

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE
APROTININA A PARTIR DE EFLUENTE INDUSTRIAL CENTRADO EM
CROMATOGRAFIA EM QUIMOTRIPSINA IMOBILIZADA

Eng^a. Ana Carolina Barros de Genaro

Aluna

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

Agosto de 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Ranold 3:34

UNIDADE	Be
L ^o CHAMADA:	T/Unidcamp
	G.285d
	Ex.
OMBO BC/	42564
ROC.	161278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REC	R\$ 11,00
DATA	30/10/00
L ^o CPD	

CM-00144297-B

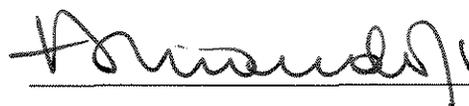
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

G285d Genaro, Ana Carolina Barros de
Desenvolvimento de processo de recuperação de aprotinina a partir de efluente industrial centrado em cromatografia em quimotripsina imobilizada / Ana Carolina Barros de Genaro.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1. Hidroxiapatita. 2. Inibidores enzimáticos proteolíticos.
3. Cromatografia de afinidade. 4. Proteínas - Purificação.
I. Miranda, Everson Alves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Esta versão corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng^a Ana Carolina Barros de Genaro e aprovada pela Comissão Julgadora em 15 de agosto de 2000.



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

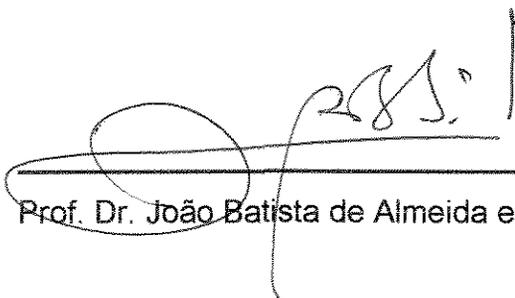
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 15 de agosto de 2000
pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof. Dr. Everson Alves Miranda
Orientador



Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno



Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

“Buscai a sabedoria como a prata, se a pesquisares como um tesouro então compreenderás o temor ao Senhor, porque é Ele quem dá a sabedoria e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência”

Prov 2, 4-6

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, princípio e fonte de toda a sabedoria.

Aos meus pais e a minha irmã pelo amor, incentivo e dedicação constantes, que tanto me apoiaram em todos os momentos, sou eternamente agradecida!

À minha avó, tão querida, que com sua bondade, carinho e seu imenso amor a Deus me orientou em quais caminhos percorrer.

Ao Vinícius, pela paciência e incentivo durante o transcurso deste meu trabalho, e pela disposição ao me ajudar nos experimentos laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda que se revelou não somente orientador, mas um amigo sempre prestativo e atuante, me ajudando nas várias etapas do trabalho sugerindo e orientando.

À Prof. Dra. Sônia Alves Bueno, pelas tão úteis sugestões que enriqueceram e ajudaram na finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana, por ter permitido o uso de seus equipamentos, bem como de seu laboratório.

Aos amigos, novos e antigos, e aos companheiros de laboratório, que proporcionaram o dia-a-dia do trabalho mais agradável: Adriano, Alessandro, Ana Paula, Carla, Cleide, Christiane Saraiva, Cristiane Evelise, Cristiane Farinas, Daniela, Eduardo, Elaine, Elcimar, Eliana, Fábio, Fabíola, Fânia, Karla, Líbia, Luciana, Luís, Patrícia, Rosana, Salah, Samantha, Oselys e Victor.

À Biobrás S/A pelo apoio prestado no desenvolvimento deste trabalho e pela doação das enzimas, bem como do efluente do processamento de insulina.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma, direta ou indireta colaboraram e possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	01
1.1. Escopo	01
1.2. Aprotinina e suas aplicações	01
1.3. Objetivo	03
2.REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1. Recuperação e Purificação de Proteínas	05
2.2. Cromatografia de Afinidade	06
2.3. Recuperação de Proteínas Através de Cromatografia de Afinidade por Íon Metálico Imobilizado (IMAC)	09
2.4. Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita	11
2.5. Aprotinina: Propriedades, Recuperação e Purificação	17
3.MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Reagentes	23
3.2. Efluente de Processamento Industrial de Insulina Bovina (SPI)	23
3.3. Determinação da Concentração de Aprotinina e Proteína Total	24
3.4. Determinação de Inibição de Tripsina	24
3.5. Determinação de Inibição de Quimotripsina	25
3.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condição Desnaturante (SDS-PAGE)	26

3.7. Análise dos Picos das Cromatografias por "Dot Blot"	27
3.8. Imobilização de Quimotripsina em Gel de Agarose	28
3.9. Preparação da Matriz IMAC	28
3.10. Estimativa da Capacidade de Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita	29
3.11. Determinação do Tempo de Equilíbrio para a Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita	29
3.12. Estudo da Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita Através de Planejamento Estatístico Experimental	30
3.13. Ensaio de Dessorção da Aprotinina em Hidroxiapatita	32
3.14. Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada	33
3.15. Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada seguida de Cromatografia IMAC	34
3.16. Cromatografia em Hidroxiapatita seguida de Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada	35
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Experimentos Preparatórios	37
4.1.1. Determinação de Aprotinina via Inibição de Tripsina	37
4.1.2. Determinação de Aprotinina via Inibição de Quimotripsina	39
4.1.3. Imobilização da Quimotripsina em Gel de Agarose	41
4.2. Primeira Estratégia: Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada	41
4.3. Segunda Estratégia: Cromatografia em Hidroxiapatita seguida de Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada	48

4.3.1. Experimentos Preliminares da Segunda Estratégia: Estudos com Aprotinina de Alta Pureza em Solução Tampão	48
4.3.1.1. Estimativa da Capacidade de Adsorção de Aprotinina pela Hidroxiapatita	48
4.3.1.2. Determinação do Tempo de Equilíbrio para a Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita	50
4.3.1.3. Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita: Efeito de Concentração de NaCl e pH	51
4.3.1.4. Dessorção de Aprotinina em Hidroxiapatita: Seleção de Eluentes	53
4.3.2. Experimentos Finais da Segunda Estratégia: Estudos com Efluente Industrial (SPI)	55
4.4. Terceira Estratégia: Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada seguida de Cromatografia IMAC	59
4.5. Comparação entre as Estratégias Estudadas	65
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS	68
5.1. Conclusões	68
5.2. Sugestões para os Próximos Trabalhos	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMO

A aprotinina é um inibidor de serino-proteases presente em órgãos bovinos, utilizado como composto farmacêutico em operações cirúrgicas e em cultura de células. Atualmente a aprotinina não é comercialmente produzida no Brasil. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo de recuperação de aprotinina a partir de efluente industrial da produção de insulina bovina (SPI), centrado em cromatografia por quimotripsina imobilizada. Foram estudadas três estratégias: a) cromatografia em quimotripsina imobilizada; b) cromatografia em hidroxiapatita seguida de cromatografia em quimotripsina imobilizada e c) cromatografia em quimotripsina imobilizada seguida de cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado (IMAC) utilizando cobre como ligante. A eficiência do processo foi analisada através ensaios de inibição de tripsina e quimotripsina, "dot blot" e eletroforese das frações cromatográficas. A primeira estratégia resultou na recuperação e purificação de aprotinina, da coluna em quimotripsina imobilizada, principalmente nos valores de pH 4,0 e 3,0, quando realizada dessorção em degrau de pH. Na segunda estratégia inicialmente estudou-se o efeito da influência do pH e concentração de NaCl na adsorção de aprotinina de alta pureza na hidroxiapatita. Um planejamento estatístico experimental indicou como condição de alta eficiência tampão fosfato 1 mM, pH 6,5 e 18 mM de NaCl. Dentre 11 soluções estudadas, cloreto de cálcio 3 mM foi a que apresentou melhores índices de dessorção. Entretanto esta segunda estratégia não foi eficiente quando o SPI foi aplicado ao processamento, provavelmente devido a baixa especificidade da hidroxiapatita frente a aprotinina no meio. A terceira estratégia foi a melhor opção estudada para a recuperação e purificação da aprotinina. IMAC foi eficiente como etapa final da purificação depois da recuperação em quimotripsina imobilizada: fatores de purificação global foram tão altos quanto 952.

Palavras chaves: Aprotinina, Hidroxiapatita, IMAC, Biosseparação, Downstream Processing.

ABSTRACT

Aprotinin is a pharmaceutical compound used in surgeries and tissue cultures, currently not commercially produced in Brazil. It is a serine-protease inhibitor present in bovine organs. The objective of this work was to develop a process for the recovery of aprotinin from industrial effluent of bovine insulin production (SPI), based on affinity chromatography onto immobilized chymotrypsin. Three approaches were used: a) chromatography onto immobilized chymotrypsin; b) chromatography onto hydroxyapatite followed by chromatography onto immobilized chymotrypsin; and c) chromatography on immobilized chymotrypsin followed by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) with copper as the ligand. Efficiency was analysed based on trypsin and chymotrypsin inhibitions, dot blotting, and electrophoresis assays of the chromatographic fractions. The first approach resulted in aprotinin recovery and purification from the chymotrypsin column with pH step elution gradient, mainly at pH 4.0 and 3.0. The second approach was initiated by studying the effects of phosphate buffer solution pH and NaCl concentration on high purity aprotinin adsorption from buffer solutions onto hydroxyapatite. This study was carried out according to a factorial experimental design and indicated 18 mM NaCl and a pH of 6.5 as a high efficiency adsorption condition. Among 11 solutions tested, 3 mM calcium chloride was selected as the best eluent. However, this second approach was not efficient when applied to the processing of SPI probably due to the low specificity of hydroxyapatite towards aprotinin in this medium. The third approach was the best option studied for aprotinin recovery and purification. IMAC was efficient in further purifying aprotinin after its recovery and purification with the chymotrypsin chromatography: overall purification factors were as high as 952.

Keywords: Aprotinin, Hydroxyapatite, IMAC, Biosseparation, Downstream Processing.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Escopo

O escopo deste trabalho é o desenvolvimento, em escala de bancada, de um processo de recuperação de aprotinina, uma proteína com aplicações médico-farmacêuticas de grande valor agregado, através do uso de técnicas de separação específicas de Recuperação e Purificação de Bioprodutos (RPB, ou “Downstream Processing”), visando sua produção em larga escala.

No caso de moléculas com aplicações médico-farmacêuticas, os custos referentes à RPB podem chegar a 80% do custo total de produção, pois o processamento de bioprodutos é complexo e geralmente multietapas, devido a necessidade de obtenção de um produto altamente puro. Portanto estudos visando a redução das etapas de separação, melhorias no processamento e a elevação da pureza final do produto são interessantes, uma vez que tornam o bioproduto mais atraente ao mercado em termos de custo e qualidade.

Este trabalho visa dar continuidade ao estudo de recuperação de aprotinina desenvolvido por Azzoni e Miranda (1999) no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos-FEQ-UNICAMP, a fim de aumentar a pureza do produto obtido.

1.2. A Aprotinina e Suas Aplicações

A aprotinina é um inibidor específico de serino-proteinases de origem bovina também chamada de “basic” ou “bovine pancreatic trypsin inhibitor” (BPTI), isolada pela primeira vez por Kunitz e colaboradores em 1936. Por ser de

estrutura molecular bastante simples, cadeia polipeptídica única de 58 resíduos de aminoácidos, a aprotinina é considerada uma molécula modelo para estudos sobre conformações protéicas e interações proteína-proteína (Tscheche *et al.*, 1987). Possui ação inibidora sobre variada gama de serino-proteinases como tripsina, quimotripsina, plasmina, uroquinase e calicreína e, devido a esta propriedade, a aprotinina tem sido utilizada na proteção de proteínas recombinantes contra a ação de proteinases como aquelas produzidas por cultura de células de mamíferos (Norris *et al.*, 1990).

Alguns estudos foram realizados nas décadas de sessenta e setenta utilizando aprotinina no tratamento de casos agudos de pancreatite e em cirurgias cardíacas (Tice *et al.*, 1964). Porém, neste último caso, os resultados não demonstraram efeito significativo, porque a droga foi usada em doses baixas para o tratamento da hemorragia, não na sua profilaxia, como nos dias atuais. Recentemente, a aprotinina tem sido utilizada com sucesso em cirurgias em que o uso de circulação extra-corpórea (CEC) se faz necessário. Este tipo de cirurgia, quase invariavelmente, é acompanhado por uma peculiar tendência ao sangramento que, em muitos casos, pode persistir e ocasionar perdas sanguíneas volumosas. A administração profilática da aprotinina com o objetivo de atenuar o sangramento associado a CEC foi primeiramente proposto por Van Oeveren e colaboradores (1987). Constatou-se que a aplicação de agentes antifibrinolíticos na CEC, como a aprotinina, durante a cirurgia é capaz de diminuir sensivelmente as perdas no pós-operatório (Elias e Souza, 1998). A aprotinina também é indicada como fármaco em cirurgias de próstata, cardíacas e patologias de origem obstétrica que acarretam condições de sangramento, como rompimento da placenta (Informativo TrasyloI- Bayer).

Por ser encontrada muito diluída nos tecidos e órgãos bovinos, sua fonte natural, a aprotinina é um fármaco de alto valor agregado, alcançando valores de mercado acima de US\$ 3000,00/g (preço FOB, EUA), despertando assim o interesse de vários grupos de pesquisa em recuperá-la seja de fontes naturais ou recombinantes.

O Brasil, país possuidor do quarto rebanho bovino mundial, apesar da disponibilidade de material, não produz aprotinina. Pretende-se, assim, com este trabalho, contribuir para o estudo da viabilidade em produzir esta proteína a partir de órgãos bovinos ou de efluentes do processamento industrial destes. Além disso, o conhecimento gerado nestes estudos tem também potencial de ser aplicado no processamento de aprotinina a partir de fontes recombinantes.

1.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho era desenvolver um processo de recuperação de aprotinina, a partir de efluente de processamento industrial de insulina bovina, baseado no processo de dupla adsorção de afinidade (adsorção seqüencial em tripsina e quimotripsina imobilizadas) desenvolvido por Azzoni e Miranda (1999).

Este estudo teve inicialmente duas abordagens: eliminação da primeira cromatografia por afinidade (cromatografia em tripsina imobilizada) ou a sua substituição por cromatografia por adsorção em hidroxiapatita. Durante o desenvolvimento desta pesquisa, incluiu-se também a cromatografia de afinidade em quelato metálico (IMAC) como etapa final de purificação de aprotinina, motivados pelos resultados obtidos por um integrante do nosso grupo que utilizou esta técnica na recuperação de aprotinina a partir de milho transgênico, chegando à pureza acima de 95%.

Como etapas do trabalho foram propostas:

1. Estudo de adsorção de aprotinina pura em hidroxiapatita visando a estimativa da capacidade e determinação de tempo de equilíbrio de adsorção.
2. Estudo sobre o efeito do pH e força iônica na adsorção e dessorção de aprotinina pura em hidroxiapatita através de técnicas de planejamento estatístico experimental.
3. Processamento do efluente industrial utilizando apenas uma coluna de adsorção (coluna com quimotripsina imobilizada) aplicando as mesmas condições de adsorção e dessorção determinadas por Azzoni e Miranda (1999).

4. Processamento do efluente industrial em duas etapas (utilizando hidroxiapatita seguida de quimotripsina imobilizada)
5. Processamento do efluente industrial em duas etapas utilizando IMAC como etapa final da recuperação.
6. Implantação do ensaio de "Dot Blot" para a detecção de aptotina por interação com anticorpo específico

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

Este ítem descreve sucintamente os conceitos básicos das técnicas empregadas neste trabalho juntamente com informações relevantes retiradas da literatura, tais como: fundamentos de purificação de proteínas, cromatografia de afinidade, adsorção em hidroxiapatita, recuperação de proteínas através de afinidade por quelato metálico, propriedades e recuperação da aprotinina.

2.1. Recuperação e Purificação de Proteínas

Uma das características da Biotecnologia é a variedade de produtos que pode gerar. Essa diversidade possibilita um grande espectro de métodos de separação de bioprodutos que podem ser empregados para que se atinja um produto de acordo com os requeridos graus de concentração e pureza. A escolha e seqüência das técnicas de separação a serem utilizadas são muito importantes a fim de minimizar as perdas e aumentar o rendimento e produtividade, pois muitos dos custos da RPB provêm da perda de rendimento e ineficiência nas múltiplas operações de separação.

Os vários métodos de separação de proteínas baseiam-se nas diferenças das propriedades físicas, químicas e funcionais das proteínas. As principais propriedades exploradas são carga, tamanho, hidrofobicidade, hidrofiliçidade forma e função. Um dos sistemas de separação mais empregados é a cromatografia, devido à seletividade (Belter *et al.*, 1988).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes entre duas fases (fase móvel, que contém solubilizados nela o produto de interesse e impurezas, e a fase estacionária, a matriz adsorvente) que estão em contato íntimo. Durante a passagem da fase móvel, sobre a fase estacionária, alguns dos componentes da mistura são retidos seletivamente na fase estacionária, separando-os dos demais. Esta retenção ocorre devido a interações entre a biomolécula de interesse e o adsorvente ocasionado pela diferença de propriedades entre esta biomolécula e os demais componentes da mistura.

2.2. Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade é uma técnica largamente utilizada para a separação de proteínas, devido à sua alta seletividade. A utilização de técnicas de alta resolução, como as baseadas em afinidade, minimiza o número de etapas, reduzindo os custos fixos e operacionais. Neste método ligantes são imobilizados em matrizes sólidas e adsorvem o produto desejado, permitindo a passagem dos outros componentes, promovendo altas purificações. Em muitos casos, a cromatografia é um poderoso método de separação, particularmente quando a proteína de interesse é o componente minoritário da mistura (Janson e Rydén, 1989).

Os princípios básicos da cromatografia de afinidade podem ser resumidos em quatro etapas: adsorção, lavagem, eluição e regeneração (Figura 2.1). Em linhas gerais, na adsorção ocorre a interação e retenção da biomolécula de interesse na fase sólida, enquanto os demais componentes da mistura não ficam retidos, pois não tem afinidade com o adsorvente. Na lavagem há a passagem de tampão de adsorção pela matriz para a remoção de moléculas na fase líquida nos vazios da coluna e das partículas e também moléculas que estão fracamente adsorvidas por interações não-específicas. Na eluição se dá a dessorção da biomolécula de interesse devido a alteração das condições do meio, principalmente variações na força iônica ou pH, que tornam o complexo biomolécula-ligante menos estável. Finalmente, a regeneração é a etapa em que

ocorre a recuperação do adsorvente para utilização em um novo ciclo por meio de lavagem com tampão específico.

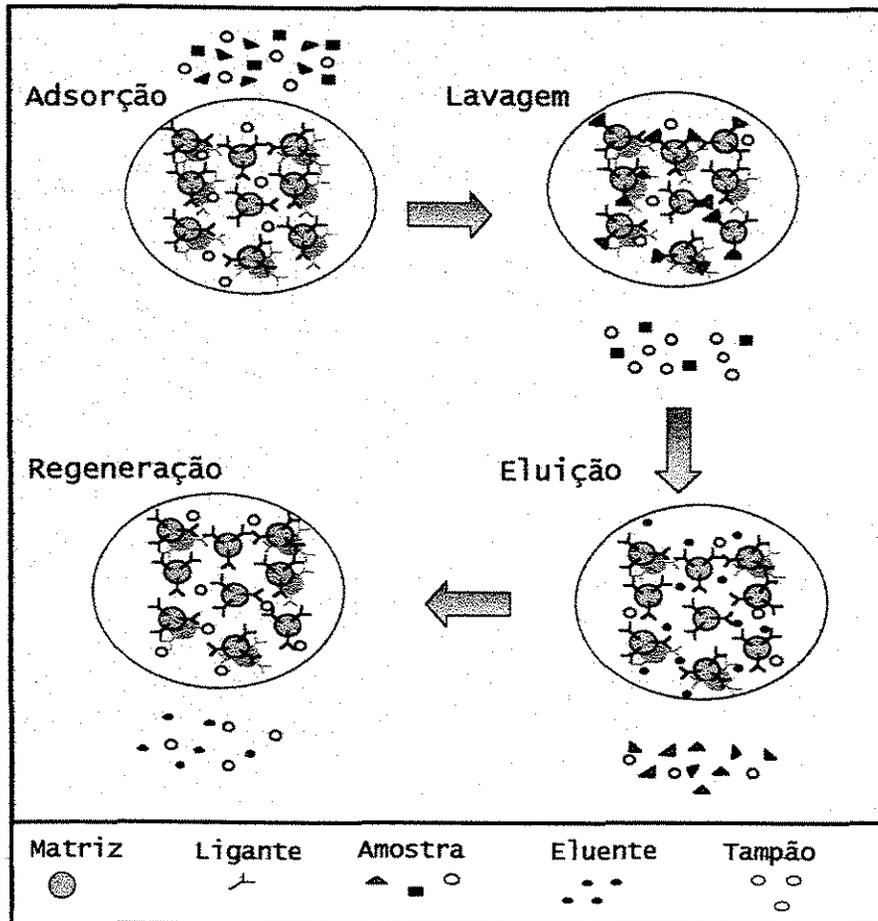


Figura 2.1- Representação esquemática das etapas da cromatografia de afinidade

O bom desempenho de uma cromatografia depende da seleção adequada do suporte adsorvente, do ligante, das condições de imobilização e das condições de retenção e eluição das biomoléculas em questão; assim, a escolha do adsorvente e do ligante é de fundamental importância para o sucesso na purificação (Collins *et al.*, 1993).

