

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia Química**

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**CROMATOGRAFIA NEGATIVA EM SEPHAROSE-TREN COMO TÉCNICA DE  
PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ADICIONADAS ARTIFICIALMENTE A  
EXTRATO DE SOJA**

Iara Rocha Antunes Pereira

Engenheira Química

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno

Orientadora

Prof . Dr. Everson Alves Miranda

Co-orientador

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

Campinas – São Paulo

Julho de 2009

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

P414c      Pereira, Iara Rocha Antunes  
Cromatografia negativa em Sepharose-TREN como  
técnica de purificação de proteínas adicionadas  
artificialmente a extrato de soja / Iara Rocha Antunes  
Pereira. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Sônia Maria Alves Bueno, Everson  
Alves Miranda.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Soja. 2. Cromatografia. 3. Purificação. 4.  
Aminas. I. Bueno, Sônia Maria Alves. II. Miranda,  
Everson Alves. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Negative chromatography on Sepharose-TREN as a technique of  
proteins purification artificially added to soybean extract

Palavras-chave em Inglês: Soybean, Chromatography, Purification, Amine

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

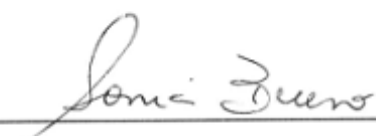
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: César Costapinto Santana, Adriano Rodrigues Azzoni

Data da defesa: 14/07/2009


Programa de Pós Graduação: Engenharia química

Dissertação de Mestrado defendida por Iara Rocha Antunes Pereira e aprovada em 14 de julho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:




---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno  
Orientadora – FEQ/UNICAMP



---

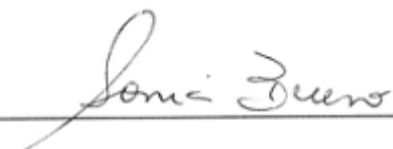
Prof. Dr. César Costapinto Santana  
FEQ/UNICAMP



---

Dr. Adriano Rodrigues Azzoni  
CBMEG/UNICAMP

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Iara Rocha Antunes Pereira e aprovada pela comissão julgadora em 14 de julho de 2009.



---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Alves Bueno  
Orientadora – FEQ/UNICAMP

Ao meu noivo Igor Tadeu

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais Arlete e Manoel pelo incentivo e amor incondicional.

Ao Igor pelo amor, companherismo e, acima de tudo, pelo auxílio no desenvolvimento dessa dissertação.

Aos orientadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Maria Alves Bueno e Prof. Dr. Everson Alves Miranda pela orientação, competência e profissionalismo.

Ao professor Marcos N. Eberlin, do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa do Instituto de Química da UNICAMP, pelas análises concedidas.

A todos os professores e funcionários da FEQ que, de uma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante esta jornada, amigos de trabalho, do dia a dia, amigos realmente imprescindíveis em minha vida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## RESUMO

Nos últimos tempos têm-se estudado plantas como biorreatores para a produção de proteínas recombinantes de interesse industrial e farmacêutico. Quando comparadas a outros sistemas de expressão, as plantas apresentam algumas vantagens, como a realização de modificações pós traducionais, baixo custo de produção, baixos riscos de contaminação por patógenos humanos, possibilidade das proteínas serem acumuladas em órgãos específicos que podem gerar maior estabilidade das mesmas. Visando a obtenção de conhecimento de base para posterior aplicação na purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas, realizaram-se estudos de purificação por cromatografia negativa em Sepharose-TREN de proteínas contendo ampla faixa de pI (IgG humana), pI ácidos (HSA e BSA) e pI alcalinos (aprotinina e lisozima), adicionadas artificialmente (“spiking”) a extrato de soja. Na cromatografia negativa, a proteína alvo é recuperada na fração não retida, enquanto as proteínas do extrato de soja permanecem adsorvidas na matriz. Visando maximizar a adsorção de proteínas do extrato de soja, avaliaram-se diferentes sistemas tamponantes, sendo que 2,8% das proteínas alimentadas foram detectadas na etapa de lavagem, quando se utilizou MES 25 mmol/L pH 6,5. Adicionando-se IgG humana na forma de “spiking” ao extrato de soja na concentração de 1,0 mg/mL, recuperou-se 38% na lavagem com pureza de 86% e fator de purificação de 4,6. Por meio de experimentos de curva de ruptura, determinou-se a capacidade dinâmica de Sepharose-TREN como sendo 25,4 mg/mL de gel a uma vazão de 0,5 mL/min. Para proteínas de valores de pI ácidos, houve adsorção total das proteínas alimentadas enquanto que proteínas de pI alcalinos foram parcialmente adsorvidas, indicando que as interações que predominam entre o adsorvente Sepharose-TREN e proteínas são de natureza eletrostática. Para efeitos de comparação foram realizados experimentos de IMAC com íons Ni(II) e Cu(II) imobilizados em Sepharose-TREN alimentando-se extrato de soja com “spiking” de IgG humana. Resultados mostraram que a IgG apresentou pureza similar, porém com menor recuperação que em cromatografia negativa em Sepharose-TREN. Experimentos em Sepharose-DEAE foram realizados alimentando-se extrato de soja com “spiking” de IgG humana, possibilitando a adsorção de proteínas do extrato de soja e a purificação de IgG, porém com menor recuperação de IgG na lavagem quando comparado a Sepharose-TREN.

## ABSTRACT

In recent years, plants have been studied as bioreactors for the production of recombinant proteins with industrial and pharmaceutical interest. When compared to other expression systems, plants have several advantages, such as the possibility of post-translational modification, low production cost, low risk of contamination by human pathogens, and the accumulation of proteins in specific organs that can generate greater protein stability. Bioseparation is a key step in the bioprocessing of plant material used as bioreactors and chromatography a key unit operation in the bioseparation train. Negative chromatography – a chromatography in which the target protein is recovered in the nonretained fractions while impurities remain adsorbed in the matrix – allows product recovery in one step. Aiming to obtain the basic knowledge for further application in the purification of recombinant proteins produced in transgenic plants, in this work we evaluated the use of negative chromatography on Sepharose-TREN with spiking of proteins of wide pI range (human IgG), high pI (HSA and BSA) and low pI (aprotinin and lysozyme) added in soybean extract. Experiments using MES 25 mmol/L pH 6.5 as adsorption buffer, 2.8% of the total protein fed was found in flowthrough fractions. Adding 1.0 mg/mL of human IgG in soybean extracts, 38% of total protein was recovered in the washing step with 86% purity and purification factor of 4.6. Breakthrough curves showed that Sepharose-TREN presented a dynamic capacity of 25.4 mg of total protein per milliliter of gel at a flow rate of 0.5 mL/min. Total protein adsorption was achieved when proteins of low pI were used while proteins of high pI were partially adsorbed, showing that the interactions between the adsorbent and TREN-Sepharose proteins are electrostatic. Sepharose-TREN was used as chelating ligand in IMAC with immobilized Ni(II) and Cu(II). Experiments with soybean extract spiked with IgG as feedstream solution resulted in similar purity but a lower IgG recovery than those with Sepharose-TREN in negative chromatography. Classic ion exchanger Sepharose-DEAE adsorbed the native soybean proteins while IgG was recovered in nonretained fractions with similar purity but lower recovery than when using Sepharose-TREN.



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....	22
1.1. OBJETIVO .....	23
1.2. PLANO E ETAPAS DO TRABALHO DESENVOLVIDO.....	24
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. UTILIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS COMO BIORREATORES .....	25
2.1.1. Vantagens e desafios do uso de plantas transgênicas como biorreatores .....	26
2.1.2. Proteínas recombinantes expressas em plantas transgênicas.....	27
2.1.3. Soja como sistema de expressão de proteínas recombinantes .....	30
2.2. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS (RPB) RECOMBINANTES OBTIDAS EM PLANTAS COMO BIORREATORES.....	32
2.2.1. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) .....	34
2.2.2. Cromatografia Negativa .....	36
2.2.3. Exemplos de RPB de proteínas a partir de extratos vegetais .....	37
2.3. PROTEÍNAS ADICIONADAS ARTIFICIALMENTE (“SPIKING”) EM EXTRATOS DE SOJA .....	40
2.3.1. Imunoglobulina G (IgG) humana .....	40
2.3.2. Albumina de soro humano (HSA) e albumina de soro bovino (BSA) .....	41
2.3.3. Aprotinina.....	42
2.3.4. Lisozima .....	43
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1. MATERIAIS .....	45
3.1.1. Grãos de soja .....	45
3.1.2. Proteínas utilizadas como “spiking” .....	45
3.1.3. Reagentes.....	45
3.2. MÉTODOS.....	46
3.2.1. Moagem dos grãos de soja orgânica.....	46
3.2.2. Desengorduramento da farinha de soja .....	47

3.2.3. Extração de proteínas da soja .....	47
3.2.4. Ativação do gel com epiclorigrina.....	47
3.2.5. Imobilização do TREN.....	48
3.2.6. Experimentos cromatográficos .....	48
3.2.7. Dosagem de proteínas totais .....	51
3.2.8. Eletroforese SDS-PAGE.....	51
3.2.9. Eletroforese de Focalização Isoelétrica (“Isoelectric Focusing” – IEF).....	51
3.2.10. Dosagem de IgG e HSA .....	52
3.2.11. Atividade da lisozima .....	52
3.2.12. Espectrometria de massa .....	53
 CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	 54
4.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA SOJA .....	54
4.2. TREN COMO LIGANTE EM CROMATOLOGRAFIA NEGATIVA.....	55
4.2.1. Efeito do sistema tamponante na adsorção de proteínas da soja .....	55
4.2.2. Purificação de IgG humana adicionada (“spiking”) em extrato de soja por cromatografia negativa .....	62
4.2.3. Estudo do efeito da vazão e da concentração de proteínas da soja e IgG na retenção e não-retenção de proteínas em gel Sepharose-TREN .....	66
4.2.3.1. Efeito da vazão na adsorção de proteínas .....	66
4.2.3.2. Efeito da concentração inicial de extrato de soja na adsorção e precipitação de proteínas .....	71
4.2.3.3. Efeito da presença de IgG no extrato de soja .....	74
4.2.4. Efeito da presença de proteínas de baixo valor de pI no extrato de soja: “Spiking” de HSA e BSA .....	79
4.2.5. Efeito da presença de proteínas de alto valor de pI no extrato de soja.....	82
4.2.5.1. “Spiking” com aprotinina .....	82
4.2.5.2. “Spiking” com lisozima.....	87
4.3. AGENTE QUELANTE TREN EM IMAC: EFEITO DOS QUELATOS TREN-Ni(II) E TREN-Cu(II) NA PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA ADICIONADA (“SPIKING”) EM EXTRATO DE SOJA.....	90
4.3.1. Sepharose-TREN-Cu(II).....	90
4.3.2. Sepharose-TREN-Ni(II) .....	96
4.3.2.1. Pontos isoelétricos das moléculas de IgG retidas e não retidas em Sepharose-TREN-Ni(II) .....	101

4.4. PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA ADICIONADA (“SPIKING”) EM EXTRATO DE SOJA POR CROMATOGRAFIA NEGATIVA: UTILIZAÇÃO DA RESINA DE TROCA IÔNICA SEPHAROSE-DEAE.....	103
4.4.1. Adsorção de proteínas da soja em Sepharose-DEAE .....	104
4.4.2. Purificação de IgG humana adicionada (“spiking”) em extrato de soja por cromatografia negativa em Sepharose-DEAE .....	105
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....	108
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	109
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS .....	110

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-1. Diagrama de blocos com as etapas desenvolvidas neste trabalho. .... 24
- Figura 2-1. Representação esquemática da estrutura dos agentes quelantes com íons metálicos hexacoordenados imobilizados: (a) IDA; (b) TREN. .... 35
- Figura 2-2. Modelo da estrutura de uma molécula de anticorpo típico, composta de duas cadeias polipeptídicas leves e duas cadeias pesadas. Pontes dissulfeto inter-cadeias estão indicadas. Dois sítios ativos idênticos de ligação ao antígeno estão localizados nos braços da molécula, formados pelas regiões variáveis. .... 41
- Figura 2-3. Estrutura quaternária da HSA (SUGIU *et al.*, 1999; Protein Data Bank 1BM0). .... 42
- Figura 2-4. Sequência de aminoácidos da aprotinina e posições das pontes dissulfeto entre os átomos de enxofre das cisteínas ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). .... 43
- Figura 2-5. Estrutura simplificada da lisozima de clara de ovo. Os resíduos de aminoácidos estão numerados do grupo N-terminal ao C-terminal. As linhas pontilhadas indicam as quatro ligações dissulfeto existentes (<http://media-2.web.britannica.com/eb-media/09/6509-004-3BFCA7C6.gif>). .... 43
- Figura 3-1. Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão. 1) reservatório de solução; 2) bomba peristáltica; 3) coluna cromatográfica; 4) monitor de medida de absorbância a 280 nm; 5) coletor de frações; 6) registrador..... 49
- Figura 4-1. Eletroforeses SDS-PAGE do extrato de soja. Amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5% em acrilamida; (b) gel a 12,5% em acrilamida. Faixas: (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular; (E) extrato. .... 55
- Figura 4-2. Porcentagens de proteínas totais, PA (proteínas adsorvidas) e PNA (proteínas não adsorvidas) da cromatografia negativa em Sepharose-TREN a partir de extrato de soja nos seguintes tampões a 25 mmol/L: MES pH 6,5, MOPS pH 6,5 e 7,5, Tris-HCl pH 7,0 e 8,5 e fosfato de sódio pH 7,5. Alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (8,25 a 10,05 mg/ml). Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. .... 56
- Figura 4-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,12 mg de proteína total/mL); (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) solução inicial; (L) “pool” das frações 3 a 5 da lavagem; (E) “pool” das frações 11 a 14 da eluição e (R) “pool” das frações 26 a 29 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. 58
- Figura 4-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MOPS 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de

extrato de soja (4,52 mg proteína total/mL); (L) lavagem: MOPS 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MOPS 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 7 a 9 da eluição e (R) “pool” das frações 18 a 20 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. 58

Figura 4-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MOPS 25 mmol/L, pH 7,5. Volume do leite: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,34 mg proteína total/mL); (L) lavagem: MOPS 25 mmol/L pH 7,5; (E) eluição MOPS 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 7,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 9 e 10 da eluição e (R) “pool” das frações 21 a 22 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. 59

Figura 4-6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em Tris-HCl 25 mmol/L, pH 7,0. Volume do leite: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação 2,0 mL de extrato de soja (4,40 mg proteína total/mL); (L) lavagem: Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0; (E) eluição Tris-HCl 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 7,0; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 10 e 11 da eluição e (R) “pool” das frações 24 e 25 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. 59

Figura 4-7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,5. Volume do leite: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,24 mg proteína total/mL); (L) lavagem: Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,5; (E) eluição Tris-HCl 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 8,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 9 e 10 da eluição e (R) “pool” das frações 25 e 26 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. 60

Figura 4-8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em Fosfato de sódio 25 mmol/L, pH 7,5. Volume do leite: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (5,02 mg proteína total/mL); (L) lavagem: Fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; (E) eluição Fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 7,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 14 e 15 da eluição e (R) “pool” das frações 24 a 26 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 60

Figura 4-9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 3,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 60 µL de IgG humana (50 mg/mL), concentração de IgG de 1,0 mg/mL no extrato; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 4 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 18 a 20 da eluição e (R) “pool” das frações 37 a 40 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 63

Figura 4-10. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (A) alimentação: 8,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 160 µL de IgG humana (50 mg/mL), com concentração de IgG de 1,0 mg/mL no extrato; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (1 a 8) frações “flowthrough”; (9 a 20) frações da lavagem; (E) “pool” das frações 94 a 99 da eluição e (R) “pool” das frações 183 a 193 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 64

Figura 4-11. (a) Curva de ruptura de extrato de soja em Sepharose-TREN em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5. Volume do leito 5,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 100,0 mL de extrato de soja (4,62 mg de proteína total/mL) (L) lavagem MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (4 a 14): frações “flowthrough”; (E) “pool” das frações 85 a 88 da eluição e (R) “pool” das frações 103 a 105 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 67

Figura 4-12. (a) Curva de ruptura de extrato de soja em Sepharose-TREN em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5. Volume do leito 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 100,0 mL de extrato de soja (4,00 mg de proteína total/mL); (L) lavagem MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (4 a 14): frações “flowthrough”; (E) “pool” das frações 71 a 738 da eluição e (R) “pool” das frações 85 a 87 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 68

Figura 4-13. (a) Curva de ruptura de extrato de soja em Sepharose-TREN em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5. Volume do leito 5,0 mL. Vazão: 0,25 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 100,0 mL de extrato de soja (4,01 mg de proteína total/mL); (L) lavagem MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições

desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (9 a 14): frações “flowthrough”; (E) “pool” das frações 83 a 85 da eluição e (R) “pool” das frações 106 a 108 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular..... 69

Figura 4-14. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 82,0 mL de extrato de soja na concentração de 1,33 mg/mL; (L) “Pool” de 40,0 mL das frações de lavagem em MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) “Pool” de 30,0 mL das frações de eluição em MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) “Pool” de 36,0 mL das frações de regeneração em NaOH 50 mmol/L. (b) Fotografia das frações 17 a 41 “flowthrough” e das frações 42 a 44 da lavagem. .... 72

Figura 4-15. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 82,0 mL de extrato de soja na concentração de 1,93 mg/mL; (L) “Pool” de 50,0 mL das frações de lavagem em MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) “Pool” de 40,0 mL das frações de eluição em MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) “Pool” de 52,0 mL das frações de regeneração em NaOH 50 mmol/L. (b) Fotografia das frações 14 a 41 “flowthrough”. .... 73

Figura 4-16. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 82,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 820 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. (b) Fotografia das frações 15 a 42 “flowthrough”. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (c) gel a 7,5%; (d) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 15) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 43 a 45 da lavagem; (E) “pool” das frações 67 a 74 da eluição e (R) “pool” das frações 100 a 102 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular..... 75

Figura 4-17. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 7 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 25 a 27 da eluição e (R) “pool” das frações 46 a 48 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular..... 77

Figura 4-18. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de albumina de soro bovino (BSA) em Sepharose-TREN, a partir de extrato de

soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de BSA (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de BSA de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 9 a 12 da lavagem; (E) “pool” das frações 20 a 24 da eluição e (R) fração 33 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de BSA; (LMW) marcador de baixa massa molecular..... 80

Figura 4-19. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de albumina de soro humano (HSA) em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de HSA (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de HSA de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 8 e 9 da lavagem; (E) “pool” das frações 19 a 22 da eluição e (R) “pool” das frações 33 a 35 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de HSA; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 81

Figura 4-20. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de aprotinina em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 1000 µL de aprotinina (5,0 mg/mL), perfazendo uma concentração de aprotinina de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (Ex) extrato puro; (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 7 a 11 da lavagem; (E) “pool” das frações 24 a 28 da eluição e (R) “pool” das frações 47 e 48 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular; (M) marcador de aprotinina. .... 83

Figura 4-21. Perfil cromatográfico de adsorção de aprotinina em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de solução de aprotinina 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L..... 84

Figura 4-22. Perfil cromatográfico de adsorção de aprotinina em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de solução de aprotinina 0,5 mg/mL proveniente da etapa de lavagem da purificação de aprotinina após previa concentração das proteínas em Centricon; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. .... 86

Figura 4-23. Perfil cromatográfico de adsorção de lisozima em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0



mL. (A) alimentação: 10,0 mL de solução de lisozima 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. .... 88

Figura 4-24. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II) em MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; Lavagem: MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0; (E) eluição: MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 4,0; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 8 a 11 da lavagem; (E) “pool” das frações 27 a 30 da eluição e (R) “pool” das frações 41 a 43 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 91

Figura 4-25. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; Lavagem: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (4 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 8 a 10 da lavagem; (21 a 23) frações da eluição e (R) “pool” das frações 34 a 36 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 93

Figura 4-26. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 9 e 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 16 a 20 da eluição e (R) “pool” das frações 32 a 34 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 95

Figura 4-27. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Ni(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; Lavagem: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300

mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 7 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 22 a 25 da eluição e (R) “pool” das frações 39 a 41 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 97

Figura 4-28. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Ni(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 8 e 9 da lavagem; (E) “pool” das frações 17 a 20 da eluição e (R) “pool” das frações 31 a 32 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 98

Figura 4-29. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Ni(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 7 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 19 e 20 da eluição e (R) “pool” das frações 26 e 27 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 99

Figura 4-30. Perfil cromatográfico e eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) de adsorção de IgG humana de alta pureza em Sepharose-TREN-Ni(II), em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 1,0 mL de IgG humana (5,0 mg/mL); (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. IEF - Faixas: (M) marcador de ponto isoelétrico; (A) amostra inicial; (L) fração 4 da lavagem; (E) fração 19 da eluição. .... 102

Figura 4-31. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-DEAE, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 8 e 9 da lavagem; (E) “pool” das frações 15 a 17 da

eluição e (R) “pool” das frações 22 e 23 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 104

Figura 4-32. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-DEAE, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 16 a 18 da lavagem; (E) “pool” das frações 23 a 26 da eluição e (R) “pool” das frações 39 e 40 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular. .... 106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1. Exemplos de anticorpos produzidos em plantas transgênicas. Adaptado de KO e KOPROWSKI (2005) com atualizações. ....	29
Tabela 2-2. Propriedades físicas das proteínas purificadas da soja (adaptado de ALLAN e SIDNEY, 1972 e ROBIC, 2005). ....	31
Tabela 4-1. Balanços de massa de proteínas totais das cromatografias negativa em Sepharose-TREN a partir de extrato de soja em diferentes tampões de adsorção e dessorção por acréscimo de 0,5 mol/L NaCl no tampão de adsorção. ....	61
Tabela 4-2. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia negativa em Sepharose-TREN realizada com alimentação de 3,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 60 µL de IgG humana em MES pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 0,5 mol/L NaCl no tampão de adsorção. ....	63
Tabela 4-3. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia realizada com alimentação de 8,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 160 µL de IgG humana em MES pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 0,5 mol/L NaCl no tampão de adsorção. ....	65
Tabela 4-4. Balanços de massa de proteínas totais das curvas de ruptura realizadas com extrato de soja em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção, nas vazões de 1,0, 0,5 e 0,25 mL/min. ....	70
Tabela 4-5. Balanços de massa de proteínas totais das cromatografias realizadas com extrato de soja em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção, nas concentrações iniciais de 1,33 e 1,09 mg/mL. ....	73
Tabela 4-6. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia negativa em Sepharose-TREN realizada com extrato de soja com “spiking” de IgG humana em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção. ....	76
Tabela 4-7. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia negativa em Sepharose-TREN realizada com alimentação de 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de IgG humana em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção. ....	78
Tabela 4-8. Balanço de massa de proteínas totais da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com “spiking” de BSA em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	80
Tabela 4-9. Balanço de massa de proteínas totais e de albumina da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com “spiking” de HSA em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	81
Tabela 4-10. Balanço de massa de proteínas totais da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com “spiking” de aprotinina em MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	83
Tabela 4-11. Balanço de massa da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com aprotinina pura em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	85

Tabela 4-12. Balanço de massa da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com aprotinina pura reprocessada em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	86
Tabela 4-13. Balanço de massa e de atividade da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com lisozima pura em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	89
Tabela 4-14. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Cu(II) realizadas em MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0 e dessorção por abaixamento de pH (MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 4,0).....	92
Tabela 4-15. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Cu(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.....	94
Tabela 4-16. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Cu(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.....	95
Tabela 4-17. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.....	97
Tabela 4-18. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.....	98
Tabela 4-19. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção. ....	99
Tabela 4-20. Balanço de massa da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas com IgG humana de alta pureza em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.....	102
Tabela 4-21. Balanço de massa de proteínas totais da cromatografia em Sepharose-DEAE realizada com extrato de soja puro em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.....	105
Tabela 4-22. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-DEAE realizadas com “spiking” de IgG em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção. ....	106

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Biomoléculas que apresentam interesse industrial e farmacêutico têm sido produzidas por diversas técnicas de DNA recombinante, cultura de células animais, fungos e bactérias. Todavia, a necessidade de sistemas mais seguros e de baixo custo tem motivado a busca de novas alternativas. A produção de proteínas recombinantes em plantas tem se mostrado como um dos meios mais atraentes do ponto de vista econômico. Dentre as proteínas recombinantes que vêm sendo produzidos por plantas transgênicas desde os anos 80, destacam-se anticorpos e hormônios, além de outros produtos, como aditivos alimentares e materiais industriais como óleos e plásticos biodegradáveis (DESAI *et al.*, 2002; TELI e TIMKO, 2004; PLATIS e LABROU, 2006).

A escolha da espécie vegetal para a produção de proteínas recombinantes, por sua vez, normalmente está baseada em fatores como a capacidade de acumular a biomolécula de interesse, a habilidade em realizar processamento pós-traducional apropriado, bem como a facilitação das etapas de recuperação e purificação da biomolécula (RPB) (KO *et al.*, 2003). Por envolver uma sequência de operações unitárias, incluindo técnicas cromatográficas de adsorção seletiva, o custo destas etapas pode chegar a 90% do custo do processo global (PEETERS *et al.*, 2001; DESAI *et al.*, 2002). Técnicas cromatográficas baseadas em princípios de troca-iônica, interação hidrofóbica, exclusão por tamanho e afinidade tornaram-se o foco de diversos grupos de pesquisa.

