior.

4.6.2. Estudo das condições de remoção de impurezas do efluente

De modo a estabelecer as condições de adsorção para uma maior remoção de impurezas do efluente, estudou-se os efeitos de pH e concentração de NaCl na adsorção destas impurezas na matriz PC-I-Cu²⁺. Antecedendo, no entanto, a verificação das capacidades de adsorção a diferentes condições, fez-se a determinação do tempo de equilíbrio da adsorção destas impurezas.

Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção de impurezas do efluente na matriz IMAC: O estudo do tempo de equilíbrio da adsorção de impurezas foi realizado em tanques agitados seguindo mesma metodologia utilizada nos estudos de adsorção de enzima e de complexo. Utilizou-se massas de 20 mg de matriz PC-I e 1,0 ml de soluções SPI em tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 7,0 e NaCl 1,0 M. Os resultados indicaram que o equilíbrio foi atingido no intervalo de 30 a 60 minutos (Figura 4.18).

Efeito do pH e concentração de NaCl na adsorção de impurezas na matriz IMAC: Na verificação das condições de adsorção, massas de 20 mg de matriz foram contactadas com 1,0 ml de soluções de efluente nas diferentes condições de pH e concentrações de NaCl.

Na averiguação do efeito do pH comparou-se capacidades de adsorção a pH 5,5 ; 6,0 e 7,0 a 1,0 M em NaCl. Os resultados indicaram que não houve efeito significativo desta variável na capacidade de adsorção de impurezas na matriz PC-I-Cu²⁺ (Figura 4.19).

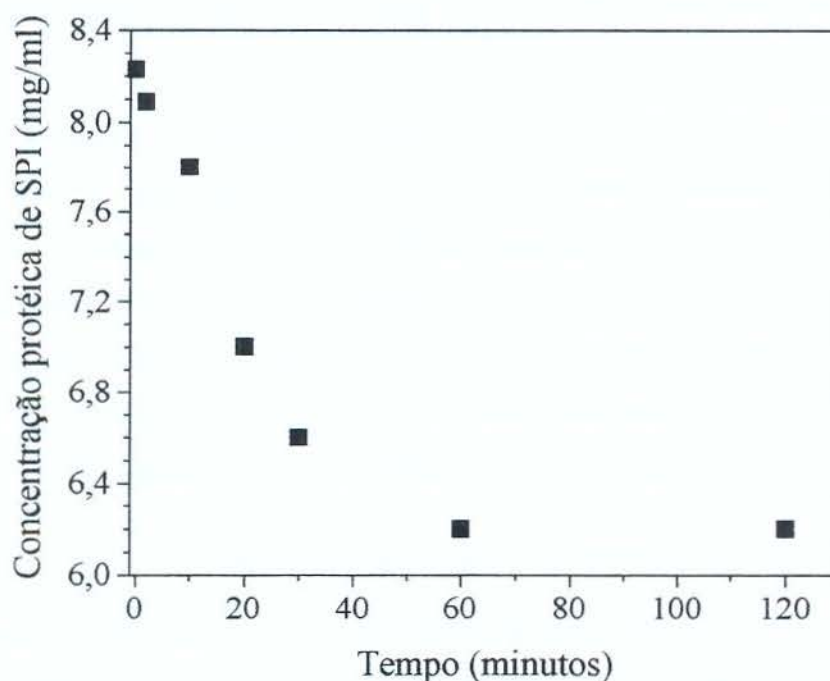


Figura 4.18 – Determinação do tempo de equilíbrio da adsorção protéica na matriz PC-I-Cu²⁺ a partir do efluente SPI a 25°C. Solução tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M.

Para averiguação do efeito da concentração de NaCl comparou-se as capacidades de adsorção em concentrações de 0,2; 0,5 e 1,0 M do eletrólito a pH 5,5. Selecionou-se o pH 5,5 para o estudo da concentração do eletrólito uma vez que nesta condição diminuiria-se as chances de formação de complexo do inibidor com alguma protease eventualmente presente no efluente, pois a condição ideal para formação e manutenção da forma complexada do inibidor é em pH mais alto, em torno de 8,0. Com a formação de complexo surgiria possibilidade de sua retenção no adsorvente, através de interação da enzima e matriz. Os resultados indicaram maiores capacidades de adsorção em concentrações mais baixas de NaCl (Figura 4.20). Este fato, assim como o observado nos estudos de adsorção de complexo aprotinina-tripsina, sugerem existência de interações não-específicas do tipo eletrostática.

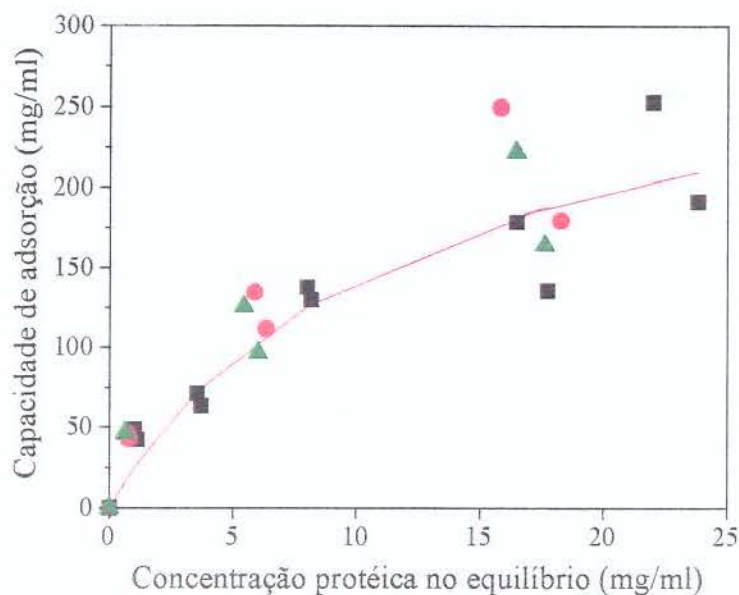


Figura 4.19 – Efeito do pH na pré-purificação de SPI: adsorção de impurezas na matriz PC-I- Cu^{2+} a 25 °C em tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0M. Capacidades de adsorção a ■ pH 7,0; ● pH 6,0 e ▲ pH 5,5 na presença de NaCl 1,0 M.