As características desejadas em um adsorvente são: macroporosidade (para acomodar moléculas de grande massa molecular, bem como os ligantes), hidrofiliicidade (facilitar a penetração da fase líquida e não favorecer interações de caráter hidrofóbico não específicas), funcionalidade adequada para permitir grande variedade de reações químicas de acoplamento de ligantes, estabilidades química e física, além de baixo custo (Belter *et al.*, 1988).

Quanto ao tipo de interação entre o ligante e a biomolécula, esta pode ser bioespecífica ou pseudobioespecífica. Sistemas bio ou pseudobioespecíficos são regidos pelas mesmas interações: complementaridade da carga, hidrofobicidade e forma entre ligante e biomolécula, diferenciando-se somente pela magnitude das forças envolvidas. As interações bioespecíficas geralmente propiciam maior seletividade, devido a maior especificidade das interações (Vijayalakshmi, 1989). Uma classificação das várias técnicas de cromatografia de afinidade baseada nos diversos tipos de ligantes utilizados é representada a seguir (Figura 2.2).

Os ligantes bioespecíficos mais conhecidos são anticorpos, substratos, cofatores e outras moléculas que sejam reconhecidas especificamente pela biomolécula de interesse, em geral tal e qual na sua função biológica *in vivo*. Já os ligantes pseudobioespecíficos podem ser moléculas orgânicas ou inorgânicas tais como aminoácidos, ligantes hidrofóbicos, corantes e íons metálicos.

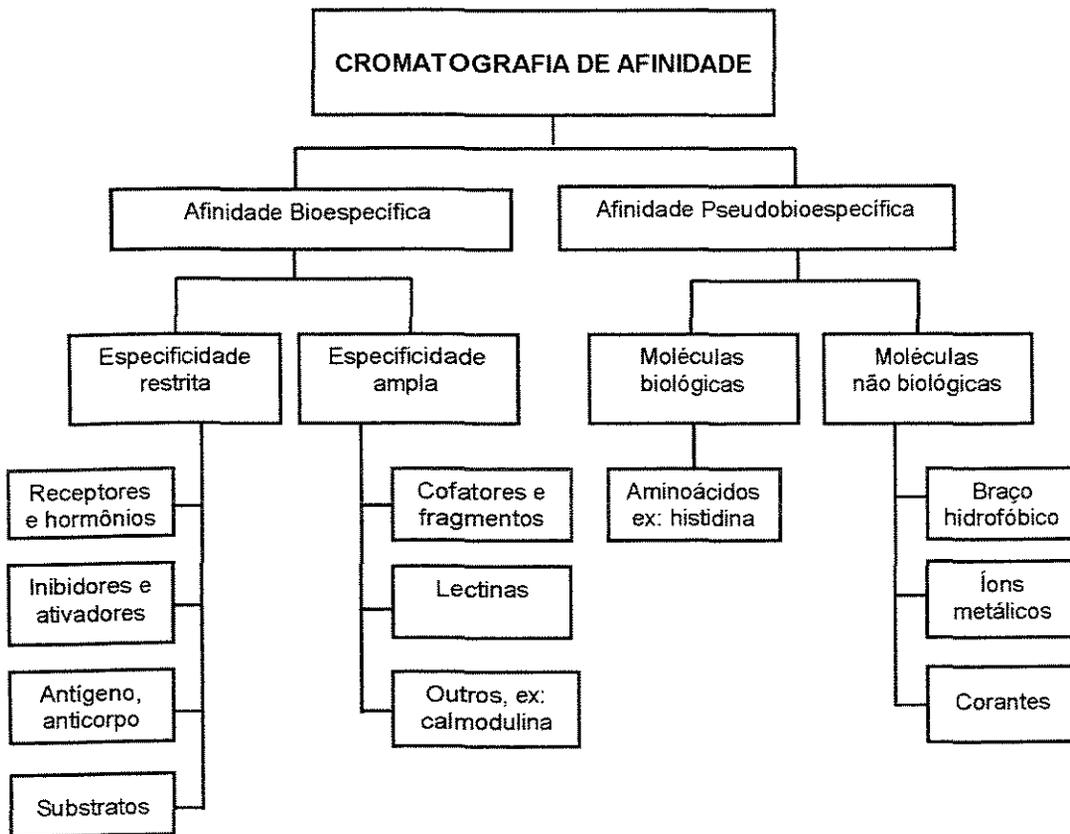


Figura 2.2- Diagrama com a classificação das cromatografias de bioafinidade e pseudobioafinidade (Vijayalakshmi, 1989).

Apesar dos ligantes bioespecíficos apresentarem maior seletividade frente os ligantes pseudobioespecíficos, estes apresentam menor custo e maior estabilidade química e microbiológica (Vijayalakshmi, 1989).

2.3. Recuperação de Proteínas Através Cromatografia de Afinidade por Íon Metálico Imobilizado (IMAC)

O termo cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado foi primeiramente introduzido por Porath *et al.* (1975), que observou que moléculas de proteína eram capazes de se ligar à íons metálicos promovendo uma purificação através de interações por afinidade; esta técnica ficou conhecida como IMAC-“Immobilized Íon Metal Affinity Chromatography”. O uso de agente quelante para imobilizar um íon metálico num suporte sólido restringe o grau de liberdade entre o complexo proteína-metal, evitando a desnaturação da proteína e mantendo a sua atividade enquanto promove a separação e purificação (Wong *et al.*, 1991).

Basicamente os aminoácidos que participam das interações em IMAC são histidina, devido ao par de elétrons do nitrogênio anel imidazol presente em sua estrutura, cisteína, devido ao grupamento tiol, e triptofano devido ao anel indol. No entanto o triptofano promove uma retenção fraca da proteína com o metal e sua contribuição é considerada pequena quando comparada com a da histidina. Atualmente já existem técnicas em que a seqüência de aminoácidos da proteína é modificada ou aumentada a fim de tornar a interação com o metal não apenas possível, mas intensificada, inserindo-se certos aminoácidos nas extremidades terminais das proteínas (Beitle e Ataaí, 1992). Esses aminoácidos interagem devido a uma coordenação entre um par de elétrons do grupamento aminoácido e o metal, porém sabe-se que há outros tipos de interação presentes no sistema. Normalmente o quelato metálico imobilizado se encontra bastante solvatado por moléculas de água possuindo assim elevado número de grupos hidroxila ao seu redor. No caso de matrizes com o quelante ácido iminodiacético (IDA) e íon cobre como ligante, o quelato apresenta uma rede de cargas negativas, sugerindo a participação de interações eletrostáticas ou indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos carregados positivamente na associação da proteína

com o quelato (Vijayalaxmi, 1989). A interação proteína-metal também pode ser afetada por uma variedade de variáveis como pH, temperatura, tipo e concentração de sal, natureza do metal imobilizado, densidade do ligante e tamanho da proteína (Wong *et al.* 1991).

O suporte do quelante também pode ser constituído de membranas porosas, geralmente de celulose, que são sistemas simples e de baixo custo. Os íons metálicos mais utilizados são Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+} . Quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os quelatos formados entre o suporte e os íons metálicos, porém mais fraca é a interação do metal com a proteína. Portanto, o agente quelante deve ser tal que proporcione uma estabilidade do complexo com o metal, mas também disponibilize sítios livres de coordenação para viabilizar a ligação com a proteína. Os agente quelantes mais utilizados são ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), tetraetilenopentamina (TEPA) e tris carboximetil etilenodiamina (TED). Uma representação esquemática do complexo formado entre o agente quelante, metal e proteína está indicada na Figura 2.3.

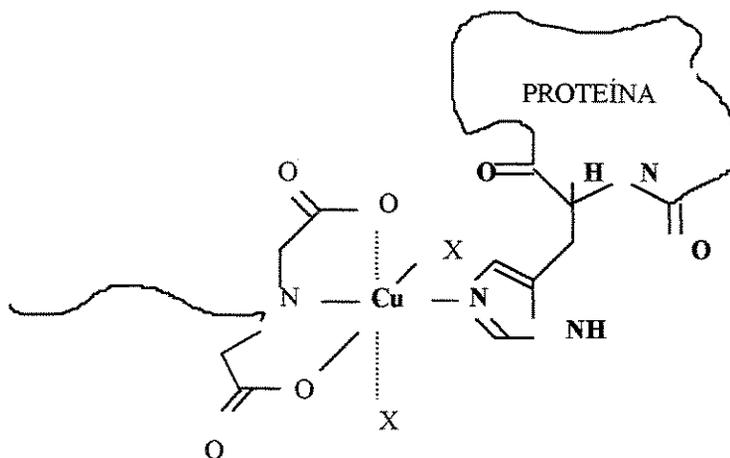


Figura 2.3- Representação esquemática da interação proteína-IDA- Cu^{2+} . X: sítio de coordenação do metal, susceptível de ligação com a proteína.

A adsorção de proteínas em IMAC geralmente é realizada na faixa de pH entre 6,0 e 8,0, intervalo em que o grupo doador de elétrons da proteína está desprotonado, para permitir a interação com o metal. Uma variável importante na adsorção é a força iônica, que influencia no tempo de retenção e na capacidade de adsorção da proteína. Assim, altas concentrações de até 4 M de sal são utilizadas, pois evitam interações do tipo não-específicas (Beitle e Atai, 1992).

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

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

Como exemplos, Zhang *et al.* (2000) conseguiram purificar beta-glucuronidase-his(6), a partir de extrato de canola, quase à homogeneidade em uma única etapa cromatográfica utilizando IDA-Co²⁺. Gilbert *et al.* (2000) purificaram quinesina expressa por *Escherichia coli* utilizando um processo em três etapas. Após o rompimento celular, o extrato obtido foi submetido a uma cromatografia IMAC em leito expandido obtendo 90% de pureza.

2.4. Adsorção de Proteínas em Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), é um importante mineral presente na natureza, além de ser o principal constituinte de ossos e dentes. O uso da hidroxiapatita na cromatografia iniciou-se com Tisselius, em 1956, e revelou-se uma ferramenta poderosa na separação de proteínas e ácidos nucleicos devido à forma cristalina especial do fosfato de cálcio, que permite adsorver proteínas

reversivelmente (Boschetti, 1994). Apesar da hidroxiapatita ser bastante utilizada para separação de proteínas, seu mecanismo de ação não é completamente compreendido. Sabe-se, porém, que os princípios da cromatografia por troca iônica não podem ser aplicados (Bernardi, 1971a).

Moléculas de pequena massa molecular são fracamente retidas em colunas de HA e polipeptídeos de várias massas moleculares conseguem se ligar à coluna devido a carga total da molécula. A carga sozinha não é uma condição suficiente para a retenção: o pH e a força iônica são parâmetros que também influenciam na retenção. Para uma dada força iônica, o processo de adsorção-dessorção é dependente do pH e para um dado pH, o processo depende da força iônica. Geralmente, um aumento do pH torna o eluente mais efetivo (Gorbunoff, 1984).

A hidroxiapatita possui dois sítios de adsorção diferentes: o sítio C, carregado positivamente com íons Ca^{2+} , e o sítio P, carregado negativamente com íons PO_4^{2-} . O sítio com função de trocador de ânions é o sítio C, e o sítio com função de trocador de cátions é o sítio P. Assim, a proteína pode ser adsorvida na superfície da hidroxiapatita de duas maneiras distintas: a molécula é adsorvida no sítio C através dos grupos carboxil ou grupo fosfato no caso de uma fosfoproteína, ou, numa segunda opção, pode ser adsorvida no sítio P utilizando-se do grupo amino. Proteínas ácidas são adsorvidas preferencialmente no sítio C e as básicas preferencialmente no sítio P (Kawasaki, 1991). A geometria dos sítios C e P também é importante no mecanismo de interação HA-proteína, ou seja, proteínas com variadas distâncias entre os sítios de adsorção devem eluir com volumes de retenção diferentes.

Bernardi, de 1959 até o início da década de 1970, estudou o comportamento de eluição de biopolímeros como função do ponto isoelétrico, variação do pH do eluente e variações na natureza química dos tampões com o propósito de elucidar os fundamentos do mecanismo cromatográfico da hidroxiapatita (Bernardi, 1971a; Bernardi, 1971b).

Gorbunoff (1984a; 1984b) e Kawasaki (1991) deram continuidade aos trabalhos de Bernardi estudando o comportamento de adsorção e dessorção de proteínas com pontos isoelétricos compreendidos entre 1 e 11, utilizando vários

eluentes (NaPO_4 , NaF , NaCl , NaSCN , MgCl_2 , NaClO_4 e CaCl_2). O mecanismo de interação HA-proteína deduzido por Kawasaki (1991) é parcialmente diferente daquele de Gorbunoff (1984a; 1984b) em relação à participação do íon sódio no processo de adsorção, apesar de se basearem praticamente nos mesmos dados experimentais. Segundo Kawasaki, o íon sódio interfere no mecanismo cromatográfico, ao contrário do que afirmava Gorbunoff.

Kawasaki (1991) propôs um método de separação entre proteínas ácidas (pI menor de 7) de proteínas básicas (pI maior de 7) aplicando duplo gradiente linear de KCl e KP (mistura equimolar de K_2HPO_4 e KH_2PO_4) ou NaCl e NaP (mistura equimolar de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4) a pH 6,8. Este método consiste em se aplicar um gradiente de KCl seguido de uma eluição isocrática com KP, explorando-se os diferentes comportamentos cromatográficos das proteínas ácidas e proteínas básicas. Na separação de proteínas utilizando duplo gradiente, as proteínas básicas são eluídas no primeiro gradiente, referente a KCl, e as proteínas ácidas são eluídas no segundo gradiente, referente a KP.

Com a finalidade de elucidar o mecanismo de interação das proteínas com hidroxiapatita, Gorbunoff analisou a retenção de proteínas em relação ao estado iônico da coluna de hidroxiapatita e o efeito da natureza química dos eluentes sobre o processo de dessorção. Além disso, o comportamento de proteínas com grupos amino e carboxil modificados foi analisado, a fim de se verificar a função dos grupos ácidos e básicos no processo de eluição. Estas modificações foram substituição, anulação e inversão das cargas da proteína.

A substituição dos grupos $-\text{NH}_2$ por cargas positivas não acarretou em nenhuma alteração do comportamento das proteínas estudadas. A anulação da carga positiva não afetou as proteínas ácidas quanto à adsorção, porém, as básicas não ficaram retidas na coluna. Na inversão da carga positiva por uma negativa, as proteínas básicas adquiriram comportamentos ácidos.

Em relação ao grupo $-\text{COOH}$, a substituição das cargas negativas por $-\text{SO}_3\text{H}$ diminuiu a molaridade de eluição das proteínas básicas, enquanto que, para as proteínas ácidas, a afinidade com a coluna diminuiu drasticamente. Com a

anulação da carga, a distinção de comportamentos entre proteínas ácidas e básicas desapareceu.

Gorbunoff examinou também todos os possíveis complexos formados na superfície da hidroxiapatita, considerando que a superfície da coluna possui Ca^{2+} e grupos fosfato capazes de formar complexos iônicos com as proteínas e com os eluentes. As proteínas se ligam aos íons da superfície da hidroxiapatita através dos grupos amino e carboxil, enquanto os eluentes estudados formam os complexos CaPO_4 , CaF , CaOOC , MgOOC e MgPO_4 (desconsiderando-se a estequiometria e considerando que os ânions Cl^- , ClO_4^- , e SCN^- dos eluentes não formam complexos com Ca^{2+}). Uma vez que o Ca^{2+} e o PO_4^{2-} podem ser da coluna ou dos eluentes, fez-se uma comparação da magnitude das constantes de formação dos possíveis complexos formados (Figura 2.4).

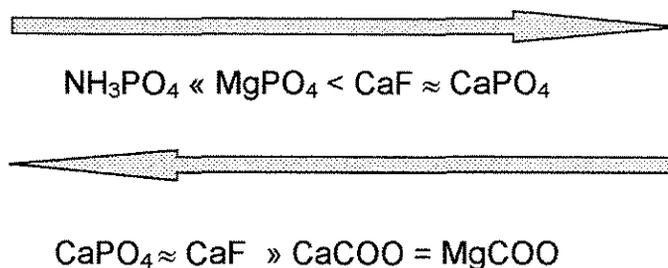
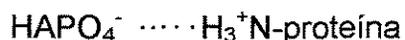


Figura 2.4- Comparação da magnitude das constantes de formação dos complexos formados na superfície da HA baseado em Gorbunoff, 1984b. (nota: desconsiderando a estequiometria, na representação).

Baseado nas constantes de formação dos complexos pode-se observar que o íon Ca^{2+} remove NH_3^+ do fosfato, e o complexo CaOOC pode ser removido por PO_4^{2-} e F^- . Além disso, o íon Ca^{2+} , por complexar com o PO_4^{2-} e COO^- , apresenta a capacidade de formar pontes entre eles.

Com base nestes resultados, Gorbunoff propôs um mecanismo considerando que a adsorção e a eluição não podem ser analisadas como processos inversos, o comportamento de eluição de proteínas básicas difere do das ácidas quando utilizado diferentes tampões e os grupos carboxil e amino das proteínas agem de maneira distinta na adsorção em hidroxiapatita.

O grupo amino atua na adsorção de proteínas em hidroxiapatita como resultado de interações eletrostáticas não-específicas entre a sua carga positiva e a carga negativa da coluna, quando a coluna é equilibrada com tampão fosfato:

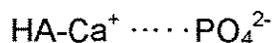


O grupo carboxil atua de duas maneiras: são repelidos eletrostaticamente pela carga negativa da coluna, mas se ligam especificamente por complexação nos sítios C da coluna formando agregados:



Assim, no mecanismo de ligação das proteínas à superfície da HA, os resíduos positivos da proteína sofrem interações não específicas com a HA devido à participação da sua carga positiva; sua estrutura química não influencia no processo (a substituição da carga positiva da proteína, por guanidilação, não afetou na molaridade final de eluição). Os resíduos negativos das proteínas formam complexos com os íons cálcio da superfície da coluna devido à sua estrutura química e carga. Os diferentes tipos de interação estão representados na Figura 2.5.

Dependendo da natureza do tampão de equilíbrio, o estado iônico da coluna de HA pode variar. Quando o tampão fosfato é usado para equilibrar a coluna, a superfície da HA fica negativa, devido à formação dos complexos



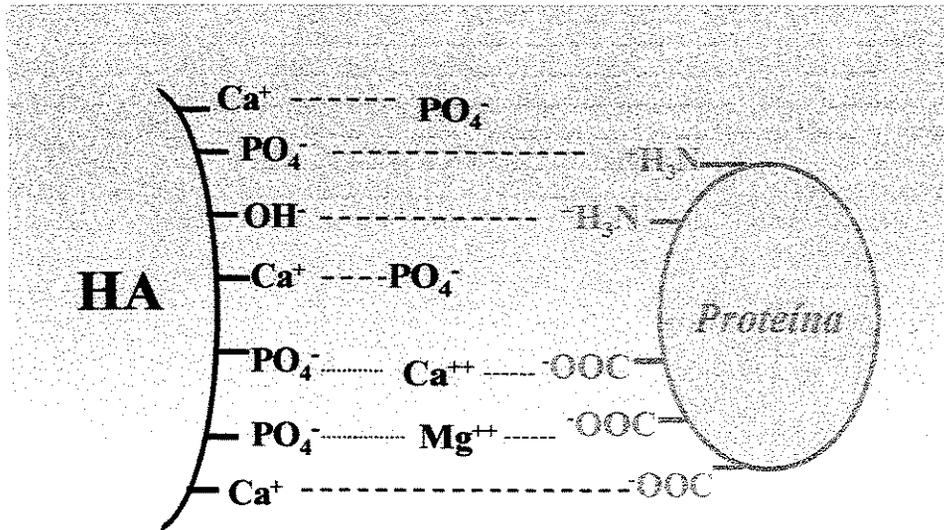


Figura 2.5-Representação esquemática das possíveis interações entre os resíduos protéicos carregados e a hidroxiapatita baseado em Gorbunoff, 1984.

No caso do uso dos tampões CaCl_2 e MgCl_2 , a superfície adquire características positivas e com NaCl a superfície da coluna adquire característica neutra. Ao realizar experimentos cromatográficos utilizando colunas de hidroxiapatita, Gorbunoff (1984) estabeleceu algumas regras de carregamento e eluição das proteínas:

- Proteínas básicas são rapidamente eluídas por Ca^{2+} e Mg^{2+} ao passo que proteínas ácidas são fortemente retidas na coluna mesmo em concentrações de até 3 M.
- Proteínas com pI entre 7 e 8 não são eluídas por Ca^{2+} , mas sim por Mg^{2+} em concentrações acima de 1 M.
- Proteínas ácidas não são eluídas por Cl^- , enquanto proteínas básicas são facilmente eluídas por este íon com concentrações compreendidas entre 0,1 e 0,3 M.
- Proteínas ácidas são eluídas por F^- e PO_4^{2-} em concentrações mais baixas do que as necessárias para eluir proteína básicas.

2.5. Aprotinina: Propriedades, Recuperação e Purificação

A aprotinina é uma proteína de pequena massa molecular que possui a propriedade de inibir serino-proteinases (proteinases, em sua maioria de origem animal, que possuem os aminoácidos Ser, His e Asp no sítio ativo, responsáveis por sua ação catalítica).