Uma das técnicas utilizadas para RPB é a cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), que explora o princípio da formação de ligações de coordenação entre íons metálicos imobilizados em suportes sólidos e resíduos de aminoácidos expostos na superfície da biomolécula a ser separada. Para a formação desta ligação, o íon metálico deve estar imobilizado em um agente quelante covalentemente acoplado ao suporte sólido. Diversos são os agentes quelantes utilizados em IMAC, entre eles o tris-2-aminoetil-amina (TREN).

Devido aos resíduos de grupamentos amina, o TREN (sem íon metálico quelatado) pode servir como um trocador de ânions. A valores de pH menores que 10,5, o TREN está carregado positivamente (de acordo com dados da Sigma-Aldrich), apresentando, portanto, a capacidade de adsorver proteínas de carga líquida negativa. Com base nesta característica

físico-química, nosso grupo de pesquisa, de forma inédita, vem abordando a utilização de TREN como ligante para a purificação de proteínas, especificamente para purificação de IgG humana por cromatografia negativa (SANTOS *et al.*, 2006a; SANTOS *et al.*, 2006b; BRESOLIN *et al.*, 2008a). Na cromatografia negativa, a proteína alvo é obtida nas frações não retidas (“flowthrough” e lavagem), enquanto que as demais proteínas (contaminantes ou impurezas) permanecem adsorvidas, sendo recuperadas na eluição.

## 1.1. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo estudar o adsorvente Sepharose-TREN em cromatografia negativa visando à obtenção de conhecimento de base para aplicação na purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas. Avaliou-se o efeito do sistema tamponante na captura de proteínas nativas de extratos de grãos de soja e consequente purificação de proteínas de diferentes ponto isoelétricos (IgG, albumina do soro bovino, albumina do soro humano, lisozima e aprotinina) adicionadas artificialmente (“spiking”) à estes extratos.

## 1.2. PLANO E ETAPAS DO TRABALHO DESENVOLVIDO

Para se atingir o objetivo proposto, o trabalho foi desenvolvido de acordo com as etapas apresentadas na Figura 1-1.

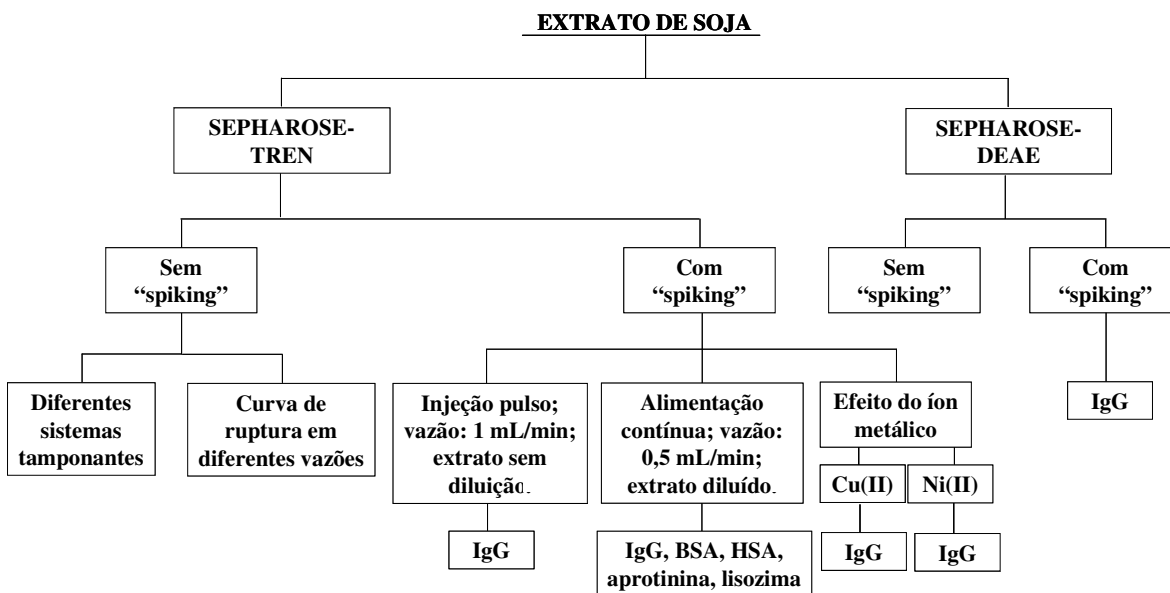


Figura 1-1. Diagrama de blocos com as etapas desenvolvidas neste trabalho.



## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são apresentados tópicos de conhecimentos básicos necessários para a compreensão do trabalho. A revisão da literatura está dividida nas seguintes partes: utilização de plantas transgênicas como biorreatores, soja como sistema de expressão de proteínas recombinantes de interesse comercial, recuperação e purificação de bioprodutos (RPB) e sua importância, cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) e cromatografia negativa. Será dado enfoque à RPB de proteínas adicionadas artificialmente (“spiking”) em extratos de plantas não transgênicas visando a aquisição de conhecimento de base para a RPB de proteínas recombinantes obtidas em plantas como biorreatores.

### 2.1. UTILIZAÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS COMO BIORREACTORES

Um novo conceito foi introduzido na ciência com o advento das técnicas de DNA recombinante e com a transformação celular tendo como objetivo a produção de proteínas de interesse industrial por meio do desenvolvimento de plantas transgênicas com novas características (FISHER e EMANS, 2000; MA *et al.*, 2003; LAU e SUN, 2009). De acordo com DE LUCCA (2003), existem basicamente três classes dessas plantas, visando:

- a) Propriedades agronômicas melhoradas, como, por exemplo, resistência a um herbicida ou a insetos;
- b) Melhoria da qualidade do produto e qualidades nutricionais por alterações em vias metabólicas;
- c) Produção de proteínas recombinantes (ou heterólogas) de aplicação industrial ou farmacêutica.

Em 1994, a empresa Calgene obteve a primeira aprovação nos EUA para comercializar um alimento geneticamente modificado, o tomate “Flavr Savr”, que apresenta o amadurecimento retardado. A partir dessa modificação genética houve um crescimento exponencial da biotecnologia no campo (MONQUERO, 2005), cuja área global de culturas saltou de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 100 milhões de hectares em 2006 com uma produção avaliada em 6,2 bilhões de dólares (MONQUERO, 2005; TEIXEIRA JR, 2007).

Um dos estudos pioneiros sobre modificação genética em plantas foi realizado por FRALEY e colaboradores em 1983, na qual expressaram genes bacterianos em células de tabaco. Desde então, têm-se estudado sistemas confiáveis de transformação e vetores de expressão a fim de se atingir altos níveis de expressão gênica e concentração da proteína recombinante em tecidos da planta (AZZONI, 2002).

### **2.1.1. Vantagens e desafios do uso de plantas transgênicas como biorreatores**

As plantas transgênicas podem ser exploradas como uma alternativa em relação aos sistemas microbianos e animais para a produção de biomoléculas (WHITELAM, 1995; PARIZOTTO *et al.*, 2000). Este sistema apresenta vantagens na produção de proteínas recombinantes quando comparadas a bactérias, fungos, células animais ou animais transgênicos:

a) Custo de produção mais baixo quando comparado à cultura de células animais que necessitam de meios de cultura dispendiosos (SENA e GOLDMAN, 2001), pois as plantas aproveitam diretamente a energia solar para seu crescimento (PLATIS e LABROU, 2006). KUSNADI *et al.* (1997), por exemplo, estimaram que o custo de produção de proteínas recombinantes em plantas pode ser entre 10 e 50 vezes menor que o custo da mesma proteína produzida em *E. coli*;

b) Plantas não apresentam patógenos humanos que podem contaminar o produto final como, por exemplo, os príons e o vírus HIV (LARRICK *et al.*, 2001; TIWARI *et al.*, 2009);

c) Plantas apresentam fácil aumento de escala (KUSNADI *et al.*, 1997);

d) A proteína pode ser produzida dentro de um órgão específico (raiz ou semente), protegida da degradação, permitindo, assim, maior estabilidade ao produto protéico (HORN *et al.*, 2004; LAU e SUN, 2009);

e) Por serem eucarióticas, as plantas são capazes de realizar modificações pós-traducionais que os sistemas microbianos não podem; animais transgênicos não têm muita aceitação pública devido à questões éticas (SENA e GOLDMAN, 2001).

Muitos desafios, por sua vez, estão presentes nesta área da ciência, com muitos aspectos a serem melhorados. Um deles é o longo tempo de cultivo das plantas

transgênicas, apresentando, na maioria dos casos, baixo nível de proteínas produzidas (inferior a 1% do total de proteínas solúveis) (GOLDSTEIN e THOMAS, 2004; SPERB, 2008).

Por ser um evento relativamente recente, o cultivo de plantas transgênicas, assim como o consumo humano e animal de seus derivados, reveste-se de interesses, impactos e conflitos múltiplos, constituindo um tema sobre o qual predominam as discussões científicas, éticas, econômicas e políticas. Mundialmente há debates sobre os impactos dos organismos geneticamente modificados (OGM) na saúde humana e animal e no meio ambiente. No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é uma instância colegiada multidisciplinar, criada através da lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, cuja finalidade é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal na formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança relativa a OGM, bem como no estabelecimento de normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (<http://www.ctnbio.gov.br/> acessado em: 07/06/2009).

### **2.1.2. Proteínas recombinantes expressas em plantas transgênicas**

Dentre as plantas mais utilizadas como biorreatores na transformação genética para expressão de proteínas recombinantes, a literatura destaca vegetais folhosos (tabaco, alfafa e alface), cereais (milho, arroz e trigo), legumes (batatas), frutas (tomates e bananas) e sementes (soja, canola, girassol e tabaco) (EVANGELISTA *et al.*, 1998; GIDDINGS *et al.*, 2000; MENKHAUS *et al.*, 2004a; RAMESSAR *et al.*, 2008).

Em 2002, a empresa norte-americana ProdiGene colocou no mercado a tripsina recombinante produzida em sementes de milho, sendo a primeira proteína recombinante produzida em grande escala (WOODARD *et al.*, 2003). De acordo com MA e colaboradores (2005b), muitas outras proteínas já se encontram nos estágios finais de desenvolvimento. TELI e TIMKO (2004) mostraram que, com o recente progresso da área de pesquisa com plantas transgênicas como biorreatores e células vegetais em cultura,

quatro grandes áreas têm se destacado: produção de peptídeos, proteínas e enzimas de importância farmacêutica e industrial; geração de anticorpos e seus fragmentos; plantas transgênicas como sistemas de produção de vacinas e manipulação do metabolismo das plantas para produção de novos compostos e metabólitos secundários usados em medicina ou na indústria.

O potencial para o uso de plantas como um sistema para produção de proteínas recombinantes como biofármacos foi estabelecido entre 1986 e 1990, com o sucesso da expressão da proteína de fusão do hormônio de crescimento humano em folhas de tabaco e semente de girassol, de um interferon humano  $\alpha$ D em couve-flor e nabo e da albumina de soro humano (HSA) em folhas de tabaco e batata (BARTA *et al.*, 1986; DE ZOETEN *et al.*, 1989; SIJMONS *et al.*, 1990). Em trabalho recente, SPERB (2008) mostrou o potencial do uso de folhas de tabaco transgênico na produção de eritropoetina (EPO) recombinante, tendo-se avaliado a expressão gênica e detectada a presença da proteína recombinante, utilizando análises de *Western blotting*.

Dentre as proteínas produzidas em plantas transgênicas, destaca-se a classe dos anticorpos, uma vez que os mesmos apresentam uma gama ampla de aplicações, incluindo-se os campos terapêutico e diagnóstico (SENA e GOLDMAN, 2001, PLATIS *et al.*, 2008). Devido a sua complexidade, os anticorpos requerem para sua produção, sistemas eucarióticos de expressão (como células animais e plantas, por exemplo), de modo a formar cadeias leves e pesadas, visando originar um anticorpo completo e funcional (MA e HEIN, 1995; SENA e GOLDMAN, 2001).

O trabalho pioneiro da produção de anticorpos em plantas transgênicas foi publicado por HIATT *et al.* (1989). Este trabalho demonstrou o princípio da expressão simultânea de dois produtos gênicos recombinantes (cadeias  $\gamma$  e  $\kappa$  de imunoglobulina G de camundongo) em folhas de tabaco, que foram corretamente acopladas em uma molécula que era funcionalmente idêntica àquela originada do camundongo. Desde então, muitos grupos têm procurado expressar outras moléculas de cadeia única até anticorpos mais complexos (MA *et al.*, 1995, PLATIS *et al.*, 2008).

Com base na literatura, a Tabela 2-1 apresenta alguns exemplos de anticorpos de variados tipos e formas produzidos em plantas transgênicas, destacando-se o tabaco devido a produção de elevada quantidade de biomassa.

Tabela 2-1. Exemplos de anticorpos produzidos em plantas transgênicas. Adaptado de KO e KOPROWSKI (2005) com atualizações.

Planta	Anticorpo	Referência
Tabaco	Cadeias $\gamma$ e $\kappa$ de IgG de camundongo	HIATT <i>et al.</i> , 1989
Tabaco	IgG contra nematóides	BAUM <i>et al.</i> , 1996
Tabaco	IgA secretória e IgG contra <i>S. mutans</i>	MA e HEIN, 1995; MA <i>et al.</i> , 1998
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IgG e fragmentos F <sub>ab</sub>	DE WILDE <i>et al.</i> , 1996; DE WILDE <i>et al.</i> , 1998
Soja, arroz e milho	IgG humanizada contra vírus da herpes	ZEITLIN <i>et al.</i> , 1998
Tabaco	IgG utilizada para combater câncer de colo	VERCH <i>et al.</i> , 1998
Alfafa	Cadeias leve e pesada de anti-IgG humana para kits diagnóstico	KHOUDI <i>et al.</i> , 1999
Tabaco	IgG <sub>1a</sub> anti-dioxina para uso em imunoensaio para detecção de dioxina	SENA e GOLDMAN, 2001
Tabaco	IgG de camundongo para aplicações terapêuticas e em imunocromatografia	VALDES <i>et al.</i> , 2003; YANO, <i>et al.</i> , 2004
Tabaco	Fragmento F <sub>v</sub> de cadeia única (receptor de fator de crescimento humano epidermal)	GALEFFI <i>et al.</i> , 2005
Tabaco	Fragmento F <sub>v</sub> de cadeia única anti-botulina	ALMQUIST <i>et al.</i> , 2006
Tabaco	IgG <sub>1</sub> humana monoclonal anti- <i>Pseudomonas aureaginosa</i>	McLEAN <i>et al.</i> , 2007; YU <i>et al.</i> , 2008
Milho	IgG <sub>1</sub> humana monoclonal anti-HIV	RAMESSAR <i>et al.</i> , 2008
Tabaco	IgG <sub>1</sub> humana monoclonal anti-HIV	PLATIS <i>et al.</i> , 2008

KO e KOPROWSKI (2005) mostraram que a expressão estável e padronização do processo de produção de anticorpos em plantas é o ponto chave quando se utilizam plantas como biorreatores. Os mesmos autores destacam que é possível se realizar transformação estável, de modo que os genes que apresentem a habilidade para produzir os anticorpos consigam permaneçam integrados ao genoma da planta, expressando de geração em geração da mesma.

TIWARI (2009), em um artigo de revisão, apresenta uma compilação de dados de mais de 100 vacinas antigênicas com expressão estável em diversas plantas (tabaco, soja, arroz, milho, tomate) visando à aplicação para o tratamento de doenças como cólera, raiva, hepatite, artrite, gripe aviária, peste bubônica, pneumonia e Alzheimer. Entretanto, a primeira vacina antigênica para uso humano foi registrada por pesquisadores cubanos, que utilizaram o anticorpo monoclonal CB-Hep.1 aprovado pelo Centro Estatal da Qualidade dos Medicamentos (CECMED) de Cuba em 2006. Este anticorpo foi expresso em uma variedade não-comercial do tabaco, cujo cultivo foi realizado em condições de confinamento, em substrato inerte (sem terra) e em condições de boas práticas de manufatura, o que garante biossegurança e controle. (LEYVA *et al.*, 2007; LÓPEZ *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ *et al.*, 2008).

### 2.1.3. Soja como sistema de expressão de proteínas recombinantes

A soja, cujo nome científico é *Glycine max*, é constituída de casca, cotilédone (dicotiledônea), hipocotil e embrião. A maior parte da semente da soja é constituída pelos cotilédones. Estes são compostos basicamente de proteínas (37%), carboidratos (30%) e óleo (20%). Os principais açúcares da semente são o dissacarídeo sacarose, o trissacarídeo rafinose e o tetrassacarídeo estatióse. A concentração de glicose e de outros açúcares redutores diminui durante a maturação. Os polifenóis representam aproximadamente 0,02% da massa da semente (SMITH e SIDNEY, 1972).

As proteínas de sementes, em geral, são divididas de acordo com a solubilidade em quatro grupos (OSBORNE, 1924): 1) albuminas, solúveis em água; 2) globulinas, solúveis em soluções aquosas salinas; 3) prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas e 4) glutelinas, solúveis em soluções aquosas de pH alcalino ou com agente redutor. As proteínas da soja contêm somente dois destes grupos: as albuminas, as quais representam menos de 10% da proteína total e possuem baixa massa molecular (cerca de 20 kDa), e as globulinas, que representam 90% da proteína total, constituídas de proteínas de massa molecular de 20 a 700 kDa. As globulinas da soja são separadas em quatro grupos baseados nos coeficientes de sedimentação: 2S, 7S, 11S e 15S (22, 37, 31 e 1% das globulinas, respectivamente). A  $\alpha$ -conglícinina, também conhecida 2S, consiste de proteínas com massa molecular entre 8 e

50 kDa e solubilidade em ampla faixa de pH. A  $\beta$ -conglucina (chamada de proteína 7S), consiste de pelo menos sete isômeros os quais são compostos de diferentes combinações das mesmas três subunidades. As diferentes isoformas de  $\beta$ -conglucina têm massa molecular entre 130 e 180 kDa e ponto isoelétrico (pI) perto de 4,9. As demais proteínas encontradas na fração 7S são hemaglutinina, lipoxigenase e  $\beta$ -amilase. A proteína 11S, chamada de glicina é um heteromultímero complexo composto de 11 ou 12 subunidades. A glicina tem massa molecular entre 300 e 350 kDa e ponto isoelétrico entre 4,5 e 4,8. As maiores proteínas da soja são as proteínas 15S, com massa molecular em torno de 700 kDa e com ponto isoelétrico perto de 4,5 (MENKHAUS *et al.*, 2004a). As propriedades físicas de algumas proteínas da soja estão apresentadas na Tabela 2-2.

Tabela 2-2. Propriedades físicas das proteínas purificadas da soja (adaptado de ALLAN e SIDNEY, 1972 e ROBIC, 2005).

<b>Proteínas</b>	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>Ponto isoelétrico</b>
Inibidor de tripsina (Bowman-Birk)	7,9 – 21,0	4,0 – 4,2
Citocromo C	12,0	
Inibidor de tripsina (Kunitz)	21,0	4,5
Globulina 2S ( $\alpha$ -conglucina)	18,2 – 32,6	4,4
Alantoinase	50,0	
$\beta$ -Amilase	61,7 – 69,0	5,85
Hemaglutinina	89,0 – 105,0	6,1
Lipoxigenase	102,0 – 108,0	5,4 – 5,65
Globulina 7S ( $\beta$ -conglucina)	180,0 – 330,0	4,9
Globulina 11S (glicina)	333,0 – 356,0	5,0

Técnicas como cromatografia de afinidade (LARSEN, 1990; MIRANDA *et al.*, 2002; FRANCO-FRAGUAS *et al.*, 2003), troca-iônica (PORTER *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1998; DHARMADI *et al.*, 2003), interação hidrofóbica (STEPHENS *et al.*, 1998; YOON *et al.*, 2000) e exclusão por tamanho (COLE e COUSIN, 1994; KOPLIK *et al.*, 2002), além da precipitação em condições ácidas (LUI *et al.*, 2007) são utilizadas para auxiliar no estudo, isolamento e purificação das diferentes proteínas nativas da soja. Estes

estudos têm auxiliado na purificação de proteínas recombinantes em soja transgênicas. ROBIC (2005) purificou por cromatografia de troca-iônica e interação hidrofóbica a enzima  $\beta$ -glucuronidase recombinante produzida em sementes de soja transgênica, apesar da baixa concentração da enzima (menor que 0,1% da proteína total), mostrando assim que a soja tem potencial como biorreator.

Segundo Elibio Rech, pesquisador da Embrapa que desenvolveu a soja transgênica resistente a herbicida no Brasil, “a soja pode ser um veículo mais barato e eficiente para produção de moléculas utilizadas na indústria farmacêutica” (TEIXEIRA JR, 2007). Entretanto, um grande problema de se utilizar soja como sistema de expressão é o fato que até hoje não se conseguiu expressar a proteína recombinante dentro da semente da soja em concentrações suficientemente altas. Por exemplo, para anticorpos expressos em soja em um nível de 1%, a produção da proteína torna-se economicamente viável (HIATT, 1990; PEETERS *et al.*, 2001).

Quando não se dispõe de uma proteína recombinante expressa, alguns pesquisadores fazem uso de “spiking”, que consiste em adicionar uma determinada proteína artificialmente ao extrato com a finalidade de simular um extrato de uma planta transgênica. Visando às etapas de recuperação e purificação, MENKHAUS *et al.* (2002) adicionaram  $\beta$ -glucuronidase (GUS) em extrato de soja não-transgênica e realizaram sua purificação por precipitação com polietileneimina, recuperando 90% da atividade da GUS adicionada.

## **2.2. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS (RPB) RECOMBINANTES OBTIDAS EM PLANTAS COMO BIORREADORES**

Uma variedade de técnicas tem sido investigada para a RPB de diversas biomoléculas de interesse. A escolha da metodologia apropriada para a purificação depende do rendimento e pureza requeridos, assim como do custo do procedimento. Compostos destinados a aplicações terapêuticas e em testes diagnósticos, requerem alto grau de pureza e necessitam de técnicas de purificação mais seletivas. Técnicas de precipitação, ultrafiltração e microfiltração têm sido utilizadas nas etapas de pré-purificação destas biomoléculas. Na etapa de purificação propriamente dita, são utilizadas, tradicionalmente,



técnicas cromatográficas de adsorção seletiva para remover as impurezas existentes, baseando-se nos princípios de exclusão molecular, troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa, afinidade, entre outras (SCOPES, 1994).

Outro fator importante a ser levado em conta é o custo de cada processo. Segundo LABROU e CLONIS (1994), o fator chave para o desenvolvimento da biotecnologia são os processos de recuperação e purificação que, frequentemente, podem chegar até a 90% do custo total de produção.

De uma forma geral, as etapas de RPB de proteínas recombinantes produzidas em plantas envolvem operações unitárias clássicas, principalmente moagem, extração sólido-líquido, precipitação, filtração, ultrafiltração, liofilização e cristalização (NIKOLOV e WOODARD, 2004; MENKHAUS *et al.*, 2004a). De acordo com estes mesmos autores, é possível dividir a RPB em três grandes etapas:

- a) Pré-processamento, envolvendo moagem e fracionamento;
- b) Extração sólido-líquido da proteína e clarificação (remoção de material particulado remanescente da extração);
- c) Purificação da proteína-alvo utilizando técnicas cromatográficas (troca-iônica, interação hidrofóbica, exclusão por tamanho, afinidade, cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados - IMAC, etc).

Uma variedade de técnicas tem sido utilizada na purificação de proteínas recombinantes produzidas em plantas transgênicas, sendo que a escolha correta do método depende da necessidade de pureza do produto final. Quando a aplicação de biomolécula de interesse requerer um alto grau de pureza, técnicas de purificação mais seletivas serão utilizadas. Dentre as técnicas mais seletivas, destaca-se a cromatografia de afinidade, baseada na ligação reversível e específica da biomolécula de interesse aos ligantes bioespecíficos ou pseudobioespecíficos imobilizados covalentemente a uma matriz cromatográfica (VIJAYALAKSHMI, 1989).

As matrizes cromatográficas contendo ligantes pseudobioespecíficos imobilizados apresentam vantagens de terem baixo custo e facilidade de escalonamento, pois os ligantes são moléculas pequenas e simples, apresentando estabilidade química e física mais alta do que os bioespecíficos e condições brandas de eluição. No entanto, como desvantagem, apresentam menor especificidade. As forças que regem a interação entre o ligante

pseudobioespecífico e a molécula-alvo são baseadas na complementaridade de carga, de hidrofobicidade e forma. Dentre estes ligantes, íons metálicos imobilizados são utilizados quando a biomolécula apresentar resíduos de histidina acessíveis (histidina natural ou cauda de histidina adicionada por meio de técnicas de DNA recombinante) para a formação de ligações de coordenação com o metal (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

### 2.2.1. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC)

A técnica de Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (“Immobilized Metal ion Affinity Chromatography” – IMAC) baseia-se na formação de ligações de coordenação entre os íons metálicos imobilizados em suportes sólidos (fase estacionária) e resíduos acessíveis de aminoácidos (histidina, cisteína e triptofano) das proteínas a serem adsorvidas que estão em solução (que estão na fase móvel) (PORATH *et al.*, 1976; PORATH, 1988; WONG *et al.*, 1991). Em IMAC, além das ligações de coordenação, forças como Van der Waals, hidrofóbicas e eletrostáticas também contribuem no processo de adsorção de uma dada biomolécula (SHARMA e AGARWAL, 2002; UEDA *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

Ao se utilizar IMAC como uma etapa de um processo de RPB, faz-se necessário o estudo da escolha do íon metálico, do agente quelante e das condições operacionais (vazão, concentração protéica da alimentação, sistema tamponante, força iônica, pH e temperatura) para que ocorra a purificação de uma determinada proteína ou biomolécula (PORATH, 1988; WONG *et al.*, 1991; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

Vários são os íons metálicos que podem ser utilizados em IMAC, entretanto metais de transição como Cu(II), Zn(II), Co(II) e Ni(II) são os mais utilizados, pois apresentam a capacidade de interagir com o átomos de nitrogênio aromático acessíveis de imidazol da histidina, de indol do triptofano, além de átomos de enxofre do tiol da cisteína presentes na biomolécula (WONG *et al.*, 1991; SULKOWSKI, 1989).