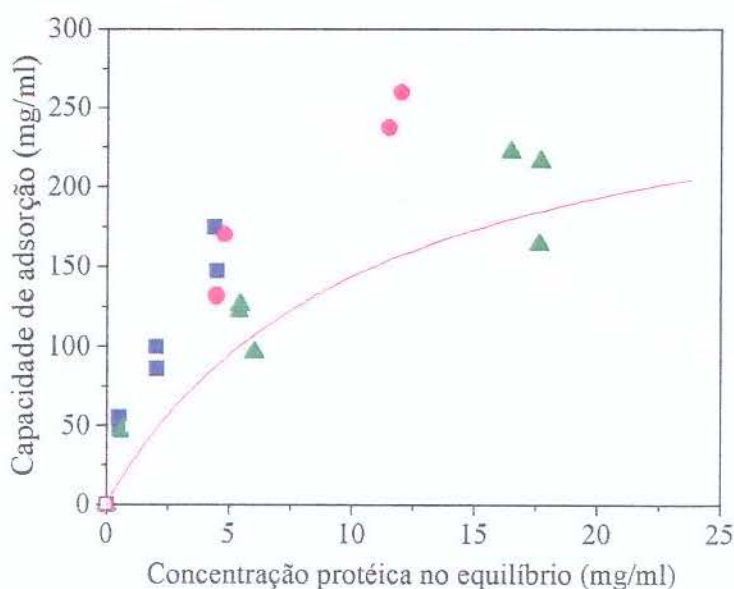


Figura 4.20 – Efeito da concentração de NaCl na pré-purificação de SPI: adsorção de impurezas na matriz PC-I- Cu^{2+} a 25 °C em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 5,5. Capacidades de adsorção a concentrações de NaCl ■ 0,2 M; ● 0,5 M e ▲ 1,0 M.

4.6.3. Remoção de impurezas via adsorção em múltiplos estágios

Estudadas as condições de adsorção de impurezas do efluente, fez-se implantação de um procedimento objetivando atingir a remoção máxima destas impurezas. Tal procedimento poderia, a princípio, ser conduzido em tanques agitados com adsorções em múltiplos estágios ou ainda em coluna cromatográfica. Devido à simplicidade da primeira alternativa, dispensando o uso do sistema de cromatografia em colunas, optou-se pela mesma, isto é, pela adsorção em tanques agitados.

Para uma estimativa das relações entre massa de adsorvente e volume de solução em cada batelada, ajustou-se os dados da adsorção de impurezas pelo modelo de Freundlich (Figura 4.21). As equações que descrevem o modelo (Equação 4.2 e Equação 4.4) foram apresentadas no capítulo 3, seção 3.3.12.

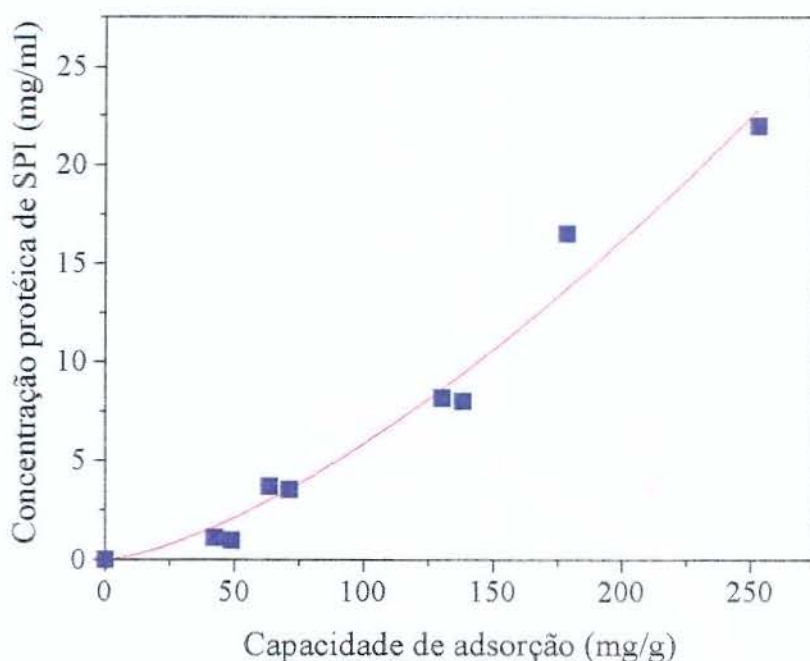


Figura 4.21 - Isoterma de adsorção de impurezas na matriz IMAC, ajustada pelo modelo de Freundlich. Adsorção a pH 7,0 , NaCl 1,0M. O ajuste forneceu os valores de $1,46$ e $7,06 \times 10^{-6}$ para os parâmetros k e n respectivamente.

As condições de adsorção dos dados utilizados na construção do modelo (Figura 4.21),

pH 7,0 e NaCl 1,0 M, devem-se unicamente ao aproveitamento de um melhor conjunto de dados. No objetivo de remoção máxima de impurezas, as condições selecionadas seriam aquelas que propiciariam maiores capacidades de adsorção de impurezas (concentração de NaCl 0,2 a 0,5 M) e manutenção do inibidor no efluente (pH 5,5). No entanto, para efeito de cálculos na adsorção de impurezas a determinação dos parâmetros do modelo com os dados a pH 7,0 e NaCl 1,0 M não deixavam de ser adequados, uma vez que o pH não influiria na capacidade de adsorção de impurezas e a alta concentração de NaCl acarretaria em uma superestimativa das massas de matriz requeridas para a adsorção (visto que em força iônica alta a capacidade de adsorção era mais baixa). Em situação contrária, com a utilização dos dados que fornecem maiores capacidades de adsorção, haveria uma sub-estimativa das massas de adsorvente e os testes em bateladas seriam ineficientes na remoção das impurezas no nível desejado.