Os 58 resíduos de aminoácidos da aprotinina (Figura 2.6) resultam em uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de 6,5 kDa e estrutura tridimensional bem compacta (29 x 19 Å, Informativo Trasylol - Bayer) sendo estável tanto a extremos de temperatura como pH, devido a presença de três pontes de dissulfeto.

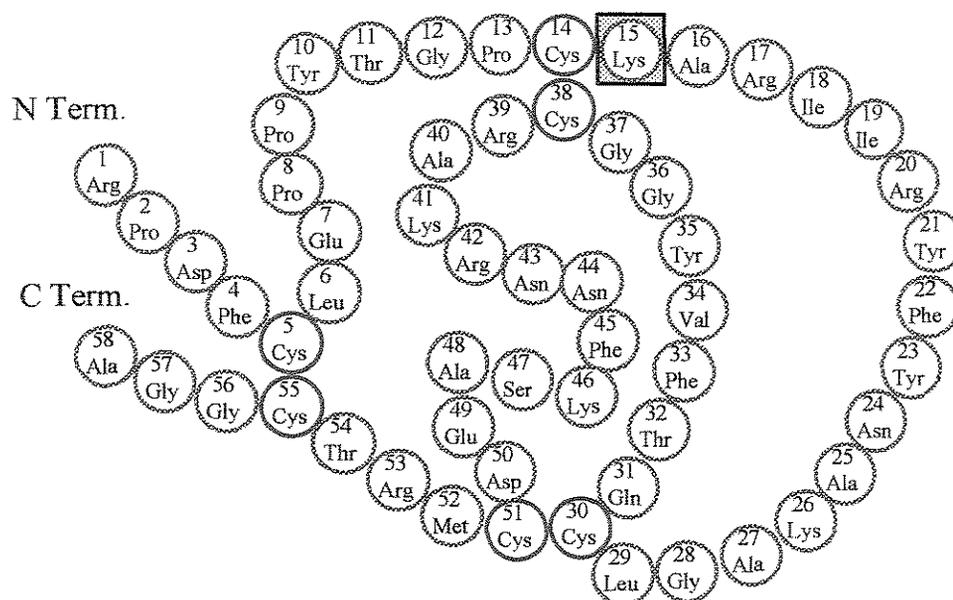


Figura 2.6- Representação da molécula de aprotinina (Informativo Trasylol-Bayer).

A aprotinina 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 de inibição permanece constante por 24 horas a temperatura ambiente em pH 12,6, porém esta atividade sofre um decréscimo em pH 12,8. Sabe-se também que a aprotinina não é inativada em soluções contendo pepsina, elastase,

carboxipeptidase A ou B, papaína entre outras enzimas, inclusive de origem bacteriana (Kassel, 1970).

A composição dos aminoácidos da aprotinina (Tabela 2.1) mostra a existência de 10 resíduos básicos (6 argininas e 4 lisinas) contra 4 resíduos ácidos (2 resíduos de ácido aspártico e 2 resíduos de ácido glutâmico), o que lhe confere características básicas: o seu ponto isoelétrico situa-se entre 10,0 e 10,5. A aprotinina é solúvel em água, metanol 70%, etanol 70% e acetona 50%.

O tempo necessário para o início da ação antifibrinolítica da aprotinina no corpo humano é de 0,7 horas e é rapidamente excretada do corpo humano, o término de seu efeito se dá após 7 horas de aplicação (Informativo Trasylol-Bayer).

Tabela 2.1- Composição dos aminoácidos da molécula de aprotinina (Informativo Trasylol- Bayer)

<i>Aminoácidos</i>	<i>Resíduos por molécula</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Resíduos por molécula</i>
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

O alto potencial da aprotinina como composto terapêutico e a sua aprovação em 1993, pela "Food and Drug Administration" dos EUA confirmam a importância da sua expressão e recuperação. Barthel e Kula (1993) expressaram e purificaram aprotinina de levedura à homogeneidade, com o adicional desta proteína recombinante inibir elastase fortemente, ao contrário da aprotinina natural. A processo de purificação consistiu na passagem por uma coluna de

afinidade, Sepharose 4B ativada com CNBr, com quimotripsina imobilizada e depois por uma coluna trocadora de cátions, obtendo rendimentos de 95 e 49%, respectivamente. A proteína eluída da coluna de troca iônica apresentou uma banda única no gel de eletroforese. Zurek e colaboradores (1996) estudaram a produção de duas variantes de aprotinina em *Hansenula polymorpha* utilizando também adsorção de troca iônica na recuperação de aprotinina, porém em leito fluidizado. Esta levedura metilotrófica foi manipulada geneticamente tornando-se um sistema ideal, segundo os autores, para expressão de proteínas heterólogas, pois aprotinina era excretada quase que exclusivamente, tornando desnecessária a ruptura das células. O eluído da cromatografia de troca iônica em leito expandido foi submetido a uma coluna de HPLC resultando num rendimento de 68% .

Tamagawa (1999) utilizou a técnica de afinidade por quelato metálico (IMAC) na recuperação de aprotinina a partir de efluente industrial do processamento de insulina. Uma vez que a aprotinina não possui resíduos de aminoácidos histidina e cisteína, livres ou acessíveis, e triptofano, essenciais para a utilização da técnica IMAC, a estratégia de recuperação baseou-se na formação do complexo aprotinina-tripsina, esta última com resíduos histidina na estrutura, possibilitando assim a adsorção na matriz IMAC. A estratégia proposta foi viável quando utilizado aprotinina e tripsina em solução tampão, porém sua aplicação ao efluente industrial apresentou vários entraves devido à baixas seletividades de adsorção e dessorção do complexo tripsina-aprotinina ocasionado pelo efluente ser multi-componente, alta capacidade da matriz em adsorver proteínas do efluente e da intensidade da interação de impurezas do efluente com a matriz ser muito alta. Uma vez que a intensidade de interação das impurezas do efluente era alta, avaliou-se uma etapa de pré-purificação do efluente utilizando a própria matriz IMAC num processo reverso (chamado neste trabalho de IMAC reverso), que consistiu na passagem do efluente com a aprotinina não complexada, esperando-se a adsorção das impurezas enquanto a aprotinina não ficaria retida, removendo-se, assim, grande parte das impurezas. No entanto a pré-purificação do efluente não apresentou limite de redução de concentração protéica ao mesmo tempo em que eliminou a presença de inibição no efluente.

Azzoni e Miranda (1999) utilizaram colunas de agarose com tripsina e quimotripsina (bovinas e suínas) imobilizadas na recuperação de aprotinina, a partir do mesmo efluente industrial do processamento de insulina utilizado por Tamagawa (1999). Das enzimas estudadas, tripsina suína e quimotripsina bovina foram os ligantes que apresentaram maior eficiência. A estratégia de recuperação foi a adsorção seqüencial em coluna de afinidade com tripsina imobilizada seguida de coluna com quimotripsina imobilizada. Esta seqüência de adsorção foi escolhida devido à presença de outro inibidor de proteases do pâncreas bovino, o inibidor ácido de tripsina pancreático (APTI), que possui massa molecular, condições ótimas de ligação, constantes de dissociação com a tripsina muito semelhante as da aprotinina, porém a aprotinina possui um ponto isoelétrico bastante distinto, em torno de pH 10,5 e, ao contrário do APTI inibe também quimotripsina. Os efeitos das variáveis pH e força iônica sobre as etapas de adsorção e dessorção de aprotinina foram estudados através de planejamento estatístico experimental e verificou-se que a adsorção de aprotinina em gel com tripsina imobilizada é maximizada a pH 8,7 e baixa força iônica, ao passo que a dessorção é máxima em pH 2,1. Para a adsorção de aprotinina em gel com quimotripsina imobilizada, pH e força iônica não apresentaram efeitos tão sensíveis como apresentados para a tripsina. Contudo, pequeno aumento de capacidade foi verificado em pH 8,0 e força iônica 0,582 M em NaCl. Já a dessorção é maximizada em pH 2,1 e força iônica 0,582 M. A cromatografia em tripsina imobilizada separou uma fração que possuía poder inibitório de tripsina e quimotripsina, que foi a alimentação da segunda cromatografia. Ao passo que a segunda cromatografia separou duas frações onde uma delas possuía poder inibitório apenas de tripsina ("flowthrough"), enquanto a outra (dessorção) inibia tripsina e quimotripsina, assim os autores acreditam que separaram o APTI, que foi co-purificado na coluna de tripsina imobilizada. A aprotinina recuperada neste processo apresentou fator de purificação de 236 para a coluna com tripsina imobilizada e 7 para a coluna com quimotripsina imobilizada.

Zhong e colaboradores (1999) expressaram aprotinina em sementes de milho transgênicas, que apresentaram expressão da proteína até a quarta geração das plantas. A aprotinina purificada possuía mesma massa molecular, seqüência

de aminoácidos, ponto isoelétrico e inibição de tripsina que a aprotinina natural. Nikolov *et al.* (2000) estudaram a recuperação de aprotinina a partir de milho transgênico utilizando adsorção seqüencial em coluna de afinidade e IMAC reverso, obtendo aprotinina com pureza acima de 95%. A cromatografia de afinidade foi realizada com tripsina imobilizada em agarose resultando na separação em uma fração, de aprotinina e um inibidor do milho. A cromatografia IMAC foi utilizada como etapa final da purificação da aprotinina, separando-a do inibidor de tripsina do milho que possui resíduos histidina na sua estrutura e ficava retido na coluna, permitindo a coleta da aprotinina no “ flowthrough”. Um seqüenciamento de aminoácidos da aprotinina recombinante purificada indicou 100% de correspondência com a aprotinina natural.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e reagentes utilizados, além dos procedimentos dos ensaios empregados ao longo do trabalho. Um diagrama de blocos esquematizando as metodologias está apresentado na Figura 3.1.

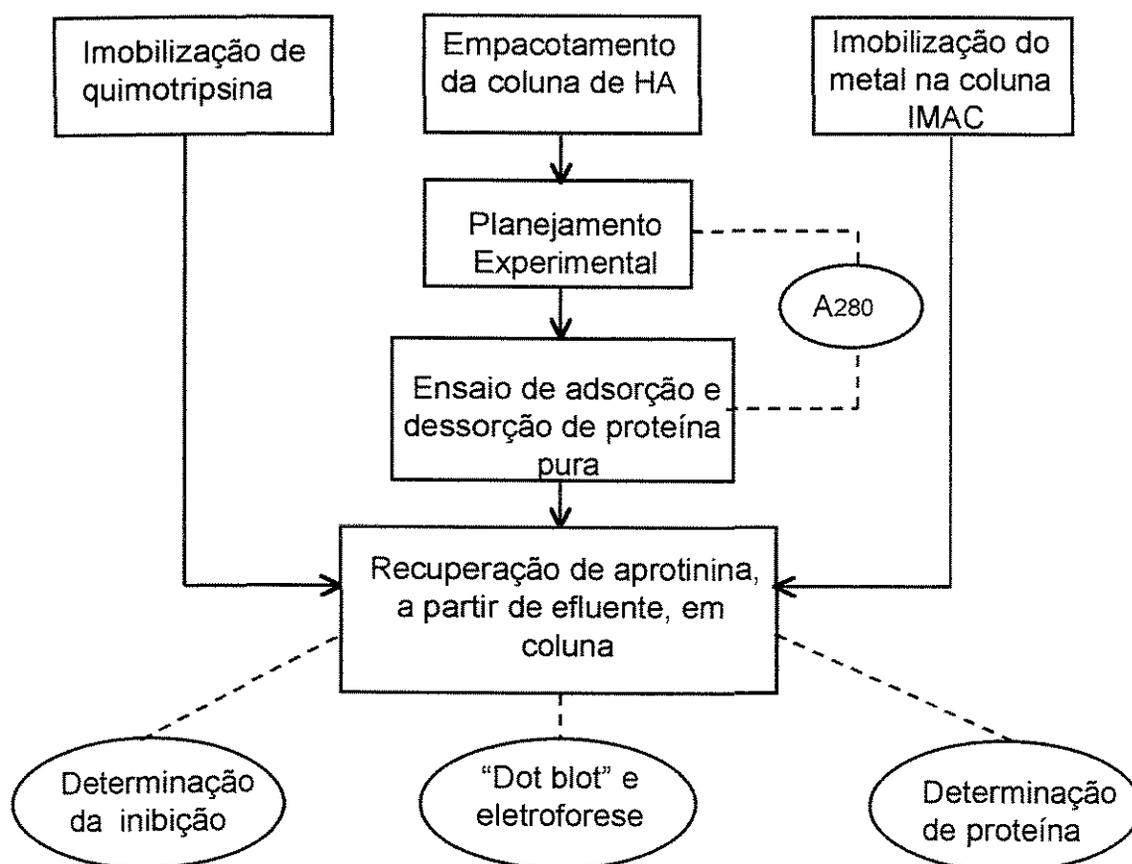


Figura 3.1. Diagrama esquemático das etapas do trabalho e metodologias.

3.1. Reagentes

A aprotinina, proveniente de pulmão bovino, (atividade de 3 a 7 unidades de inibição de tripsina por mg de proteína), os substratos sintéticos para tripsina, N- α -benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA), e para quimotripsina, acetil-tirosina-etil-éster (ATEE), o anticorpo de cabra contra coelho (marcado com fosfatase alcalina) a hidroxiapatita-Ultrogel e o tampão trietanolamina foram obtidos da Sigma, EUA. Os reagentes utilizados para o ensaio de "Dot blot" sal 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato p-toluedino (BCIP) foi obtido da Fluka (EUA) e o 4-nitroblue tetrazolio cloreto monohidratado foi obtido da Aldrich (EUA). Tripsina e quimotripsina foram gentilmente fornecidas pela Biobrás, Montes Claros, M.G., Brasil. Trishidroximetil amino metano (Tris), glicina, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio foram obtidos da Merck, Alemanha. O anticorpo contra aprotinina foi gentilmente cedido pelo Dr. Zivko Nikolov da Prodigene, EUA. Solução estoque de acrilamida, solução SDS 10%, β -mercaptoetanol e N,N,N',N' tetrametiletilenodiamino (TEMED) utilizados na eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram produzidos pela Bio-Rad EUA. O gel Sepharose 4B ativado com CNBr, e a matriz IMAC "chelating" Shepharose foram adquiridos da Pharmacia, Suécia. Utilizou-se leite desnatado em pó, da marca Molico, encontrado no comércio local para o bloqueio no método de "Western Blot". A membrana de nitrocelulose utilizada para a análise foi do tipo Optitran-S83 (Schleicher & Schull, Alemanha). Todos os demais reagentes utilizados possuíam, no mínimo, grau analítico. Água ultra-pura foi obtida com a utilização do aparelho Milli-Q da Millipore, EUA.

3.2. Efluente de Processamento Industrial de Insulina Bovina (SPI)

O efluente industrial utilizado neste trabalho, sobrenadante de uma precipitação isoelétrica (SPI), é proveniente do processamento de insulina, a partir de pâncreas bovino, gentilmente fornecido pela Biobrás, Montes Claros, MG, nos foi passado na forma liofilizada (762 g resultante da liofilização de 84 L de efluente).

Esta fração contém principalmente espécies de baixa massa molecular (entre 5,2 e 5,5 kDa), além da aprotinina (massa molecular 6,5 kDa) e força iônica

equivalente a de 0,38 M de NaCl por medida de condutividade (Tamagawa, 1999). A inibição de tripsina presente no SPI era de 90%, o que correspondia a uma concentração equivalente de aprotinina em torno de 17 $\mu\text{g/mL}$ (Azzoni, 1998).

3.3. Determinação de Concentração de Aprotinina e Proteína Total

A concentração de aprotinina de alta pureza presente em amostras em solução tampão, em termos de proteína, foi determinada por medida de absorvância a 280 nm e uso do coeficiente de absorção específica. O coeficiente adotado para os experimentos realizados neste estudo foi determinado no comprimento de onda 280 nm em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, NaCl 1,0 M por Tamagawa (1999), e apresenta o valor de 0,656 cm^2 / mg na faixa linear que compreende concentrações entre 0,1 e 1,2 mg/mL com fator de correlação de 0,999.

A concentração total de proteína presente nas amostras de efluente e frações cromatográficas foi monitorada através da diferença das medidas de absorvância a 280 nm e 320 nm, a medida de absorvância no comprimento de onda 320 nm é feita a fim de se eliminar a possível influência da turbidez, segundo Gehle e Schügerl (1984). A proteína total presente também foi quantificada através do método apresentado por Bradford (1976), tendo-se por referência uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovino como proteína padrão.

3.4. Determinação de Inibição de Tripsina

O método de determinação de inibição de tripsina utilizado foi adaptado a partir do método apresentado por Kassel (1970). Baseia-se na hidrólise do substrato BApNA pela tripsina, medida pela variação da absorvância a 405 nm com o tempo. A inibição da tripsina pela aprotinina é estequiométrica e do tipo competitiva, portanto, a presença de inibidor em solução pode ser detectada pela diminuição do coeficiente angular da curva obtida no ensaio.

Em uma cubeta de 1 mL termostatizada a 25°C, adicionava-se 66,6 μL de solução de tripsina 120 $\mu\text{g/mL}$ em solução HCl 0,001 N, 66,6 μL de amostra

contendo inibidor e 533 μL de tampão Trietanolamina-HCl 0,2 M a pH 7,8 com 20 mM de CaCl_2 . Esta mistura era agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionava-se 333 μL de solução de BApNA 0,1% (m/v) em água deionizada e, após rápida homogeneização, a variação da absorbância a 405 nm com o tempo era registrada utilizando-se um espectrofotômetro. O ensaio era também repetido sem a presença de inibidor. Uma unidade de tripsina corresponde a hidrólise de 1,0 μmol de substrato por minuto correspondendo a uma variação na absorbância de 3,32 unidades por minuto. Uma unidade de inibição foi definida como a redução de 50% de duas unidades de atividade de tripsina.

Este método foi modificado quando as amostras a serem analisadas estavam em tampão fosfato, pois o cálcio presente no tampão trietanolamina-HCl precipitava com o fosfato presente nas amostras, impedindo a interpretação correta de inibição. Para contornar este problema retirou-se o cálcio do tampão trietanolamina-HCl e determinou-se novas curvas de calibração para analisar estas amostras.

3.5. Determinação de Inibição de Quimotripsina

O método de determinação de inibição de quimotripsina utilizado foi adaptado a partir do método de determinação de inibição apresentado por Burck (1970). Baseia-se na hidrólise do substrato ATEE pela quimotripsina, medida pela variação com o tempo da absorbância a 237 nm. Portanto, a presença de inibidor em solução pode ser determinada pela diminuição do coeficiente angular da curva obtida no ensaio de atividade de quimotripsina. Para o inibidor, uma unidade de inibição (UI) corresponde a redução da hidrólise de ATEE em 1,0 unidade de absorbância a 237 nm por minuto.

O procedimento de realização do ensaio é bastante semelhante ao do ensaio de tripsina, utilizando a cubeta de quartzo de 1,0 mL termostaticada a 25°C com circulação de água. Em seu interior, adicionava-se 33 μl de solução de quimotripsina bovina 130 $\mu\text{/mL}$ em HCl 0,0025 N com CaCl_2 0,02 N e 33 μL de amostra em tampão Tris 50 mM a pH 8,0 contendo inibidor. Esta mistura era

agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionava-se 0,933 mL de solução de ATEE 1,0 mM em tampão Tris 50 mM a pH 8,0 e, após rápida homogeneização, a variação da absorbância com o tempo era registrada utilizando-se um espectrofotômetro.

Este método foi modificado quando as amostras a serem analisadas estavam em tampão fosfato, pois o cálcio, presente na solução de quimotripsina em HCl 0,0025 N com CaCl₂ 0,02 N, precipitava com o fosfato presente nas amostras, impedindo a interpretação correta de inibição. O novo procedimento de análise para as amostras com tampão fosfato consistiu em utilizar cubeta de quartzo de 3,0 mL termostalizada a 25°C. Em seu interior, adicionava-se 133 µl de solução de quimotripsina bovina 40 µg/mL em HCl 1 mM, 133 µL de amostra contendo inibidor e 1066 mL de tampão Tris 0,1 M pH 8,0. Esta mistura era agitada e mantida a 25°C por 3 min. Em seguida, adicionava-se 667 mL de solução de ATEE 2,8 mM em água deionizada e, após rápida homogeneização, a variação da absorbância a 237 nm com o tempo era registrada utilizando-se um espectrofotômetro. Foram determinadas novas curvas de calibração para analisar as amostras em tampão fosfato.

3.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condição Desnaturante (SDS-PAGE)

As análises de eletroforese em gel de poliacrilamida foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Laemmli (1970). O gel foi preparado na concentração de 15% e espessura de 1mm. As amostras foram preparadas em tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e β-mercaptoetanol e foram aquecidas por 8 minutos a 100°C (condição desnaturante). A separação das proteínas foi conduzida utilizando cuba vertical da Bio-Rad, EUA, com voltagem constante de 200 V. O procedimento de coloração foi realizado com nitrato de prata segundo protocolo descrito por Morrysey (1981).