Os agentes quelantes são moléculas que imobilizam o íon metálico por meio de ligações de coordenação. O agente quelante mais utilizado em IMAC é o ácido iminodiacético (IDA). Este agente quelante é tridentado e possui um átomo de nitrogênio e dois átomos de oxigênio para a coordenação. Outro agente quelante utilizado em IMAC é o

tetradentado tris-2(aminoetil)amina (TREN), que possui quatro aminas disponíveis para a ligação com o metal, sendo duas primárias, uma secundária e uma terciária (SHARMA e AGARWAL, 2002). As estruturas dos agentes quelantes IDA e TREN estão apresentadas na Figura 2-1.

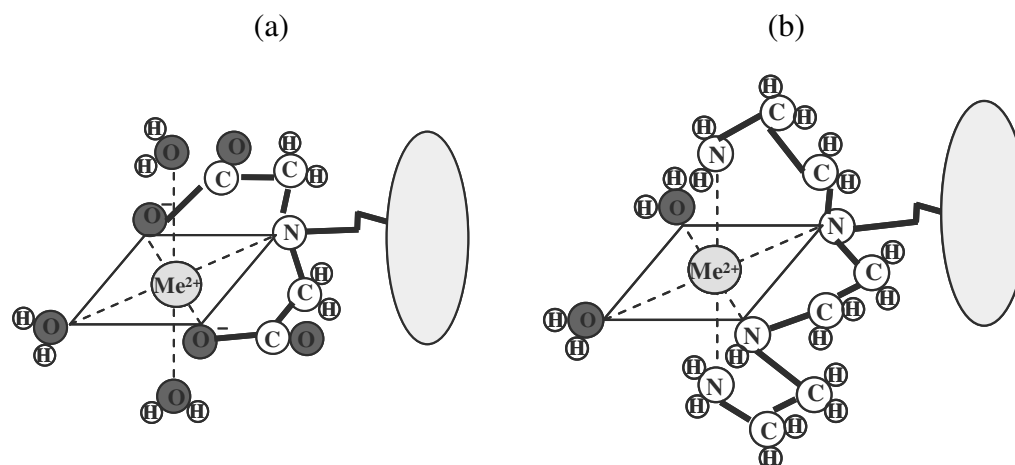


Figura 2-1. Representação esquemática da estrutura dos agentes quelantes com íons metálicos hexacoordenados imobilizados: (a) IDA; (b) TREN.

Os tampões mais comumente utilizados em IMAC na adsorção de proteínas são: fosfato de sódio, acetato de sódio, Tris-HCl e os zwitteriônicos (*Good's buffers* – GOOD *et al.*, 1966) tais como MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico), MES (ácido 2-[N-morfolino] etanosulfônico) e HEPES (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etansulfônico]). A eluição (ou dessorção) das proteínas adsorvidas em IMAC pode ser feita por adição de um agente competidor que tenha capacidade de interagir com o íon metálico, abaixamento de pH, aumento da força iônica ou eluição isocrática quando as proteínas não interagem fortemente com a fase estacionária (SULKOWSKI, 1985; GABERCK-POREKAR e MENART, 2001; UEDA *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.*, 2009b).

Em alguns processos, entretanto, a biomolécula alvo não é adsorvida pelos ligantes imobilizados, enquanto que as impurezas são adsorvidas. O processo que envolve a retenção das impurezas e contaminantes e a não retenção da biomolécula alvo é conhecido por cromatografia negativa.

### 2.2.2. Cromatografia Negativa

Uma técnica alternativa utilizada para o isolamento e purificação de biomoléculas é a cromatografia negativa. Nesta técnica, a proteína alvo é recuperada na fração não retida, enquanto as demais proteínas permanecem adsorvidas na matriz. Esta forma de operação cromatográfica pode utilizar princípios de troca iônica, IMAC, afinidade, entre outras (MORRIN e REEN, 1993; BROOKS e STOREY, 1996; PITIOT *et al.*, 2001; GENARO *et al.*, 2002; AZZONI *et al.*, 2002; SORENSEN *et al.*, 2003; SOUZA, 2009; BRESOLIN *et al.*, 2009a).

Nos anos 80, a cromatografia negativa foi utilizada por LOWE *et al.* (1982) como etapa de polimento para a purificação de subclasses de IgG humana (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) utilizando anticorpos monoclonais imobilizados em géis de agarose como ligantes. Estes autores denominaram a técnica de cromatografia de imunoadsorção negativa. Os mesmos autores mostraram que foi possível obter a subclasse IgG<sub>4</sub> livre de outras subclasses quando se alimentou IgG humana comercial em uma coluna contendo anticorpo monoclonal anti-IgG de subclasses 1, 2 e 3 imobilizado. BIRD *et al.* (1984) obtiveram as subclasses IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> com 99% de pureza utilizando anticorpos monoclonais com especificidades para subclasses específicas ou subclasses restritas de IgG humana, após uma etapa preliminar de cromatografia em DEAE-Sepharose alimentando-se IgG humana diluída em tampão fosfato de sódio, pH 8,0. Na mesma linha, PERSSON (1987) obteve IgG<sub>1</sub> humana com pureza entre 52 a 90% quando utilizou a técnica de cromatografia negativa com anticorpos monoclonais anti-IgG<sub>2,3,4</sub> imobilizados em agarose.

PITIOT e colaboradores em 2001 demonstraram a potencialidade da técnica da cromatografia negativa em uma única etapa para a purificação de IgG a partir do plasma humano empregando o ligante aminohexil-histidina imobilizado em gel de agarose. Neste trabalho, IgG humana eletroforéticamente com alta pureza foi recuperada nas frações não retidas. A adsorção das demais proteínas do plasma humano ocorreu possivelmente devido a propriedades estruturais das biomoléculas como cavidades hidrofóbicas ou a presença de uma repartição particular de cargas, e não devido a uma função biológica. Segundo os mesmos autores, os grupamentos NH<sub>3</sub><sup>+</sup> e o anel imidazol contribuem predominantemente nas interações eletrostáticas (carga-carga e carga-dipolo) em cooperação com outras interações tais como hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e Van der Waals.

Mais recentemente, por meio de cromatografia negativa em uma única etapa, trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que foi possível obter IgG com grau de pureza entre 90 a 95% a partir da alimentação de soro humano, com recuperação de 73,3%, quando se utilizou o ligante Tris(2-aminoetil amina) (TREN), imobilizado em gel de agarose (SANTOS *et al.*, 2006a, SANTOS *et al.*, 2006b e BRESOLIN *et al.*, 2009a). SOUZA (2009) realizou um estudo da purificação de IgG humana a partir de soro e plasma por cromatografia negativa com diaminas imobilizadas em géis de agarose, estudando o efeito do tamanho da cadeia alifática e do braço espaçador da diamina, comparando os resultados com os obtidos com o adsorvente de troca iônica clássico DEAE-agarose. De acordo com eletroforeses SDS-PAGE e análises nefelométricas das frações dos picos de proteínas obtidos, a diamina  $\omega$ -aminohexil imobilizada em agarose ativada com bisoxirano se mostrou mais seletiva, atingindo-se fator de purificação de 6,8 e pureza superior a 95%.

Entretanto, é importante ressaltar que, quando a cromatografia negativa é utilizada como uma única etapa de purificação de uma biomolécula que se encontra entre muitos contaminantes ou impurezas, a capacidade do adsorvente torna-se um parâmetro muito importante quando se visa ao aumento de escala. De acordo com experimentos de isotermas de adsorção de albumina do soro humano em batelada (HSA, principal contaminante na purificação de IgG), BRESOLIN *et al.* (2009a) obtiveram capacidade máxima de 192 mg de HSA/mL de gel (para agarose-TREN), enquanto SOUZA (2009) obteve 206,6 mg/mL (para  $\omega$ -aminohexil-agarose), ambos cerca de 2 vezes maior que a apresentada por PITIOT e colaboradores (2001) na adsorção de HSA em Sepharose-aminohexil-histidina (93 mg de HSA/mL de gel).

### **2.2.3. Exemplos de RPB de proteínas a partir de extratos vegetais**

As mesmas etapas apresentadas para a RPB de proteínas recombinantes podem ser também utilizadas na RPB de proteínas nativas de plantas. FERREIRA *et al.* (1998) purificaram quatro isoformas de fosfatases a partir de sementes de soja utilizando extração aquosa, precipitação por sulfato de amônio e acetona e cromatografias de afinidade, troca-iônica e interação hidrofóbica, atingindo fatores de purificação entre 15 e 903. STEPHENS

*et al.* (1998) purificaram e caracterizaram aspartato aminotransferase a partir de semente de soja, extraíndo as proteínas a partir dos cotilédones moídos, realizando, subsequentemente filtração, centrifugação, precipitação com acetona e cromatografias de troca-iônica, interação hidrofóbica, filtração em gel e imunoafinidade, atingindo fatores de purificação de 402.

Mais recentemente, DHARMADI *et al.* (2003) mostraram que foi possível realizar a recuperação de onze diferentes enzimas nativas de canola, soja e milho após a purificação de proteínas recombinantes produzidas nas mesmas, utilizando cromatografia de troca-iônica e precipitação com polieletrólitos, atingindo rendimentos de até 59% e fatores de purificação de até 11.

Após etapas de moagem, extração aquosa em meio ácido, filtração e ajuste de pH, a aprotinina recombinante produzida em semente de milho transgênico foi pré-purificada por cromatografia de afinidade com tripsina imobilizada (recuperada juntamente com inibidor de tripsina do milho) e posteriormente purificada por dois processos: IMAC negativa com agarose-IDA-Cu(II), atingindo pureza superior a 79%, rendimento de 49% e fator de purificação de 280 (AZZONI *et al.*, 2002) e cromatografia de troca-iônica com o trocador de cátions SP-Sepharose, obtendo pureza de 84%, rendimento 37% e fator de purificação 465 (AZZONI *et al.*, 2005). Na cromatografia de afinidade negativa com íons Cu(II) imobilizado, a aprotinina foi recuperada na fração não retida, enquanto as demais proteínas da semente de milho foram adsorvidas nos íons Cu(II) imobilizados na fase estacionária via agente quelante IDA.

O processo de RPB da enzima  $\beta$ -glucuronidase produzida em sementes de soja foi apresentado por ROBIC e colaboradores (2006). Após extração aquosa, os autores usaram cromatografias sequenciais de troca iônica e interação hidrofóbica e obtiveram fator de purificação global de 97,3 e recuperação total da atividade enzimática. MENKHAUS *et al.* (2004b), por sua vez, purificaram a mesma enzima produzida em ervilha transgênica, porém apresentando cauda de histidina, realizando-se primeiramente etapas de moagem, extração aquosa, diafiltração, precipitação isoeletrica e com polieletrólitos e, posteriormente, cromatografia de troca-iônica seguida de IMAC com íons cobalto imobilizados, obtendo um fator de purificação de 206 e pureza de 99%.

O advento das técnicas de engenharia genética tem possibilitado, além de novos sistemas de expressão de proteínas recombinantes, novas estratégias para a purificação destas mesmas proteínas como no caso de incorporação de caudas (“tag”) de proteínas ou peptídeos na proteína de interesse. A proteína híbrida resultante apresenta características físico-químicas inerentes ao “tag” que facilitam a subsequente purificação. A fusão de sequência de histidinas (“his-tag”) na porção C ou N-terminal da proteína alvo tem sido bastante utilizada e confere à mesma a possibilidade de purificação através de IMAC.

Têm-se estudado nos últimos anos a técnica de IMAC na captura de proteínas recombinantes de plantas transgênicas. ZHANG e colaboradores (2000) utilizaram IMAC com cobalto imobilizados aos quelantes IDA e NTA para purificar  $\beta$ -glucoronidase recombinante (com cauda de poli(histidina)) adicionada por “spiking” em extratos de canola, obtendo-se altos fatores de purificação. BOULIS *et al.* (2003) estudaram o fracionamento de quatro diferentes formas de esporamina (proteína do tubérculo de batata doce) expressas em folhas de tabaco por IMAC com cobre imobilizado em agarose-IDA. Após uma etapa de precipitação por sulfato de amônio, estes autores mostraram que, de acordo com análises de SDS-PAGE e *Western blotting*, ocorreu purificação completa para apenas duas formas. VALDEZ-ORTIZ *et al.* (2005) utilizaram IMAC com níquel imobilizado para caracterizar e purificar amarantina a partir de sementes de tabaco, obtendo 70% de recuperação da proteína em uma única cromatografia.

RIBEIRO e colaboradores (2008a) obtiveram e purificaram cistatina (inibidor de protease da cisteína) com cauda de histidina, produzida em folhas de cana-de-açúcar transgênica. Os autores mostraram que a técnica de IMAC foi utilizada com sucesso na purificação, uma vez que a cistatina manteve 85% de sua atividade enzimática inibitória.

Em um trabalho recente de nosso grupo de pesquisa, BRESOLIN *et al.* (2008) apresentaram um estudo do efeito das condições operacionais de adsorção por IMAC de proteínas nativas de folhas de tabaco não-transgênico, visando-se obter conhecimento de base para posterior aplicação na captura de proteínas recombinantes produzidas em tabaco transgênico. Dentre os tampões estudados pelos autores, verificou-se que em presença do tampão fosfato de sódio a pH 7,0 houve uma menor adsorção de proteínas de tabaco em agarose-IDA-Ni(II) em relação aos demais. Esta condição operacional foi selecionada para determinar a seletividade do adsorvente quando realizada adição artificial (“spiking”) de

IgG humana policlonal comercial. Nesta condição, a IgG foi capturada, sendo recuperada com pureza superior a 75%.

### **2.3. PROTEÍNAS ADICIONADAS ARTIFICIALMENTE (“SPIKING”) EM EXTRATOS DE SOJA**

Neste tópico serão abordados aspectos e características mais relevantes das cinco proteínas utilizadas neste trabalho: Imunoglobulina G (IgG) humana, albumina de soro humano (HSA), albumina de soro bovino (BSA), aprotinina e lisozima.

#### **2.3.1. Imunoglobulina G (IgG) humana**

As imunoglobulinas (Ig) são um grupo de glicoproteínas presentes no soro humano ou animal, compostas de 82 a 96% de proteínas e 4 a 18% de carboidratos, conferindo imunidade humoral e constituindo a maior parte das defesas imunológicas contra infecções provocadas por microrganismos. A estrutura básica de uma imunoglobulina possui uma configuração comum em forma de “Y” (apresentada na Figura 2-2) e consiste de quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas, cuja massa molecular varia de 50 a 70 kDa, e duas cadeias leves, de massa molecular de 25 kDa, sempre em pares idênticos (VLUG e VAN REMORTEL, 1989). As quatro cadeias são unidas por ligações dissulfídicas (pontes dissulfeto). As cadeias leves que fazem parte da região Fab podem ser do tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$  e são formadas por dois domínios: um variável e outro constante. As cadeias pesadas são características dos tipos de Igs e diferem entre si a partir da estrutura das cadeias pesadas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (VLUG e VAN REMORTEL, 1989). Os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas constituem os sítios ligantes de antígeno (epítipo).



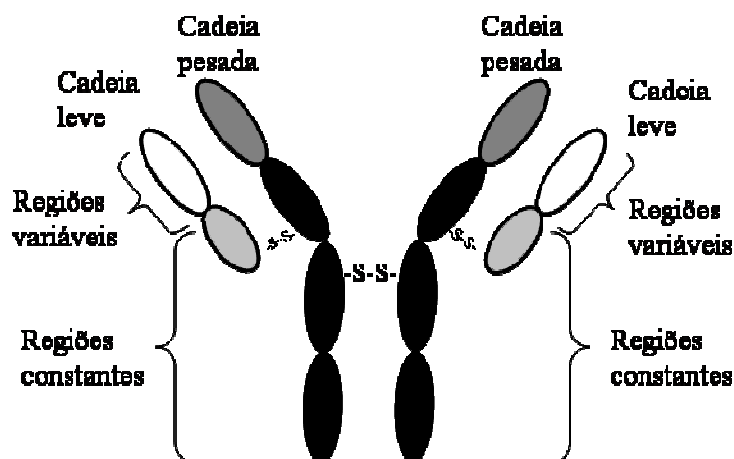


Figura 2-2. Modelo da estrutura de uma molécula de anticorpo típico, composta de duas cadeias polipeptídicas leves e duas cadeias pesadas. Pontes dissulfeto inter-cadeias estão indicadas. Dois sítios ativos idênticos de ligação ao antígeno estão localizados nos braços da molécula, formados pelas regiões variáveis.

A IgG, na fase adulta responde por 75 a 80% das imunoglobulinas séricas. É a imunoglobulina predominante em todas as idades e é produzida nos últimos estágios da resposta imune, encontrando-se na forma de monômero (massa molecular em torno de 150 kDa). A IgG humana apresenta quatro subclasses distintas: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>. As subclasses de IgG possuem valores de pI distintos: IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> – de 7,8 a 9,0, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> – de 6,3 a 8,0 (VLUG E VAN REMORTEL, 1989).

A IgG humana é de grande interesse para aplicações terapêuticas, para diagnósticos e para purificação de anticorpos e antígenos. Essas aplicações requerem eficiência na purificação e na atividade dos constituintes (BURNOUNF e RADOSEVICH, 2001).

### 2.3.2. Albumina de soro humano (HSA) e albumina de soro bovino (BSA)

A albumina é uma proteína amplamente estudada, de uma cadeia polipeptídica de massa molecular de aproximadamente 66 kDa. É uma das proteínas mais abundantes do sangue humano e animal, com concentração típica de 50 mg/mL, contribuindo com 80% da pressão sanguínea osmótica. Como proteína multifuncional de transporte, a albumina tem papel fundamental na reserva de óxido nítrico, o que implica diretamente em grande e importante número de processos fisiológicos (MICHNIK *et al.*, 2005). A BSA possui entre 566 a 621 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico de 4,8, enquanto que a HSA contém

entre 569 a 613 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico de 4,4 (SPECTOR, 1975). Tanto a BSA quanto a HSA possuem apenas um resíduo de cisteína livre, Cys34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A BSA possui 2 resíduos de triptofano, Trp134 e Trp212 e a HSA apenas um, Trp214 (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Existem resultados contraditórios e muitas discussões sobre a determinação da estrutura da HSA, porém com base em experimentos de hidrodinâmica e espalhamento de raios-X, a albumina sérica aproxima-se de um elipsóide de  $140 \times 40$  Angstroms, com três domínios homólogos (Figura 2-3).

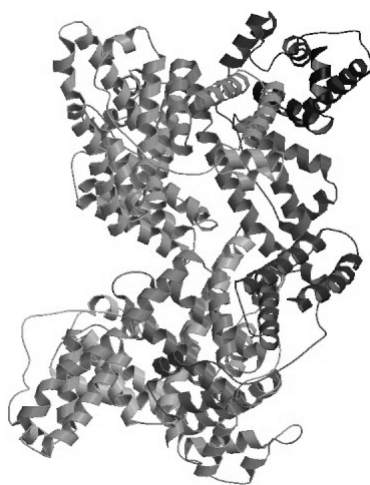


Figura 2-3. Estrutura quaternária da HSA (SUGIU *et al.*, 1999; Protein Data Bank 1BM0).

### 2.3.3. Aprotinina

A aprotinina é um polipeptídeo de cadeia simples derivado de tecidos bovinos, constituído de 58 resíduos de aminoácidos, massa molecular de aproximadamente 6,5 kDa e ponto isoelétrico de 10,5. É um inibidor de enzimas proteolíticas incluindo a quimiotripsina, calicreína, plasmina, trombina e tripsina. É utilizada no tratamento de hemorragia associada às altas concentrações de plasmina no plasma. Também é utilizada para reduzir perda sanguínea e necessidade de transfusões em pacientes durante ou após cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea (NORRIS *et al.*, 1990; LEHNINGER, 1995). A estrutura da aprotinina está apresentada na Figura 2-4.

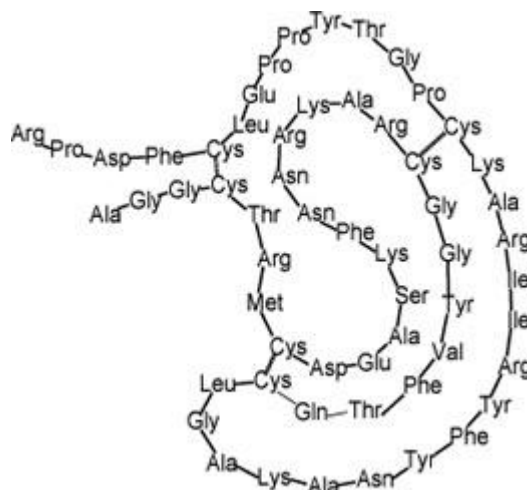


Figura 2-4. Sequência de aminoácidos da aprotinina e posições das pontes dissulfeto entre os átomos de enxofre das cisteínas (www.sigmaaldrich.com).

#### 2.3.4. Lisozima

Lisozima (1,4- $\beta$ -N-acetilmuramidase) é um polipeptídeo de cadeia simples de 129 aminoácidos reticulada com quatro pontes dissulfeto (JOLLES, 1969) encontrada na lágrima, na secreção nasal, na saliva, no baço e em leucócitos. Sua estrutura está apresentada na Figura 2-5.

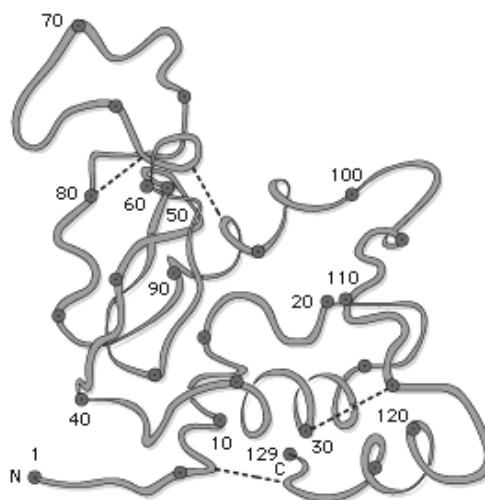


Figura 2-5. Estrutura simplificada da lisozima de clara de ovo. Os resíduos de aminoácidos estão numerados do grupo N-terminal ao C-terminal. As linhas pontilhadas indicam as quatro ligações dissulfeto existentes (<http://media-2.web.britannica.com/eb-media/09/6509-004-3BFCA7C6.gif>).

Esta proteína possui massa molecular de cerca de 14,7 kDa, ponto isoelétrico aproximadamente igual a 11,3. A enzima causa a lise de células bacterianas específicas por meio da hidrólise das ligações glicosídicas de oligossacarídeos presentes nas paredes celulares das mesmas (HOLLER *et al.*, 1975; LEHNINGER, 1995). Devido a essa propriedade, a lisozima está presente em grande quantidade nos ovos de muitas aves, onde desempenham um importante papel na defesa do embrião contra infecção bacteriana (RUDNEY *et al.*, 1985). Nas indústrias alimentícia e farmacêutica, a lisozima é muito utilizada como aditivo e conservante (SU e CHIANG, 2006).

## **CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. MATERIAIS**

#### **3.1.1. Grãos de soja**

Os grãos de soja orgânica, para consumo humano, utilizados neste trabalho foram adquiridos no mercado local, da marca Jasmine (PR, Brasil), lote 402, com validade até 12/02/2009.

#### **3.1.2. Proteínas utilizadas como “spiking”**

Neste trabalho foram utilizadas cinco proteínas de diferentes massas moleculares e pontos isoelétricos (pI): Imunoglobulina G (IgG) humana, albumina de soro humano (HSA), albumina de soro bovino (BSA), aprotinina e lisozima.

IgG humana foi obtida da ZLB Behring (Alemanha), com pureza de 98,3% de acordo com análise nefelométrica de IgG, IgA, IgM, albumina e transferrina feita em nosso laboratório. Apresenta pI entre 5,8 e 9,0 e massa molecular de 150 kDa.

HSA foi obtida da Sigma (EUA), com pureza de 98 a 99%, segundo dados do próprio fabricante, pI de 4,4 e massa molecular de 66 kDa.

BSA foi obtida da Sigma (EUA), com pureza de 98% segundo o fabricante, pI de 4,8 e massa molecular de 66 kDa.

Aprotinina de pulmão bovino foi obtida da Sigma (EUA), com pureza não determinada pelo fabricante, 5,1 TIU/mg sólido, pI de 10,5 e massa molecular de 6,5 kDa.

Lisozima de ovo de galinha foi obtida da Sigma (EUA), com pureza superior a 99% de acordo com dados do fabricante, 54.700 unidades/mg de proteína, pI de 11,3 e massa molecular de 14,7 kDa.