Para o início dos cálculos estabeleceu-se a concentração protéica que o efluente deveria apresentar ao final das adsorções em 0,2 mg/ml, o que implicaria em um fator de purificação em termos de inibição específica de 50 caso não houvesse perda de inibição. Assim, uma vez que a concentração protéica original do efluente era de aproximadamente 10 mg/ml e a concentração final esperada era de 0,2 mg/ml determinou-se, através da Equação 4.4 (capítulo 3, seção 3.2.12) que numa adsorção em único estágio deveria-se atingir uma capacidade de adsorção q_1 igual a 9,8 mg/ml. Com base neste valor, determinou-se através da Equação 4.6, uma relação de massa de adsorvente por volume de solução (M/V) de 1,0 g/ml necessária para se atingir a concentração final de impurezas de 0,2 mg/ml em um único estágio. No entanto, esta relação era inviável pois, a massa de adsorvente em relação ao volume da solução era demasiadamente alta: o volume de líquido mal seria suficiente para umedecer a matriz e não haveria nenhum sobrenadante no sistema. Desse modo, definiu-se que a adsorção deveria ser conduzida em maior número de estágios. Refez-se então os cálculos para dois estágios, cujo balanços de massa e relações entre massa de matriz e volume de solução são apresentados nas Equações 4.7 a 4.10 (capítulo 3, seção 3.2.12). Nestas equações, os valores C_2 (0,2 mg/ml) e q_2 (9,8 mg/ml) eram dados conhecidos, ao passo que C_1 e q_1 foram calculados a partir das Equações 4.11 e 4.4 e a seguir a partir das Equações 4.7 e 4.8 calculou-se M_1/V (0,194 mg/ml) e M_2/V (0,151 mg/ml). Ambas as relações de massa de matriz por volume de solução (M/V) eram adequadas em termos práticos, indicando que havia possibilidade de se atingir a concentração de impurezas esperada, em dois estágios de adsorção.

Tendo então, como referência, os cálculos para adsorção em duplo estágio, conduziu-se a adsorção em múltiplos estágios. A redução da concentração de proteína do efluente após cada estágio é apresentada na Figura 4.22 e Tabela 4.4 que indicam, além da diminuição progressiva da concentração de proteína total, a diminuição do poder inibitório da solução. Na Figura 4.22, proteína total e inibição estão expressas em termos da porcentagem em relação ao valor inicial, pois, a expressão quantitativa de proteína total e de inibidor em termos de suas concentrações não permitiria a visualização comparativa adequada de ambos os valores pois suas magnitudes numéricas eram muito diferentes: ao passo que as concentrações de proteína total eram da ordem de até 9,9 mg/ml, as concentrações do inibidor eram da ordem de apenas 34 µg/ml. Na Tabela 4.4 tem-se as concentrações de proteína total e inibidor nas frações de lavagem da matriz obtidas após cada adsorção de modo a avaliar a proporção de proteína ou inibidor fracamente adsorvido durante adsorção.

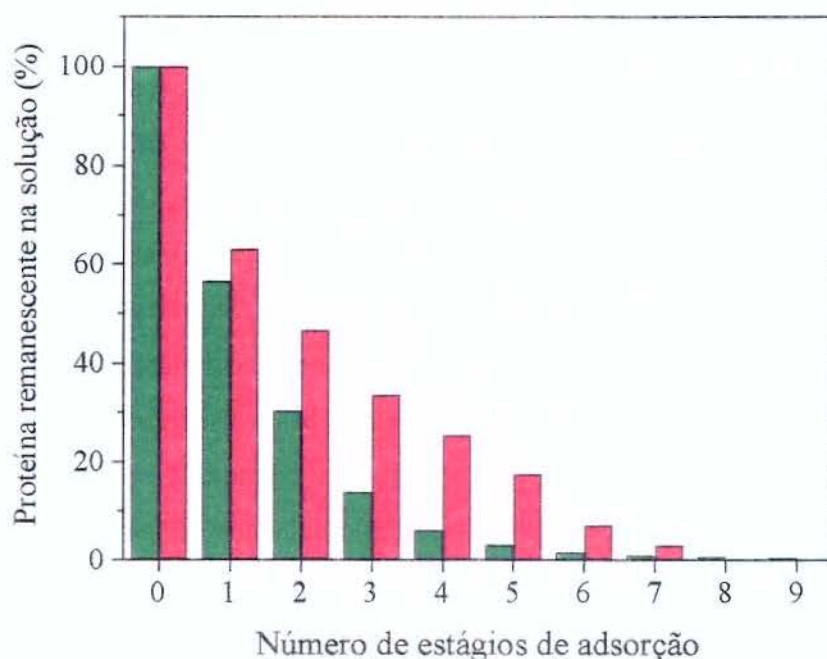


Figura 4.22 - Remoção de impurezas do SPI através de adsorção em PC-I-Cu²⁺ em múltiplos estágios. Proteína total remanescente na solução (■). Inibidor remanescente na solução (■). Condições de adsorção: pH 5,5, NaCl 0,5 M.

Tabela 4.4 – Remoção de impurezas do efluente através de adsorção IMAC em múltiplos estágios

Estágio	Concentrações no equilíbrio		Inibição específica ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Proteína removida na lavagem (% de massa adsorvida)	
	Proteína total (mg/ml)	Inibidor ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Proteína total (%)	Inibidor (%)
0	9,90	34,3	3,46	38	24
1	5,60	21,7	3,88	47	18
2	3,00	16,0	5,00	29	0
3	1,36	11,5	8,46	23	0
4	0,60	8,7	14,5	0	0
5	0,30	6,0	20,0	0	0
6	0,16	2,4	15,0	0	0
7	0,09	1,0	11,1	0	0
8	0,07	0,0	-	0	0
9	0,05	0,0	-	0	0

Verificou-se o desaparecimento do poder inibitório da solução de efluente com o aumento do número de estágios. Durante os primeiros estágios, a diminuição da inibição na solução não foi um fator preocupante, pois, além de aprotinina, previa-se a presença de outras espécies que apresentassem poder de inibição de tripsina, que possivelmente, adsorveriam na matriz IMAC. No entanto, ao final de nove estágios de adsorção, observou-se que a inibição decresceu continuamente atingindo uma concentração abaixo da sensibilidade do método de detecção.

Desta forma, o experimento de adsorção em múltiplos estágios, que simula uma adsorção em coluna cromatográfica, mostrou que o procedimento de pré-purificação do efluente com adsorção de impurezas era inviável devido à remoção do inibidor que deveria ser recuperado em etapa posterior com formação e adsorção de seu complexo. No entanto, deve-se ressaltar que houve purificação de inibidor uma vez que a redução da concentração de proteína total foi maior que a da inibição: após o quinto estágio a inibição específica aumentou de 3,46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ na alimentação para 20,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ o que implica em um fator de purificação de cerca de 6.