3.7. Análise dos Picos das Cromatografias por "Dot Blot"

A técnica de "Western Blot" utilizada foi adaptada a partir da metodologia apresentada por Mazen (1989), porém sob a forma de "Dot Blot", pois não se fez a separação eletroforética dos componentes das amostras e a eletrotransferência destes do gel para a membrana. O método baseia-se no reconhecimento da substância de interesse, no caso aprotinina, por anticorpo específico permitindo a sua detecção em concentrações baixas, da ordem de nanogramas. Esta sensibilidade possibilita a confirmação da existência do antígeno, mesmo em amostras contendo uma mistura de proteínas complexas.

O procedimento consistiu em aplicar amostras das frações que apresentaram a maior inibição em cada etapa cromatográfica em uma membrana de nitrocelulose com tamanho de poro 0,22 μm . Após a secagem, a temperatura ambiente, efetuou-se o bloqueio da membrana com caseína contida em leite em pó desnatado a 5% dissolvido em solução de tampão Tris 50 mM com NaCl 0,15 M e Tween 0,3% (tampão de corrida). O bloqueio foi realizado mantendo a membrana em agitação com a solução de leite no tampão de corrida a 20 °C por 1 hora. Em seguida fez-se a incubação da membrana com o anticorpo de coelho contra aprotinina diluído na proporção 1:1000 em tampão de corrida com leite 5%, como descrito acima, em banho agitado a 20 °C por 2 horas. Lavou-se então a membrana três vezes por 10 minutos com tampão Tris 50 mM com NaCl 0,15 M e Tween 0,3% a fim de se remover proteínas e, principalmente, o excesso de anticorpo que não aderiu especificamente à membrana. A seguir, fez-se a incubação com o segundo anticorpo (anticorpo de cabra contra anticorpo de coelho marcado com fosfatase alcalina, diluído 1:2000 em tampão de corrida com leite 5%) em banho agitado a 20°C por 2 horas. Após esta segunda incubação com anticorpo, lavou-se a membrana com tampão de corrida e depois com tampão dietanolamina 0,1 M pH 9,6. A etapa final consistiu em incubar a membrana com tampão de revelação: 20 mL de tampão dietanolamina 0,1 M pH 9,6; 20 μL de cloreto de magnésio 1 M, 200 μL de BCIP, solução 5mg/mL preparado em dimetilformamida e 2 mg de NBT. O aparecimento do sinal colorido

na membrana se deu em torno de 10 minutos de agitação após o contato com o tampão de revelação.

3.8. Imobilização de Quimotripsina em Gel de Agarose

A imobilização das enzimas em agarose ativada com CNBr foi realizada segundo instruções do fornecedor da matriz ativada (Pharmacia, Suécia). A matriz de agarose seca (1,0 g) foi suspensa por 15 minutos em solução de HCl 1 mM sendo posteriormente lavada em um funil de vidro sinterizado, com várias alíquotas desta mesma solução, totalizando um volume de 200 mL. Este tratamento a pH baixo foi feito para eliminação dos aditivos que estão presentes no gel que tem que ser removidos antes da imobilização da enzima. O pH baixo preserva a atividade dos grupos reativos que hidrolizariam a valores de pH altos. A massa de gel foi drenada a vácuo. O gel foi suspenso em 7,0 mL de solução 5 mg/mL de quimotripsina bovina em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 8,3 com NaCl 0,5 M (tampão de acoplamento). A suspensão foi, então, mantida em banho agitado a temperatura ambiente por 2 horas. Após este período de reação, amostras dos sobrenadantes da solução foram retiradas, centrifugadas e analisadas via medição da absorbância a 280 nm. Em seguida o gel foi lavado exaustivamente com tampão de acoplamento para retirada do excesso de ligantes. O excesso de grupos reativos que permanecia no gel foi bloqueado pela adição de tampão Tris 0,1 M pH 8,0, mantendo-se a suspensão em agitação por 2 horas a uma temperatura de 25°C. Finalmente, o gel foi lavado exaustivamente com ciclos de tampão acetato 0,1 M pH 4,0 com NaCl 0,5 M e, com tampão Tris 0,1 M pH 8,0 com NaCl 0,5 M.

3.9. 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 de sulfato de cobre 20 mM, 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 ultra-pura e estas foram degaseificadas previamente ao uso.

3.10. Estimativa da Capacidade de Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita

Os experimentos para estimar a capacidade da hidroxiapatita na adsorção de aprotinina foram feitos em batelada utilizando frascos Eppendorf de 1,5 mL de capacidade e diferentes massas de resina previamente acondicionada em tampão fosfato 1 mM pH 6,8.

O procedimento consistiu em adicionar 1,0 mL de solução de aprotinina com concentração 1,2 mg/mL em tampão fosfato 1 mM pH 6,8, a diferentes massas de hidroxiapatita (40, 30, 25 e 20 mg). Os frascos foram colocados sob agitação a uma temperatura 25°C por 1 hora. Após este período foram centrifugados e as alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas.

3.11. Determinação do Tempo de Equilíbrio para a Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita

O procedimento dos testes visando avaliar o tempo de equilíbrio do processo de adsorção da aprotinina em hidroxiapatita para os ensaios de adsorção em frascos agitados, foi semelhante ao realizado nos experimentos para estimar a capacidade da hidroxiapatita. A solução de aprotinina 1mg/mL foi preparada em tampão fosfato 1 mM pH 6,8 e os frascos Eppendorf colocados sob agitação. Em períodos de tempo determinados (0, 5, 10, 15, 30, 60 e 120 min) um frasco era retirado, centrifugado e a concentração de aprotinina restante em solução determinada.

Um ensaio controle foi feito em paralelo com este, em condições idênticas excetuando o fato de conter hidroxiapatita somente em contato com solução tampão, sem proteína.

3.12. Estudo da Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita Através de Planejamento Estatístico Experimental

Foram utilizadas as técnicas de planejamento estatístico experimental apresentadas por Bruns e colaboradores (1995) para estudar a influência do pH e concentração de NaCl sobre a adsorção de aprotinina em hidroxiapatita. A técnica consistiu em planejar a execução de experimentos segundo a metodologia de planejamentos fatoriais completos com ampliação em estrela. As variáveis independentes estudadas foram pH e concentração de sal e a variável dependente foi a capacidade da resina (massa de aprotinina adsorvida por massa de gel). Os experimentos foram realizados segundo as condições apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Planejamento experimental em valores codificados e reais para o estudo do efeito do pH e concentração de sal sobre a adsorção de aprotinina em hidroxiapatita.

<i>Ensaio</i>	<i>x1</i>	<i>x2</i>	<i>pH</i>	<i>C (M)*</i>
1	-1	-1	6,5	0,100
2	1	-1	7,5	0,100
3	-1	1	6,5	0,500
4	1	1	7,5	0,500
5	0	0	7,0	0,300
6	0	0	7,0	0,300
7	0	0	7,0	0,300
8	0	0	7,0	0,300
9	$-2^{1/2}$	0	6,3	0,300
10	0	$2^{1/2}$	7,0	0,582
11	$2^{1/2}$	0	7,7	0,300
12	0	$-2^{1/2}$	7,0	0,018

C*- concentração molar de cloreto de sódio

q**- capacidade de adsorção de aprotinina

x1 é o valor da variável independente pH, através da equação: $x1 = (pH - 8,0) / 0,5$

x2 é o valor da variável independente C, através da equação: $x2 = (C - 0,300) / 0,5$

Para a análise dos resultados obtidos experimentalmente através do planejamento fatorial foi utilizado o programa Modreg (parte integrante do livro “Planejamento e Otimização de Experimentos”, Bruns *et al.* 1995), a superfície de resposta foi construída com o auxílio do software Statistica (Statsoft, EUA). O programa Modreg faz o cálculo dos parâmetros do modelo empregado e seus erros padrão através da tabela ANOVA (acrônimo de Analysis of Variance), que é calculada como descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Tabela com as equações para analisar a variância para ajuste de um modelo nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p - 1)$
Resíduos	$SQ_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_{res} = SQ_{res} / (n - p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m - p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% de variância explicada: SQ_{reg} / SQ_T			
% de variância explicável: $(SQ_T - SQ_{ep}) / SQ_T$			

Na Tabela 3.2 n_i é o número de repetições no nível i , m é o número de níveis distintos, n é o número total de observações e p número de parâmetros do modelo. Para verificar se há evidência da falta de ajuste ao modelo empregado, deve-se observar se a porcentagem de variância explicada está muito diferente da porcentagem de variância explicável. Se a relação das médias quadráticas da falta de ajuste e de erro puro for maior que o valor do F tabelado para o nível de confiança desejado, também é indicativo de falta de ajuste.

Para determinar se a regressão é significativa para o modelo, a relação entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos deve ser 4 vezes maior que o do valor de F tabelado para os graus de liberdade da regressão, do resíduo, e do intervalo de confiança desejado.

O procedimento para o ensaio das condições de adsorção consistiu em suspender 30 mg de hidroxiapatita, em frascos Eppendorf, em 1,0 mL de solução com concentrações iniciais de aprotinina 1mg/mL em tampão fosfato 1 mM com pH variando de 6,3 a 7,7 e força iônica de 0,018 M a 0,582 M (condições estipuladas pelo planejamento estatístico) e colocadas sob agitação a uma temperatura de 25°C por 1 hora, tempo estipulado nos ensaios cinéticos para atingir o equilíbrio. Após o período de agitação, os frascos foram centrifugados e alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas para determinação da quantidade de aprotinina presente.

3.13. Ensaios de Dessorção da Aprotinina em Hidroxiapatita

Os estudos de dessorção em hidroxiapatita foram realizados com aprotinina, previamente adsorvida em hidroxiapatita, utilizando várias soluções citadas na literatura (Gorbunoff, 1984 e Kawasaki, 1991) a fim de verificar qual a condição que apresentava a melhor recuperação de aprotinina. As soluções de eluentes estudadas e suas respectivas concentrações foram: CaCl_2 de 1 a 20 mM; MgCl_2 , 3mM, NaCl de 0,1 a 0,3 M e tampão fosfato pH 6,8 de 0,1 a 0,3 M.

A hidroxiapatita utilizada no ensaio de dessorção foi primeiramente saturada com aprotinina em uma batelada de adsorção em frascos Erlenmeyer de 50 mL, onde o adsorvente foi suspenso em uma solução contendo 1mg/mL de aprotinina em tampão fosfato 1 mM pH 6,5 e CaCl_2 18 mM, sendo mantido em agitação a 25°C por 1 hora. Em seguida, a hidroxiapatita foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio. Em frascos Eppendorf, quantidades de 30 mg de hidroxiapatita foram suspensas em 1,0 mL de solução tampão em diferentes concentrações, sendo então, colocadas em agitação a uma temperatura de 25°C por 1 hora. Em seguida, os frascos foram centrifugados e os sobrenadantes reservados para posterior medida da concentração de proteína.

Não foi feito um planejamento estatístico para a análise da dessorção de aprotinina em hidroxiapatita, pois o pH não é uma variável que influencia significativamente esta etapa. Recomenda-se realizar a dessorção com soluções salinas e não com soluções tampão, apesar de se encontrar na literatura alguns poucos artigos que usam solução tampão para dessorção.

3.14. Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada

Nos ensaios de adsorção em coluna de leito fixo, utilizou-se o efluente industrial do processamento de insulina que nos foi fornecido na forma liofilizada. A amostra aplicada à coluna foi preparada solubilizando-se o liofilizado em tampão Tris 50 mM pH 8,0 com CaCl_2 0,02 N e NaCl 0,582 M na proporção 5,0% (massa de liofilizado por volume de tampão). A simples dissolução do material bruto liofilizado em tampão resultou em uma solução de coloração escura, com presença de materiais em suspensão; por isso optou-se por filtrar a solução em membrana com tamanho de poro de 1,2 μm antes desta ser alimentada na coluna. O gel com quimotripsina imobilizada foi empacotado em uma coluna com 10,0 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro (coluna modelo C 10/10 da Pharmacia, Suécia). O volume final de gel empacotado foi de 1,3 mL.

A cromatografia foi realizada acoplando-se a coluna contendo gel com quimotripsina imobilizada ao sistema de cromatografia de baixa pressão constituído de uma bomba peristáltica Minipuls 3 da marca Gilson, França, um detector de absorvância Econo UV Monitor da marca Bio Rad, EUA, um registrador modelo 1327 da marca Bio Rad, EUA, e um coletor de frações modelo SF-2120 da marca Advantec (EUA). A coluna contendo gel com quimotripsina foi primeiramente equilibrada a uma vazão de 0,8 mL/min (vazão utilizada em todas as etapas da cromatografia) com tampão Tris 50 mM pH 8,0 com CaCl_2 0,02 N e NaCl 0,582 M (tampão de corrida) em temperatura ambiente. Na etapa de adsorção, alimentou-se a coluna com volumes de amostra que variaram de 100 a 400 mL e a lavagem foi realizada com 60,0 mL de tampão de corrida. Primeiramente, a etapa de dessorção foi realizada com 25,0 mL de tampão glicina

20 mM pH 2,1. As condições de adsorção e dessorção adotadas nesta etapa foram baseadas nos ensaios feitos por Azzoni e Miranda (1999).

Posteriormente foi adotada uma dessorção com gradiente de pH em degraus, variando-se o pH de 5,0 até 2,1. Os tampões utilizados nesta etapa foram: tampões acetato pH 5,0 e pH 4,0 e tampões glicina pH 3,0 e 2,1. Durante todo o processo foram coletadas frações que variaram em volume segundo a etapa, sendo de 10,0 mL na etapa de adsorção, 3,0 mL na de lavagem e 1,0 mL na de dessorção. Estas últimas frações foram diluídas em 20% em volume com tampão Tris 50 mM pH 8,0 para se elevar o pH, evitando-se assim interferência de baixo pH no teste de inibição, posteriormente tiveram seu poder de inibição de tripsina e quimotripsina determinado.

3.15. Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada seguida de Cromatografia IMAC

A cromatografia de afinidade por quelato metálico foi realizada tendo como alimentação as frações referentes aos picos de dessorção nos pHs 4,0; 3,0 e 2,1 da cromatografia em coluna de quimotripsina imobilizada alimentada com SPI 5% (item 3.12). As soluções de alimentação na coluna IMAC passaram antes por uma coluna de dessalinização para a troca de tampão para o tampão fosfato 50 mM pH 7,0, tampão nas condições que mais favorecem a adsorção IMAC. Uma vez que a quantidade de proteína total presente era pequena na primeira cromatografia IMAC realizada a pH 4,0, optou-se pela concentração das amostras a pH 3,0 e 2,1 por meio de uma liofilização. O processo de liofilização proporcionou uma redução do volume em torno de 5 vezes, possibilitando assim o cálculo de fatores de purificação mais precisos. A resina IMAC utilizada foi agarose-IDA com íon cobre imobilizado em uma coluna C10/10 (Pharmacia, Suécia), com volume final de matriz empacotada de 1,2 mL.

A cromatografia foi realizada utilizando o sistema de cromatografia de baixa pressão. A coluna contendo a matriz IMAC já com o íon metálico imobilizado segundo o protocolo descrito no item 3.8 foi primeiramente equilibrada a uma vazão de 0,7 mL/min (vazão utilizada em todas as etapas da cromatografia) com

tampão fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl (tampão de corrida) em temperatura ambiente. Na etapa de adsorção alimentou-se a coluna com volumes de amostras que variaram de 1,5 a 6 mL e a lavagem foi realizada com 6 mL de tampão de corrida. A dessorção foi realizada com tampão fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl e 0,1 M de imidazol. A seguir efetuou-se a regeneração da matriz que consistiu na passagem de 10 mL de solução 50 mM de EDTA até a eluição completa dos íons metálicos da matriz. Após a remoção dos íons metálicos lavou-se a matriz com água deionizada para a remoção do EDTA. Durante todas as etapas da cromatografia foram coletadas frações de 1,0 mL, com exceção das cromatografias com alimentações que foram concentradas através da liofilização (eluído a pH 3,0 e 2,1 da cromatografia de SPI em quimotripsina imobilizada), que na etapa de adsorção tiveram volume coletado de 0,75 mL. Posteriormente as frações tiveram seu poder de inibição de tripsina e quimotripsina determinado.

3.16. Cromatografia em Hidroxiapatita seguida de Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada

Realizou-se cromatografia do efluente industrial (solução 5,0% em massa de liofilizado por volume de tampão) em coluna C 10/10 com hidroxiapatita. A coluna foi primeiramente equilibrada a uma vazão de 0,8 mL/min (vazão utilizada em todas as etapas da cromatografia) com tampão fosfato 1 mM pH 6,5 (tampão de corrida) em temperatura ambiente. De acordo com a natureza do tampão de equilíbrio, o estado iônico da coluna de HA pode variar; escolheu-se o tampão fosfato para deixar a superfície da hidroxiapatita negativa, pois assim neutralizaria os sítios positivos da resina deixando-a apta para a adsorção preferencial de proteínas básicas, uma vez que o pH do tampão de equilíbrio é 6,5 (melhor condição indicada pelo estudo de planejamento estatístico experimental) e o valor do pI da aprotinina é 10,5. Na etapa de adsorção, alimentou-se a coluna com 100 e 200 mL de amostra e a lavagem foi realizada com 300 mL de tampão fosfato 1 mM pH 6,5. A etapa de dessorção foi realizada com 50 mL de solução de CaCl₂ 3 mM. Durante o processo, foram coletadas frações que variaram em volume

segundo a etapa, sendo de 10,0 mL na de adsorção, 5,0 mL na de lavagem e 1,0 mL na de dessorção. Estas últimas não foram diluídas 20% em volume com tampão Tris 50 mM pH 8,2 pois o pH dessas amostras não interferiu nos ensaios de inibição de quimotripsina que foram realizados posteriormente.

Após a dessorção, a coluna de hidroxiapatita apresentava em sua superfície algum material ainda adsorvido que a eluição com CaCl_2 não foi efetiva em dessorver. Para a remoção deste material testou-se três possibilidades: passagem de uma solução com NaCl 1 M (Fargues et al., 1997), tampão fosfato 0,35 M (Ogawa e Hiraide, 1996, e Romaniec et al, 1993) e aumento gradativo do pH de 7,0 a 9,5 com soluções diluídas de NaOH. A opção que apresentou melhores resultados (resultados não apresentados) foi o uso de tampão fosfato 0,35 M pH 8,0, sendo assim a escolhida para a regeneração da coluna.

A próxima etapa de recuperação do inibidor foi alimentar uma coluna contendo gel com quimotripsina bovina imobilizada, com as frações referentes ao pico de dessorção coletadas durante o desenvolvimento da cromatografia acima descrita. Neste ensaio, seguiu-se as mesmas condições das cromatografias anteriores com a coluna contendo gel com quimotripsina, exceto pela vazão, que foi de 0,25 mL/min (vazão utilizada em todas as etapas da cromatografia). Na etapa de adsorção, alimentou-se a coluna com 6,0 mL de amostra e a lavagem foi realizada com 24 mL de tampão de corrida. A etapa de dessorção foi realizada com 10 mL dos tampões acetato pH 5,0 e 4,0 e tampões glicina pH 3,0 e 2,1. Durante todo o processo, foram coletadas frações que variaram em volume segundo a etapa, sendo de 1,5 mL na etapa de adsorção e lavagem e 1,0 mL na de dessorção. Estas últimas foram, posteriormente, diluídas em 20% em volume com tampão Tris 50 mM pH 8,0 e analisadas quanto ao poder de inibição de tripsina e quimotripsina.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo foi dividido em três partes: a) experimentos preparatórios, obtenção de curvas de calibração, métodos de inibição e imobilização de ligante; b) experimentos de adsorção de aprotinina de alta pureza a partir de solução tampão, estimativa da capacidade e determinação cinética e das melhores condições de adsorção e dessorção em hidroxiapatita e c) experimentos com efluente industrial.

4.1. Experimentos Preparatórios

4.1.1. Determinação de Aprotinina via Inibição de Tripsina

O método implementado neste trabalho para a determinação de inibição de tripsina foi desenvolvido por Kassel (1970). A Figura 4.1 retrata uma curva típica de determinação de inibição de tripsina pela presença de inibidor, no caso a aprotinina. Pode-se observar que após 14 minutos o substrato ainda não foi completamente convertido pela solução com enzima pura nem para a amostra contendo inibidor, porém a taxa de conversão é menor para a amostra com inibidor.

Uma curva de calibração relacionando a inibição de tripsina com a concentração de aprotinina foi realizada para se determinar a concentração de aprotinina presente nas amostras futuras, obtendo-se uma inclinação de $5,65 (\mu\text{g/mL})^{-1}$ e coeficiente de correlação de 0,995 (Figura 4.2). Além desta, preparou-se também uma curva de calibração em que o tampão do substrato não continha cálcio para a análise de amostras em tampão fosfato, que precipitam na presença

de Ca^{2+} , na qual obteve-se inclinação de $3,57 (\mu\text{g/mL})^{-1}$ e coeficiente de correlação de 0,987.