#### **3.1.3. Reagentes**

O gel de agarose (Sephacrose 4B, contendo 4% de agarose reticulada, tamanho de partícula entre 45-165 µm) foi obtido da Amersham Biosciences (Suécia), sulfato de níquel, sulfato de cobre, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tris(hidroximetil)-

aminometano (Tris), ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES), acetato de sódio, formaldeído, hexano e isopropanol foram obtidos da Merck (Alemanha). Fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio bibásico anidro, fosfato de potássio monobásico anidro, hidróxido de potássio, ácido clorídrico, ácido acético, ácido cítrico, carbonato de sódio, metanol e etanol foram obtidos da Synth (Brasil). Acrilamida, bis-acrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS), glicina e N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) foram obtidos da BioAgency (Brasil). Persulfato de amônio, ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), tris-(2-aminoetil)amina (TREN), glicerol, Sepharose-dietilaminoetil (Sepharose-DEAE) e *Micrococcus lysodeikticus* foram obtidos da Sigma (EUA). Azul de bromofenol e ditiotrietol foram obtidos da Plusone (Suécia). Glutaraldeído e hidróxido de sódio foram obtidos da Nuclear (Brasil). Ácido o-fosfórico foi obtido da Ecibra (Brasil). Azul de comassie brilhante G 250 foi obtido da Vetec (Brasil). Para as eletroforeses, utilizaram-se marcadores de massas moleculares altas contendo as seguintes proteínas: miosina (220 kDa),  $\alpha$ 2-macroglobulina (170 kDa),  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), transferrina (76 kDa) e desidrogenase glutâmica (53 kDa) e marcadores de massas moleculares baixas, contendo as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa),  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa), ambos “kits” adquiridos da GE Healthcare (EUA). Como marcador de IgG, foi utilizado IgG humana da ZLB Behring (Alemanha), como marcador de BSA, HSA e aprotinina foram utilizadas as respectivas proteínas da Sigma (EUA). Utilizou-se água ultrapura Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Moagem dos grãos de soja orgânica

Os grãos de soja foram moídos a seco utilizando um micro moinho de facas (Tecnal TE-648, Brasil). A farinha de soja foi peneirada utilizando-se a fração passante em peneira de abertura de 0,50 mm.

### 3.2.2. Desengorduramento da farinha de soja

O desengorduramento da farinha de soja foi feito utilizando-se hexano (Merck, Alemanha) a 60°C em aparelho tipo Soxhlet, conforme descrito por ROBIC (2005). Um volume de 400 mL de hexano foi usado para 100 g de farinha de soja durante 6 h e a mesma foi retirada do aparelho e deixada em capela à temperatura ambiente durante 8 horas para evaporação do hexano.

### 3.2.3. Extração de proteínas da soja

Em béquer de 250 mL, 5,0 g de farinha de soja desengordurada foram agitados com 100 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0 por 30 min a 20°C. Utilizou-se agitador mecânico modelo Q-251D (IKA Labortechnik, Alemanha) com impelidor do tipo pás inclinadas (4 cm de diâmetro e inclinação de 45°, construído pela Kroma, Brasil) a uma rotação de 500 rpm por 30 min. A suspensão foi centrifugada a 10000 g por 20 min a 5°C em uma centrífuga (5804R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi removido, filtrado em membrana com diâmetro de poro de 3 µm (Inlab, Brasil) e utilizado imediatamente para análise ou congelado em tubos Eppendorf para análise posterior (ROBIC, 2005).

### 3.2.4. Ativação do gel com epicloridrina

O gel de agarose foi ativado com epicloridrina, de acordo com o protocolo descrito por HEMDAN e PORATH (1985). Inicialmente o gel embebido em água, foi desgaseificado para remover o ar presente nos poros, utilizando uma bomba de vácuo.

Em capela, um frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 20 g de gel (filtrado a vácuo por 5 min) foi colocado em um agitador orbital. Em seguida, foi adicionado ao gel um volume de 5,0 mL de epicloridrina e 50,0 mL de NaOH 2,0 mol/L contendo 0,266 g de boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ). Esta suspensão (gel e solução) foi deixada sob moderada agitação (50 rpm), à temperatura de 25 °C, durante 15 min. Após este tempo de reação, foram gotejados, simultaneamente, 50,0 mL de NaOH e 23,3 mL de epicloridrina, a uma vazão de, respectivamente, 0,27 e 0,13 mL/min, para evitar o aumento de temperatura durante a reação. A seguir, a suspensão (gel e solução) foi deixada sob agitação por um

período de 16 hs a 25 °C, tempo suficiente para a reação ser completada. Após este período, em capela, o gel foi lavado com água Milli-Q até verificar o mesmo valor de pH para a água Milli-Q e para a água de lavagem (descarte), indicando que todo o excesso de solução (solução com epicloridrina, NaOH e NaBH<sub>4</sub> com pH em torno de 10,0) foi removido. Esta lavagem foi feita com a adição da água Milli-Q no gel, seguida de uma leve agitação orbital manual e escoamento em funil com placa de vidro sinterizada.

### 3.2.5. Imobilização do TREN

A imobilização do tris-(2-aminoetil)amina (TREN) foi realizada como descrito por BODEN *et al.* (1995). Foi preparada uma solução contendo 5,0 mL de TREN (96 % m/v) em 25,0 mL de água ultrapura (o frasco contendo o reagente TREN foi aberto em uma capela com atmosfera de argônio, uma vez que o mesmo adsorve umidade e CO<sub>2</sub> do ar). O gel previamente ativado foi colocado em um frasco erlenmeyer e a solução de TREN foi adicionada ao mesmo. Esta solução permaneceu sob agitação durante 48 horas a temperatura ambiente, em capela. Após este período de imobilização, o gel foi lavado com água ultrapura, até verificar o mesmo valor de pH para a água ultrapura e para a água de lavagem (descarte), indicando que todo o excesso de solução de TREN foi removido. O adsorvente obtido foi denominado Sepharose-TREN. Segundo RIBEIRO (2006), a densidade de TREN em agarose ativada com epicloridrina é de 66,2 µmol/g seca para Cu(II) e 71,5 µmol/g seca para Ni(II).

### 3.2.6. Experimentos cromatográficos

Empacotou-se uma coluna cromatográfica modelo C 10/20 de 10 mm de diâmetro interno × 20 cm de altura (Amersham Biosciences, EUA) com 2,0 ou 5,0 mL de gel (Sepharose-TREN ou Sepharose-DEAE), conforme o experimento. Esta foi, então, conectada um sistema de cromatografia de baixa pressão (Bio-Rad, EUA), representado na Figura 3-1. Com vazão de 0,5 ou 1,0 mL/min, equilibrou-se a coluna com um dos seguintes tampões: MES 25 mmol/L, pH 6,5; MOPS 25 mmol/L pH 6,5 e 7,5; Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0 e 8,5 e Fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,5.



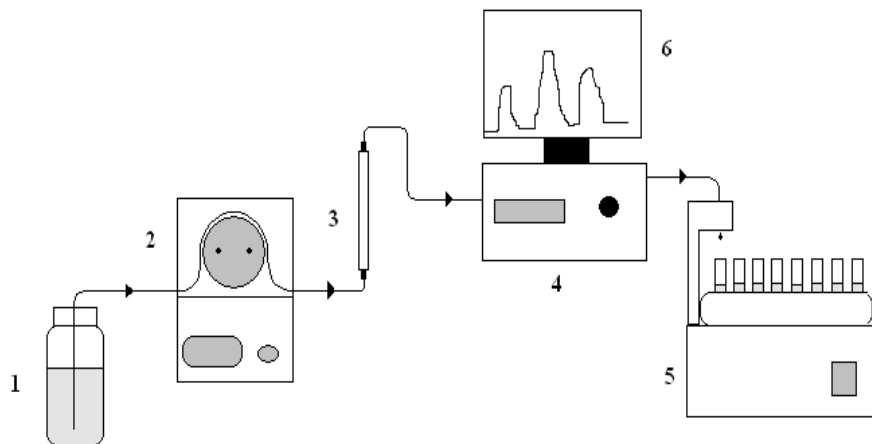


Figura 3-1. Esquema do sistema cromatográfico de baixa pressão. 1) reservatório de solução; 2) bomba peristáltica; 3) coluna cromatográfica; 4) monitor de medida de absorvância a 280 nm; 5) coletor de frações; 6) registrador.

Para cromatografias IMAC, a coluna contendo o adsorvente foi alimentada, até a saturação, com uma solução a 50 mmol/L de sulfato de Cu(II) ou Ni(II) preparadas, respectivamente, em água e em 20 mmol/L de acetato de sódio pH 6,5 e, em seguida, lavada, sequencialmente, com água ultrapura e com tampão de eluição (com maior concentração de agente competidor imidazol (300 mmol/L) ou de menor valor de pH), com o intuito de remover o metal fracamente adsorvido na matriz e, finalmente, com o tampão de adsorção utilizado para cada experimento: MES 25 mmol/L, pH 6,5; MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, 1,0 mol/L NaCl, pH 6,5; Mops-Acetato (MA) 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0.

Realizaram-se cromatografias alimentando-se 2,0, 10,0 e 82,0 mL de extrato de soja e curvas de ruptura alimentando-se 100,0 mL de extrato de soja, sendo todas as amostras alimentadas no tampão de equilíbrio, após prévia troca de tampão do extrato original em coluna de filtração em gel (PD 10 – Sephadex G 25 M, GE Healthcare, EUA).

A lavagem foi realizada com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna e, em seguida, a eluição foi feita por acréscimo de 0,5 ou 1,0 mol/L de NaCl no tampão de equilíbrio e abaixamento de pH ou adição de 300 mmol/L de imidazol para IMAC. Finalizada a eluição, a coluna foi regenerada com NaOH 50 mmol/L para os experimentos de cromatografia negativa e com EDTA 50 mmol/L nos experimentos de IMAC (para a remoção do metal) e, finalmente, com água Milli-Q. Durante todo o experimento, foram

coletadas frações de 1,0 ou 2,0 mL para análise. As frações obtidas foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford (1976) e aquelas situadas nos picos de proteína foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE.

Selecionada o melhor sistema tamponante, vazão e concentração protéica de alimentação, realizou-se cromatografia com 10,0 mL de alimentação com “spiking” de IgG humana na concentração de 1,0 e 0,5 mg de IgG/mL de extrato. As frações obtidas também foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford (1976) e aquelas situadas nos picos de proteína foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE e nefelometria.

Ainda nas melhores condições cromatográficas, realizaram-se experimentos com 10,0 mL de alimentação com “spiking” de BSA, HSA, aprotinina e lisozima na concentração de 0,5 mg de proteína/mL de extrato. As frações obtidas também foram monitoradas a 280 nm, quantificadas pelo método de Bradford (1976) e aquelas situadas nos picos de proteína foram agrupadas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. As proteínas BSA e aprotinina não foram quantificadas. A proteína HSA foi quantificada por nefelometria e a lisozima por absorbância a 280 nm e medida a atividade enzimática.

Foi realizado um experimento cromatográfico com 5,0 mL do gel Sepharose-TREN-Ni(II) e posterior eletroforese de focalização isoeletrica (“Isoelectric Focusing” – IEF) para determinação dos pontos isoeletricos das moléculas de IgG adsorvidas e não adsorvidas na matriz de IMAC. Alimentou-se uma solução contendo 5,06 mg de IgG com elevada pureza/mL de tampão MES 25 mmol/L, pH 6,5. Esta concentração foi escolhida para não saturar a capacidade do gel, permitindo, assim, a identificação dos pontos isoeletricos da IgG das frações cromatográficas retidas e não retidas. A eluição das proteínas adsorvidas no gel foi realizada por adição de 300 mmol/L de imidazol ao tampão de adsorção. O gel foi regenerado com EDTA 50 mmol/L e lavado, sequencialmente, com água ultrapura. A corrente de saída foi monitorada a 280 nm e coletada em frações de 2,0 mL. As frações foram quantificadas pela medida de absorbância a 280 nm (coeficiente de extinção de 1,36 para a IgG) e aquelas correspondentes às etapas de lavagem e eluição foram agrupadas e analisadas por IEF (método descrito no item 3.2.9. ).

### 3.2.7. Dosagem de proteínas totais

Determinaram-se as concentrações de proteínas totais nas amostras utilizando o procedimento descrito por BRADFORD (1976), com albumina do soro bovino (BSA) como proteína de referência.

### 3.2.8. Eletroforese SDS-PAGE

A amostra de alimentação e as frações de lavagem, eluição e regeneração das cromatografias foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE, realizadas no equipamento Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida, conforme protocolo apresentado por LAEMMLI (1970), na concentração de 7,5% e 12,5% (ou 15%), sendo as amostras tratadas com tampões contendo SDS em condições desnaturantes e não-redutoras (sem a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol). A desnaturação das proteínas das amostras foi realizada por aquecimento a 100 °C por 10 min. Alíquotas de 15  $\mu$ L de cada amostra, 10  $\mu$ L de marcador de alta massa molecular e 5  $\mu$ L de marcador de baixa massa molecular foram aplicadas nos géis de 7,5% e 12,5% (ou 15%), respectivamente. Estes géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cuba vertical. A coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, conforme MORRISSEY (1981).

### 3.2.9. Eletroforese de Focalização Isoelétrica (“Isoelectric Focusing” – IEF)

A eletroforese IEF é uma técnica baseada na separação de moléculas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI). A técnica consiste na aplicação da solução de proteína sobre um gel de acrilamida que apresenta um gradiente contínuo de pH e neste gel é aplicado um campo elétrico que promove o deslocamento da proteína até a região de pH que corresponde ao seu pI, não havendo deslocamento a partir deste ponto. O PhastSystem (Pharmacia, Suécia) e géis gradientes de pH 3 a 9 e marcadores de pI (GE-Healthcare, EUA) foram usados para a IEF de acordo com o método descrito pelo fabricante. A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata, de acordo com o fabricante.

### 3.2.10. Dosagem de IgG e HSA

A determinação da concentração de IgG humana e HSA presente no “pool” das amostras mais concentradas de cada etapa das cromatografias foram determinadas por nefelometria, conforme descrito no manual do nefelômetro Array 360 System (Beckman, EUA). O método nefelométrico baseia-se no espalhamento de luz obtida pelos complexos (anticorpo específico-antígeno) em suspensão na amostra a ser medida quando submetido a um feixe luminoso incidente. A variação da intensidade do espalhamento de luz medida pelo nefelômetro é convertida em unidades de concentração (mg/dL). A concentração mínima detectada pelo equipamento é de 0,0093 mg/mL para IgG e 0,0062 mg/mL para HSA.

### 3.2.11. Atividade da lisozima

Para a determinação da atividade da lisozima adaptou-se o método apresentado por SHUGAR (1952) que baseia-se na determinação da taxa de redução turbidimétrica de uma suspensão celular de *Micrococcus lysodeikticus* medida através da absorbância a 450 nm em função do tempo. Para a realização do experimento, adicionou-se em uma cubeta de plástico a 25°C, 2,5 mL de suspensão de *M. lysodeikticus* 0,15 mg/mL e 100 µL de solução enzimática, ambas preparadas em tampão fosfato de potássio 66 mmol/L pH 6,24. A atuação enzimática é rompendo a membrana celular das bactérias e a suspensão que inicialmente é turva, torna-se límpida com o decorrer do tempo. Após a adição do substrato e da enzima, agitou-se a cubeta por inversão e registrou-se o decréscimo da absorbância a 450 nm por 5 min. Uma unidade enzimática produz uma variação de absorbância de 0,001 por minuto nas condições experimentais trabalhadas.

A atividade específica da lisozima foi calculada através da expressão:

$$\text{Atividade Específica (U/mg)} = \frac{((\Delta A_{450\text{nm}}(\text{teste}) - \Delta A_{450\text{nm}}(\text{branco}))/t)D}{C \times 0,001 \times V_{\text{enzima}}}$$

em que  $((\Delta A_{450\text{ nm}}(\text{teste}) - \Delta A_{450\text{ nm}}(\text{branco}))/t)$  é a inclinação da curva da absorbância a 450 nm em função do tempo (descontando-se a diferença entre a inclinação para a amostra analisada e para seu branco); D é o fator de diluição; C é a concentração de proteína da

solução enzimática (mg/mL);  $V_{enzima}$  é o volume de enzima adicionado na reação (mL); 0,001 é a variação da absorbância a 450 nm por definição de unidade.

### 3.2.12. Espectrometria de massa

Realizaram-se análises de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), com as seguintes amostras: aprotinina comercial diluída em água milli-Q, aprotinina comercial diluída em tampão MES 25 mmol/L, pH 6,5 e posterior troca de tampão para água Milli-Q em coluna de filtração em gel (PD 10 – Sephadex G 25 M, GE Healthcare, EUA), “pool” das frações mais concentradas da lavagem em tampão MES 25 mmol/L, pH 6,5 e posterior troca de tampão para água Milli-Q em coluna de filtração em gel (PD 10 – Sephadex G 25 M, GE Healthcare, EUA) e “pool” das frações mais concentradas da eluição em tampão MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 6,5 e posterior troca de tampão para água Milli-Q em coluna de filtração em gel (PD 10 – Sephadex G 25 M, GE Healthcare, EUA). Utilizou-se o equipamento LTQ FT Ultra (ThermoScientific). Estes ensaios foram realizados no Laboratório Thomson, do Instituto de Química da UNICAMP. As soluções de aprotinina foram diluídas em uma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O (50% v/v e 0,1% v/v de ácido fórmico). A solução foi introduzida no equipamento de ESI-MS através de um sistema automatizado (Nanomate – Advion, UK), com vazão de 10 µL/min. Os espectros foram adquiridos no modo positivo.

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo são abordados aspectos relativos à extração de proteínas da soja, bem como resultados de adsorção destas proteínas em Sepharose-TREN, analisando os efeitos de diferentes sistemas tamponantes, da diluição do extrato da alimentação e da vazão. Na sequência são apresentados resultados da adição artificial (“spiking”) de IgG humana visando sua purificação por cromatografia negativa. São apresentados resultados de capacidade dinâmica do gel por meio de experimentos de curva de ruptura. Para efeito de comparação são apresentados resultados de controle com o gel de troca-iônica clássico Sepharose-DEAE, bem como experimentos de IMAC com íons Ni(II) e Cu(II) imobilizados em Sepharose-TREN. Resultados com a adição artificial (“spiking”) de outras proteínas como albumina de soro humano (HSA), albumina de soro bovino (BSA), aprotinina e lisozima em extratos de soja também são apresentados utilizando-se o gel Sepharose-TREN.

### **4.1. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA SOJA**

O extrato de soja utilizado como solução de alimentação para os experimentos cromatográficos apresentados neste trabalho, foi obtido por extração de proteínas da soja em tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0, condição esta que favorece maior extração das proteínas da soja, na faixa de 5,0 a 5,5 mg/mL (ROBIC, 2005). De acordo com ALLAN e SIDNEY, 1972, as proteínas nativa da soja possuem massas moleculares que variam de 7,9 a 356 kDa. As eletroforeses da Figura 4-1 identificam as proteínas do extrato preparado neste trabalho de acordo com suas massas moleculares.

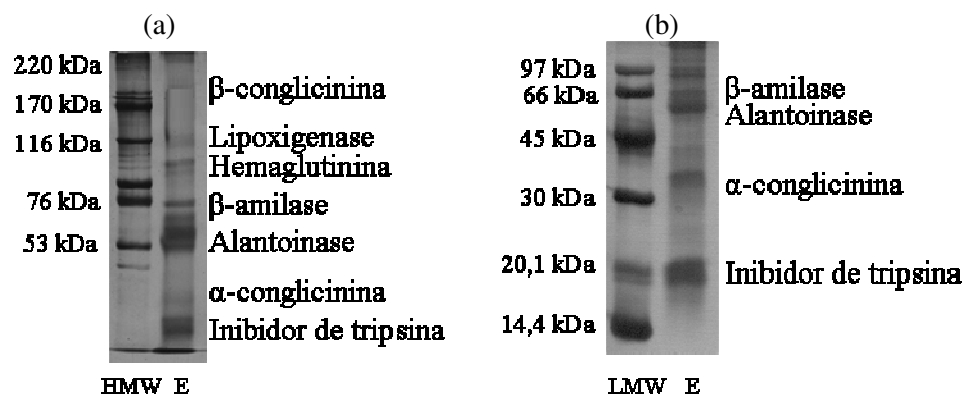


Figura 4-1. Eletroforeses SDS-PAGE do extrato de soja. Amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5% em acrilamida; (b) gel a 12,5% em acrilamida. Faixas: (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular; (E) extrato.

Em todos os experimentos realizados neste trabalho foi necessária a troca de tampão do extrato, realizado por filtração em gel em colunas contendo gel Sephadex G-25 com o intuito de adequar a solução de extrato ao tampão de alimentação da coluna Sepharose-TREN. Partindo-se dos extratos em tampão de alimentação, realizaram-se experimentos cromatográficos para estudo da adsorção de proteínas nativas da soja e purificação de proteínas adicionadas artificialmente (“spiking”) ao extrato de soja.

## 4.2. TREN COMO LIGANTE EM CROMATOGRAFIA NEGATIVA

### 4.2.1. Efeito do sistema tamponante na adsorção de proteínas da soja

Realizaram-se cromatografias com extrato de soja em diferentes sistemas tamponantes (MES, MOPS, Tris-HCl e fosfato de sódio, em valores de pH referentes aos extremos da faixa tamponante de cada tampão), a fim de selecionar a condição que favorecesse a maior adsorção de proteínas nativas da soja em coluna de Sepharose-TREN. As porcentagens de proteínas totais (método de Bradford (1976)) adsorvidas e não adsorvidas no gel para cada sistema tamponante estudado são mostradas na Figura 4-2.

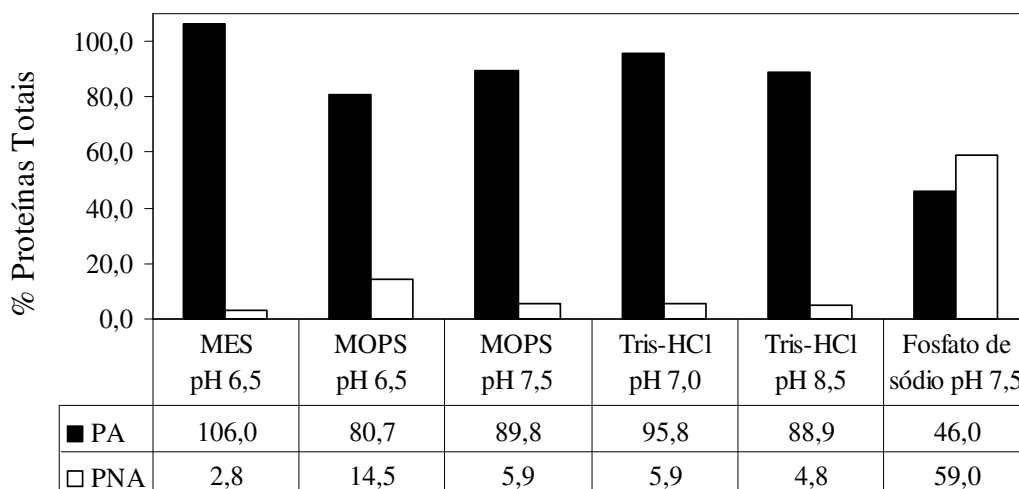


Figura 4-2. Porcentagens de proteínas totais, PA (proteínas adsorvidas) e PNA (proteínas não adsorvidas) da cromatografia negativa em Sepharose-TREN a partir de extrato de soja nos seguintes tampões a 25 mmol/L: MES pH 6,5, MOPS pH 6,5 e 7,5, Tris-HCl pH 7,0 e 8,5 e fosfato de sódio pH 7,5. Alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (8,25 a 10,05 mg/ml). Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min.

As condições tamponantes MES pH 5,5 e fosfato de sódio pH 6,0 não foram estudadas porque algumas proteínas da soja precipitaram em valores de pH inferiores a 6,0. Desta forma, além de etapas de separação do precipitado (centrifugação, filtração, etc), a concentração de proteínas no extrato seria inferior, o que tornaria inviável a comparação destes sistemas, em termos de capacidade e seletividade.

A condição que favoreceu a adsorção de maior quantidade de proteínas nativas do extrato de soja foi com tampão MES pH 6,5 (106% de proteínas adsorvidas), enquanto que em tampão fosfato de sódio pH 7,5, houve a menor adsorção (46%).

A seletividade do adsorvente Sepharose-TREN também diferiu para cada sistema tamponante estudado (Figura 4-3 a Figura 4-8 e Tabela 4-1). Os resultados obtidos no experimento conduzido em MES pH 6,5 indicaram que a maioria das proteínas alimentadas permaneceu adsorvida em Sepharose-TREN, sendo quantificada apenas 2,8% na etapa de lavagem (Tabela 4-1). Entretanto, não se visualizaram bandas de proteínas na eletroforese referente às frações da etapa de lavagem (Figura 4-3), concluindo-se que o gel Sepharose-TREN apresenta alta capacidade de adsorção de proteínas da soja. Como a maioria das proteínas da soja apresenta valores de pI inferiores a 6,1 (ALLAN e SIDNEY, 1972), no pH estudado de 6,5, tais proteínas encontram-se carregadas negativamente, enquanto que o



ligante TREN (ponto de carga nula em torno de 10,5, de acordo com informações do fabricante), encontra-se carregado positivamente. A carga líquida do MES a pH 6,5 é negativa (pKa de 6,15) e provavelmente este seja repelido pelas proteínas, permitindo, desta forma, que elas interajam com o TREN e sejam adsorvidas.