Supõe-se que a diminuição do inibidor no sobrenadante tenha ocorrido devido a interações ocasionadas pelo grande volume de matriz em relação ao volume da solução. Isto é, havendo uma maior superfície da matriz em contato com a solução, houve um aumento do número de sítios não preferenciais de adsorção e, assim, mesmo com a ocupação dos sítios preferenciais de adsorção, havia possibilidade de interação de demais espécies do efluente, entre as quais a

aprotinina, interagirem com a matriz através destes sítios não preferenciais.

4.7. RECUPERAÇÃO DE APROTININA A PARTIR DO EFLUENTE

Visto a alta capacidade da matriz na adsorção de impurezas do SPI e a impossibilidade de pré-tratamento do mesmo, passou a se estudar a dessorção de complexo adsorvido a partir do efluente, em variadas condições de pH na presença ou não de NaCl 1,0 M. Utilizou-se como tampões de eluição soluções acetato de sódio 100 mM a pH 4,0 e 3,5 e glicina 100 mM a pH 2,1.

O monitoramento quantitativo durante etapas de adsorção e dessorção consistiu de determinações de proteína total em todas as frações, realizado através de medidas de absorbância, sem discriminação das concentrações de complexo. Apesar de tripsina e aprotinina serem individualmente detectáveis, mesmo em baixas concentrações, através de suas atividades enzimática e de inibição, o complexo por eles formado não pode ser discriminado dentre outras proteínas com medidas espectrofotométricas. Assim, para detecção do complexo nas frações de adsorção e dessorção a partir do efluente utilizou-se um método de análise qualitativa, a eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE).

Estes experimentos de adsorção e dessorção de complexo a partir do efluente foram realizados através de “spiking”, isto é de adição de complexo ao efluente. A razão deste artifício, decorreu do fato de que a verificação do complexo formado a partir de aprotinina presente no efluente SPI não seria possível de detecção nas frações de dessorção através dos métodos analíticos utilizados pois nestas frações a concentração de aprotinina seria certamente inferior à sua concentração original no efluente, já demasiadamente baixa, estimada em cerca de 3,0 µg/ml (Azzoni, 1998). A definição da concentração de complexo a ser adicionado ao SPI no “spiking” baseou-se se na análise exploratória em eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.23), onde comparou-se as bandas de proteína resultantes da adição de três diferentes massas de complexo ao SPI na sua concentração original de 2,5% (concentração em que se encontra no processo industrial).

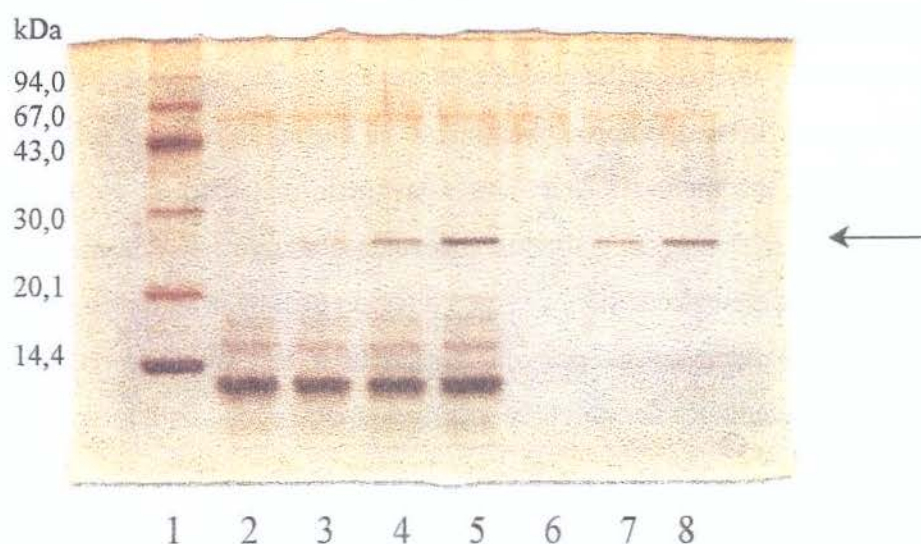


Figura 4.23 – Análise exploratória das concentrações de complexo em solução de SPI detectáveis através da técnica eletroforese SDS-PAGE. Amostras de efluente SPI e complexo aprotinina-tripsina em diferentes concentrações, com fator de diluição de 125. Os volumes de amostra aplicados nas faixas 2 a 8 foram de 10 μ l. **Faixa 1**, marcador de massa molecular (fosforilase b, 94,0 kDa; albumina bovina, 67,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e α -lactoalbumina, 14,4 kDa); **faixa 2**, solução de SPI 2,5% ; **faixa 3**, solução de SPI 2,5% com adição de complexo a 0,3 mg/ml; **faixa 4**, solução de SPI 2,5% com adição de complexo a 1,0 μ g/ml; **faixa 5**, solução de SPI com adição de complexo a 3,0 mg/ml; **faixa 6**, complexo a 0,3 mg/ml; **faixa 7**, complexo a 1,0 mg/ml e **faixa 8**, complexo a 3,0 mg/ml. A seta indica a posição da banda de tripsina formadora de complexo aprotinina-tripsina.

A partir desta análise verificou-se que para uma boa identificação da presença de complexo através da banda de tripsina, originária do complexo, era necessária uma concentração de pelo menos 3,0 mg/ml do mesmo na solução de SPI. A proporção de massa protéica de complexo em relação às proteínas do SPI na solução resultante da adição de 3,0 mg/ml de complexo ao efluente é de aproximadamente 1:3, uma vez que a solução deste a 2,5 % possuía aproximadamente 10 mg/ml de massa protéica.

Na realização de “spiking” fez-se a adição de complexo numa proporção maior que a determinada anteriormente, 1:1 (adição de 10 mg/ml de complexo), uma vez que durante etapas de adsorção e dessorção haveria diminuição na concentração de proteína devido partição entre

fases sólida e líquida o que acarretaria dificuldades analíticas. Na preparação de matriz contendo proteína a ser dessorvida, utilizou-se bateladas com massas de 800 mg de matriz PC-I-Cu²⁺ e 5,0 ml de solução de efluente contendo aproximadamente 10 mg/ml de proteína originária do meio e 10 mg/ml de complexo aprotinina-tripsina. Após lavagem, distribuiu-se em diversas seringas massas de 60 mg de matriz contendo proteína adsorvida e adicionou-se às mesmas 0,75 ml de tampão de dessorção a diferentes condições. Após o tempo de uma hora e meia, recarregou-se as seringas com novos volumes de tampão de dessorção a fim de dessorver proteína ainda remanescente. Os sobrenadantes foram então analisados em termos de concentração proteica e perfil eletroforético.