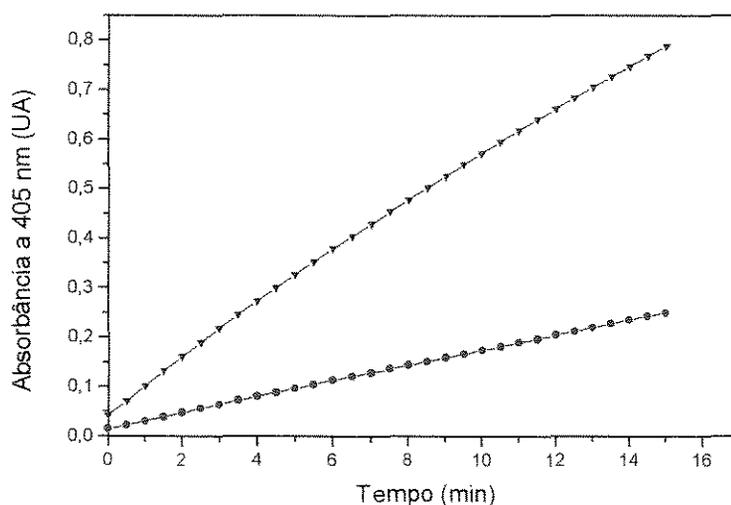


Figura 4.1- Curva típica de determinação de inibição de atividade de tripsina pela inibição da hidrólise do substrato BApNA, para a quantificação de aprotinina. ▲ - solução de tripsina pura; ● - solução com inibidor. Atividade de tripsina 0,060 e 0,017 UA/min, sem e com inibição, respectivamente.

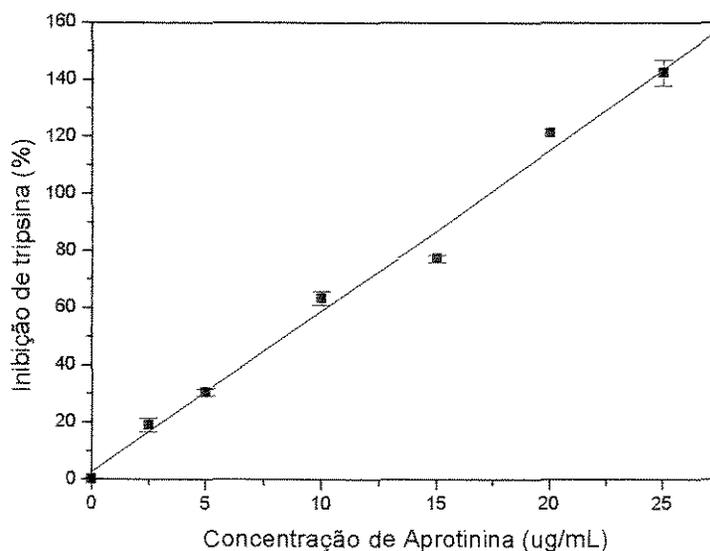


Figura 4.2- Curva de calibração para a determinação da concentração de aprotinina presente em uma amostra através da inibição da atividade de tripsina. As barras de erro referem-se a amplitude apresentada por quadruplicatas. Inclinação e coeficiente de correlação $5,65 (\mu\text{g/mL})^{-1}$ e 0,995; respectivamente.

4.1.2. Determinação de Aprotinina via Inibição de Quimotripsina

Além do método de determinação de aprotinina via inibição de tripsina, também foi empregado um método via inibição de quimotripsina. O método escolhido foi apresentado por Burck (1970) e é semelhante ao de inibição de tripsina.

A Figura 4.3 retrata uma curva típica de determinação de inibição de quimotripsina pela presença de inibidor. O decréscimo de absorbância indica a ocorrência da hidrólise do substrato ATEE e a região linear compreende à faixa de tempo 0 até 90 s.

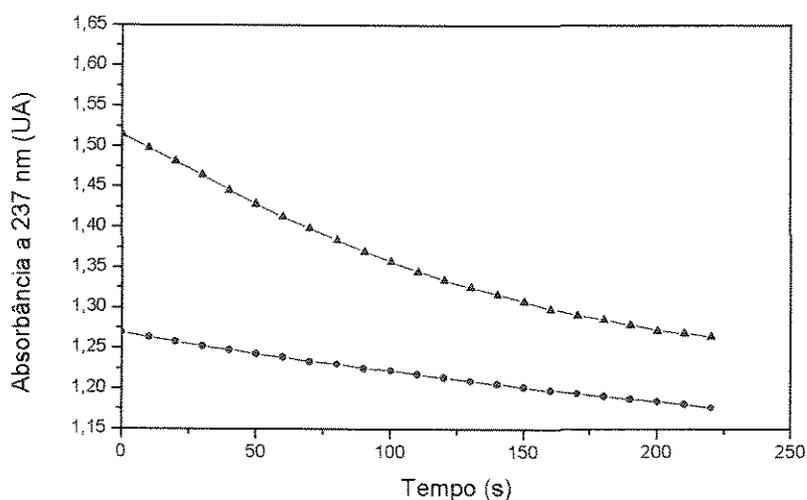
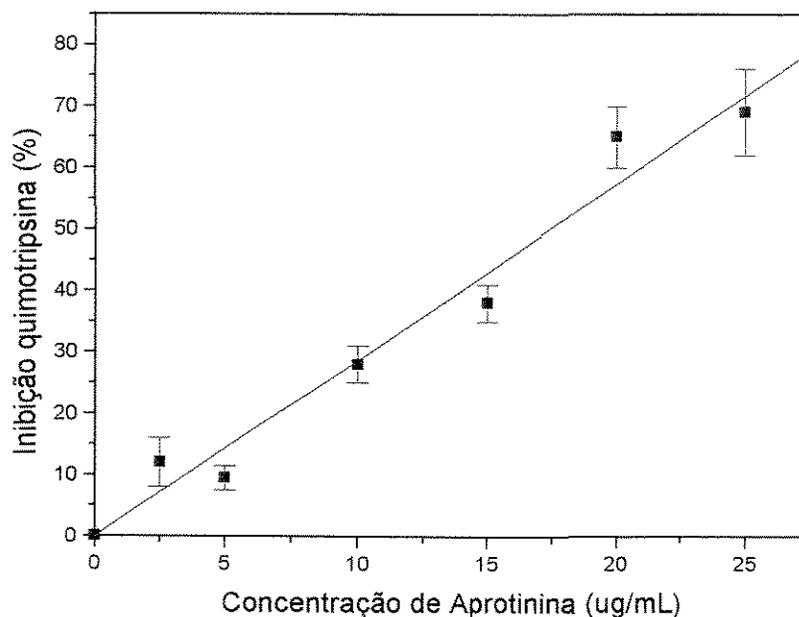


Figura 4.3- Curva típica de determinação de inibição de atividade de quimotripsina pela inibição da hidrólise do substrato ATEE, para a quantificação de aprotinina. ▲- solução de quimotripsina pura; ● - solução com inibidor. Atividade de quimotripsina 0,107 e 0,043 UA/min, sem e com inibição, respectivamente.

Duas curvas de calibração correlacionando inibição e concentração de aprotinina são apresentadas na Figura 4.4. A curva **a)** refere-se a solução de enzima em tampão Tris 50 mM pH 8,0 e a curva **b)** se refere a solução de enzima em tampão Tris 50 mM pH 8,0 com NaCl 0,582 M.

a)



b)

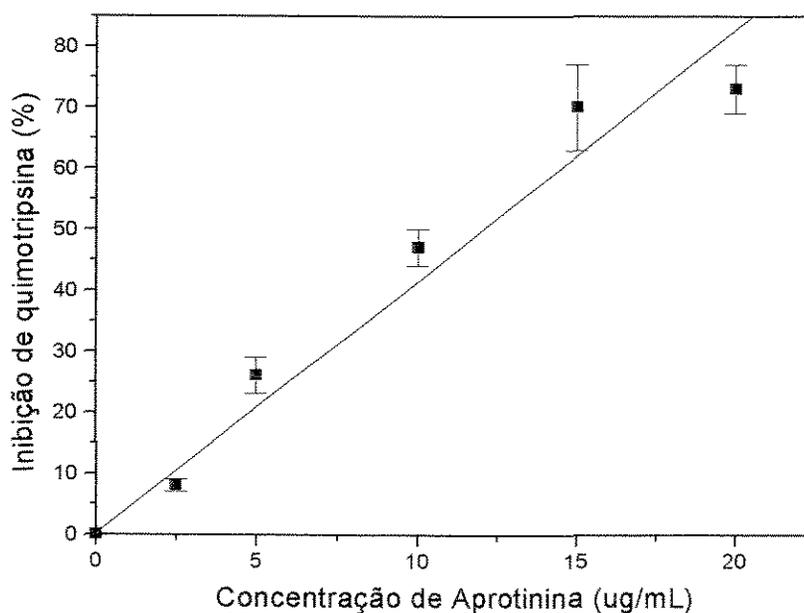


Figura 4.4- Curvas de calibração para a determinação da concentração de aprotinina presente em uma amostra através da inibição da atividade de quimotripsina em **a)** tampão Tris 50 mM pH 8,0 e **b)** tampão Tris 50 mM pH 8,0 com NaCl 0,582 M. As barras de erro referem-se a amplitude apresentada por triplicatas. Inclinação e coeficiente de correlação para a curva a) $2,87 (\mu\text{g/mL})^{-1}$ e 0,975 e para a curva b) $4,13 (\mu\text{g/mL})^{-1}$ e 0,980, respectivamente.

Os gráficos indicam que o comportamento das amostras com e sem sal diferem em relação à quantidade de inibição obtida. As amostras com presença de sal apresentam maior inibição em comparação com as amostras sem a presença de sal, principalmente para concentrações mais elevadas, fato comprovado comparando as inclinações de cada curva (2,87 e 4,13 $(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$ para a ausência e presença de sal, respectivamente). Além das curvas relativas à presença ou não de sal, também foi feita uma curva de calibração na ausência de cálcio, para analisar as amostras que estejam em tampão fosfato e assim evitar a precipitação indesejada mencionada anteriormente. A inclinação obtida foi de 7,02 $(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$ e o coeficiente de correlação de 0,983.

4.1.3. Imobilização da Quimotripsina em Gel de Agarose

A eficiência da imobilização de quimotripsina em agarose foi verificada pelo acompanhamento com o tempo da concentração de quimotripsina na solução de imobilização. A medida da absorbância a 280 nm da solução de quimotripsina foi feita antes do contato com a agarose ativada com CNBr e após 2 horas de contato com o gel (tempo indicado pelo fabricante como suficiente para imobilização). Este monitoramento da absorbância permitiu calcular a quantidade de enzima imobilizada no gel, que foi de 85% (aproximadamente 30,0 mg de quimotripsina em 1,0 g de agarose seca).

4.2. Primeira Estratégia: Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada

A primeira abordagem de processo estudada com o efluente industrial foi a possibilidade de recuperar aprotinina realizando somente uma cromatografia de afinidade, com quimotripsina imobilizada em agarose. Este estudo verificaria se somente com esta cromatografia seria possível recuperar aprotinina sem o comprometimento do rendimento e pureza, em relação aos resultados obtidos por Azzoni e Miranda (1999), que utilizaram cromatografia em tripsina seguida de cromatografia em quimotripsina imobilizada. Visto que é a coluna de quimotripsina imobilizada aquela capaz de propiciar a remoção do APTI, considerava-se a

possibilidade de apenas esta coluna ser eficiente na recuperação e purificação de aprotinina.

O efluente do processamento industrial da insulina (SPI), estudado para a recuperação de aprotinina, foi preparado com concentração de 5,0%, e não a 2,5% conforme a metodologia desenvolvida por Azzoni e Miranda (1999): elevou-se a concentração de SPI a fim de propiciar uma maior capacidade de adsorção dos adsorventes elevando-se a concentração de aprotinina na solução de alimentação, pois sabe-se que a aprotinina está presente em baixa concentração no efluente.

Durante o desenvolvimento da cromatografia verificou-se que ao longo da alimentação, o adsorvente na coluna adquiriu uma faixa escura e este material adsorvido não era eliminado na lavagem. Essa coloração desaparecia somente na etapa de dessorção, sendo que nas frações iniciais de coleta da dessorção houve o aparecimento de material precipitado. A Figura 4.5 retrata a etapa de dessorção característica dessa cromatografia.

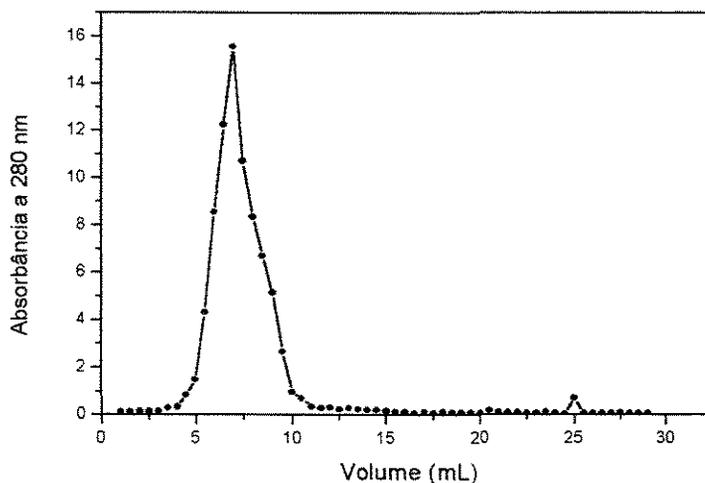


Figura 4.5- Perfil cromatográfico da dessorção da coluna com quimotripsina imobilizada alimentada com 400 mL de SPI 5%. Tampão de lavagem: Tris 50 mM pH 8,0 com CaCl_2 0,02 N e NaCl 0,582 M; tampão de dessorção: glicina 20 mM pH 2,1; vazão 0,8 mL/min.

Na possibilidade de já se ter saturado a coluna com aprotinina e que um eventual excesso de alimentação fosse responsável pela formação da faixa

escura, optou-se por diminuir o volume de alimentação para 200 mL. Esta medida, porém, não evitou a formação da faixa escura na coluna que somente foi eluída na etapa de dessorção.

Uma outra opção de eluição, a fim de se eliminar a faixa escura, foi a dessorção em degrau de pH (pH 5,0; 4,0; 3,0 e 2,1). Esperava-se que as impurezas eluíssem nas primeiras frações, reproduzindo o que aconteceu nas cromatografias anteriores, e que a aprotinina eluísse nas frações finais, a pH baixo, uma vez que Azzoni e Miranda (1999) observaram que o pH era um fator importante na dessorção de aprotinina em coluna com quimotripsina imobilizada, aumentando a eficiência de dessorção à medida em que o seu valor diminuía, encontrando o valor de máxima dessorção de pH igual a 2,8. Esta medida teve efeito positivo, pois o cromatograma de eluição apresentou picos na dessorção referentes aos valores de pH 4,0; 3,0 e 2,1 (dados não apresentados). No entanto, ocorreu a presença de material precipitado nos picos de eluição a pH 4,0 e 3,0.

Verificou-se também, que ao longo da etapa de alimentação, que durava cerca de 4 horas, a solução de SPI aparentava conter precipitado mesmo antes de entrar em contato com a coluna, apesar da solução ser filtrada em membrana de tamanho de poro de 1,2 μm . Para evitar a introdução de material precipitado e mesmo precipitação dentro da coluna, optou-se por preparar a solução de SPI deixando-a sob leve agitação em torno de 13 horas para que uma eventual precipitação ocorresse na totalidade (estabilização da solução). Acrescentou-se também, após a filtração de 1,2 μm , outras duas filtrações com membranas de tamanho de poro de 0,45 e 0,22 μm , sendo que essa última filtração era feita no momento da entrada do efluente na coluna. O SPI conservou o poder de inibição para tripsina após a precipitação e filtrações, não apresentando redução na inibição durante todo este processo de preparação para alimentação da cromatografia.

Com estas alterações das condições iniciais (redução do volume e estabilização da solução de alimentação e dessorção em degrau de pH), conseguiu-se evitar a formação da faixa escura na coluna e após a etapa de

lavagem, a coluna se apresentava completamente limpa. Este procedimento foi mantido como o padrão para as cromatografias que se seguiram.

Foram realizadas novas cromatografias nestas condições onde formaram-se picos nos pH 4,0; 3,0 e 2,1. As frações protéicas foram analisadas em “pool” e todas apresentaram inibição tanto para tripsina como para quimotripsina (Figura 4.6).

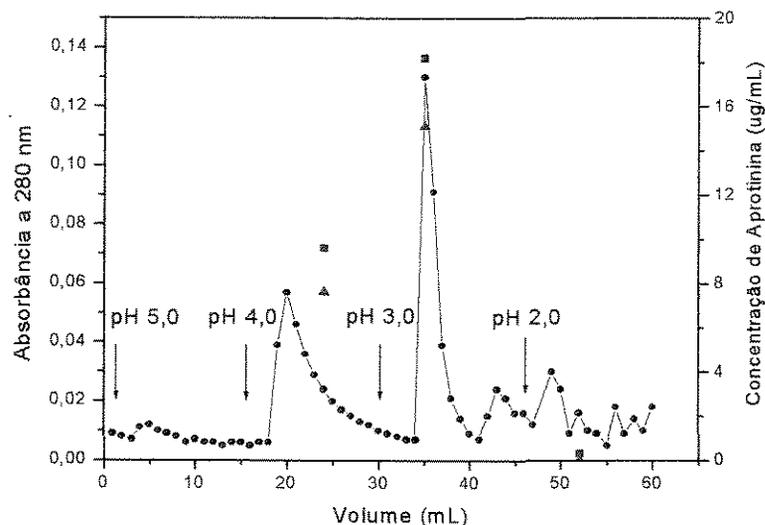


Figura 4.6- Dessorção da coluna com quimotripsina imobilizada alimentada com SPI 5,0%. Tampão de lavagem, Tris 50 mM pH 8,0 com CaCl_2 0,02 N e NaCl 0,582 M; tampões de dessorção: acetato 50 mM pH 5,0 e pH 4,0, glicina 20 mM pH 3,0 e pH 2,1; vazão, 0,8 mL/min. As setas indicam a troca de tampão nos diferentes pHs. ● - proteína total; ■ - inibição de tripsina; ▲ - inibição de quimotripsina.

Posteriormente à execução destes experimentos teve-se conhecimento que Azzoni (2000) verificou o aparecimento de turvação em extrato de milho transgênico, utilizado para a purificação de aprotinina, que mais tarde identificou como sendo crescimento bacteriano (comunicação pessoal). O procedimento utilizado por ele para a eliminação da interferência bacteriana foi a esterilização da solução através de filtração por membrana de poro 0,22 µm. Apesar de não ter sido analisada a possibilidade da presença de bactérias no efluente utilizado neste trabalho, o SPI foi submetido a filtração de membrana de poro 0,22 µm, eliminando assim qualquer eventual influência bacteriana.

Uma tabela resumo com a concentração de aprotinina presente em cada pico de eluição da cromatografia em quimotripsina imobilizada, baseada nas inibições de tripsina e quimotripsina, está representada a seguir (Tabela 4.1).

Tabela 4.1-Resumo das cromatografias realizadas com coluna contendo gel com quimotripsina imobilizada alimentada com SPI 5,0%.

<i>pH de Eluição do Pico</i>	<i>Concentração Equivalente de Aprotinina (µg/mL)</i>						<i>Fator de Purificação</i>	
	<i>Cromatografia #1</i>		<i>Cromatografia # 2</i>		<i>Cromatografia #3</i>			
	<i>T</i>	<i>Q</i>	<i>T</i>	<i>Q</i>	<i>T</i>	<i>Q</i>	<i>T</i>	<i>Q</i>
<i>pH 4,0</i>	13,9	4,5	9,6	7,6	18,7	7,3	262	225
<i>pH 3,0</i>	21,1	12,3	18,2	15,1	22,0	17,2	266	476
<i>pH 2,1</i>	1,4	0	0,3	0	0	0	9	-

T e Q – concentração (µg/mL) de aprotinina relativa á inibição de tripsina e quimotripsina, respectivamente.

Os resultados indicam que a inibição de tripsina foi maior que a de quimotripsina em todos os picos, portanto a quantidade de inibidor capaz de inibir somente tripsina era maior do que a do inibidor capaz de inibir tanto tripsina como quimotripsina. As recuperações obtidas no pH 4,0 são as que apresentam maior diferença entre as concentrações de inibidor recuperado de acordo com as inibições, ou seja, foram recuperados dois tipos de inibidores: um que inibe somente tripsina (provavelmente APTI) e outro que inibe tripsina e quimotripsina (provavelmente aprotinina).

No pico formado com eluição a pH 3,0, essas quantidades são próximas, indicando que praticamente foi recuperado somente o inibidor capaz de inibir tripsina e quimotripsina, e muito pouco do APTI. No pico referente a eluição a pH 2,1, quase não houve recuperação de inibidor, além de não ser detectada inibição de quimotripsina. Os fatores de purificação apresentados nestas cromatografias variaram de 200 a 400, sendo que o pico a pH 3,0 foi o que apresentou maiores

fatores de purificação e maior recuperação de aprotinina. Este comportamento vai ao encontro à conclusão apresentada por Azzoni e Miranda (1999) onde valores de pH próximos a 2,8 as dessorções são próximas a 100%.

Provavelmente a eluição a pH 4,0 esteja dessorvendo proteínas que interagiram fracamente por adsorções não-específicas devido a influência do sal, que por isso estão sendo liberadas da coluna antes da aprotinina. A concentração de NaCl no meio influencia significativamente na adsorção de proteínas em colunas de agarose com quimotripsina imobilizada, segundo Wilimowska-Pelc *et al.* (1999) que separaram duas formas de inibidores de tripsina utilizando coluna de afinidade com quimotripsina imobilizada. De acordo com estes autores, altas concentrações de sal podem conferir, a inibidores de tripsina, a propriedade de também inibirem quimotripsina. Dessa maneira, inibidores de tripsina do SPI estariam ocupando sítios ativos da quimotripsina imobilizada, devido à influência do NaCl, e competindo pela ocupação destes sítios com moléculas de aprotinina. Além da diminuição da recuperação eles acabariam sendo dessorvidos junto com a aprotinina, resultando também em uma menor pureza do produto desejado.