Em tampão MOPS (pKa de 7,14) a pH 6,5 e 7,5 não se alcançou seletividade similar àquela alcançada com MES. Como pode ser observado na Tabela 4-1 e eletroforeses da Figura 4-4, 14,5% de proteínas (faixa de massa molecular entre 30 a 80 kDa) foram detectadas na lavagem em MOPS pH 6,5. Neste valor de pH, a maioria das proteínas da soja apresenta-se carregada negativamente, o TREN carregado positivamente e o MOPS encontra-se com carga líquida nula (zwiteriônico). A carga líquida nula indica que existe um equilíbrio na quantidade de cargas positivas e negativas. Possivelmente, os contra-íons positivos deste tampão estariam sendo atraídos pelas proteínas, impedindo assim, total interação destas com a matriz TREN.

Ao se utilizar MOPS a pH 7,5, 5,9% das proteínas foram detectadas na lavagem, numa faixa estreita de massas moleculares: 45 a 70 kDa (Figura 4-5). Neste valor de pH, a carga líquida do MOPS é negativa, fazendo com que uma maior quantidade de proteínas interaja com o TREN e sejam adsorvidas.

Para o sistema tamponante Tris-HCl (pKa de 8,06), em ambos os valores de pH (7,0 e 8,5), parte das proteínas da soja alimentada permaneceu adsorvida em Sepharose-TREN. Detectou-se, na etapa de lavagem, 5,9% e 4,8% de proteínas em pH 7,0 e pH 8,5, respectivamente. Pelas eletroforeses apresentadas na Figura 4-6 e na Figura 4-7, verifica-se que proteínas na faixa de 45 a 60 kDa e de 30 kDa (provavelmente a  $\alpha$ -conglucina) foram detectadas na etapa de lavagem, respectivamente, para os valores de pH 7,0 e 8,5.

Em tampão fosfato de sódio pH 7,5 os resultados não foram bons em termos de capacidade de adsorção de proteínas, sendo detectado 59% na etapa de lavagem. Tanto as proteínas adsorvidas como as não adsorvidas pertencem a uma ampla faixa de massa molecular (eletroforese similar ao extrato alimentado na coluna), como pode ser visualizado na Figura 4-8.

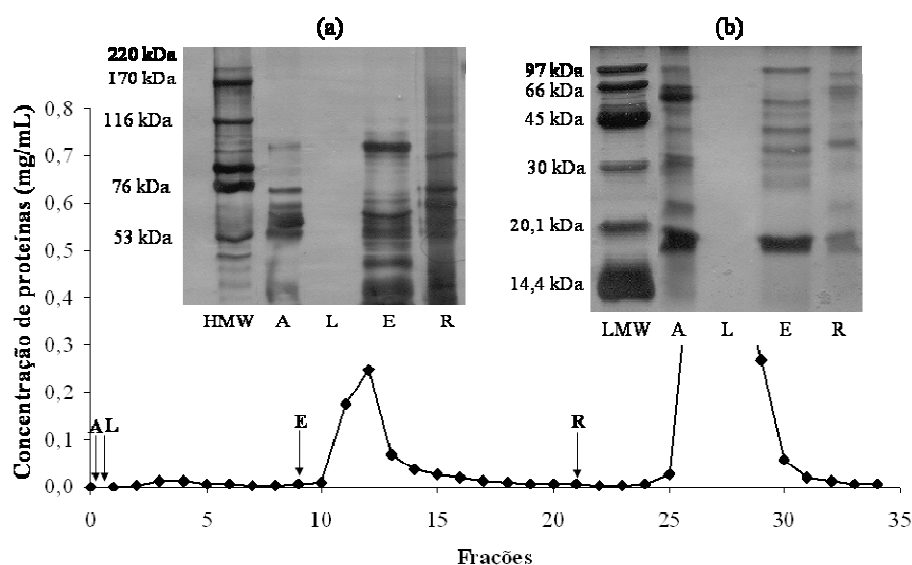


Figura 4-3. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,12 mg de proteína total/mL); (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) solução inicial; (L) “pool” das frações 3 a 5 da lavagem; (E) “pool” das frações 11 a 14 da eluição e (R) “pool” das frações 26 a 29 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

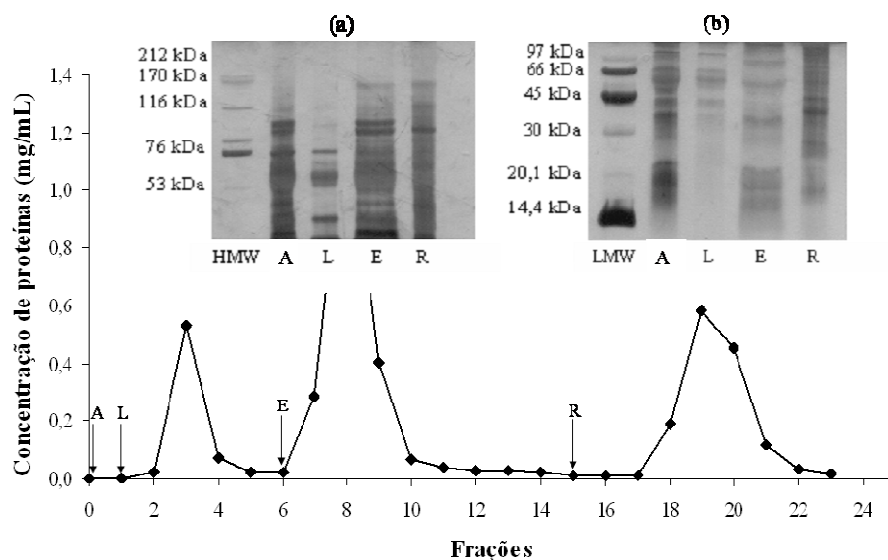


Figura 4-4. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MOPS 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,52 mg proteína total/mL); (L) lavagem: MOPS 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MOPS 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 7 a 9 da eluição e (R) “pool” das frações 18 a 20 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

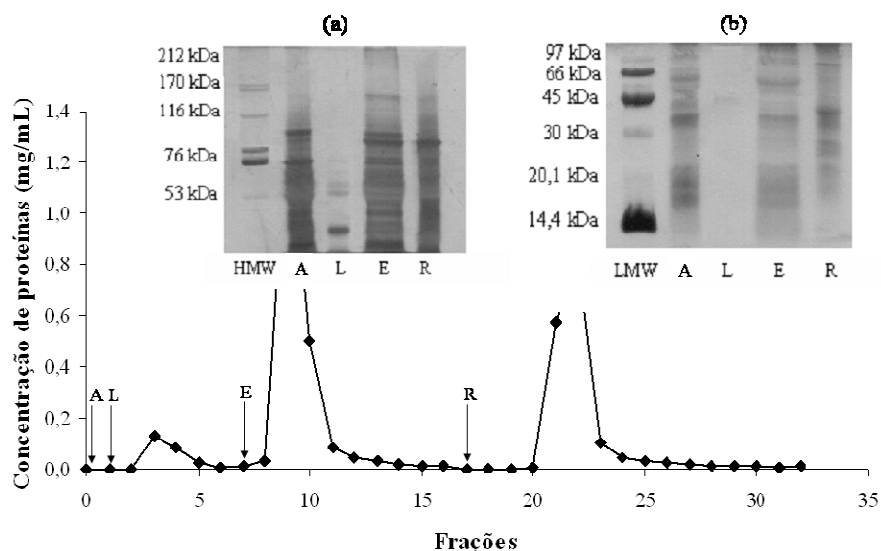


Figura 4-5. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MOPS 25 mmol/L, pH 7,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,34 mg proteína total/mL); (L) lavagem: MOPS 25 mmol/L pH 7,5; (E) eluição MOPS 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 7,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) "pool" das frações 3 e 4 da lavagem; (E) "pool" das frações 9 e 10 da eluição e (R) "pool" das frações 21 a 22 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

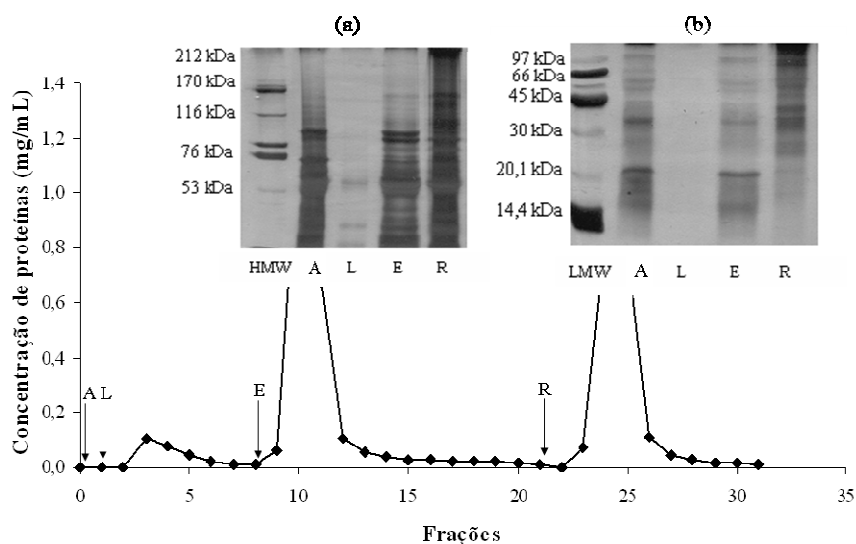


Figura 4-6. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em Tris-HCl 25 mmol/L, pH 7,0. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação 2,0 mL de extrato de soja (4,40 mg proteína total/mL); (L) lavagem: Tris-HCl 25 mmol/L pH 7,0; (E) eluição Tris-HCl 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 7,0; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) "pool" das frações 3 e 4 da lavagem; (E) "pool" das frações 10 e 11 da eluição e (R) "pool" das frações 24 e 25 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

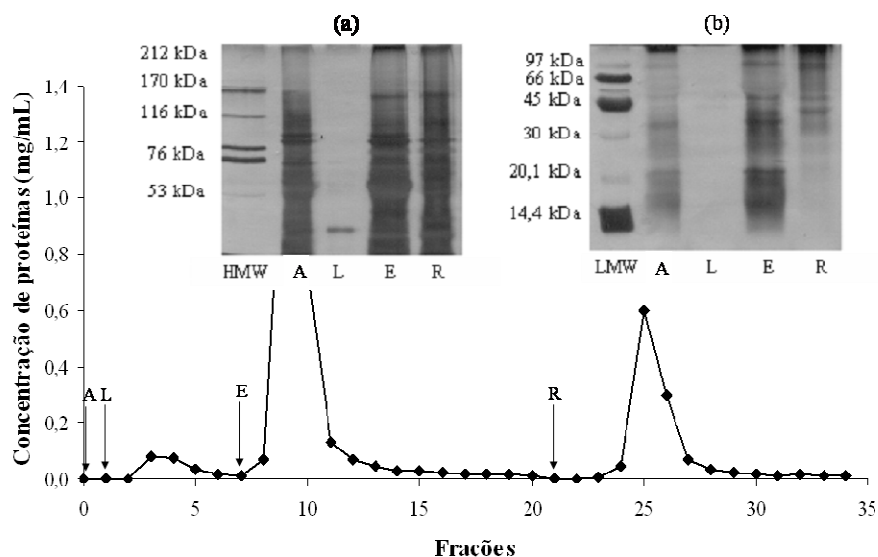


Figura 4-7. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (4,24 mg proteína total/mL); (L) lavagem: Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,5; (E) eluição Tris-HCl 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 8,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 9 e 10 da eluição e (R) “pool” das frações 25 e 26 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

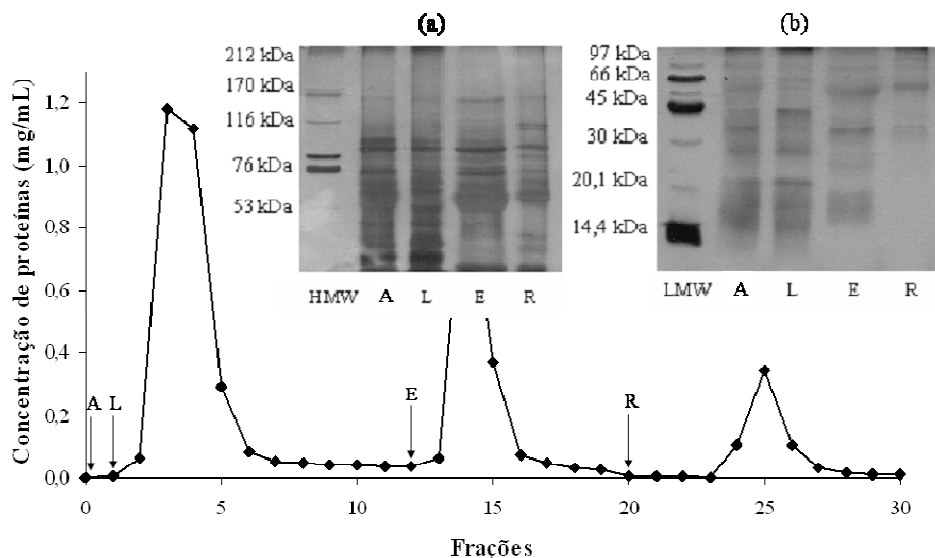


Figura 4-8. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em Fosfato de sódio 25 mmol/L, pH 7,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 2,0 mL de extrato de soja (5,02 mg proteína total/mL); (L) lavagem: Fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; (E) eluição Fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 7,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 3 e 4 da lavagem; (E) “pool” das frações 14 e 15 da eluição e (R) “pool” das frações 24 a 26 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-1. Balanços de massa de proteínas totais das cromatografias negativa em Sepharose-TREN a partir de extrato de soja em diferentes tampões de adsorção e dessorção por acréscimo de 0,5 mol/L NaCl no tampão de adsorção.

Etapas \ Tampão	MES pH 6,5		MOPS pH 6,5		MOPS pH 7,5		Tris pH 7,0		Tris pH 8,5		Fosfato pH 7,5	
	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	8,25	100,0	9,03	100,0	8,67	100,0	8,80	100,0	8,47	100,0	10,05	100,0
Lavagem	0,23	2,8	1,31	14,5	0,51	5,9	0,52	5,9	0,41	4,8	5,93	59,0
Eluição	2,55	30,9	4,42	48,9	4,40	50,7	4,60	52,3	5,26	62,1	3,36	33,4
Regeneração	6,20	75,1	2,87	31,8	3,39	39,1	3,83	43,5	2,27	26,8	1,27	12,6
Recuperação	8,98	108,8	8,60	95,2	8,30	95,7	8,95	101,7	7,94	93,7	10,56	105,0
Proteínas adsorvidas	8,75	106,0	7,29	80,7	7,79	89,8	8,43	95,8	7,53	88,9	4,63	46,0

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

Volume do leito: 2,0 mL.

De acordo com resultados obtidos, conclui-se que a condição mais indicada para realização de cromatografia negativa com “spiking” de proteínas em extrato de soja seria tampão MES 25 mmol/L pH 6,5, cujas eletroforeses não apresentam proteínas da soja na etapa de lavagem (Figura 4-3), indicando, eletroforéticamente, que todas as proteínas foram adsorvidas em Sepharose-TREN.

Neste trabalho foram selecionadas proteínas com diferentes valores de pI para serem adicionadas no extrato de soja: IgG humana (ampla faixa de pI, entre 5,8 e 9,0), HSA (pI ácido de 4,4), BSA (pI ácido de 4,8), aprotinina (pI alcalino de 10,5) e lisozima (pI alcalino de 11,3). Pelo fato de possuir uma ampla faixa de pI, a IgG humana foi a proteína escolhida para o início deste estudo, cujos resultados encontram-se apresentados e discutidos a seguir (item 4.2.2. ).

#### **4.2.2. Purificação de IgG humana adicionada (“spiking”) em extrato de soja por cromatografia negativa**

As cromatografias negativa em Sepharose-TREN para purificação de IgG humana foram realizadas com 3,0 e 8,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 60 e 160 µL a 50 mg/mL de IgG humana, respectivamente, resultando em uma concentração de 1,0 mg de IgG/mL de extrato. Os perfis cromatográficos e eletroforéticos obtidos estão apresentados nas Figura 4-9 e Figura 4-10. As frações cromatográficas referentes às etapas de alimentação, lavagem, eluição e regeneração foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e nefelometria em termos de proteínas totais e IgG, respectivamente (Tabela 4-2 e 4.3).

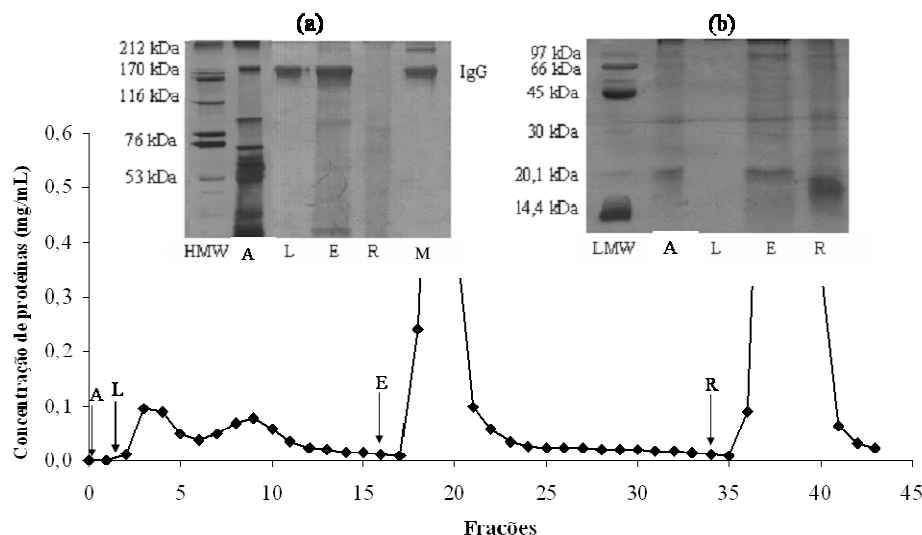


Figura 4-9. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com "spiking" de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 3,0 mL de extrato de soja com "spiking" de 60 µL de IgG humana (50 mg/mL), concentração de IgG de 1,0 mg/mL no extrato; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) "pool" das frações 4 a 10 da lavagem; (E) "pool" das frações 18 a 20 da eluição e (R) "pool" das frações 37 a 40 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-2. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia negativa em Sepharose-TREN realizada com alimentação de 3,0 mL de extrato de soja com "spiking" de 60 µL de IgG humana em MES pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 0,5 mol/L NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	12,72	100,0	2,39	100,0	18,8	1,00
Lavagem	1,05	8,2	0,90	37,9	85,7	4,56
Eluição	4,21	33,1	1,44	60,4	34,2	1,82
Regeneração	9,69	76,2	-	-	-	-
Recuperação	14,95	117,5	2,34	98,2	-	-
Proteínas adsorvidas	13,90	109,3	1,44	60,4	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 2,0 mL.

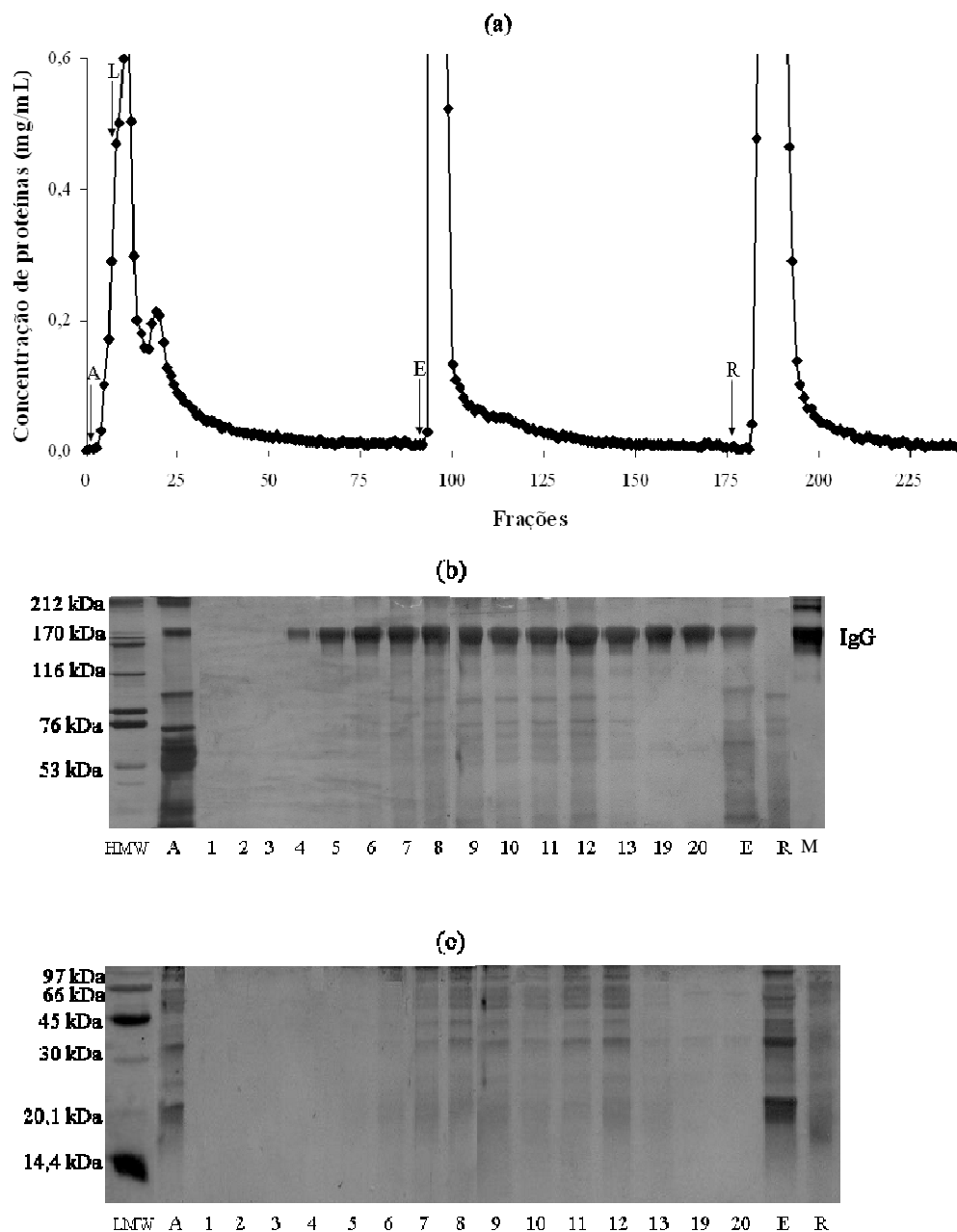


Figura 4-10. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 2,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (A) alimentação: 8,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 160  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), com concentração de IgG de 1,0 mg/mL no extrato; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 0,5 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (1 a 8) frações “flowthrough”; (9 a 20) frações da lavagem; (E) “pool” das frações 94 a 99 da eluição e (R) “pool” das frações 183 a 193 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.



Tabela 4-3. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia realizada com alimentação de 8,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 160 µL de IgG humana em MES pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 0,5 mol/L NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	33,92	100,0	6,36	100,0	18,7	1,00
“Flowthrough”	1,07	3,16	0,82	13,0	76,6	4,10
Lavagem	6,17	18,2	3,09	48,6	50,1	2,68
Eluição	14,49	42,7	3,28	51,6	22,6	1,21
Regeneração	19,18	56,5	-	-	-	-
Recuperação	40,91	120,6	7,19	113,1	-	-
Proteínas adsorvidas	33,67	99,2	3,28	51,6	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 2,0 mL.

De acordo com o resultado da Figura 4-9 observa-se, na etapa de lavagem, apenas uma banda correspondente a IgG que, por análise de nefelometria (Tabela 4-2), sua pureza é de 85,7%. Visualizam-se também bandas de IgG na eluição, visto que a IgG humana possui valores de pI de 5,8 a 9,0, assim IgG de pI abaixo de 6,5 (pH do sistema tamponante utilizado) estão carregadas negativamente e são adsorvidas pelo ligante TREN. Esta hipótese pode ser confirmada de acordo com resultados de focalização isoeletrica apresentados por BRESOLIN *et al.* (2009a). Utilizando agarose-TREN em sistema tamponante idêntico ao utilizado neste experimento (MES 25 mmol/L, pH 6,5), os autores mostraram que, a partir da alimentação de IgG humana comercial (5,8 < pI < 9,0), detectou-se na etapa de lavagem IgG com valores de pI entre 6,3 a 9,0, enquanto na eluição (acrécimo de 0,4 mol/L NaCl no tampão de lavagem) detectou-se IgG de menores valores de pI (5,8 – 7,3).

O aumento da massa de IgG alimentada refletiu na não retenção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, pois nas frações iniciais de “flowthrough”, verificam-se bandas de proteínas da soja em virtude da baixa capacidade de adsorção deste gel (Figura 4-10).

Utilizando Sepharose-TREN, BRESOLIN *et al.* (2009a) obtiveram valores de pureza mais elevados na etapa de lavagem (entre 90% e 95%) do que neste trabalho (50%,

Tabela 4-3). Estes autores purificaram IgG a partir da alimentação de soro humano diluído 20 vezes em tampão MES 25 mmol/L, pH 6,5, na qual cerca de 15% das proteínas totais alimentadas correspondiam a IgG, com uma vazão de 0,5 mL/min.