Na Tabela 4.5 estão apresentadas as recuperações obtidas nas diferentes condições de eluição em termos de porcentagem de proteína dessorvida em relação à proteína adsorvida. Estes resultados mostraram uma maior eficiência da dessorção de proteína quanto mais baixo o pH como verificado anteriormente, na dessorção de complexo adsorvido a partir de solução tampão, sem contudo, ter se alcançado dessorções elevadas na presença de NaCl. A dessorção máxima foi de 64,0% a pH 2,1 sem a presença de NaCl.

Tabela 4.5 – Perfil da dessorção de proteína total da matriz PC-I-Cu²⁺ contendo complexo e impurezas adsorvidas a partir de solução de SPI.

Condição de dessorção	Proteína dessorvida (%)		
	pH 4,0	pH 3,5	PH 2,1
Sem adição de NaCl	8,0	12,0	64,0
Com adição de NaCl	5,0	13,0	51,0

O monitoramento da recuperação de complexo por eletroforese SDS-PAGE está apresentado nas Figuras 4.24 e 4.25. Através da Figura 4.24 observa-se que que nas frações de dessorção sem adição de sal (faixas 6 a 8) não há banda visível referente à tripsina, indicando que não houve dessorção significativa do complexo, apesar da dessorção de espécies protéicas do SPI ter sido eficiente. Na Figura 4.25, onde está apresentado o gel de análise da dessorção na presença de NaCl 1,0 M, a diferença que pode ser notada em relação ao gel anterior, é que

aparecem bandas referentes à tripsina (faixas 6 a 8), comprovando que o complexo é significativamente dessorvido na presença de NaCl 1,0 M.

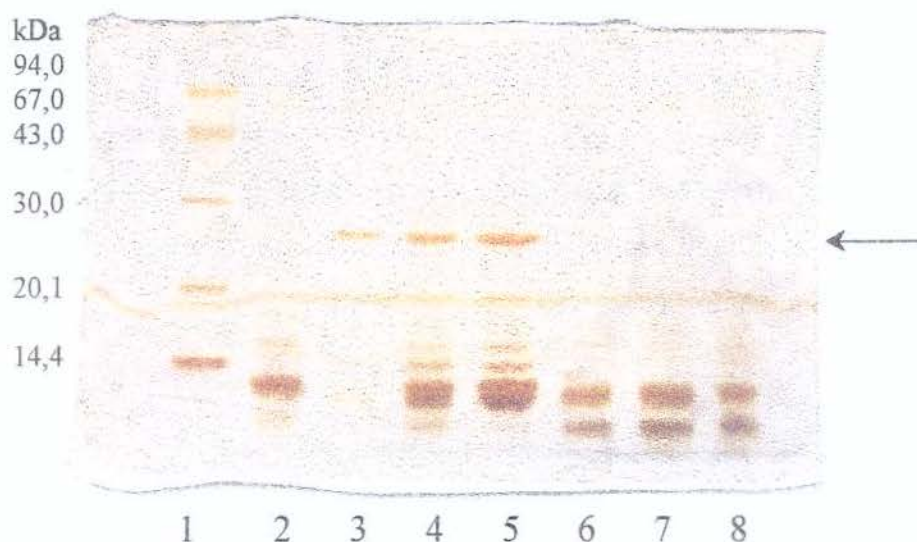


Figura 4.24 – Análise das frações de adsorção e dessorção (sem adição de NaCl) de complexo a partir de SPI. Os volumes de amostra aplicados nas faixas 2 a 8 foram de 15 μ l. **Faixa 1**, marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94,0 kDa; albumina bovina, 67,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e α -lactoalbumina, 14,4 kDa); **faixa 2**, solução de SPI (80,0 μ g/ml); **faixa 3**, solução de complexo (24,0 μ g/ml); **faixa 4**, solução de SPI e complexo antes da adsorção (109,0 μ g/ml); **faixa 5**, solução de SPI e complexo após a adsorção (97,0 μ g/ml); **faixa 6**, fração de dessorção a pH 4,0 (76,0 μ g/ml); **faixa 7**, fração de dessorção a pH 3,5 (98,0 μ g/ml); **faixa 8**, fração de dessorção a pH 2,1 (101,0 μ g/ml). A seta indica a posição da banda de tripsina formadora de complexo aprotinina-tripsina.

Baseando-se no fato da dessorção de impurezas ter sido eficiente sem a adição de NaCl, ao passo que, a dessorção de complexo foi favorecida à 1,0 M em NaCl, levantou-se a possibilidade de dessorção seletiva com eliminação de grande parte de impurezas numa primeira etapa de eluição em baixa concentração do eletrólito e dessorção de, principalmente, complexo numa segunda etapa de eluição em alta concentração do eletrólito. Para verificação experimental desta possibilidade, nova massa de adsorvente foi contactado com solução de SPI contendo complexo

e, após lavagem com tampão de adsorção, distribui-se o adsorvente em seringas onde foram conduzidas as dessorções sem sal, seguidas da dessorção com sal. Na dessorção sem adição de sal, os valores de pH foram de 4,0; 3,5 e 2,1, ao passo que na dessorção com sal, manteve-se o pH em 2,1. A Figura 4.26 apresenta a análise através de SDS-PAGE das frações de dessorção a diferentes valores de pH sem adição de NaCl, acompanhadas das frações de dessorção a pH 2,1 na presença de 1,0 M de NaCl. A eletroforese indicou uma concentração significativa de complexo nas frações de dessorção na presença do sal (faixas 5, 7 e 9), mas no entanto, a presença de impurezas continuou sendo relevante, indicando que a seletividade na dessorção também não foi alta, assim como na adsorção.