O balanço de absorvância obtido das cromatografias indicou que cerca 78% da proteína total injetada foi recuperada, sendo a maior parte recuperada nas frações do “flowthrough” e de lavagem.

Amostras dos “pools” das cromatografias realizadas em quimotripsina imobilizada foram submetidas à análise de “dot blot”, segundo protocolo desenvolvido por Mazon, (1989) (Figura 4.7). O volume de cada amostra aplicado à membrana variou de 4 a 100 μ L de acordo com a quantidade de inibição apresentada, tomando como base a aplicação de uma massa equivalente a 200 ng de aprotinina por amostra. O teste indicou a presença de aprotinina nos ‘pools’ de eluição a pH 4,0, 3,0 e 2,1 das cromatografias.

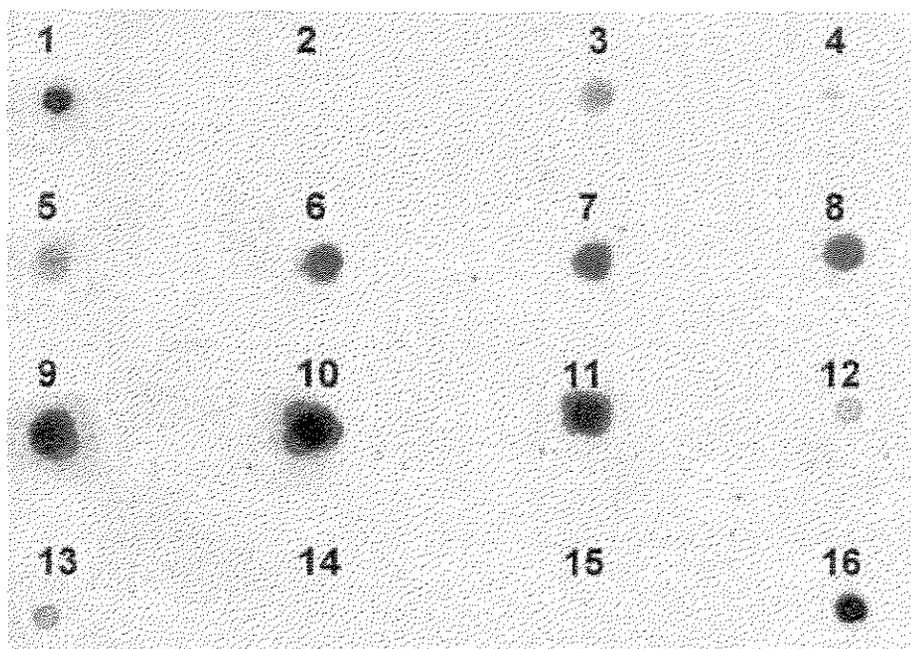


Figura 4.7-“Dot blot” das amostras obtidas nos picos de dessorção da cromatografia realizada na coluna com quimotripsina imobilizada. A aprotinina (Sigma-EUA) corresponde aos pontos # 1 e 16, e o efluente industrial ao ponto #2. Picos de dessorção a pH 2,1: pontos # 3, 4 e 5 (cromatografias # 1, 2 e 3, respectivamente). Picos de dessorção a pH 3,0: pontos # 6, 7 e 8 (cromatografias # 1, 2 3, respectivamente). Picos de dessorção a pH 4,0: pontos # 9, 10 e 11 (cromatografias # 1, 2 3, respectivamente). Proteínas utilizadas como controle: pontos # 12, 13, 14 e 15 (quimotripsina, tripsina, insulina e glucagon, respectivamente). Aplicado em cada ponto o equivalente a 200 ng de aprotinina, segundo inibição de quimotripsina.

Apesar do ensaio ser qualitativo, percebe-se que os pontos referentes ao pico de eluição com tampão no pH 4,0 (pontos # 9, 10 e 11) e pH 3,0 (pontos # 6, 7 e 8) são os mais fortes dando a indicação que estes picos são os que contêm maior quantidade de aprotinina. Apesar de não ter sido detectada inibição de quimotripsina no eluído a pH 2,1, o teste indicou a presença de uma pequena quantidade de aprotinina nessas amostras (pontos # 3, 4 e 5). O ponto # 2, referente ao efluente industrial, apresentou um halo fraco, perceptível apenas na membrana de teste original, o que era esperado, pois este efluente é uma mistura complexa e parte da inibição pode ser devido a compostos que inibem a tripsina (ou quimotripsina), mas não são aprotinina.

Foram incluídas amostras contendo proteínas que não a aprotinina como controle do método no que se refere a especificidade do anticorpo (pontos # 12,

13, 14 e 15). Dentre os controles utilizados, insulina e glucagon (pontos # 14 e 15), conforme esperado, não indicaram a presença da aprotinina, já quimotripsina e tripsina (pontos #12 e 13) apresentaram um sinal fraco, que talvez seja devido à própria aprotinina que pode estar eventualmente complexada à estas enzimas, uma vez que ambas são inibidas pela aprotinina e presentes no pâncreas.

4.3. Segunda Estratégia: Cromatografia em Hidroxiapatita seguida de Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada

Neste ítem são apresentados, primeiramente os resultados obtidos nos experimentos utilizando somente proteína pura em solução tampão. Os objetivos destes estudos foram adquirir os conhecimentos básicos necessários para utilização da hidroxiapatita na recuperação de aprotinina e obtenção das melhores condições de adsorção e dessorção de aprotinina neste adsorvente. Ao final, se apresentam os resultados obtidos como efluente industrial quando submetido às cromatografias em hidroxiapatita e quimotripsina imobilizada.

4.3.1. Experimentos Preliminares da Segunda Estratégia: Estudos com Aprotinina de Alta Pureza em Solução Tampão

4.3.1.1. Estimativa da Capacidade de Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita

A estimativa da determinação da capacidade de adsorção de aprotinina na hidroxiapatita foi inicialmente baseada no comportamento de adsorção de diversas proteínas neste adsorvente. Estudou-se seis proteínas com diversos pontos isoelétricos: pepsina, albumina de soro bovino, insulina, mioglobina, quimotripsina e lisozima, sendo as três primeiras proteínas ácidas e as três últimas básicas (pI's iguais a 1,0; 4,7; 5,5; 7,0; 8,4 e 10,8 , respectivamente).

A quantidade de proteína adsorvida foi medida pela diferença de absorbância inicial e final da fase líquida. As proteínas ácidas apresentaram uma média de adsorção de 67% (56, 64 e 80 para pepsina, albumina de soro bovino e insulina, respectivamente), ao passo que as proteínas básicas, que é o caso da aprotinina,

apresentaram uma média de 83% de proteína adsorvida (87, 79 e 84% para mioglobina, quimotripsina e lisozima, respectivamente). Como utilizou-se 1,0 mL de solução protéica com concentração de 1 mg/mL para cada 40 mg de adsorvente, a capacidade média resultante foi de cerca de 20 mg proteína básica/g de adsorvente seco.

Após este estudo preliminar, verificou-se a quantidade de aprotinina adsorvida em diferentes massas iniciais de hidroxiapatita (Tabela 4.2), cujo valor médio foi em torno de 20 mg/g.

Tabela 4.2- Determinação da capacidade de adsorção de aprotinina em hidroxiapatita

Massa de HA (mg)	Ceq* (mg/mL)	Adsorção (%)	q (mg/g)**
40,0	0,34	70,5	17,6
30,0	0,45	61,5	20,5
25,0	0,62	46,4	18,6
20,0	0,68	40,1	20,1

* Ceq = concentração de aprotinina no equilíbrio

** q = capacidade de adsorção de aprotinina

Co = concentração inicial de aprotinina, 1,0 mg/mL

A capacidade de adsorção para a aprotinina foi a mesma da média encontrada para as três proteínas básicas, estudadas anteriormente (mioglobina, quimotripsina e lisozima). Como não houve diferença significativa da capacidade com a variação da massa, estabeleceu-se 30 mg de hidroxiapatita como a quantidade de adsorvente a ser utilizada em cada batelada dos experimentos posteriores de adsorção e dessorção.

4.3.1.2. Determinação do Tempo de Equilíbrio para a Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita

A Figura 4.8 reporta os valores de concentração de aprotinina em solução ao longo do tempo, quando se contactou soluções de aprotinina com hidroxiapatita. Os valores de absorbância indicados no eixo das ordenadas são referentes à diferença entre as absorbâncias das soluções de proteínas contactados com o adsorvente e de solução tampão contactada apenas com adsorvente (sistema controle).

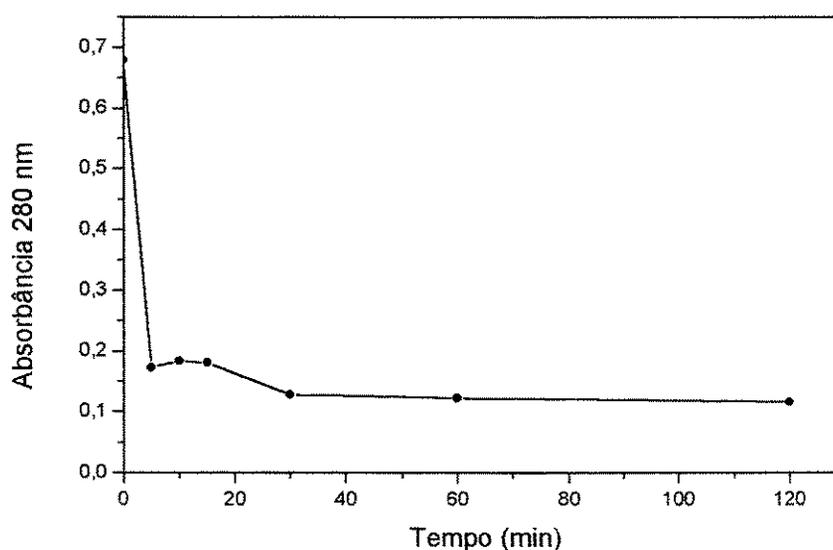


Figura 4.8- Determinação do tempo de equilíbrio para a adsorção da aprotinina em hidroxiapatita. Concentração inicial de 1,0 mg/mL de aprotinina em tampão fosfato 1 mM pH 6,8. Temperatura, 25°C. Massa de hidroxiapatita, 30 mg.

Nos 10 minutos iniciais ocorre uma redução significativa da absorbância, em torno de 75%. Após este tempo, há uma tendência à estabilidade. O tempo de equilíbrio utilizado nos ensaios posteriores para a otimização das condições de adsorção (planejamento estatístico experimental) foi estipulado como 1 hora para se assumir uma condição de equilíbrio.

4.3.1.3. Adsorção de Aprotinina em Hidroxiapatita: Efeito de Concentração de NaCl e pH

O estudo da adsorção de aprotinina em hidroxiapatita foi realizado através de planejamento estatístico experimental composto por duas variáveis independentes, pH e concentração de sal, e uma variável dependente, massa de aprotinina adsorvida por massa de gel. Os níveis das variáveis estudadas, bem como as capacidades obtidas estão representados a seguir na Tabela 4.3.

Tabela 4.3- Planejamento experimental para o estudo do efeito do pH e força iônica sobre a adsorção de aprotinina em hidroxiapatita.

<i>Ensaio</i>	<i>x1</i>	<i>x2</i>	<i>pH</i>	<i>C (M)*</i>	<i>Adsorção (%)</i>	<i>q (mg/g)**</i>
1	-1	-1	6,5	0,100	28,5	9,5
2	1	-1	7,5	0,100	27,4	8,9
3	-1	1	6,5	0,500	14,4	4,8
4	1	1	7,5	0,500	9,8	3,3
5	0	0	7,0	0,300	22,7	7,5
6	0	0	7,0	0,300	24,6	8,2
7	0	0	7,0	0,300	24,4	7,9
8	0	0	7,0	0,300	26,4	8,6
9	-2 ^{1/2}	0	6,3	0,300	25,8	8,6
10	0	2 ^{1/2}	7,0	0,582	1,9	0,6
11	2 ^{1/2}	0	7,7	0,300	9,5	3,4
12	0	-2 ^{1/2}	7,0	0,018	44,9	14,8

C*- concentração molar de cloreto de sódio

q**- capacidade de adsorção de aprotinina

x1 é o valor da variável independente pH, através da equação: $x1 = (pH - 8,0) / 0,5$

x2 é o valor da variável independente C, através da equação: $x2 = (C - 0,300) / 0,5$

As faixas de pH estudadas para a adsorção de aprotinina foram próximas às encontradas na literatura para adsorção de proteínas diversas em hidroxiapatita, além de terem sido limitadas pelas faixas tamponantes dos tampões escolhidos. O sal escolhido para o estudo foi o cloreto de sódio por ser este normalmente utilizado em processos envolvendo produtos farmacêuticos. O

cálculo dos erros associados aos coeficientes pôde ser determinado através da variabilidade apresentada por quatro ensaios no ponto central.

A partir dos resultados obtidos experimentalmente segundo as condições apresentadas na Tabela 4.3, foram realizadas modelagens pelo método dos mínimos quadrados, ajustando-se os dados a modelos empíricos (polinômio de primeira ou segunda ordem) com auxílio dos programas computacionais Modreg (parte integrante do livro "Planejamento e Otimização de Experimentos", Bruns *et al.* 1995) e Statistica (Statsoft, EUA). Através dos modelos obtidos, foi construída uma superfície de resposta onde os efeitos que as variáveis estudadas exercem sobre a resposta de interesse podem ser visualizados (Figura 4.9).

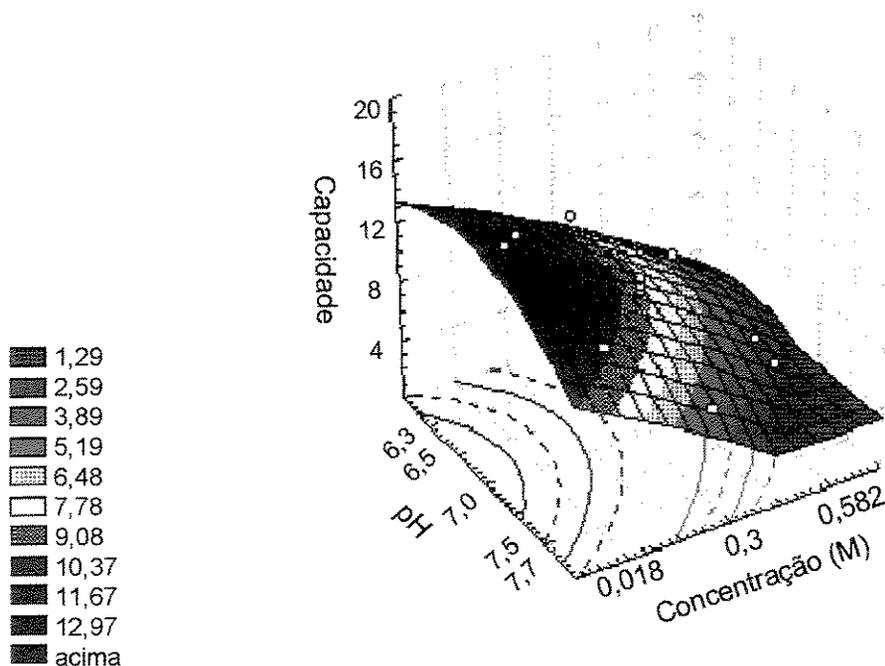


Figura 4.9- Superfície de resposta dos efeitos de pH e força iônica em NaCl sobre a adsorção de aprotinina em hidroxiapatita. A concentração molar se refere à concentração de NaCl; e a capacidade à capacidade de adsorção de aprotinina em hidroxiapatita (mg proteína adsorvida por mg de adsorvente) . Massa de hidroxiapatita: 30 mg, concentração de aprotinina inicial: 1,0 mg/mL.

O modelo obtido através do planejamento fatorial para capacidade de adsorção de aprotinina em hidroxiapatita, com os valores dos parâmetros codificados, é o que se segue:

$$q = -194,56 + 61,04 \text{ pH} + 0,82 \mu - 4,71 \text{pH}^2 - 5,78 \mu^2 - 2,33 \text{pH}\mu \quad \text{Eq 3.1}$$

onde:

q é a capacidade da resina dada em miligrama de aprotinina por miligrama de hidroxiapatita;

μ é a força iônica em termos de concentração molar de sal.

De acordo com os resultados obtidos com o programa Modreg, a porcentagem de variância explicada (89,3451) está relativamente próxima da porcentagem máxima de variância explicável (99,5678), não apresentando evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático. Por outro lado, há evidência de falta de ajuste ao modelo quadrático no campo experimentado ao nível de confiança de 95% quando analisando a relação entre as médias quadráticas de falta de ajuste e de erro puro é maior do que o valor de F tabelado.

$$MQ_{faj} / MQ_{ep} = 23,6542 > 9,28 = F_{3,3} \quad \text{Eq 3.2}$$

Apesar do coeficiente de determinação do modelo não ter sido elevado (0,893), o ajuste permitiu se fazer uma análise qualitativa do comportamento do sistema relativo às variações de pH e de concentração de NaCl. Pôde-se verificar que o aumento da força iônica desfavoreceu o processo de adsorção, enquanto o pH não influenciou significativamente o processo. De acordo com este comportamento, a condição selecionada como condição de alta eficiência para adsorção nos ensaios futuros foi tampão fosfato 1 mM, pH 6,5 e 18 mM de NaCl.

4.3.1.4. Dessorção de Aprotinina em Hidroxiapatita: Seleção de Eluente

Foram estudadas várias soluções de eluentes, em diferentes condições, a fim de se promover a dessorção de aprotinina de hidroxiapatita. Na Tabela 4.4 estão apresentados os diferentes eluentes, suas concentrações e as respectivas eficiências de dessorção de aprotinina.

Tabela 4.4- Dessorção de aprotinina adsorvida em hidroxiapatita, com diferentes eluentes em várias concentrações.

<i>Eluente</i>	<i>Concentração (mM)</i>	<i>Dessorção (%) ¹</i>
CaCl ₂	1	27
	3	64
	10	62
	20	57
PO ₄ ⁻² pH 6,8	100	39*
	200	44*
	300	50*
MgCl ₂	3	50
NaCl	100	43
	200	44
	300	50

1 – percentagem da aprotinina adsorvida em 30 mg de HA, média de triplicatas.

* – valor médio de dois resultados

Um aumento da concentração de sal tanto para a solução de tampão fosfato como para a solução de NaCl proporcionou um aumento na dessorção de aprotinina. O CaCl₂, no entanto, apresentou maior dessorção com a diminuição da concentração de sal, sendo que a dessorção para 10 mM foi praticamente a mesma para 3 mM; já na concentração de 1 mM observou-se uma diminuição drástica do nível da dessorção. O MgCl₂, na concentração que para CaCl₂ resultou na maior dessorção, mostrou-se menos eficiente que este. Assim, a dessorção da aprotinina mostrou ser mais efetiva quando o CaCl₂ 3 mM foi utilizado como eluente. O mecanismo de dessorção de proteínas em hidroxiapatita para este caso foi previsto por Gorbunoff (1984), onde o íon Ca²⁺ do tampão age no grupamento -NH₃⁺ da proteína ligada ao fosfato da hidroxiapatita, liberando-a.

Nestes experimentos, o objetivo foi verificar se a hidroxiapatita era apta para dessorver a aprotinina empregando diversas soluções de eluentes normalmente utilizados para a dessorção de proteínas neste adsorvente. Não pretendeu-se com

este estudo atingir a totalidade da dessorção, mas sim a viabilidade do processo por esta via, a ser otimizado eventualmente em outro trabalho.

Em suma, os experimentos realizados utilizando aprotinina de alta pureza em solução tampão e hidroxiapatita permitiram estimar a capacidade e a determinação do tempo de equilíbrio para a adsorção de aprotinina neste adsorvente. Além disso, o planejamento experimental forneceu informações sobre o comportamento de adsorção e dessorção da aprotinina, necessárias para os estudos posteriores com efluente industrial.

4.3.2. Experimentos Finais da Segunda Estratégia: Estudos com Efluente Industrial (SPI)

Dando continuidade ao desenvolvimento da segunda abordagem estudada para a recuperação de aprotinina, o SPI foi processado por cromatografias seqüenciais: cromatografia em hidroxiapatita seguida de cromatografia de afinidade com quimotripsina imobilizada.

A cromatografia em hidroxiapatita foi realizada segundo a condição de alta eficiência encontrada com os experimentos baseados no planejamento estatístico experimental: tampão fosfato 1 mM pH 6,5 com 18 mM de NaCl para a adsorção e CaCl_2 3 mM para a dessorção (Figura 4.10).

Na dessorção desta primeira etapa cromatográfica utilizando a hidroxiapatita como adsorvente, as primeiras frações da dessorção, volumes compreendidos entre 8 e 13 mL, formaram um pico de proteína que apresentou inibição de quimotripsina (a determinação da inibição de tripsina não foi realizada para estas frações). Amostras coletadas próximas a 30 mL apresentaram inibição apesar de não se detectar pico de proteína. Durante a etapa de regeneração uma grande quantidade de proteína foi removida da coluna, porém nenhuma das frações coletadas apresentou inibição. Desse modo o material responsável pelo aparecimento da cor escura na coluna de hidroxiapatita ao longo da cromatografia, não é aprotinina ou algum outro inibidor de proteases. O fator de purificação, calculado segundo a inibição de quimotripsina, apresentado nesta etapa foi de 55

para o "pool" das frações compreendidas entre 8 e 13 mL, bem como das frações coletadas em 25 e 30 mL.