Neste trabalho, entretanto, a vazão utilizada foi de 1,0 mL/min, podendo acarretar menor capacidade de adsorção. Com o intuito de determinar condições que favorecessem a adsorção de proteínas da soja em gel Sepharose-TREN, realizaram-se curvas de ruptura a diferentes vazões e concentração protéica na alimentação.

#### **4.2.3. Estudo do efeito da vazão e da concentração de proteínas da soja e IgG na retenção e não-retenção de proteínas em gel Sepharose-TREN**

Visando a avaliação o efeito da vazão, foram realizados experimentos de curvas de ruptura em 3 diferentes vazões (1,0, 0,5 e 0,25 mL/min), cujo resultado e discussão está apresentado no item 4.2.3.1. Por sua vez, resultados do efeito da concentração de proteínas da soja (1,33 e 1,09 mg/mL) e a presença de IgG adicionada artificialmente (“spiking”) no extrato de soja estão apresentados nos itens 4.2.3.2 e 4.2.3.3, respectivamente.

##### **4.2.3.1. Efeito da vazão na adsorção de proteínas**

Realizaram-se curvas de ruptura com alimentação de 100,0 mL de extrato de soja em MES pH 6,5, a fim de observar o efeito da vazão (1,0, 0,5 e 0,25 mL/min ou velocidades superficiais de 1,27, 0,64 e 0,32 cm/min) na adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN (Figura 4-11 a Figura 4-13). As análises das frações das etapas de “flowthrough”, lavagem, eluição e regeneração foram realizadas por eletroforese SDS-PAGE. Os balanços de massa em termos de proteínas totais das curvas de ruptura estão apresentados na Tabela 4-4.

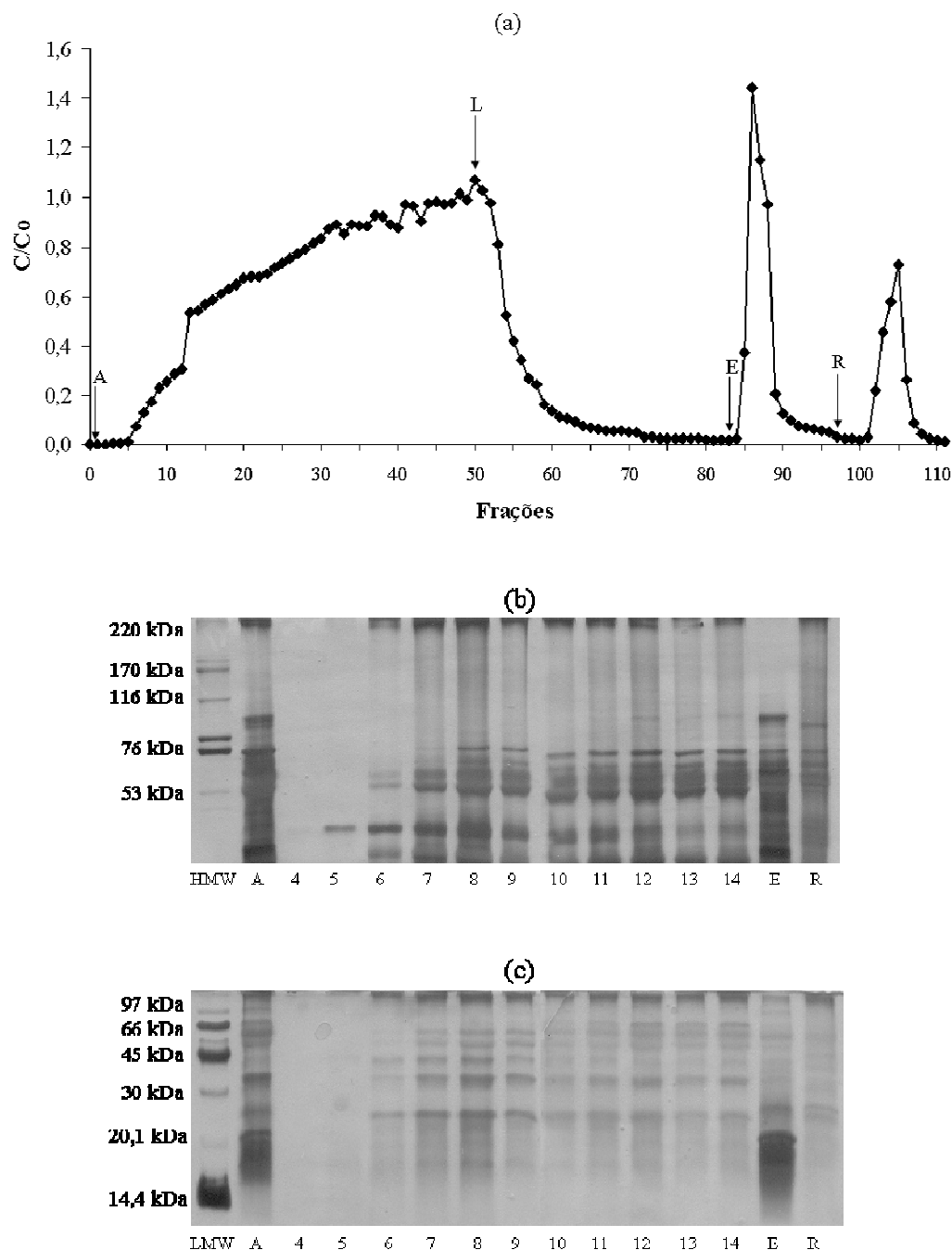


Figura 4-11. (a) Curva de ruptura de extrato de soja em Sepharose-TREN em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5. Volume do leito 5,0 mL. Vazão: 1,0 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 100,0 mL de extrato de soja (4,62 mg de proteína total/mL) (L) lavagem MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (4 a 14): frações “flowthrough”; (E) “pool” das frações 85 a 88 da eluição e (R) “pool” das frações 103 a 105 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

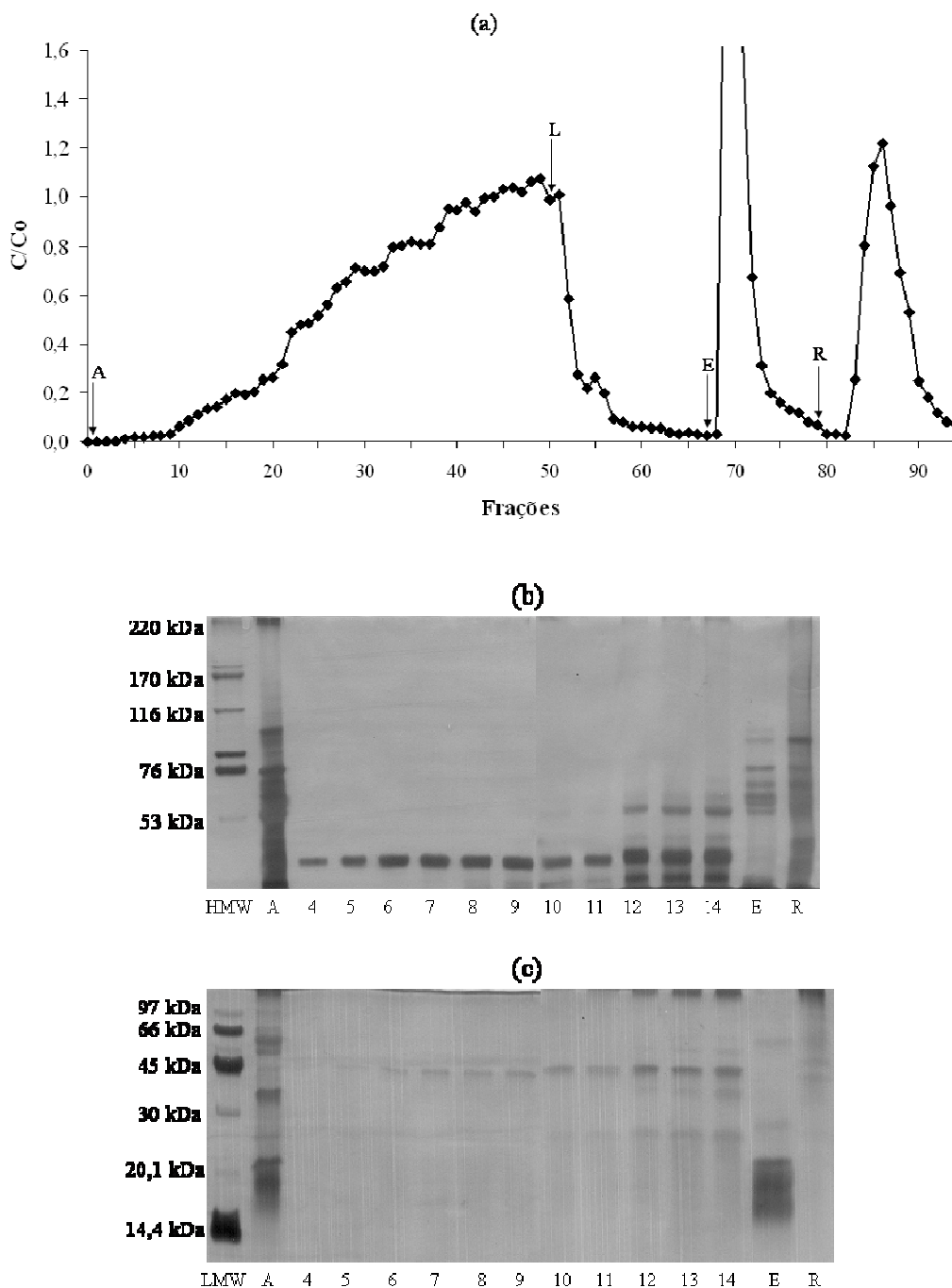


Figura 4-12. (a) Curva de ruptura de extrato de soja em Sepharose-TREN em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5. Volume do leito 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 100,0 mL de extrato de soja (4,00 mg de proteína total/mL); (L) lavagem MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (4 a 14): frações “flowthrough”; (E) “pool” das frações 71 a 738 da eluição e (R) “pool” das frações 85 a 87 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

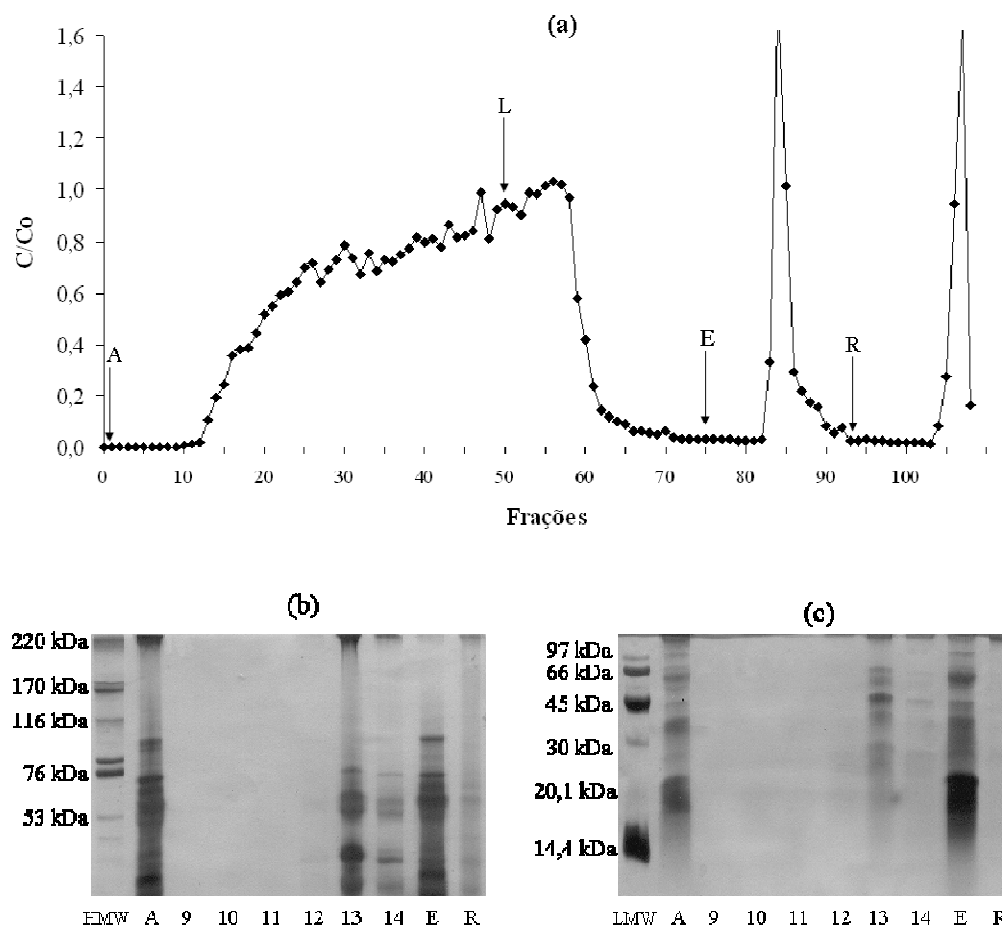


Figura 4-13. (a) Curva de ruptura de extrato de soja em Sepharose-TREN em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5. Volume do leito 5,0 mL. Vazão: 0,25 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 100,0 mL de extrato de soja (4,01 mg de proteína total/mL); (L) lavagem MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (b) gel a 7,5%; (c) gel a 15%. Faixas: (A) amostra inicial; (9 a 14): frações “flowthrough”; (E) “pool” das frações 83 a 85 da eluição e (R) “pool” das frações 106 a 108 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-4. Balanços de massa de proteínas totais das curvas de ruptura realizadas com extrato de soja em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção, nas vazões de 1,0, 0,5 e 0,25 mL/min.

Etapas	Vazão 1,0		Vazão 0,5		Vazão 0,25	
	mL/min		mL/min		mL/min	
	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	461,82	100,0	400,06	100,0	400,97	100,0
“Flowthrough”	297,25	64,4	198,55	49,6	195,58	48,8
Lavagem	66,61	14,4	32,67	8,2	87,41	21,8
Eluição	44,80	9,7	75,23	18,8	57,60	14,4
Regeneração	24,02	5,2	51,64	12,9	31,53	7,9
Recuperação	432,68	93,7	358,09	89,5	372,12	92,8
Proteínas totais adsorvidas	68,82	14,9	126,87	31,7	89,13	22,3
Proteínas totais adsorvidas/mL de gel	13,76	-	25,37	-	17,83	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.  
Volume do leito: 5,0 mL.

A vazão teve um efeito na adsorção de proteínas da soja, sendo a maior capacidade dinâmica de adsorção atingida a 0,5 mL/min (25,37 mg de proteína/mL de gel). Utilizando agarose-TREN e sistema tamponante MES 25 mmol/L, pH 6,5 (idêntico ao utilizado neste experimento), BRESOLIN e colaboradores (2009a) obtiveram capacidade dinâmica de adsorção cerca de 25% maior que neste trabalho (31,65 mg de proteínas do soro humano/mL de gel), quando alimentaram 34 mL (119,0 mg de proteína total sendo 19,72 mg de IgG) de solução de soro humano a uma vazão de 0,5 mL/min, enquanto que neste trabalho alimentou-se 100 mL (400,1 mg de proteína total). Apesar das diferenças na quantidade de proteína total alimentada, a menor capacidade dinâmica de adsorção também pode ter ocorrido devido às interações eletrostáticas entre as proteínas da soja e o TREN, uma vez que estas apresentam pI entre 4,0 a 6,1, enquanto que as proteínas do soro humano apresentam uma faixa mais ampla de pI entre 4,0 e 9,95 (PRIN *et al.*, 1995 e PUTNAM, 1987).

Entretanto, apesar da maior capacidade de adsorção, as eletroforeses da Figura 4-12 mostram bandas de proteínas de massa molecular de aproximadamente 45 kDa, referentes

às frações iniciais “flowthrough”. Estas proteínas não foram identificadas nas eletroforeses da Figura 4-13, mostrando que na vazão de 0,25 mL/min, um tempo maior foi requerido para que as proteínas saturassem a coluna. Na cromatografia realizada na vazão de 0,25 mL/min, não foi possível total regeneração da coluna devido ao entupimento da mesma com proteínas que precipitaram durante a cromatografia. Este fato pode ter ocasionado diminuição na capacidade de adsorção do gel na menor vazão trabalhada. Baseado nos resultados destes experimentos, passou-se a trabalhar com vazões de 0,5 mL/min.

Nas três vazões trabalhadas observou-se precipitação dentro da coluna e frações turvas a partir da décima segunda fração “flowthrough”. Uma hipótese para explicar este fenômeno seria que a medida que os sítios do gel Sepharose-TREN seriam ocupados, começaria a ocorrer interação proteína-proteína, ocasionando a precipitação das mesmas e as turbidez das frações.

Realizaram-se experimentos testando-se diferentes diluições do extrato a ser alimentado na coluna com o intuito de determinar a concentração inicial que evitasse a precipitação de proteínas durante a cromatografia.

#### **4.2.3.2. Efeito da concentração inicial de extrato de soja na adsorção e precipitação de proteínas**

Com base nos resultados apresentados no item 4.2.3.1, realizaram-se cromatografias com alimentação de 82,0 mL de extrato de soja em diferentes concentrações iniciais de proteínas da soja, a fim de verificar o efeito da concentração da alimentação na adsorção e precipitação de proteínas em Sepharose-TREN. Inicialmente, estudaram-se as seguintes proporções (% v/v) extrato de soja/tampão: 50/50 (1,33 mg de proteínas totais/mL) e 45/55 (1,09 mg de proteínas totais/mL). Os resultados obtidos estão apresentados nas Figura 4-14 e Figura 4-15. A Tabela 4-5 apresenta os balanços de massa em termos de proteínas totais das cromatografias. Monitoraram-se os valores de pH e condutividade de cada fração coletada nas cromatografias, a fim de verificar o efeito e a variação destes fatores na precipitação de proteínas no interior da coluna de Sepharose-TREN. Estes resultados estão apresentados na Tabela A.1 (Apêndice A), e não houve grande variação de pH e condutividade ao longo do processo cromatográfico para ambas concentrações iniciais.

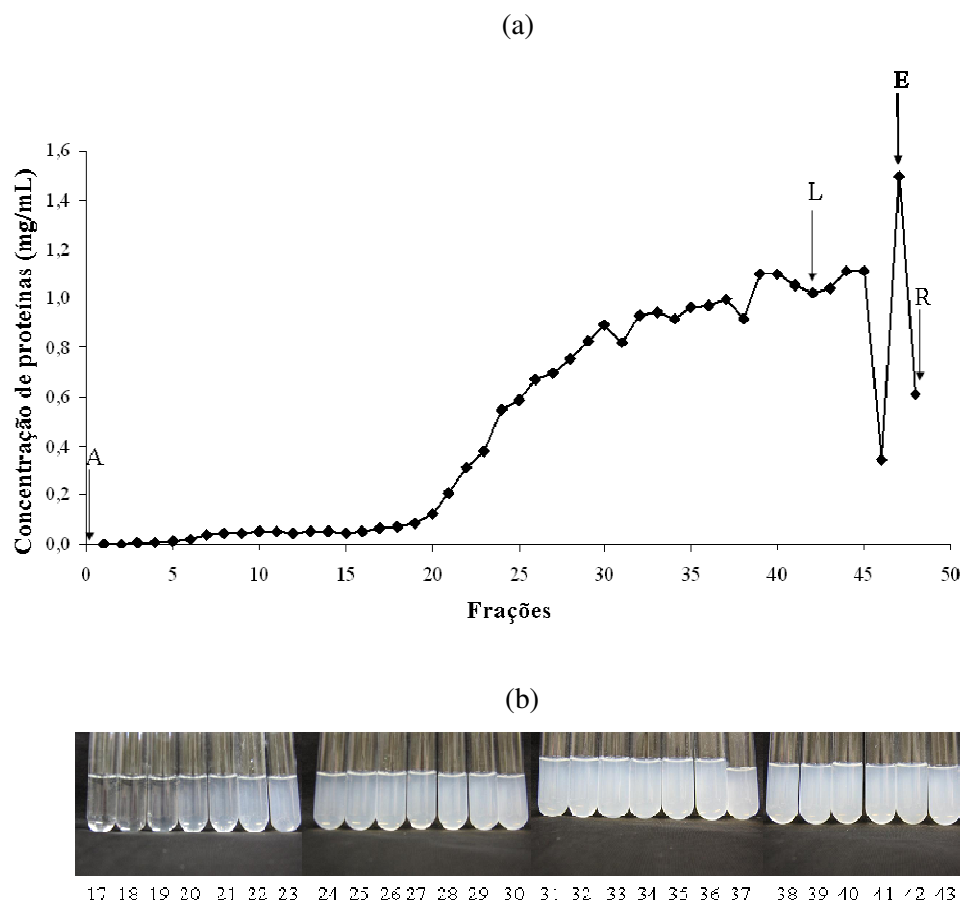


Figura 4-14. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 82,0 mL de extrato de soja na concentração de 1,33 mg/mL; (L) “Pool” de 40,0 mL das frações de lavagem em MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) “Pool” de 30,0 mL das frações de eluição em MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) “Pool” de 36,0 mL das frações de regeneração em NaOH 50 mmol/L. (b) Fotografia das frações 17 a 41 “flowthrough” e das frações 42 a 44 da lavagem.



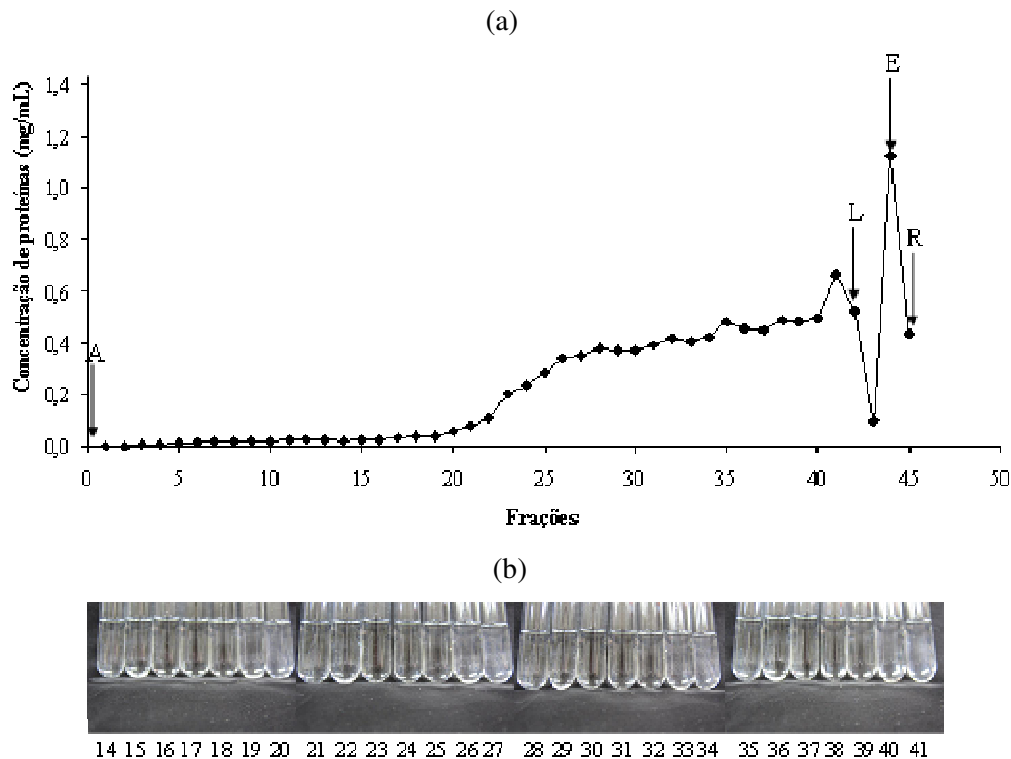


Figura 4-15. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 82,0 mL de extrato de soja na concentração de 1,09 mg/mL; (L) “Pool” de 50,0 mL das frações de lavagem em MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) “Pool” de 40,0 mL das frações de eluição em MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) “Pool” de 52,0 mL das frações de regeneração em NaOH 50 mmol/L. (b) Fotografia das frações 14 a 41 “flowthrough”.

Tabela 4-5. Balanços de massa de proteínas totais das cromatografias realizadas com extrato de soja em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção, nas concentrações iniciais de 1,33 e 1,09 mg/mL.

Etapas	1,33 mg/mL		1,09 mg/mL	
	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	109,41	100,0	89,64	100,0
“Flowthrough”	36,92	33,7	17,64	19,7
Lavagem	20,25	18,5	4,77	5,3
Eluição	44,78	40,9	44,77	49,9
Regeneração	21,93	20,0	22,75	25,4
Recuperação	123,87	113,2	89,93	100,3
Proteínas totais adsorvidas	66,71	60,9	67,52	75,3

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com as fotografias apresentadas na Figura 4-14-b, pode-se observar que ocorreu precipitação durante a cromatografia realizada com alimentação na concentração de 1,33 mg/mL (50% de extrato/50% de tampão), a partir da fração 20. Na cromatografia realizada na concentração de alimentação de 1,09 mg/mL (45% de extrato/55% de tampão) não houve precipitação (fotografias apresentadas na Figura 4-15-b). Logo, a concentração de proteínas totais do extrato de soja alimentado na coluna influencia na precipitação de proteínas no decorrer do processo cromatográfico, uma vez que em concentrações menores não houve precipitação. Possivelmente ao alimentar a coluna com menor concentração de proteínas totais, o tempo para alcançar a saturação dos sítios do gel Sepharose-TREN seja maior, evitando, dessa forma, a interação proteína-proteína e a precipitação das mesmas.