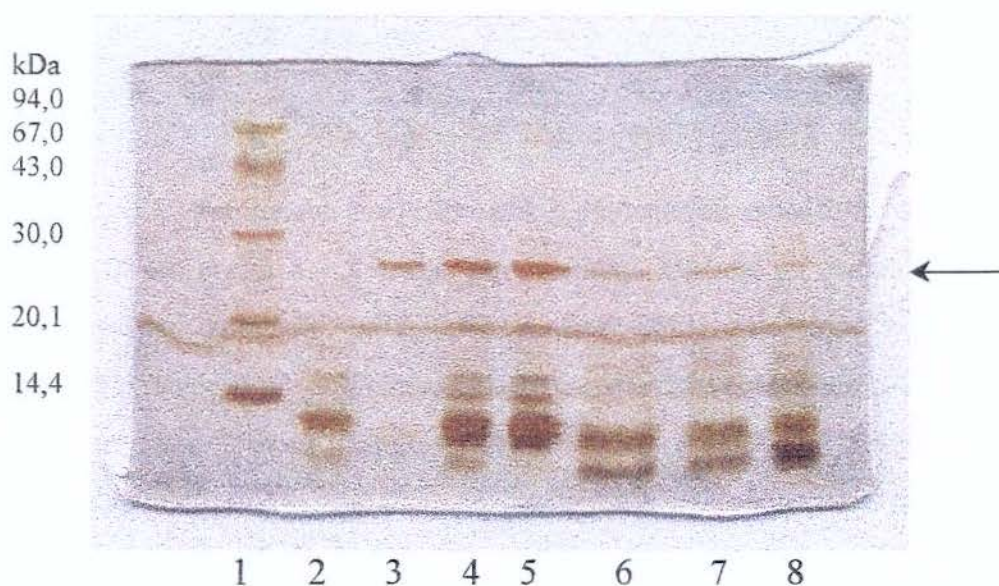


Figura 4.25 – Análise das frações de adsorção e dessorção com adição de sal (1,0 M em NaCl) de complexo a partir de SPI. Os volumes de amostra aplicados nas faixas 2 a 8 foram de 15 μ l. **Faixa 1**, marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94,0 kDa; albumina bovina, 67,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e α -lactoalbumina, 14,4 kDa); **faixa 2**, solução de SPI (80,0 μ g/ml); **faixa 3**, solução de complexo (24,0 μ g/ml); **faixa 4**, solução de SPI e complexo antes da adsorção (109,0 μ g/ml); **faixa 5**, solução de SPI e complexo após a adsorção (97,0 μ g/ml); **faixa 6**, fração de dessorção a pH 4,0 (122,0 μ g/ml); **faixa 7**, fração de dessorção a pH 3,5 (94,0 μ g/ml); **faixa 8**, fração de dessorção a pH 2,1 (93,0 μ g/ml). A seta indica a posição da banda de tripsina formadora de complexo aprotinina-tripsina.

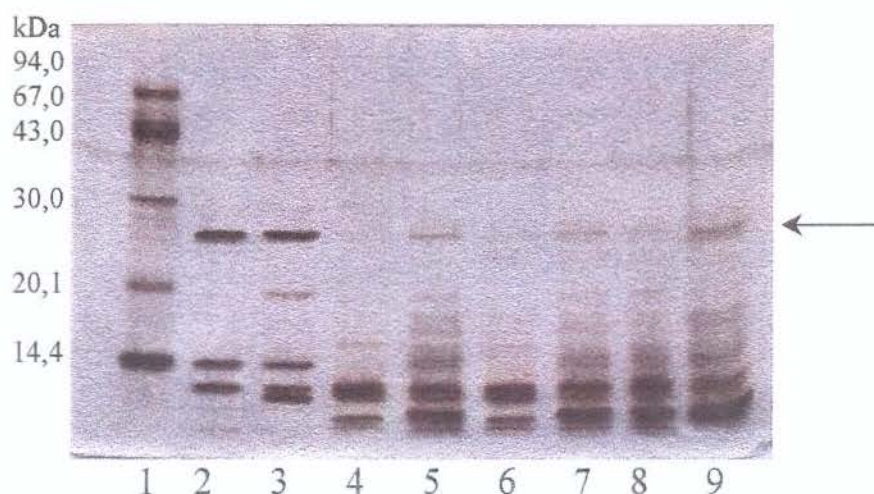


Figura 4.26 – Análise das frações de dessorção sem adição de NaCl seguida de dessorção a 1,0 M em NaCl em pH 2,1. As amostras foram aplicadas em concentração de 100 µg/ml. Os volumes de amostra aplicados foram 8 µl, 10 µl e 12 µl nas faixas 2, 3 e 4 a 9 respectivamente. *Faixa 1*, marcadores de massa molecular (fosforilase b, 94,0 kDa; falbumina bovina, 67,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa; anidrase carbônica, 30,0 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e α -lactoalbumina, 14,4 kDa); *faixa 2*, tripsina; *faixa 3*, complexo; *faixa 4*, dessorção a pH 4,0 sem sal; *faixa 5*, dessorção a pH 2,1 em NaCl 1,0 M após dessorção a pH 4,0 sem sal; *faixa 6*, dessorção a pH 3,5 sem sal; *faixa 7*, dessorção a pH 2,1 e NaCl 1,0 M após dessorção a pH 3,5 sem sal; *faixa 8*, fração de dessorção a pH 2,1 sem sal; *faixa 9*, fração de dessorção a pH 2,1 e NaCl 1,0 M após dessorção a pH 2,1 sem sal. Incluiu-se nesta análise uma faixa com somente tripsina, de modo a certificar de que a enzima se apresenta na forma livre e não complexada, nas frações de adsorção e dessorção. A seta indica a posição da banda de tripsina formadora de complexo aprotinina-tripsina.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

- a) A adsorção de aprotinina em tripsina previamente adsorvida não foi viável devido a tripsina ser deslocada da matriz com a adição do inibidor, passando a formar complexo com este no sobrenadante.
- b) Na adsorção, tanto de tripsina como do complexo aprotinina-tripsina, verificou-se interações não-específicas, do tipo eletrostáticas, ocorrendo em paralelo à interação proteína-metal. As capacidades de adsorção não-específica na adsorção de tripsina nas matrizes PC-I-Cu²⁺ e CSFF-Cu²⁺ foram da ordem de 50% a 70% das capacidades de adsorção total.
- c) Na adsorção do complexo, o pH na faixa de 7,0 a 8,5 não causou efeito significativo nas capacidades de adsorção, mas, no entanto, ocorreu influência pela força iônica: maiores capacidades de adsorção foram obtidas em concentrações mais baixas de NaCl, comprovando-se a presença de interações não-específicas, do tipo eletrostáticas.
- d) Na dessorção de complexo a recuperação foi mais alta em valores de pH baixo e força iônica alta, tendo sido aproximadamente 100% em pH 2,1 na presença de NaCl 1,0 M. A presença do eletrólito foi essencial para a dessorção: na ausência do sal, mesmo a pH 2,1, a recuperação foi de apenas 40%.
- e) A matriz IMAC apresentou capacidade de adsorção de impurezas do SPI, indiferente à variação do pH, influenciada, no entanto, pela presença de NaCl com capacidades de adsorção maiores a baixa força iônica.