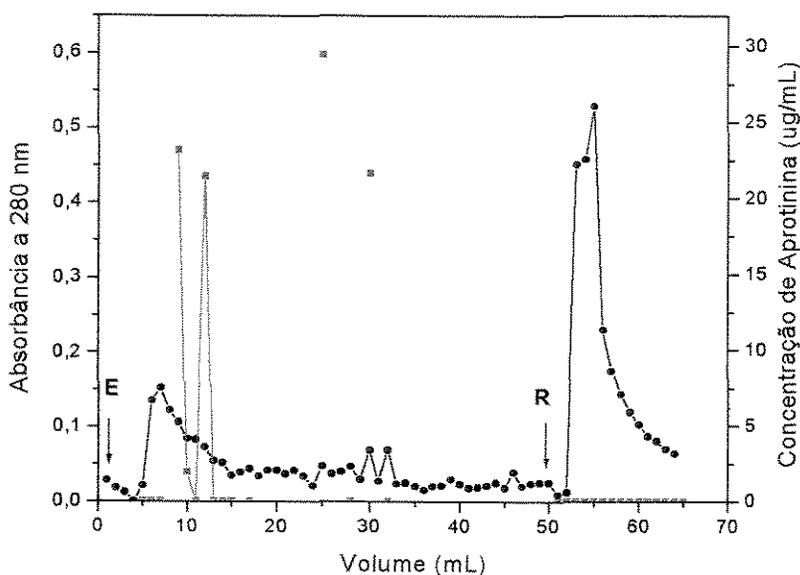


Figura 4.10- Dessorção da coluna com hidroxiapatita alimentada com SPI 5,0%. Tampão de lavagem, fosfato 1 mM pH 6,5; tampão de dessorção, CaCl_2 3 mM e tampão de regeneração fosfato 350 mM pH 8,0; vazão, 0,8 mL/min. A letra E indica o início da etapa de eluição e a letra R o início da etapa de regeneração ● - proteína total; ■ - inibição de quimotripsina.

O balanço de proteína baseado nas medidas de absorbância das amostras mostrou que mais de 90% da proteína injetada era recuperada nas frações coletadas durante as etapas de "flowthrough" e lavagem. De acordo com os ensaios de inibição de quimotripsina, somente de 2 a 3% da aprotinina injetada foi recuperada. Esta baixa recuperação talvez seja devido à complexidade do efluente industrial (presença de inibidores que não a aprotinina), uma vez que nos experimentos utilizando aprotinina pura em solução tampão, os níveis de dessorção atingidos foram consideravelmente maiores. A complexidade da alimentação parece estar interferindo na afinidade entre a hidroxiapatita e aprotinina reduzindo a recuperação de aprotinina em quantidades significativas.

Em seguida, alimentou-se a coluna contendo gel com quimotripsina bovina imobilizada com as frações de dessorção, coletadas durante o desenvolvimento da adsorção em hidroxiapatita, que apresentaram inibição (Figura 4.11).

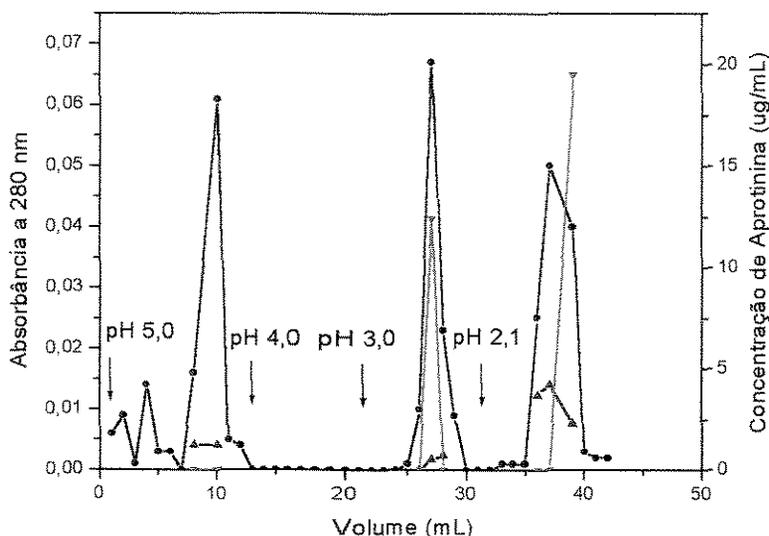


Figura 4.11 Dessorção da coluna com quimotripsina imobilizada alimentada com picos obtidos da cromatografia com hidroxiapatita. Tampão de lavagem, Tris 50 mM pH 8,0 com CaCl_2 0,02 N e NaCl 0,582 M; tampões de dessorção: acetato 50 mM pH 5,0 e pH 4,0, glicina 20 mM pH 3,0 e pH 2,1; vazão, 0,8 mL/min. As setas indicam a troca do tampão nos diferentes pHs durante esta etapa. ● - proteína total; ▲ - inibição de tripsina; ▼ - inibição de quimotripsina.

O desenvolvimento desta cromatografia foi semelhante ao realizado com o efluente diretamente na coluna com quimotripsina imobilizada com dessorção em degrau de pH. Detectou-se três picos significativos, porém, o primeiro pico surgiu durante a aplicação do tampão a pH 5,0 e não a pH 4,0 como nas cromatografias realizadas anteriormente em quimotripsina imobilizada. Talvez isto tenha ocorrido porque a alimentação desta cromatografia já sofreu uma separação sendo, portanto menos complexa, daí o tampão a pH 5,0 ser eficiente para eluir as proteínas. Contrariamente, a coluna de quimotripsina por ser a primeira cromatografia, poderia estar sofrendo algum efeito tamponante, devido a complexidade do meio, que resultou no aparecimento do pico somente a pH 4,0.

Todos os picos apresentaram inibição para a tripsina, mas o primeiro pico não apresentou inibição para quimotripsina.

Uma vez que, ao longo da etapa de dessorção, a inibição de quimotripsina aumentou gradativamente, tem-se a impressão de que em valores mais baixos de pH a dessorção de aprotinina é favorecida, contrariando resultados anteriores e o estudo realizado por Azzoni e Miranda (1999). Uma tabela contendo as recuperações de aprotinina bem como os fatores de purificação obtidos nesta etapa está apresentada a seguir (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Recuperação de aprotinina obtida na adsorção sequencial em hidroxiapatita seguida de quimotripsina imobilizada, com respectivos fatores de purificação.

pH de Eluição do Pico	Recuperação de Aprotinina (μg)		Fator de Purificação*	
	T	Q	T	Q
<i>pH 5,0</i>	2,4	0	26	0
<i>pH 3,0</i>	1,2	12,4	25	54
<i>pH 2,1</i>	10,2	19,7	41	72

T e Q: indicam que os valores foram calculados baseados nas inibições de tripsina e quimotripsina, respectivamente.

* Fator de purificação em relação ao SPI.

Talvez no primeiro "pool", eluído a pH 5,0 esteja ocorrendo a dessorção de APTI, pois neste pH somente foi detectada inibição de tripsina. Esperava-se que os fatores de purificação obtidos no processo em duas etapas (54 e 72) fossem maiores do que os obtidos somente na adsorção em hidroxiapatita (55), por se tratar de uma coluna de afinidade como etapa final do processo, porém estes fatores foram da mesma ordem de grandeza. Uma vez que a coluna de afinidade quando alimentada diretamente com o SPI atinge fatores de purificação de 200 a 400, a explicação talvez possa residir justamente na alimentação da cromatografia em quimotripsina imobilizada neste processo em duas etapas: possivelmente a hidroxiapatita não está sendo efetiva na separação da aprotinina dos demais componentes do meio, devido complexidade do SPI, resultando num eluído que

não contém aprotinina em quantidades significativas. Como a regeneração também não apresentou inibição, a proteína deve estar se ligando fracamente a hidroxiapatita, sendo eliminada no “flowthrough”.

4.4. Terceira Estratégia: Cromatografia em Quimotripsina Imobilizada seguida de Cromatografia IMAC

A terceira abordagem estudada na recuperação de aprotinina foi a utilização de IMAC, seguindo a estratégia utilizada por Tamagawa (1999) e Nikolov *et al.* (2000). Estes autores usaram IMAC para adsorver impurezas e não a proteína alvo (técnica aqui chamada de IMAC reverso), uma vez que a aprotinina não possui resíduos histidina e não adsorve em metais quelatados. Tamagawa (1999) não obteve sucesso devido ter trabalhado com alimentação complexa (SPI). No entanto, Nikolov *et al.* (2000) utilizaram como alimentação material pré-purificado por afinidade e obtiveram resultados altamente positivos, pois aprotinina recombinante de milho foi obtida com pureza de 95%.

A alimentação da cromatografia IMAC foi realizada com os “pools” de eluição da cromatografia de afinidade nos pHs 4,0, 3,0 e 2,1, separadamente, a fim de se observar em qual pH de eluição da cromatografia em quimotripsina imobilizada ocorre maior recuperação de aprotinina. Incluiu-se também um estudo sobre a influência de sal na alimentação da coluna IMAC com o “pool” do eluído a pH 2,1 através da realização de duas cromatografias idênticas exceto pela concentração de sal (NaCl): zero e 0,5 M.

As cromatografias realizadas nessas condições apresentaram o mesmo perfil com exceção do eluído a pH 2,1, (Figuras 4.12, 4.13 e 4.14). Como a quantidade de proteína total presente na alimentação da primeira cromatografia realizada (eluído a pH 4,0) era baixa, optou-se pela concentração dos demais “pools” de eluição da cromatografia em quimotripsina imobilizada. Assim os eluídos a pH 3,0 e 2,1 foram concentrados por meio de uma liofilização para possibilitar a determinação de inibição, concentração de proteína e conseqüentemente, de fatores de purificação mais precisos. Portanto, as

cromatografias representadas nas Figuras 4.13 e 4.14 referem-se às alimentações liofilizadas e dissolvidas em volumes reduzidos de tampão.

O comportamento de dessorção foi semelhante para as cromatografias, com alimentação dos "pools" a pH 4,0 e 3,0: aparecimento de inibição de quimotripsina e tripsina nas frações finais coletadas durante a alimentação ("flowthrough") e durante toda a etapa de lavagem e somente inibição de tripsina nas frações coletadas durante a eluição. Na etapa de regeneração formaram-se dois picos com absorbância alta, devido a presença do íon metálico e do agente quelante EDTA.

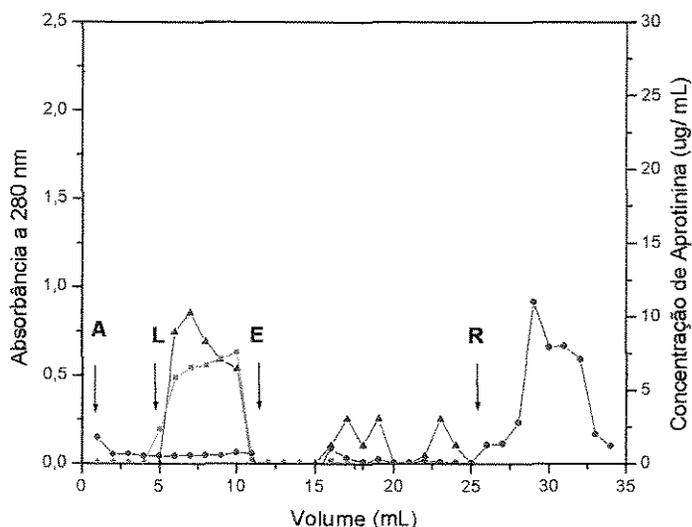


Figura 4.12- Cromatograma IMAC com alimentação do pico de eluição da cromatografia de afinidade com quimotripsina imobilizada no pH 4,0. Tampão de equilíbrio, adsorção e lavagem, fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl; tampão de dessorção, fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl e 0,1 M de imidazol; tampão de regeneração EDTA 50 mM com 1,0 M de NaCl. ● -proteína total; ▲ - inibição de tripsina; ■ - inibição de quimotripsina.

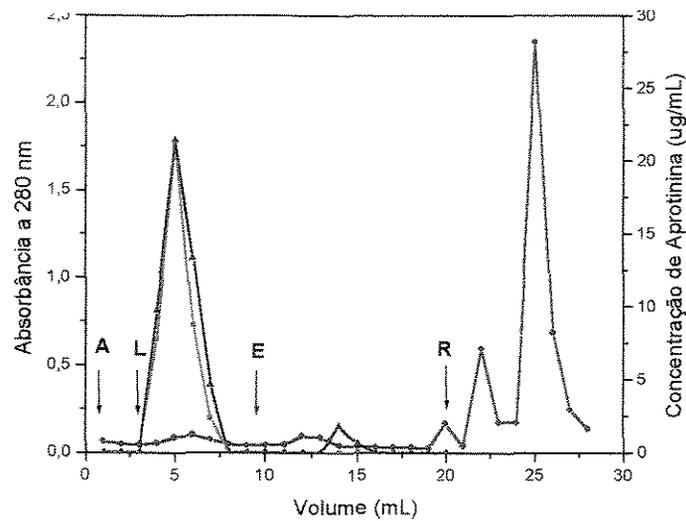


Figura 4.13- Cromatograma IMAC com alimentação do pico de eluição da cromatografia de afinidade com quimotripsina imobilizada no pH 3,0. Tampão de equilíbrio, adsorção e lavagem, fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl; tampão de dessorção, fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl e 0,1 M de imidazol; tampão de regeneração EDTA 50 mM com 1,0 M de NaCl. ● - proteína total; ▲ - inibição de tripsina; ■ - inibição de quimotripsina.

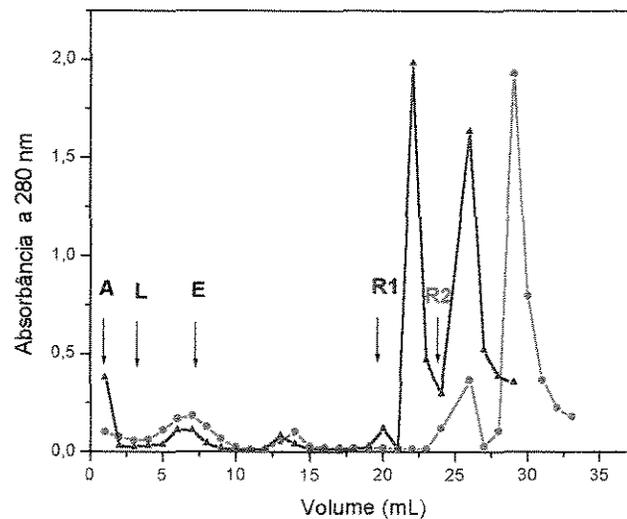


Figura 4.14- Cromatogramas IMAC com alimentação do pico de eluição da cromatografia de afinidade com quimotripsina imobilizada no pH 2,1, com e sem sal. Tampão de equilíbrio, adsorção e lavagem, fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl; tampão de dessorção, fosfato 50 mM pH 7,0 com 0,5 M de NaCl e 0,1 M de imidazol; tampão de regeneração EDTA 50 mM com 1,0 M de NaCl. ▲ - proteína total da amostra a pH 2,1 com sal, ● - proteína total da amostra a pH 2,1 sem sal. As letras R1 e R2 indicam o início das etapas de regeneração para a alimentação com sal, e regeneração para a alimentação sem sal, respectivamente.

As Tabelas 4.6 e 4.7 contêm os balanços de massa das cromatografias IMAC utilizando como alimentação os eluídos a pH 4,0 e 3,0 da cromatografia em quimotripsina imobilizada.

Tabela 4.6 - Balanço de inibição da cromatografia IMAC utilizando como alimentação a fração eluída a pH 4,0 na cromatografia em quimotripsina imobilizada.

FRAÇÃO	VOLUME (mL)	RECUPERAÇÃO DE APROTININA			
		Massa (μg)		Porcentagem	
		T	Q	T	Q
ALIMENTAÇÃO	6,0	49,0	53,4	100	100
"Flowthrough"	6,0	8,9	8,1	18	15
LAVAGEM	5,0	33,7	28,0	69	52
ELUIÇÃO	14,0	13,1	0,2	27	0,4
TOTAL				114	67

T e Q: indicam que os valores foram calculados baseados ns inibições de tripsina e quimotripsina, respectivamente.

Tabela 4.7 - Balanço de inibição da cromatografia IMAC utilizando como alimentação a fração eluída a pH 3,0 na cromatografia em quimotripsina imobilizada.

FRAÇÃO	VOLUME (mL)	RECUPERAÇÃO DE APROTININA			
		Massa (μg)		Porcentagem	
		T	Q	T	Q
ALIMENTAÇÃO	3,0	37,4	46,9	100	100
"Flowthrough"	3,0	0	0	0	0
LAVAGEM	6,0	49,0	39,8	131	85
ELUIÇÃO	11,0	2,4	0	6	0
TOTAL				137	85

T e Q: indicam que os valores foram calculados baseados ns inibições de tripsina e quimotripsina, respectivamente.

Assim, esta terceira estratégia de recuperação da aprotinina foi positiva, pois o inibidor presente na alimentação capaz de inibir tripsina e quimotripsina, pôde ser recuperado no “flowthrough” e, principalmente, na etapa de lavagem. Esse inibidor é certamente aprotinina, uma vez que esta molécula, por não conter resíduos que propiciem a interação IMAC, deveria passar diretamente na coluna, sendo eluída na etapa de lavagem, restando à etapa de eluição a dessorção das moléculas que ficaram retidas fortemente na matriz devido às interações com a histidina.

Nas cromatografias realizadas com o eluído da coluna de quimotripsina a pH 2,1, na presença ou não de NaCl, nenhuma inibição foi detectada. Talvez este comportamento possa ser explicado devido a alimentação ter baixa concentração de aprotinina, mesmo após o processo de liofilização, pois dentre as três alimentações utilizadas era a que possuía menor quantidade de aprotinina presente. O ensaio de “dot blot” das alimentações e frações destas cromatografias IMAC está apresentado na Figura 4.15.

O ensaio confirmou a presença de aprotinina nas amostras coletadas durante as cromatografias IMAC. Conforme as análises de inibição, aprotinina estaria presente somente nas frações do “flowthrough” e da lavagem das cromatografias alimentadas com o eluído a pH 4,0 e 3,0. No entanto este “dot blot” indicou a presença de aprotinina também nas frações da eluição destas cromatografias (pontos # 4, 5 e 8) inclusive com a cromatografia alimentada com o eluído a pH 2,1 (ponto # 11). Talvez esta aprotinina presente na eluição indicada pelo “dot blot” tenha alguma eventual modificação na sua estrutura, não possibilitando a sua detecção no ensaio de inibição, uma vez que os sítios de reconhecimento do anticorpo e os sítios que atuam inibindo a reação com a tripsina ou quimotripsina podem ser diferentes. Outra explicação seria a sensibilidade do método: ao passo que os ensaios de inibição permitem detectar quantidades de aprotinina de no mínimo 400 ng, o método “dot blot” detecta quantidades de aprotinina da ordem de dezenas de nanogramas.

As amostras da regeneração não indicaram a presença de aprotinina em nenhuma das cromatografias realizadas, como esperado. O efluente industrial e a

tripsina, utilizada como controle do método apresentaram novamente um halo, repetindo o comportamento dos ensaios anteriores.

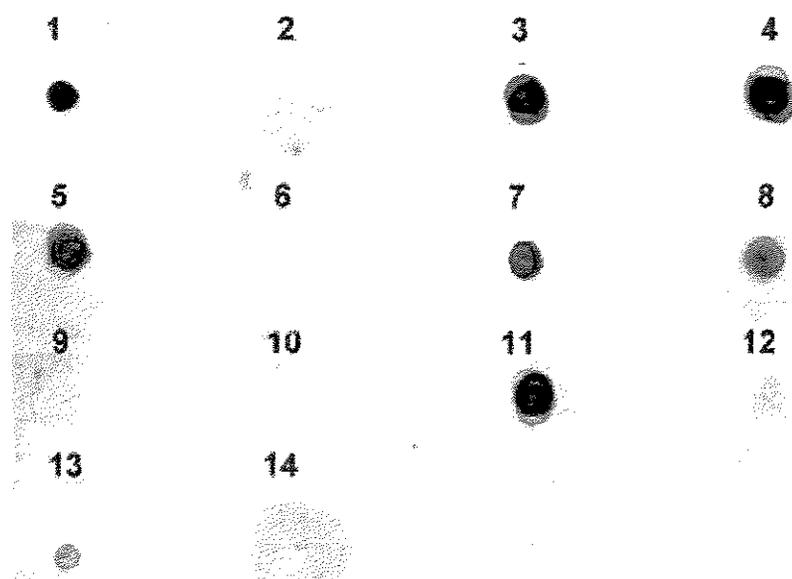


Figura 4.15—“Dot blot” das amostras obtidas nos picos de dessorção da cromatografia IMAC cuja alimentação foram os picos de eluição da coluna com quimotripsina imobilizada. A aprotinina (Sigma-EUA) corresponde ao ponto #1 e o efluente industrial aos pontos #2 e 16. Amostras referentes às etapas de lavagem, eluição (duas amostras) e regeneração da cromatografia cuja alimentação foi o eluído a pH 4,0: pontos # 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Amostras referentes às etapas de lavagem, eluição e regeneração da cromatografia cuja alimentação foi o eluído a pH 3,0: pontos # 7 8 e 9, respectivamente. Amostras referentes às etapas de lavagem, eluição e regeneração da cromatografia cuja alimentação foi o eluído a pH 2,1 sem sal: pontos # 10, 11 e 12, respectivamente. Tripsina utilizada como controle: ponto #13. Aplicado em cada ponto o equivalente a 200 ng de aprotinina, segundo inibição de tripsina.

Realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante, para a confirmação da presença de aprotinina e também avaliação da presença de contaminantes. Optou-se por analisar o conjunto das amostras cuja alimentação da cromatografia IMAC foi o eluído a pH 3,0 da cromatografia em quimotripsina imobilizada, pois foi o que apresentou alguma definição (Figura 4.16).

Apesar de ser uma análise exploratória e da baixa concentração das amostras, percebe-se que houve uma alta purificação ao longo do processo, principalmente com a cromatografia em quimotripsina imobilizada. Pode-se

observar que o efluente industrial do processamento de insulina, utilizado como ponto de partida neste trabalho, possui uma composição complexa, com grande quantidade de proteínas de baixa massa molecular, principalmente próximas a da aprotinina, mas que foram eliminadas já na primeira etapa com coluna de afinidade de quimotripsina imobilizada. Uma vez que as amostras estão em concentrações baixas, pode ser que existam contaminantes nas amostras das eluições das cromatografias em quimotripsina imobilizada e IMAC que não estão sendo detectados.

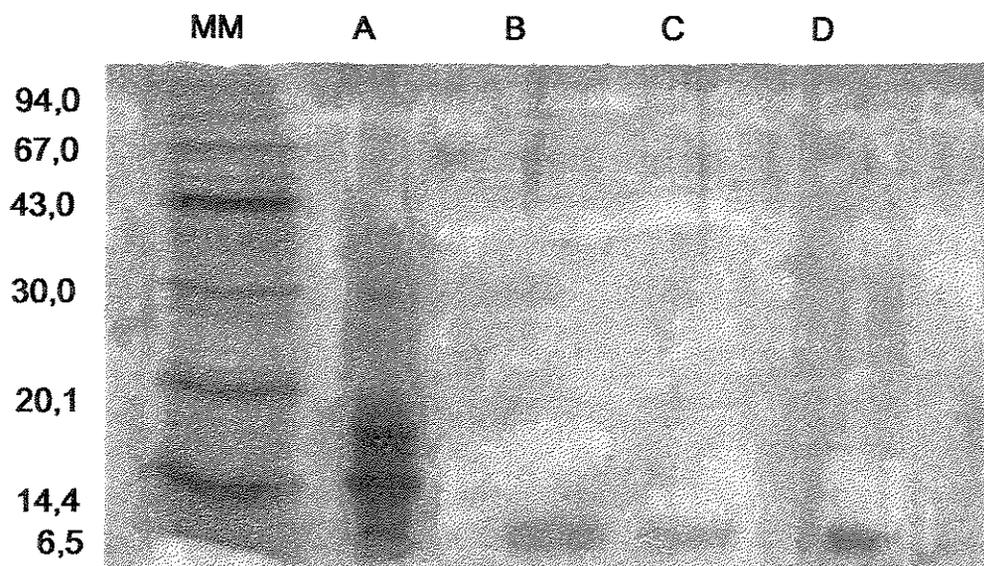


Figura 4.16 – Gel de eletroforese SDS-PAGE com análise das frações eluídas da cromatografia em quimotripsina imobilizada e IMAC. Os volumes de amostra aplicados variaram de 15 a 20 μL . Concentração do gel 17%. **MM**: marcador de massa molecular, **faixa A**: efluente industrial, 10 μg de proteína equivalente/mL, **faixa B**: eluído a pH 3,0 da cromatografia em quimotripsina imobilizada, 28 μg de aprotinina/mL, **faixa C**: fração da lavagem do IMAC utilizando como alimentação as frações dessorvidas da cromatografia em quimotripsina imobilizada a pH 3,0, 21 μg de aprotinina/mL, **faixa D**: aprotinina comercial 50 μg /mL.

4.5. Comparação entre as Estratégias Estudadas

Uma vez concluídas todas as etapas do trabalho, comparou-se as alternativas estudadas através dos fatores de purificação obtidos nas diferentes estratégias (Tabela 4.7). Os fatores de purificação foram determinados

experimentalmente baseado-se na quantidade de aprotinina, indicada pelos ensaios de inibição, presente na alimentação e nas frações da dessorção.

Tabela 4.8- Resumo das cromatografias em quimotripsina imobilizada (Q), IMAC, quimotripsina imobilizada seguida de IMAC (Q⇒IMAC), Hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita seguida de quimotripsina imobilizada (HA⇒Q), com os respectivos fatores de purificação dos picos de dessorção.

Tipo de Inibição	pH de Eluição dos Picos	Q	IMAC**	Q ⇒IMAC ^a	HA**	HA⇒Q ^b
<i>Inibição de tripsina</i>	(pH 4,0)	262	>3	786	-	26*
	(pH 3,0)	266		798		25
	(pH 2,1)	9		27		41
<i>Inibição de quimotripsina</i>	(pH 4,0)	225	>2	450	55	0*
	(pH 3,0)	476		952		54
	(pH 2,1)	-		-		72

* pico referente ao pH 5,0

** somente um pico de dessorção

a- calculado por multiplicação dos dois fatores de purificação

b- determinado experimentalmente, referente ao SPI

Na adsorção seqüencial em hidroxiapatita seguida de quimotripsina, os fatores foram calculados tomando-se como referência o efluente industrial. Na adsorção em quimotripsina imobilizada seguida de IMAC, os valores foram determinados através da multiplicação dos fatores obtidos em cada etapa cromatográfica. Entretanto, os fatores de purificação calculados para a cromatografia IMAC refletem uma purificação menor que a real, porque a concentração de proteína foi calculada através da diferença entre a quantidade de proteína presente na alimentação e na regeneração, não foi possível determinar a concentração de proteína nas frações do “flowthrough” e eluição. Desse modo, além da proteína nas frações de “flowthrough” e lavagem, também estava incluída a proteína referente às frações de eluição. Conseqüentemente os fatores de purificação alcançados nesta etapa foram certamente maiores que os indicados.

Analisando o desempenho da cromatografia em quimotripsina imobilizada, observa-se que as maiores recuperações ocorrem nos dois primeiros picos, pH 4,0 e 3,0, enquanto no pH 2,1 praticamente não há recuperação, com exceção quando a alimentação é a eluição da coluna de hidroxiapatita. A cromatografia IMAC proporciona uma purificação pequena, porém deve-se considerar que a alimentação é oriunda da coluna de quimotripsina imobilizada e já sofreu uma purificação significativa.

Na cromatografia com hidroxiapatita, a pequena purificação alcançada é um indicativo de que a hidroxiapatita não está promovendo uma separação efetiva da aprotinina. Observa-se que no processamento em duas etapas a coluna mais eficiente é a hidroxiapatita e não conforme esperado a de afinidade por teoria mais seletiva.

Das alternativas estudadas, a que apresentou maior fator de purificação foi o processo em duas etapas utilizando cromatografia em quimotripsina imobilizada seguida de IMAC, que atinge fator de purificação acima de 900. Comparando estes valores com os resultados obtidos por Azzoni e Miranda, 1999 (236 para a primeira coluna com tripsina imobilizada, baseada em inibição de quimotripsina e 7 para a segunda coluna com quimotripsina imobilizada, baseada em inibição de tripsina) a adsorção seqüencial em quimotripsina seguida de IMAC é uma alternativa bastante eficiente, uma vez que obteve fatores de purificação da mesma ordem de grandeza com o adicional de se estar trabalhando com uma coluna de custo mais baixo.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA OS PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. Conclusões

A principal conclusão deste trabalho é que, dentre as alternativas de processo estudadas, a que atingiu maiores níveis de purificação foi a terceira estratégia: cromatografia seqüencial de quimotripsina imobilizada seguida de cromatografia IMAC. Este processo foi tão eficiente quanto o processo inicial desenvolvido por Azzoni e Miranda (1999), pois atingiu fatores de purificação da mesma ordem de grandeza com o adicional de substituir uma cromatografia de afinidade (cromatografia em tripsina imobilizada) por uma cromatografia de menor custo (IMAC).

As conclusões específicas que permitiram chegar à conclusão principal acima estão citadas a seguir:

- a) O estudo das melhores condições de adsorção de aprotinina em hidroxiapatita através de técnicas de planejamento estatístico experimental indicou tampão fosfato 1 mM pH 6,5 com NaCl 18 mM como a melhor alternativa.
- b) Dentre os eluentes estudados para a dessorção de aprotinina em hidroxiapatita, o CaCl_2 a 3 mM apresentou maior dessorção, sendo portanto o escolhido.
- c) Para a cromatografia com quimotripsina imobilizada as melhores condições foram: 200 mL na alimentação (preparada com antecedência), filtrações em membranas com tamanho de poro 1,2; 0,45 e 0,22 μm , e dessorção em degrau de pH utilizando os tampões acetato 50 mM (pH 5,0 e 4,0) e glicina 20 mM (pH 3,0 e 2,1)

- d) O processamento do efluente industrial diretamente na coluna com quimotripsina imobilizada resultou em três picos, referentes aos pH 4,0; 3,0 e 2,1. Os picos apresentaram inibição tanto para tripsina como para quimotripsina, com fatores de purificação entre 225 e 476.
- e) A adsorção em hidroxiapatita foi realizada segundo as condições encontradas no planejamento estatístico experimental, porém foi necessária a remoção de material ainda adsorvido na coluna através de lavagem com tampão fosfato 0,35 M pH 8,0. O pico da dessorção apresentou inibição para quimotripsina.
- f) O comportamento de eluição da cromatografia de quimotripsina, utilizando os picos da cromatografia com hidroxiapatita como alimentação, foi semelhante aos anteriores utilizando somente coluna com quimotripsina imobilizada e degrau de pH, exceto pelo primeiro pico que foi formado durante a aplicação do tampão a pH 5,0 e não 4,0.
- g) A pré-purificação feita no extrato inicial, pela passagem em coluna com quimotripsina imobilizada, possibilitou o uso da técnica de IMAC reverso na recuperação de aprotinina.
- h) O processamento em duas etapas cromatográficas (adsorção em quimotripsina seguida de IMAC), atingiu os maiores fatores de purificação (acima de 900), dentre os processos estudados.
- i) O método de “Western blot” realizado sob a forma de “Dot blot” indicou a presença de aprotinina nos três picos das cromatografias, confirmando assim os dados obtidos nos ensaios de inibição.

5.2. Sugestões para os Próximos Trabalhos

Para dar continuidade ao trabalho, seriam interessantes alguns estudos adicionais objetivando recuperar aprotinina em maiores quantidades e níveis de purificação.

Uma vez que a melhor estratégia dentre as três estudadas foi a cromatografia seqüencial em quimotripsina imobilizada seguida de cromatografia

IMAC, seria importante continuar o desenvolvimento desta estratégia de processo visando uma maior recuperação de aprotinina. Uma sugestão seria realizar a dessorção da cromatografia em quimotripsina imobilizada a pH 3,0, ao invés de degrau de pH, uma vez que a maior parte da aprotinina é recuperada no pH 4,0 e 3,0. Dessa maneira, a dessorção a pH 3,0 possibilitaria a obtenção de um pico com maior quantidade de aprotinina, não havendo a necessidade de se trabalhar com o material eluído a pH 2,1, já que a recuperação de aprotinina eluída neste pH é mínima.

Seria interessante também verificar se a realização da etapa de adsorção na ausência de sal minimizaria as interações de inibidores de tripsina na coluna de quimotripsina imobilizada, uma vez que Wilimowska-Pelc *et al.* (1999) afirmam que altas concentrações de sal podem conferir, a inibidores de tripsina, a propriedade de também inibirem quimotripsina. Outra tentativa de obter maior recuperação de aprotinina seria incluir na cromatografia IMAC um tampão zwitteriônico no lugar do tampão fosfato, pois este é levemente competitivo na adsorção, desfavorecendo a adsorção de contaminantes.

Uma outra sugestão seria processar volumes maiores de efluente em colunas maiores, ou seja, aumentar a escala destes estudos em bancada. As frações destas cromatografias em maior escala poderiam ser concentradas, por liofilização, por exemplo, o que permitiria nas análises de inibição, concentração de proteína, eletroforese e "dot blot" a identificação e quantificação da aprotinina e contaminantes presentes com mais precisão e clareza.

Uma análise de outros efluentes do processamento industrial da insulina permitiria a identificação de efluentes com potencialidade de serem melhor alimentação que o SPI no processo de recuperação de aprotinina, propiciaria maior recuperação sem grandes modificações no processo desenvolvido.

Outra estratégia de recuperação de aprotinina a ser considerada seria a aplicação da cromatografia em troca iônica como substituta da cromatografia em hidroxiapatita. Esta técnica exploraria o ponto isoelétrico alto da aprotinina (pH entre 10 a 10,5) promovendo uma elevada seletividade na separação da aprotinina dos demais constituintes do efluente.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZZONI, A. R. **Recuperação de Aprotinina a partir de Efluente de Processamento Industrial de Insulina através de Adsorção por Afinidade.** Campinas: FEQ UNICAMP, 1998. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- AZZONI, A. R. e MIRANDA, E. A., Recovery of aprotinin from insulin industrial process effluent by affinity adsorption. **Bioprocess Engineering** v.21, nº6, p.553-560, 1999.
- BARTHEL, T. e KULA, M. R. Rapid purification of des Pro (2) – Val15-Leu17- aprotinin from de culture broth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering** v.42, p.1331-1336, 1993.
- BEITLÉ, R. R. e ATAÍ, M. M. Immobilized metal affinity chromatography and related techniques. **AIChE Symposium Series** v.88, p.34-44, 1992.
- BELTER, P. A., CUSSLER, E. L. e HU, W. S. **Bioseparations-Downstream Processing Biotechnology.** John Wiley & Sons, 1988.
- BERNARDI, G. Chromatography of proteins on hydroxyapatite. **Methods in Enzymology** v.22, p.325-339, 1971A.
- BERNARDI, G. Chromatography of proteins on hydroxyapatite. **Methods in Enzymology** v.21, p.95-108, 1971B.
- BOSCHETTI, E. Advanced sorbents for preparative protein separation purposes. **Journal of Chromatography A** v. 658, p.207-236, 1994.

- 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** v.72, p. 248-254, 1976.
- BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. e BARROS NETO, B. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, Campinas, 1995.
- BURCK, P. J. Pancreatic secretory trypsin inhibitors. **Methods in Enzymology** v.19, p. 906-914, 1970.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Editora da Unicamp, Campinas, 1993.
- ELIAS, D. O. e SOUZA, M. H. L. Antifibrinolíticos na profilaxia do sangramento pós-perfusão I. Aprotinina. Publicação Eletrônica - Perfusion Line. <http://perfline.com/artigos/artigos98/aprotin.htm> (1998).
- FARGUES, C.; CHANEL, S. e GRÉVILLOT, G. An efficient three steps preparative purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* cells **Bioseparation** v.6, p.343-351, 1997.
- GEHLE, R. D. e SCHUGERL, K. Protein recovery by continuous flotation. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 20, p.133-138, 1984.
- GILBERT, S.; BAKALARA, N. e SANTARELLI, X. Three step chromatographic purification procedure for the production of a his-tag recombinant kinesin overexpressed in *E. coli*. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications** v.737, nº 1/2, p.143-150, 2000.
- GORBUNOFF, M. J. The interaction of proteins with hydroxyapatite. I. Role of protein charge and structure. **Analytical Biochemistry** v.136, p.425-432, 1984.
- GORBUNOFF, M. J. The interaction of proteins with hydroxyapatite. II. Role of acid and basic groups. **Analytical Biochemistry** v.136, p.433-439, 1984.

- GORBUNOFF, M. J. and TIMASHEFF, S. N. The interaction of proteins with hydroxyapatite. III. mechanism. **Analytical Biochemistry** v.136, p.440-445, 1984.
- JANSON, J. e RYDEN, L. Protein Purification. VCH Publishers, NY 1989.
- KASSEL, B. Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). **Methods in Enzymology** v.19, p. 844-852, 1970.
- KAWASAKI, T. Hydroxiapatite as a liquid chromatographic packing. **Journal of Chromatography** v. 544, p.147-184, 1991.
- KUNITZ, M. e NORTHROP, J. H. Isolation from beef pancreas crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitors and an inhibitors trypsin compound. **Journal of General Physiology** v. 19, p. 991-1001,1936 *apud* CARRERA, A.; FERNÁNDEZ, P.; QUINTANA, B. e MARTINEZ, M. V. Propiedades farmacológicas de la aprotinina y empleo terapéutico en cirugía cardíaca. **Revista Espanhola de Anestesiología e Reanimación**, v. 40,p. 292-299, 1993.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature** v.227, p. 680-685, 1970.
- MAZEN, A.; MURCIA, J. M.; MOLINETE, M.; SIMONIN, F.; GRADWOHL, G.; POIRIER, G. e DE MURCIA, G. Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel zinc-finger protein. **Nucleic Acids Research** v.17, nº12, p.4689-4698, 1989.
- MORRYSSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry** v. 117, p. 307-310, 1981.
- NIKOLOV, Z.; KUSNADI, A.; WOODARD, S.; AZZONI, A. R. e MIRANDA, E. A. Recovery of recombinant aprotinin from transgenic maize seed. **219th ACS National Meeting, São Francisco, USA.**

- NORIS, K.; NORIS, F.; BJORN, S. E.; DIERS, I. e PETERSEN, L. C. Aprotinin and aprotinin analogues expressed in yeast. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler** v.371, p.37-42, 1990.
- OGAWA, T. e HIRAIDE, T. Effect of pH on gradient elution of different proteins on two types of ceramic hydroxyapatite. **American Laboratory** v.28, nº 9, p.171-17L, 1996.
- PORATH, J.; CARLSSON, J; OLSSON, L. e BELFRAGE, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New approach to protein fractionation. **Nature** v.258, p. 589-599.
- ROMANIEC, M. P. M.; HUSKISSON, N.; BARKER, P. e DEMAIN, A. L. Purification and properties of the *Clostridium thermocellum* bglB gene product expressed in *Escherichia coli*. **Enzyme Microbiology and Technology** v.15, p.393-400, 1993.
- TAMAGAWA, R. E. **Desenvolvimento de Processo de Recuperação de Aprotinina através de Afinidade por Quelato Metálico**. Campinas: FEQ UNICAMP, 1999. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- TICE, D. A.; WOETH, M. H.; CLAUSS, R. H. e REED, G. E. The inhibition by trasylol of fibrinolytic activity associated with cardiovascular operations. **Surgery Gynecology and Obstetrics** v.119, p.71-74, 1964.
- TISELIUS, A.; HJERTÉN, S. e LEVIN, O. Protein chromatography on calcium phosphate columns. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 65, p. 132-155, 1956.
- TSCHECHE, H.; BECKMANN, J.; MEHLICH, A.; SCHNABEL, E.; TRUSCHEIT, E. e WENZEL, H. R. Semisynthetic engineering of proteinase inhibitor homologues. **Biochimica and Biophysica Acta** v.913, p. 97-101, 1987.

- VAN OEVEREN, W.; JANSE, N. J. G. e BIDSTRUP, B. P. Effects of aprotinin on haemostatic mechanism in cardiopulmonary bypass. **Annals of Thoracic Surgery** v. 44, p. 640-645, 1987.
- VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. **Trends in Biotechnology** v. 7, n° 3, p.71-76, 1989.
- WILIMOWSKA-PELC, A.; OLICHWIER, Z.; KOWALSKA, J.; GAUSZKA, A.; SZUSZKIEWICZ, W.; POLANOWSKI, A. e WILUSZ, T. High concentrations of sodium chloride facilitate the use of immobilized chymotrypsin for separating virgins forms of specific trypsin inhibitors. **Journal of Chromatography A** v.852, n° 1, p.227-235, 1999.
- WONG, J. W.; ALBRIGTH, R. L. e WANG, N. L. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications. **Separation and Purification Methods** v.20, n° 1, p.49-101, 1991.
- ZUREK, C.; KUBIS, E.; KEUP, P.; HÖRLEIN, D.; BEUNINK, J.; THOMMES, J.; KULA, M. R.; HOLLENBERG, C. P. e GELLINSEN, G. Production of two aprotinin variants in *Hansenula polymorpha*. **Process Biochemistry** v. 31, n° 7, p. 679-689, 1996.
- ZHANG, C. M.; RESLEWIC, S. A. e GLATZ, C. E. Suitability of immobilized metal affinity chromatography for protein purification from canola. **Biotechnology and Bioengineering** v.68, n° 1, p. 52-58, 2000.
- ZHONG, G.Y.; PETERSON, D.; DELANEY, D. E.; BAILEY, M.; WITCHER, D. R.; REGISTER III, J. C.; BOND, D.; LI, C. P.; MARSHAL, L.; KULISEK, E.; RITLAND, D.; MEYER, T.; HOOD, E. E. e HOWARD, J. A. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds. **Molecular Breeding** v.5, p.345-356, 1999.