A condição mais apropriada para a realização de “spiking” com as proteínas IgG humana, HSA, BSA, aprotinina e lisozima seria a de 45% de extrato/55% de tampão. Entretanto, por medidas de segurança, para evitar a precipitação de proteínas após a adição de IgG, realizou-se o “spiking” com 82,0 mL de extrato em uma condição mais diluída (40% de extrato/60% de tampão).

#### **4.2.3.3. Efeito da presença de IgG no extrato de soja**

Realizou-se o “spiking” adicionando-se 820 µL de IgG humana (50 mg/mL), tendo-se a concentração final de proteínas totais de 1,26 mg/mL, e concentração final de IgG de 0,5 mg/mL. O resultado obtido está apresentado na Figura 4-16 e a Tabela 4-6 apresenta os balanços de massa em termos de proteínas totais e IgG da cromatografia.

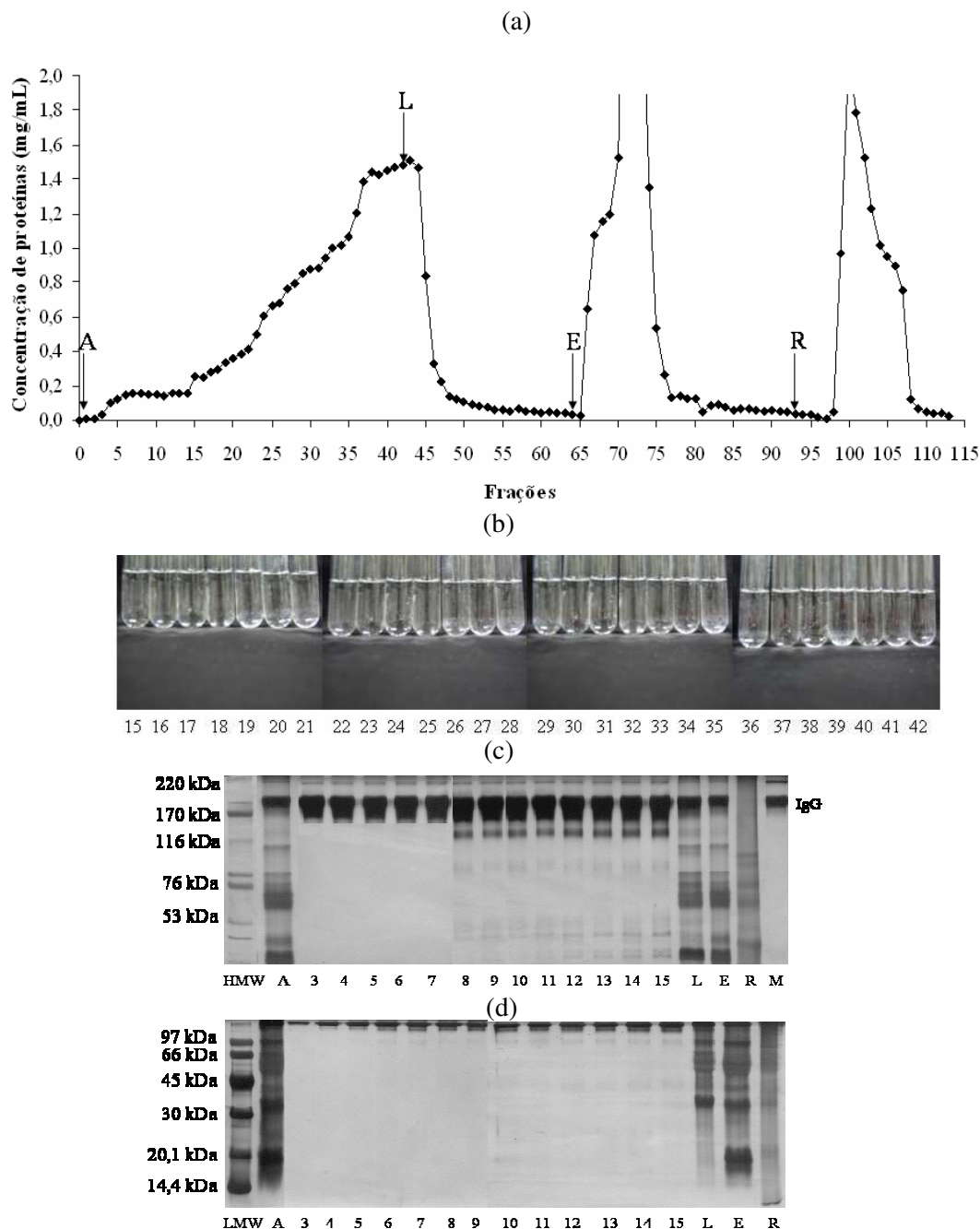


Figura 4-16. (a) Perfil cromatográfico de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 82,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 820  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. (b) Fotografia das frações 15 a 42 “flowthrough”. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (c) gel a 7,5%; (d) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 15) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 43 a 45 da lavagem; (E) “pool” das frações 67 a 74 da eluição e (R) “pool” das frações 100 a 102 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-6. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia negativa em Sepharose-TREN realizada com extrato de soja com “spiking” de IgG humana em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	103,62	100,0	40,75	100,0	39,3	1,00
“Flowthrough” (frações 3 - 7)	1,14	1,1	1,39	3,4	121,9	3,10
“Flowthrough” (frações 8 - 15)	45,27	43,7	20,81	51,1	45,9	1,17
Lavagem	14,00	13,5	1,57	3,8	11,2	0,28
Eluição	38,00	36,7	15,65	38,4	41,2	1,05
Regeneração	23,56	22,7	-	-	-	-
Recuperação	121,97	117,7	39,41	96,7	-	-
Proteínas adsorvidas	61,56	59,4	15,65	38,4	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com a fotografia apresentada na Figura 4-16-b, pode-se observar que não ocorreu precipitação durante a cromatografia realizada com alimentação na concentração de 1,26 mg/mL (40% de extrato/60% de tampão), onde 0,5 mg/mL correspondia a IgG. Pode-se observar ainda na Figura 4-16 (c e d) que, eletroforéticamente, houve a purificação de IgG nas frações 3 a 7 “flowthrough”, fato este, confirmado através da análise nefelométrica, (Tabela 4-6), que indica alto grau de pureza de IgG destas frações.

A pureza obtida com valor maior a 100% para IgG na etapa “flowthrough” pode ser explicada pelas diferenças nos métodos de quantificação de proteínas, pois para quantificar proteínas totais utilizou-se o método de BRADFORD (1976), que subestima a concentração de IgG nestas frações, uma vez que elas estão com grau de pureza elevado. O método de Bradford apresenta grande variação de resposta, dependendo da proteína dosada (HAMMOND e KRUGER, 1988). O método nefelométrico utilizado para a quantificação de IgG, é altamente específico, pois as interações ocorridas para a quantificação de

proteínas são do tipo antígeno-anticorpo, assim, tem-se a quantidade de IgG real na amostra.

Uma vez determinadas as condições experimentais que evita precipitação (40% de extrato de soja/60% de tampão) favorecendo maior capacidade de adsorção das proteínas nativas de soja (vazão de 0,5 mL/min), realizou-se uma cromatografia com 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL) em um leito de 5,0 mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4-17 e na Tabela 4-7.

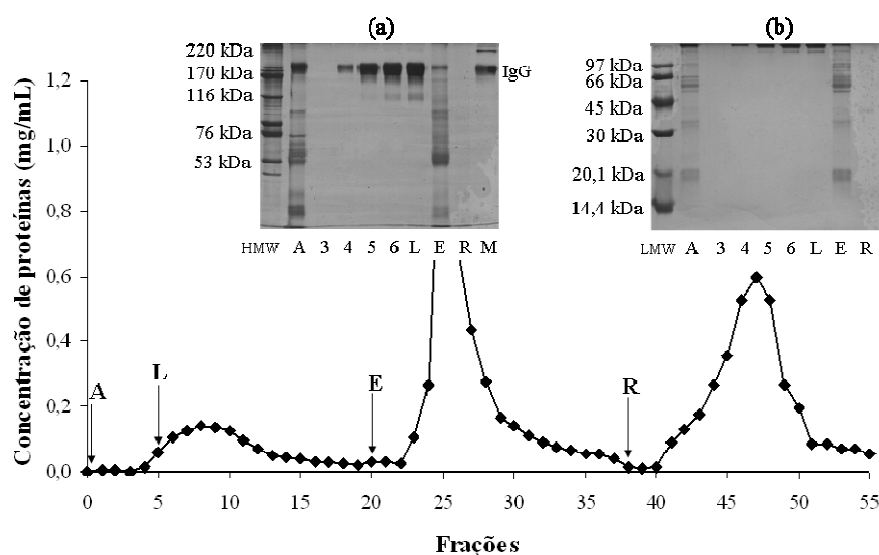


Figura 4-17. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25mM, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 7 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 25 a 27 da eluição e (R) “pool” das frações 46 a 48 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-7. Balanços de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia negativa em Sepharose-TREN realizada com alimentação de 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de IgG humana em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	15,12	100,0	4,78	100,0	31,6	1,00
“Flowthrough”	0,36	2,4	0,34	7,1	94,4	2,99
Lavagem	1,31	8,7	1,37	28,7	104,6	3,31
Eluição	5,01	33,1	2,19	45,8	43,7	1,38
Regeneração	7,67	50,7	-	-	-	-
Recuperação	14,35	94,9	3,90	81,6	-	-
Proteínas adsorvidas	12,68	83,8	2,19	45,8	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

Confirmando experimentos anteriores nestas condições, porém em menor leito (2,0 mL), os resultados mostram que é possível utilizar esta condição para purificação de IgG humana na forma de “spiking” em extrato de soja por cromatografia negativa, atingindo-se elevado teor de pureza.

Como a IgG humana possui uma faixa ampla de pI (de 5,8 a 9,0), observa-se, pelo balanço de massa, que 35,8% da IgG existente na amostra inicial foi detectada nas frações não retidas (etapas “flowthrough” e lavagem), enquanto que 45,8% foi adsorvida (sendo encontrada na fração retida). Resultado similar a este foi observado por BRESOLIN *et al.* (2009a) trabalho no qual foi detectada a presença de moléculas de IgG com pI entre 5,8 e 7,3 nas frações retidas e IgG com pI de 6,3 a 9,0 nas frações não-retidas, quando os autores utilizaram soro humano diluído como alimentação. Cerca de 75% da IgG alimentada foi obtida nas frações não-retidas quando um leito de 3,0 mL de Sepharose-TREN foi utilizado pelos autores.

Os resultados aqui apresentados corroboram os resultados de BRESOLIN *et al.* (2009), indicando que, ao se utilizar uma proteína de ampla faixa de pI, como é o caso da IgG, na condição tamponante estudada (MES 25 mmol/L, pH 6,5), o TREN interage com proteínas carregadas negativamente através de interações eletrostáticas. Para se comprovar

esta hipótese, realizaram experimentos adicionando-se artificialmente (“spiking”) proteínas que apresentam valores de pI pontuais, sejam ácidos (HSA e BSA) ou alcalinos (lisozima e aprotinina).

#### **4.2.4. Efeito da presença de proteínas de baixo valor de pI no extrato de soja: “Spiking” de HSA e BSA**

Mediante os resultados obtidos com “spiking” de uma proteína de ampla faixa de pI (IgG humana) em extrato de soja, avaliou-se o perfil de adsorção de proteínas de baixo valor de pI em Sepharose-TREN, realizando dois experimentos cromatográficos com a alimentação de 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de BSA a 50 mg/mL, (concentração de BSA no extrato de 0,5 mg/mL) e 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de HSA a 50 mg/mL (concentração de HSA no extrato de 0,5 mg/mL).

Ambas proteínas possuem pI ácidos, sendo 4,8 e 4,4 para BSA e HSA, respectivamente. Uma vez que se acredita que a interação envolvida seja de natureza eletrostática ou iônica, espera-se que estas sejam adsorvidas no valor de pH trabalhado (MES 25 mmol/L pH 6,5). Nesta condição, a matriz encontra-se carregada positivamente e as proteínas da soja e as proteínas alvo (possuem pI abaixo do pH trabalhado) encontram-se carregadas negativamente. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figura 4-18 e 4-19 e Tabela 4-8 e 4-9.

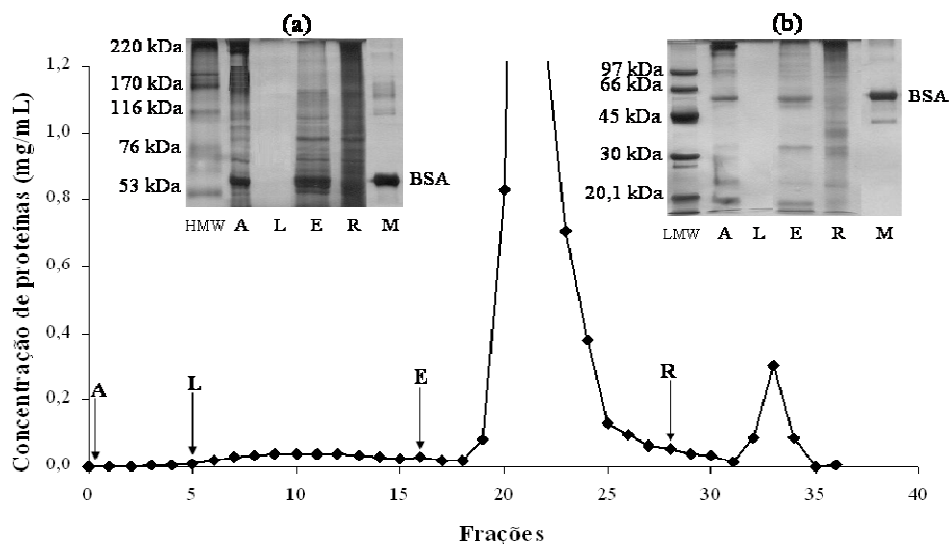


Figura 4-18. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de albumina de soro bovino (BSA) em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de BSA (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de BSA de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 9 a 12 da lavagem; (E) “pool” das frações 20 a 24 da eluição e (R) fração 33 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de BSA; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-8. Balanço de massa de proteínas totais da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com “spiking” de BSA em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	15,70	100,0
“Flowthrough”	0,09	0,6
Lavagem	0,60	3,8
Eluição	14,39	91,7
Regeneração	1,36	8,7
Recuperação	16,44	104,7
Proteínas totais adsorvidas	15,75	100,3

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

Volume do leito: 5,0 mL.



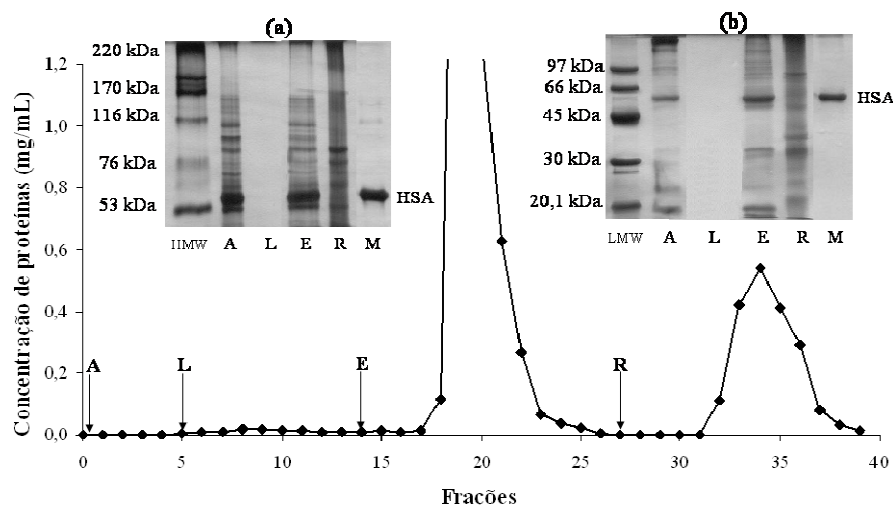


Figura 4-19. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de albumina de soro humano (HSA) em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de HSA (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de HSA de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 8 e 9 da lavagem; (E) “pool” das frações 19 a 22 da eluição e (R) “pool” das frações 33 a 35 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de HSA; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-9. Balanço de massa de proteínas totais e de albumina da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com “spiking” de HSA em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	HSA <sup>c</sup> (mg)	HSA <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	15,32	100,0	4,00	100,0	26,1	1,00
“Flowthrough”	0,03	0,2	0,04	1,0	133,3	5,11
Lavagem	0,18	1,2	0,04	1,0	22,2	0,85
Eluição	11,47	74,9	3,92	98,0	34,2	1,31
Regeneração	4,08	26,6	-	-	-	-
Recuperação	15,77	10,3	4,00	100,0	-	-
Proteínas adsorvidas	15,56	100,1	3,92	98,0	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> HSA: Massa de albumina de soro humano determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de albumina em cada etapa dividida pela massa de albumina alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de albumina dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com os resultados qualitativos das eletroforeses das Figuras 4-18 e 4-19, toda albumina alimentada em ambas cromatografias permaneceu adsorvida na matriz Sepharose-TREN. Dados de nefelometria para a determinação da HSA (Tabela 4-9) indicam que 98% da HSA alimentada permaneceu adsorvida.

Como a HSA é a maior constituinte do soro humano (representa entre 60 a 75% das proteínas totais, segundo ANDRADE e HLADY, 1987), BEAUCHEMIN e colaboradores (2007), utilizando análises espectroscópicas (infravermelho com transformada de Fourier – FT-IR, UV-visível e dicroísmo circular), determinaram a forma de ligação e os efeitos da complexação de três diferentes poliaminas em solução (espermina, espermidina e putrescina) na estabilidade e na estrutura secundária de HSA. Por meio de análises estruturais, os mesmos autores concluíram que a ligação existente entre as poliaminas e a HSA é de caráter não-específica (do tipo ligação de hidrogênio) via grupos polares dos polipeptídeos apresentando constantes de associação da ordem de  $10^2$  a  $10^3$  (mol/L)<sup>-1</sup>.

#### **4.2.5. Efeito da presença de proteínas de alto valor de pI no extrato de soja**

Visando complementar os resultados obtidos com “spiking” de uma proteína de ampla faixa de pI (IgG humana) e de proteínas de baixo valor de pI (HSA e BSA) em extrato de soja, avaliou-se o perfil de adsorção de proteínas de alto valor de pI em Sepharose-TREN, como é caso da aprotinina e da lisozima.

##### **4.2.5.1. “Spiking” com aprotinina**

Na condição tamponante utilizada (MES 25 mmol/L pH 6,5), tanto a matriz como a aprotinina se encontram carregadas positivamente, indicando, provavelmente, que a aprotinina não seja adsorvida. Realizou-se cromatografia com 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 1000 µL de aprotinina (5,0 mg/mL), perfazendo uma concentração de aprotinina de 0,5 mg/mL. Utilizou-se aprotinina comercial, que possui pI de 10,5, cujo resultado obtido está apresentado na Figura 4-20 e Tabela 4-10.

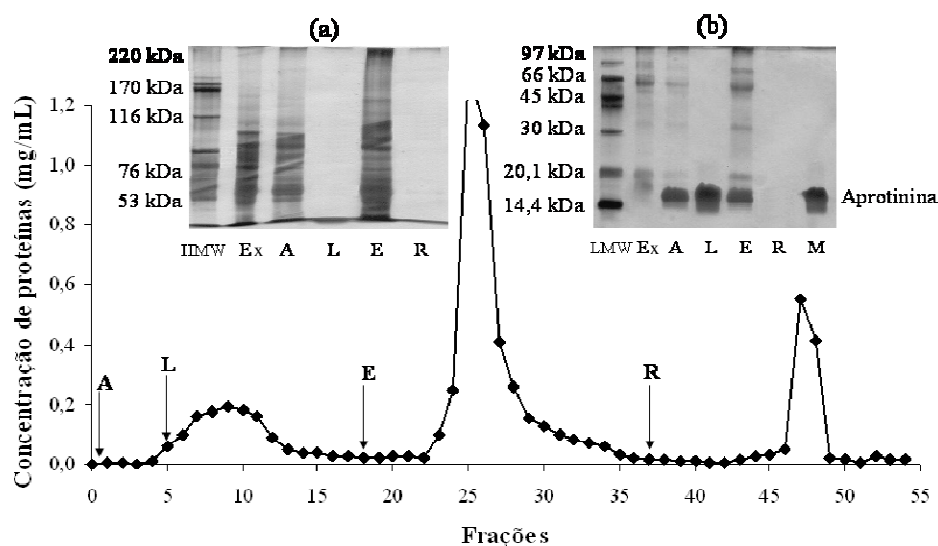


Figura 4-20. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de aprotinina em Sepharose-TREN, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 1000  $\mu$ L de aprotinina (5,0 mg/mL), perfazendo uma concentração de aprotinina de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 15%. Faixas: (Ex) extrato puro; (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 7 a 11 da lavagem; (E) “pool” das frações 24 a 28 da eluição e (R) “pool” das frações 47 e 48 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular; (M) marcador de aprotinina.

Tabela 4-10. Balanço de massa de proteínas totais da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com “spiking” de aprotinina em MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	14,74	100,0
“Flowthrough”	0,35	2,4
Lavagem	2,29	15,5
Eluição	8,45	57,3
Regeneração	2,58	17,5
Recuperação	13,67	92,7
Proteínas totais adsorvidas	11,03	74,8

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com os resultados apresentados na eletroforese da Figura 4-20b, pode-se observar que recuperou-se aprotinina (adicionada artificialmente no extrato de soja) com pureza eletroforicamente similar a aprotinina comercial (marcador de aprotinina, faixa M). Entretanto, observa-se banda de massa molecular equivalente a aprotinina na etapa de eluição, indicando que, possivelmente, parte da aprotinina alimentada foi adsorvida.

Realizou-se uma cromatografia nas mesmas condições, porém com alimentação de 10,0 mL de solução de aprotinina comercial em MES 25 mmol/L, pH 6,5 na concentração de 0,5 mg/mL (sem extrato de soja) para se confirmar a existência de aprotinina na etapa de eluição. Os resultados estão apresentados na Figura 4-22 e Tabela 4-11.

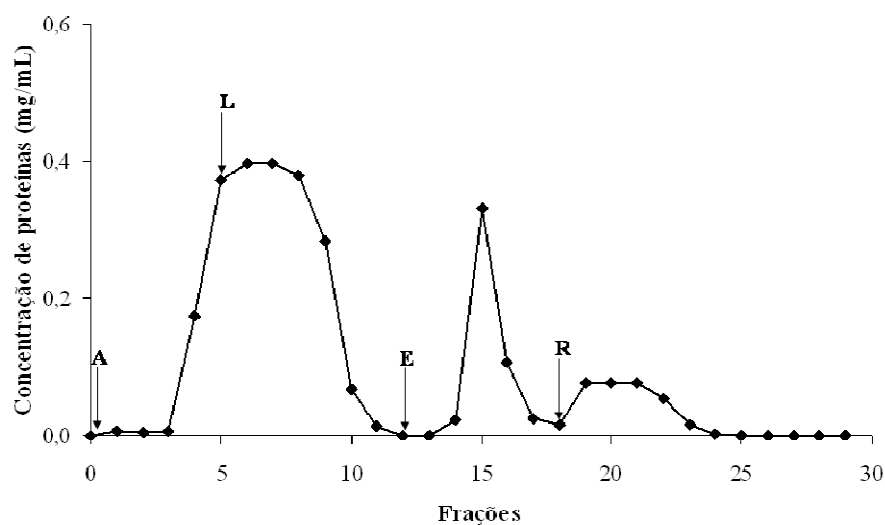


Figura 4-21. Perfil cromatográfico de adsorção de aprotinina em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de solução de aprotinina 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L.

Tabela 4-11. Balanço de massa da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com aprotinina pura em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	5,00	100,0
“Flowthrough”	1,93	38,6
Lavagem	2,26	45,2
Eluição	1,00	20,0
Regeneração	0,64	12,8
Recuperação	5,83	116,6
Proteínas totais adsorvidas	1,64	32,8

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio de absorbância a 226 nm.

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.  
Volume do leito: 5,0 mL.

Como observado no cromatograma da Figura 4-21, houve um pico na etapa de eluição, confirmando assim que parte da aprotinina permaneceu adsorvida na matriz Sepharose-TREN. De acordo com o balanço de massa da Tabela 4-11, 20% da aprotinina alimentada no processo foi detectada na etapa de eluição. Esperava-se que toda a aprotinina fosse detectada na lavagem, acreditando-se que as interações entre a proteína e o adsorvente fossem de natureza eletrostática.

Visando esclarecer se ocorreu algum tipo de saturação da coluna devido a adsorção de parte da aprotinina em Sepharose-TREN, as frações 3 a 10 do experimento da Figura 4-21 foram agrupadas e concentradas em Centricon YM-3 (membrana de celulose regenerada com massa molecular de corte de 3 kDa, Millipore, EUA) até a concentração de 0,5 mg/mL. Esta nova solução foi realimentada na coluna de Sepharose-TREN por meio de um novo experimento cromatográfico, cujos resultados estão apresentados na Figura 4-22 e o balanço de massa na Tabela 4-12.