- f) A pré-purificação do efluente SPI por adsorção de impurezas na matriz IMAC não apresentou um limite de redução de concentração protéica ao mesmo tempo que reduziu a zero a presença de inibidor no efluente.
- g) Na recuperação de complexo aprotinina-tripsina adicionado ao SPI foi possível alcançar alguma purificação pela dessorção com abaixamento de pH em duas etapas: primeira etapa sem adição de NaCl e segunda etapa com adição deste sal, conforme indicado pelas análises de SDS-PAGE. Houve, no entanto, baixa purificação.
- h) O complexo adsorvido a partir do efluente só foi dessorvido eficientemente a alta força iônica como na dessorção de complexo adsorvido a partir de solução tampão. Houve também neste caso, dessorção significativa de impurezas, que ocorre igualmente a baixa força iônica.

Assim, conclui-se que o princípio básico do processo proposto, recuperação de aprotinina através de IMAC explorando sua interação com tripsina, é viável pelos resultados obtidos com soluções de aprotinina e tripsina em solução tampão. No entanto, sua aplicação ao efluente industrial específico (sobrenadante de efluente industrial de produção de insulina bovina) apresenta sérios entraves devido à baixa seletividade de adsorção e dessorção do complexo devido a: a) complexidade do efluente no tocante a diversidade de proteínas presentes; b) alta capacidade da matriz em adsorver proteínas do efluente e c) intensidade da interação de impurezas do efluente com a matriz muito alta.

5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

A fim de reduzir os problemas de baixa seletividade mencionados anteriormente propõe-se:

- a) Continuação do estudo de pré-purificação do efluente pelo uso da matriz IMAC em condição menos propícia para a adsorção de inibição em termos da concentração de sal (NaCl 1,0 M) uma vez que apesar de perda de inibição na fase líquida, os estudos de pré-purificação realizados mostraram uma redução maior na concentração de proteínas do efluente do que da inibição (aumento da inibição específica de 6 vezes após o 5º estágio de adsorção).

- b) Pré-purificação do efluente através de técnicas diversas. Como exemplo, poderia-se sugerir adsorção por troca iônica que exploraria uma propriedade relativamente extrema da aprotinina: pI elevado, igual a 10,5.
- c) Utilização de metais (tais como cobalto, níquel e zinco) e agentes quelantes que interajam mais fracamente com proteínas.
- d) Utilização de condições de adsorção que reduzam a retenção na matriz IMAC de proteínas de fraca interação, como pela introdução no tampão de imidazol ou histidina.
- e) Dessorção em leito fixo explorando o uso de gradiente de NaCl.

As sugestões “c” e “d” acarretariam em uma menor recuperação de complexo; no entanto, estaria se fazendo a opção por recuperação mais baixa mas com alguma seletividade.

Outro ponto de relevância que auxiliaria no desenvolvimento deste processo seria a produção de anti-corpos contra aprotinina que permitiria a implementação do teste de reconhecimento “Western Blot” para uma detecção mais sensível de aprotinina nas frações de estudo e nas frações do processo industrial em questão (produção de insulina).

CAPÍTULO 6**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ANTONINI, E. e ASCENZI, P. Interactions Between Serine (Pro) Enzymes, and Kazal and Kunitz Inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, **165**, 543-558, 1983.
2. AZZONI, A.R. **Recuperação de Aprotinina a Partir de Efluente do Processamento Industrial de Insulina Através de Adsorção por Afinidade**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1998. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
3. BARTHEL, T. e KULA, M.R. Rapid Purification of Des Pro (2)–Val15-Leu17-Aprotinin from the Culture Broth of a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, **42**, 1331-1336 1995.
4. BAUFRETON, C., VELTHUIS, H.T., JANSEN, P.G.M., BESNERAIS, P.L., WILDVUUR, C.H.R. e LOISANCE, D.Y. Reduction of Blood Activation in Patients Receiving Aprotinin During Cardiopulmonary Bypass for Coronary Artery Surgery. **ASAIO Journal**, **42**, 417-423, 1996.
5. BEITLE, R. e ATAAI, M.M. Immobilized Metal Affinity Chromatography and Related Techniques. **AIChE Symposium Series**, **88**, 290, 34-44, 1992.
6. BODEN, V. Etude de la separation fine des sous-especes de la trypsine et de l'influence d'inhibiteurs sur l'accessibilite de leurs residus histidine par chromatographie d'affinite sur ions metalliques immobilises. Tese de DEA, Université Technologie de Compiègne, França, 1992.
7. BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for a Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, **72**, 248-254, 1976

8. BURCK, P.J. Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitors. **Methods in Enzimology**, 19, 906-914, 1970
9. CARRERA, A., FERNÁNDEZ, P., GARCIA, D.V.S., DE LA QUINTANA, B. e MARTÍNEZ, M.V. Propriedades Farmacológicas de la Aprotinina y Empleo Terapéutico en Cirugía Cardíaca. **Revista Espanhola Anestesiología y Reanimación**, 40, 292-299, 1993.
10. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da UNICAMP, Campinas, 1993.
11. DAVANKOV, V. A. e SEMECHKIN, A. V. Ligand Exchange Chromatography. **Journal of Chromatography**, 141, 313-353, 1977.
12. EL-RASSI, Z. e HORVATH, C. **Journal of Chromatography**, 359, 241, 1986 *apud* WONG, J., ALBRIGTH, R.L. e WANG, N.H.W. **Separation and Purification Methods**, 20, 1, 49-106, 1991.
13. FIGUEROA, A., CORRADINI, C. FEIBUSH, B. e KARGER, B.L. **Journal of Chromatography**, 371, 335, 1986 *apud* WONG, J., ALBRIGTH, R.L. e WANG, N.H.W. **Separation and Purification Methods**, 20, 1, 49-106, 1991..
14. FIORUCCI, L., ERBA, F., FALASCA, L., DINI, L. e ASCOLI, F. Localization and Interaction of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and Tryptase in the Granules of Bovine Mast Cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1243, 407-413, 1995.
15. HUBER, R., KUKLA, D., STEIGEMANN, W., DEISENHOFER, J., e JONES, A. Structure of the Complex Formed by Bovine Trypsin and Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor: Refinement of the Crystal Structure Analysis. **Bayer Symposium V "Proteinase Inhibitors"**, 497-512, 1974.
16. JONHSON, R. e ARNOLD, F.H. Multipoint Binding and Heterogeneity in Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, 48, 437-443, 1995.
17. KASSEL, B., RADICEVIC, M., BERLOW, S., PEANASKY, R.J. e LASKOWSKI, M. The Basic Trypsin Inhibitor of Bovine Pancreas. **The Journal of Biological Chemistry**, 238, 10, 3274-3279, 1963

18. KASSEL, B. Bovine-Kallikrein Inhibitor (Kunitz Inhibitor, Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor, Polyvalent Inhibitor from Bovine Organs. **Methods in Enzimology**, **19**, 844-852, 1970.
19. KATO, Y. NAKAMURA, K. e HASHIMOTO, T. **Journal of Chromatography**, **354**, 511, 1986 *apud* WONG, J., ALBRIGTH, R.L. e WANG, N.H.W. **Separation and Purification Methods**, **20**, 1, 49-106, 1991.
20. KRISHNAN, S. e VIJAYALAKSHMI, M.A. Purification and Some Properties of Three Serine Carboxy-peptidases from *Aspergillus niger*. **Journal of Chromatography**, **370**, 315-326, 1986.
21. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-685, 1970.
22. LAZDUNSKI, M., VICENT, J.P. e SCHWEITZ, H. The Mechanism of Association of Trypsin (or Chymotrypsin) with the Pancreatic Trypsin Inhibitors (Kunitz and Kazal): Kinetics and Thermodynamics of the Interaction. **Bayer-Symposium V "Proteinase Inhibitors"**, 420-431, 1974.
23. MORRYSSEY, J.H. Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: A Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. **Analytical Biochemistry**, **117**, 307-310, 1981.
24. NORRIS, K., NORRIS, F., BJORN, S.E., DIERS, I. e PETERSEN, L.C. Aprotinin and Aprotinin Analogues Expressed in Yeast. **Biological Chemistry Hope-Seyler**, **371**, 37-42, 1990.
25. PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, L. e BELFRAGE, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. **Nature**, **258**, 589-599.
26. PORATH, J. e OLIN, B. Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. **Biochemistry**, **22**, 1621-1630, 1983.
27. PORATH, J. IMAC-Immobilized Metal Ion Affinity Based Chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, **7**, 254-259, 1988.

28. QUERESHI, A., LAMONT, J., BURKE, P., GRACE, P. e BOUCHIER-HAYES, D.
Aprotinin: The Ideal Anti-Coagulant? **European Journal of Vascular Surgery**, **6**,
317-320, 1992.
29. RUTHVEN, D.M. **Principles of Adsorption and Desorption Process**. John Wiley &
Sons, USA, 49-55, 1994.
30. SMALL, D.A.P., ATKINSON, T. e LOWE, C.R. **Affinity Chromatography, Practical
and Theoretical Aspects**, Marcel Dekker Inc., New York, (1985) *apud* WONG, J.,
ALBRIGTH, R.L. e WANG, N.H.W. **Separation and Purification Methods**, **20**, 1,
49-106, 1991.
31. SUH, S.S., VAN DAM, M.E., WUENSCHALL, G.E., PLUNKETT, S. e ARNOLD, F.H.
**ACS Symposium Series, Protein Purification from Molecular Mechanisms to
Large-Scale Processes**. Chapter 10: Novel Metal-Affinity Protein Separations,
139-149, 1985.
32. SULKOWISKI, E. Purification of Proteins by IMAC. **Trends in Biotechnology**, **3**, 1,
1985.
33. SULKOVSKI, E. The Saga of IMAC and MIT. **BioEssays**, **10**, 5, 170-175, 1989.
34. TSCHECHE, H. Semisynthetic Engineering of Proteinase Inhibitor Homologues.
Biochimica and Biophysica Acta, **913**, 97-101, 1987.
35. VEESLER, S., LAFONT, S., MARCQ, S., ASTIER, J.P., e BOOISTELLE, R.
Prenucleation, Crystal Growth and Polymorfism of Some Proteins. **Journal of
Crystal Growth**, **168**, 124-129, 1996.
36. VICENT, J.P. e LAZDUNSKI, M. Trypsin-Pancreatic Inhibitor Association: Dynamics
of the Interaction and Role of Disulfide Bridges. **Biochemistry**, **11**, 16, 2967-2977,
1972.
37. VIJAYALAKSHMI, M.A. Affinity Chromatography and Biological Recognition (I.M.
Chaiken et al., eds.), Academic Press, Inc., New York, 269 (1983) *apud* WONG, J.,
ALBRIGTH, R.L. e WANG, N.H.W. **Separation and Purification Methods**, **20**, 1,
49-106, 1991.

38. VIJAYALAKSHMI, M.A. Pseudobiospecific Ligand Affinity Chromatography. **Trends in Biotechnology**, 7, 3, 71-76, 1989.
39. VUNNUM, S., GALLANT, S.R., KIM, Y.J. e CRAMER, S. Immobilized Metal Affinity Chromatography: Modeling of Nonlinear Multicomponent Equilibrium. **Chemical Engineering Science**, 50, 11, 1785-1803, 1995.
40. WONG, J., ALBRIGTH, R.L. e WANG, N.H.W. **Separation and Purification Methods**, 20, 1, 49-106, 1991.
41. ZIELENKIEWICZ, P., GEORGALIS, Y. e SAENGER, W. Self-Association of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor: Specific or Nonspecific? **Biopolymers**, 31, 1347-1349, 1991.