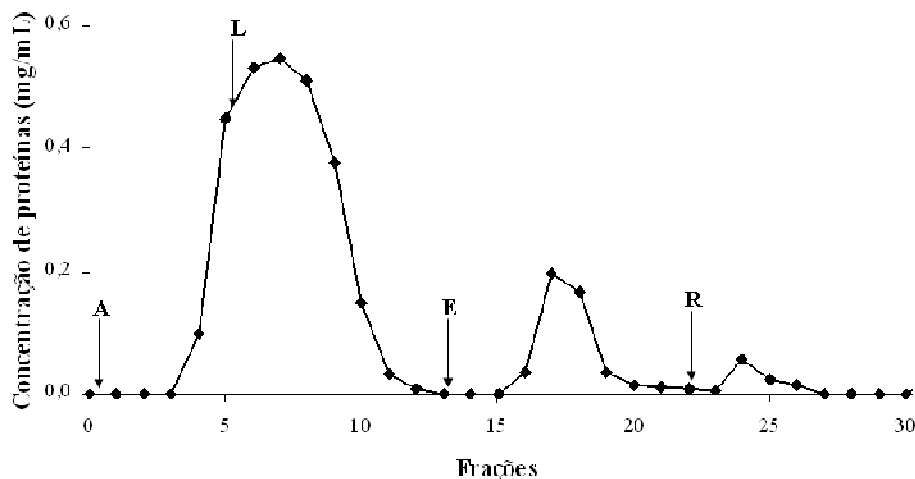


Figura 4-22. Perfil cromatográfico de adsorção de aprotinina em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de solução de aprotinina 0,5 mg/mL proveniente da etapa de lavagem da purificação de aprotinina após previa concentração das proteínas em Centricon; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L.

Tabela 4-12. Balanço de massa da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com aprotinina pura reprocessada em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	5,64	100,0
“Flowthrough”	2,16	38,3
Lavagem	3,25	57,6
Eluição	0,92	16,3
Regeneração	0,33	5,8
Recuperação	6,66	118,1
Proteínas totais adsorvidas	1,25	22,1

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio de absorbância a 226 nm.

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.  
Volume do leito: 5,0 mL.

O perfil cromatográfico para o experimento realizado com aprotinina recromatografada se mostrou muito semelhante ao realizado com aprotinina comercial (Figura 4-21). De acordo com o balanço de massa da Tabela 4-12, 16,3% da aprotinina alimentada permaneceu adsorvida mesmo após previa purificação (reprocessamento). As interações predominantes entre o adsorvente e a proteína são de natureza eletrostática, pois

a maior parte da aprotinina foi detectada na etapa de lavagem. A matriz, com ponto de carga nula em torno de 10,5, encontrava-se carregada positivamente na condição de trabalho (MES 25 mmol/L pH 6,5) e a aprotinina também carregada positivamente (pI 10,5). Provavelmente outros tipos de interações estejam envolvidas na adsorção de proteínas em Sepharose-TREN pelo fato de parte da aprotinina ter permanecido adsorvida na matriz, mesmo após o reprocessamento da aprotinina, já previamente purificada por cromatografia negativa.

Com o intuito de verificar o motivo da adsorção de parte da aprotinina em Sepharose-TREN, realizaram-se análises de espectrometria de massas (Apêndice B) com amostras da alimentação e dos picos de lavagem (“pool” das frações) e eluição (“pool” das frações) da cromatografia. Nas amostras de alimentação e do pico de lavagem foram detectadas moléculas apresentando massa molecular próxima à da aprotinina, enquanto que na amostra do pico de eluição constatou-se a presença de um peptídeo (Arg – Pro – Asp – Phe – Cys) oriundo, provavelmente, da hidrólise ácida da aprotinina pelo N-terminal.

As poliaminas são moléculas essenciais de natureza policatiônica presentes tanto em seres eucariontes como em procariontes (WANG *et al.*, 2003). Ao se considerar que o ligante TREN é uma poliamina ramificada, e que poliaminas possuem afinidade por peptídeos ácidos (LEROY *et al.*, 1997), pode ter ocorrido uma interação de afinidade entre o peptídeo Arg – Pro – Asp – Phe – Cys e o TREN, que ocasionou uma mudança conformacional na aprotinina e, conseqüentemente, sua hidrólise ácida.

#### 4.2.5.2. “Spiking” com lisozima

Outra proteína de alto valor de pI utilizada neste trabalho foi a lisozima (pI de 11,3). Visando avaliar se as interações que predominam entre o adsorvente Sepharose-TREN e proteínas de alto pI são de natureza eletrostática, procedeu-se a adição artificial (“spiking”) de 100 µL de lisozima (50 mg/mL) em 10,0 mL de extrato de soja. Ao se realizar o “spiking” observou-se precipitação no extrato. Esta precipitação pode ter ocorrido devido a presença de interações hidrofóbicas. CHEN *et al.*, (2007) relataram que moléculas de sais presentes em soluções contendo lisozima contribuem para a ocorrência de interação hidrofóbica, diminuindo a atração eletrostática entre a lisozima e resinas de troca catiônica.

Em nosso caso, entretanto, pode ter ocorrido interação hidrofóbica entre as proteínas da soja e a lisozima ocasionando a precipitação.

Uma vez que não foi possível realizar o experimento com o “spiking” de lisozima em extrato de soja, alimentou-se em Sepharose-TREN 10,0 mL de uma solução de lisozima comercial (0,5 mg/mL) em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Os resultados estão apresentados na Figura 4-23, enquanto na Tabela 4-13 está apresentado o balanço de massa e o balanço de atividade.

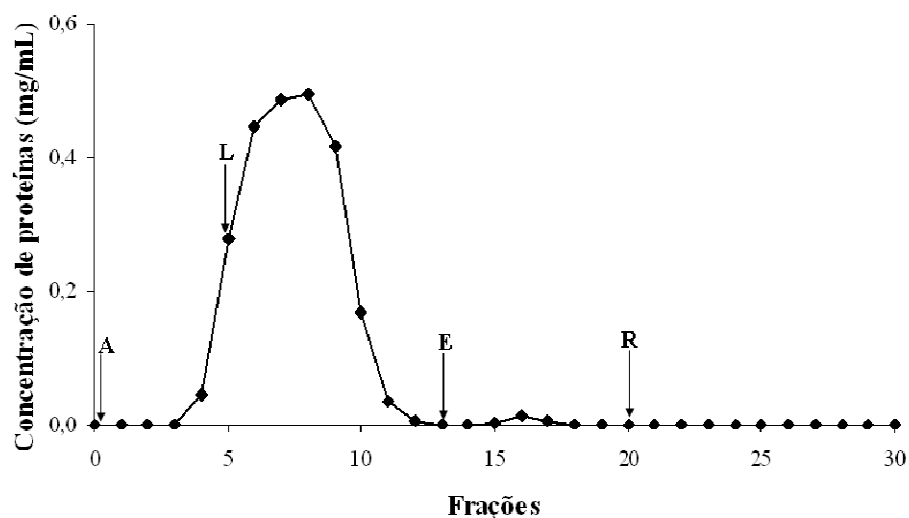


Figura 4-23. Perfil cromatográfico de adsorção de lisozima em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de solução de lisozima 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L.



Tabela 4-13. Balanço de massa e de atividade da cromatografia em Sepharose-TREN realizadas com lisozima pura em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	Vol. <sup>c</sup> (mL)	AT <sup>d</sup> (U/mL)	AT <sup>e</sup> (U)	AT <sup>f</sup> (%)
Amostra inicial	5,04	100,0	10,0	10711,1	107111	100,0
“Flowthrough”	1,54	30,6	4,0	7473,7	29895	27,9
Lavagem	3,13	62,1	10,0	7000,0	70000	65,3
Eluição	0,12	2,4	2,0	411,0	822	0,8
Regeneração	0,00	0,0	-	-	-	-
Recuperação	4,79	95,1	-	-	100717	94,0
Proteínas adsorvidas	0,12	2,4	-	-	822	0,8

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio de absorbância a 280 nm.

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Volume utilizado de cada etapa para medida de atividade.

<sup>d</sup> Atividade da lisozima por mL de solução de cada etapa (método de Shugar, 1952).

<sup>e</sup> Atividade da lisozima: atividade/mL x volume de cada etapa.

<sup>f</sup> Atividade da lisozima em cada etapa dividida pela atividade da lisozima alimentada no processo x 100.  
Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com dados da Tabela 4-13, houve a recuperação de 93,2% da atividade total da lisozima nas frações não retidas (“flowthrough” e lavagem), correspondendo a 92,7% de proteína total. Este resultado indica que, de fato, ocorreu uma predominância de interações eletrostáticas entre o ligante TREN e a lisozima devido a seu alto pI.

Após a purificação de proteínas adicionadas artificialmente em extrato de soja com a matriz Sepharose-TREN que é uma poliamina que funciona como troca iônica, realizaram-se experimentos para comparação em Sepharose-TREN-Cu(II) e Sepharose-TREN-Ni(II), uma vez que o TREN é um agente quelante em IMAC. O capítulo 4.3 apresenta os resultados referentes às cromatografias em IMAC utilizando IgG humana adicionada artificialmente ao extrato de soja.

### **4.3. AGENTE QUELANTE TREN EM IMAC: EFEITO DOS QUELATOS TREN-Ni(II) E TREN-Cu(II) NA PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA ADICIONADA (“SPIKING”) EM EXTRATO DE SOJA**

O efeito de ligações de coordenação formadas entre íons metálicos cobre e níquel imobilizados e proteínas foi avaliado na purificação de IgG humana (“spiking”) a partir de extrato de proteínas da soja. A IgG foi a proteína escolhida para os experimentos de IMAC por ser a mais complexa entre todas as proteínas estudadas neste trabalho, além dos vários trabalhos relativos a sua purificação por IMAC encontrados na literatura (HALE e BEIDLER, 1994; BODEN *et al.*, 1995; YOSHIDA *et al.*, 2001; VANÇAN *et al.*, 2002; TISHCHENKO *et al.*, 2002; TODOROVA-BALVAY *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008b). A complexidade da proteína diz respeito ao seu tamanho, a faixa de amplo pI e disponibilidade de resíduos de histina acessíveis para a ligação de coordenação. Quanto às outras proteínas que não foram testadas em IMAC, espera-se que a aprotinina, que não possui histidina, não seja adsorvida em nenhuma das condições estudadas, o que favoreceria um IMAC negativo (AZZONI *et al.*, 2002). A lisozima possui apenas um resíduo de histidina, o que permite sua adsorção em Cu(II) imobilizado (CHEN *et al.*, 1997). Por sua vez, a BSA e HSA seriam adsorvidas tanto em íons Cu(II) quanto em Ni(II), uma vez que ambas possuem 16 resíduos de histidinas (VANÇAN *et al.*, 2002, SERPA *et al.*, 2005; BRESOLIN, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2008b).

#### **4.3.1. Sepharose-TREN-Cu(II)**

O íon metálico cobre foi quelatado ao agente quelante TREN por apresentar elevada capacidade de adsorção de proteínas em IMAC, pois, segundo SULKOWSKI (1989), a presença de, pelo menos, um resíduo de histidina disponível para a coordenação é suficiente para a retenção de proteínas em géis contendo o íon metálico cobre imobilizado. Realizaram-se três experimentos com a alimentação de 10,0 mL de extrato de soja contendo “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), utilizando os tampões de adsorção Mops-Acetato (MA) 25 mmol/L pH 7,0 contendo 1,0 mol/L NaCl, MES 25 mmol/L pH 6,5 contendo 2 mmol/L de imidazol e MES 25 mmol/L pH 6,5.

O tampão MA com a eluição por gradiente descontínuo de pH para 4,0 foi utilizado por ter sido reportado por RIBEIRO (2006) como a melhor condição para purificação de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II) e em membranas de PEVA (álcool polietileno vinílico)-TREN-Cu(II). Na Figura 4-24 e na Tabela 4-14 estão apresentados os resultados da cromatografia com o tampão MA, a eletroforese e o balanço de massa.

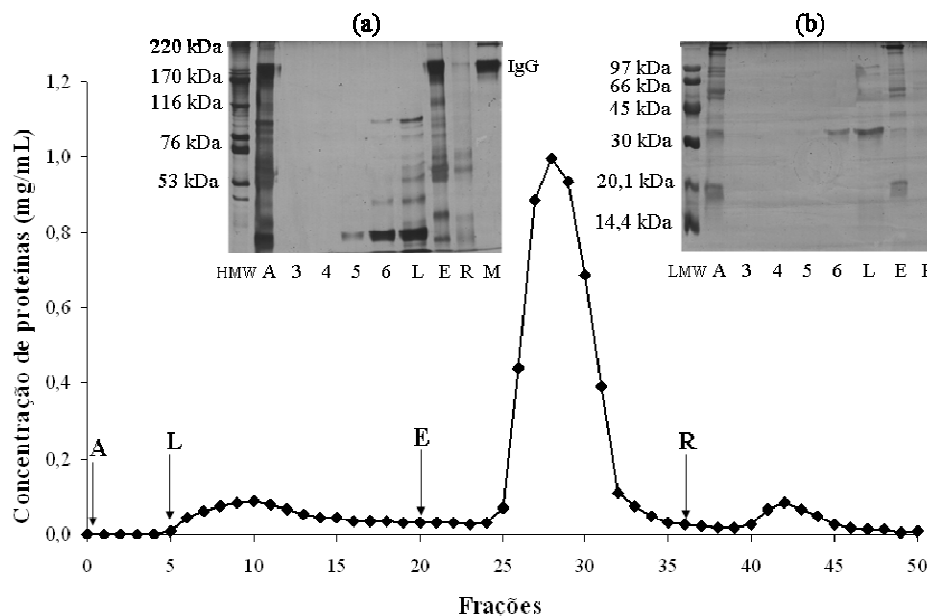


Figura 4-24. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com "spiking" de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II) em MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com "spiking" de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; Lavagem: MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0; (E) eluição: MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 4,0; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações "flowthrough"; (L) "pool" das frações 8 a 11 da lavagem; (E) "pool" das frações 27 a 30 da eluição e (R) "pool" das frações 41 a 43 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-14. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Cu(II) realizadas em MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 7,0 e dessorção por abaixamento de pH (MA 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, pH 4,0).

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	13,05	100,0	5,00	100,0	38,3	1,00
“Flowthrough”	0,02	0,1	n.d.	-	-	-
Lavagem	1,55	11,9	n.d.	-	-	-
Eluição	9,58	73,4	4,20	84,0	43,8	1,15
Regeneração	0,99	7,6	-	-	-	-
Recuperação	12,14	93,0	4,20	84,0	-	-
Proteínas totais adsorvidas	10,57	81,0	4,20	84,0	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

n.d.: abaixo do limite de detecção do aparelho (0,0093 mg/mL de IgG).

Volume do leito: 5,0 mL.

Os resultados apresentados na Tabela 4-14 e na Figura 4-24 mostram que a Sepharose-TREN-Cu(II) adsorveu a totalidade de IgG presente no “spiking”. Entretanto, esta condição tamponante não apresentou seletividade para a purificação de IgG, visto que algumas proteínas da soja também foram adsorvidas (Figura 4-24).

Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por RIBEIRO (2006), que utilizando o mesmo sistema tamponante para a purificação de IgG a partir do plasma humano, observou alta capacidade de adsorção de IgG do adsorvente PEVA-TREN-Cu(II). No entanto, a alta capacidade de adsorção foi associada à baixa seletividade (foi detectada a presença de albumina nas frações eluídas).

Outro sistema tamponante avaliado para purificação de IgG foi o tampão MES 25 mmol/L, pH 6,5, por ser apresentada como sendo a condição que proporcionou maior seletividade na purificação de IgG em “spiking” de extrato de soja por Sepharose-TREN (conforme resultados apresentados na Figura 4-17 e na Tabela 4-7). Entretanto, para tornar esta condição experimental mais próxima às condições clássicas de IMAC (GUTIERREZ *et al.*, 2007; BRESOLIN *et al.* 2009b), acrescentou-se 2 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção, e a eluição foi realizada com o agente competidor imidazol a 300 mmol/L,

mantendo-se o pH em 6,5. O imidazol é agente competitivo, proporcionando, dependendo da concentração no meio, a dessorção das proteínas complexadas, evitando condições de baixo pH na eluição (WONG *et al.*, 1991). Os resultados encontram-se na Figura 4-25 e Tabela 4-15.

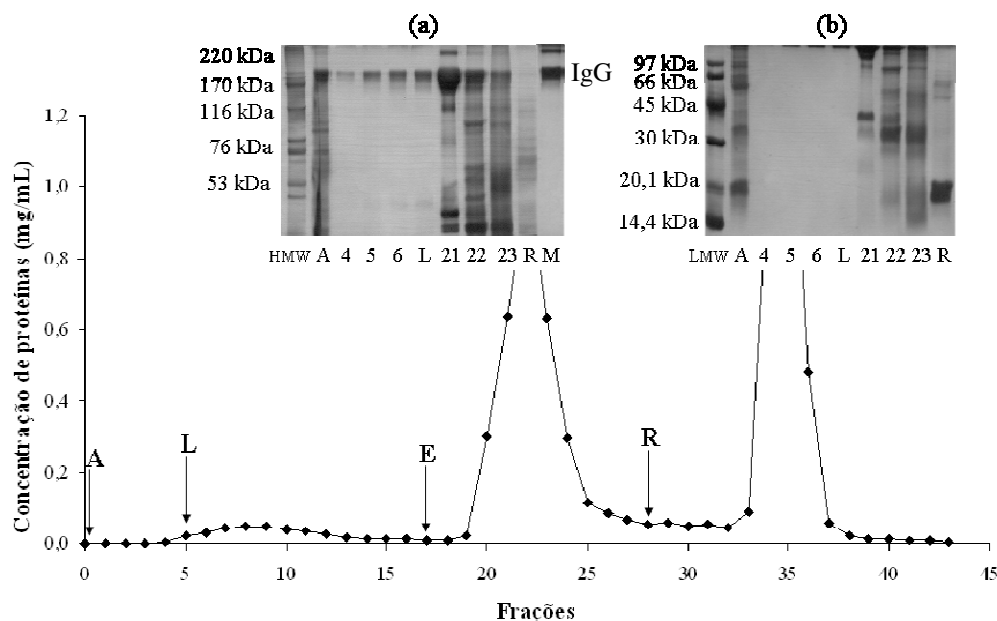


Figura 4-25. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; Lavagem: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (4 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 8 a 10 da lavagem; (21 a 23) frações da eluição e (R) “pool” das frações 34 a 36 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-15. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Cu(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	16,26	100,0	4,81	100,0	29,6	1,00
“Flowthrough”	0,12	0,7	0,10	2,0	83,3	2,81
Lavagem	0,59	3,6	0,37	7,7	62,7	2,12
Eluição	6,39	39,3	3,83	79,6	59,9	2,03
Regeneração	6,98	42,9	-	-	-	-
Recuperação	14,08	86,6	4,30	89,3	-	-
Proteínas adsorvidas	13,37	82,2	3,83	79,6	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

Observa-se que foi possível a purificação de IgG do “spiking” de extrato de soja por cromatografia de afinidade IMAC negativa. Porém, de acordo com a Tabela 4-15, pequena quantidade da IgG inicialmente alimentada na coluna foi purificada (9,7%) e a pureza obtida das frações “flowthrough” e lavagem foram de 83,3 e 62,7%, respectivamente. Este fato também pode ser visualizado na eletroforese da Figura 4-25a, na qual se observa traços (bandas leves) de proteínas nas etapas “flowthrough” e lavagem de massa molecular em torno de 45 kDa.

Para realizar uma análise comparativa e avaliar a influência da presença do imidazol no tampão de adsorção, realizou-se um experimento sem a presença do imidazol no tampão de equilíbrio (MES 25 mmol/L, pH 6,5), mantendo, contudo, a eluição com gradiente descontínuo de imidazol (Figura 4-26 e Tabela 4-16).

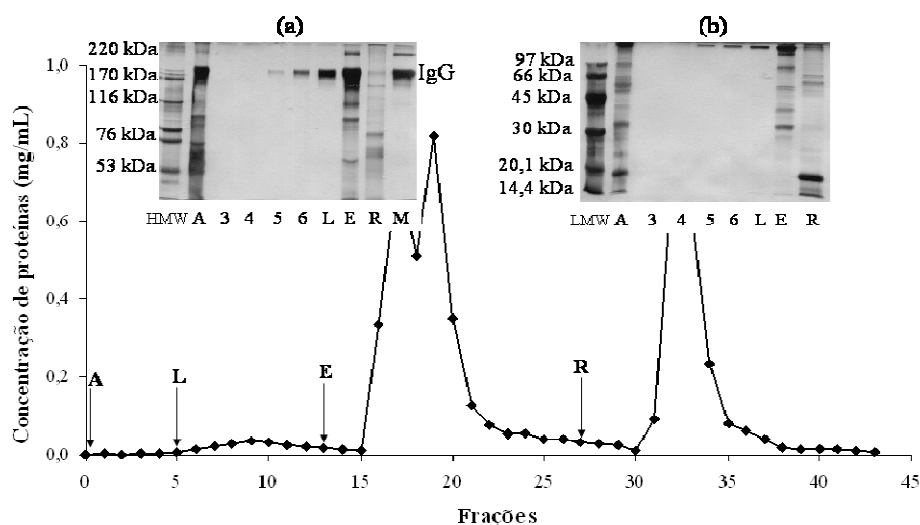


Figura 4-26. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Cu(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 9 e 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 16 a 20 da eluição e (R) “pool” das frações 32 a 34 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-16. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Cu(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	13,20	100,0	4,60	100,0	34,8	1,00
“Flowthrough”	0,07	0,5	0,04	0,9	57,1	1,64
Lavagem	0,33	2,5	0,12	2,6	36,4	1,04
Eluição	6,19	46,9	3,80	82,6	61,4	1,76
Regeneração	4,30	32,6	-	-	-	-
Recuperação	10,89	82,5	3,96	86,1	-	-
Proteínas adsorvidas	10,49	79,5	3,80	82,6	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4-26 e Tabela 4-16, a ausência do imidazol no tampão de adsorção não influenciou o processo de adsorção de proteínas em Sepharose-TREN-Cu(II), uma vez que apenas 3,5% das proteínas alimentadas não foram adsorvidas enquanto que 4,3% das proteínas não foram adsorvidas quando o imidazol fazia parte da constituição do tampão de adsorção.

#### **4.3.2. Sepharose-TREN-Ni(II)**

O íon metálico níquel foi quelatado ao agente quelante TREN por apresentar, de modo geral, maior seletividade na adsorção de proteínas em IMAC. Segundo SULKOWSKI (1989), a presença de dois resíduos de histidina disponíveis para a coordenação é requerida para a retenção de proteínas em géis contendo o íon metálico níquel imobilizado. As condições utilizadas para realização da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) foram similares às aquelas utilizadas na cromatografia negativa em Sepharose-TREN, com alimentação de 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL) em MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; MES 25 mmol/L, pH 6,5 e MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Incluiu-se NaCl nos tampões de adsorção e eluição visando a predominância de formação de ligações de coordenação, minimizando a ocorrência de interações eletrostáticas (PORATH, 1975). A etapa de eluição foi feita acrescentando-se um agente competidor (300 mmol/L de imidazol), nas três cromatografias. Nas Figuras 4-27 a 4-29 e Tabelas 4-17 a 4-19 encontram-se os resultados destes experimentos.



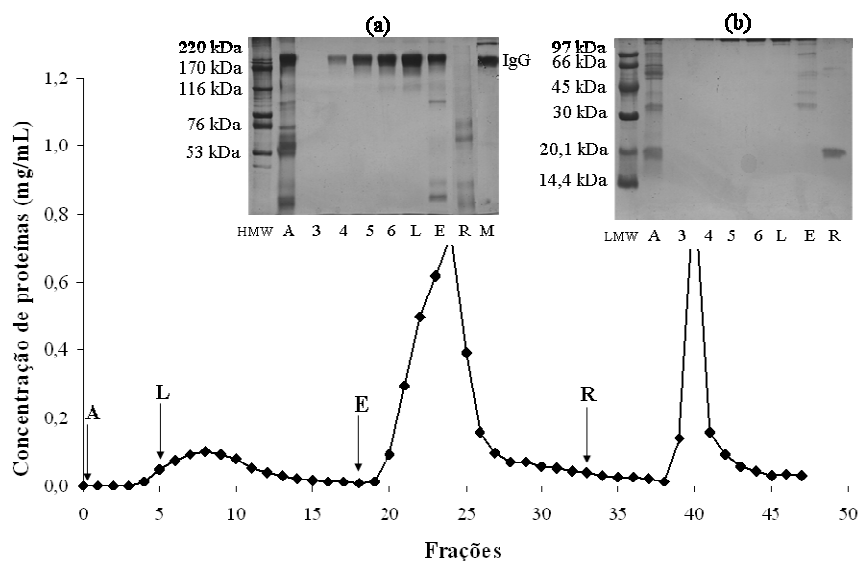


Figura 4-27. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Ni(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; Lavagem: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 7 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 22 a 25 da eluição e (R) “pool” das frações 39 a 41 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-17. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	13,59	100,0	5,00	100,0	36,8	1,00
“Flowthrough”	0,27	2,0	0,30	6,1	111,1	3,02
Lavagem	1,11	8,2	1,02	20,5	91,9	2,50
Eluição	6,40	47,1	2,84	56,8	44,4	1,21
Regeneração	3,24	23,8	-	-	-	-
Recuperação	11,02	81,1	4,16	83,4	-	-
Proteínas totais adsorvidas	9,64	70,9	2,84	56,8	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

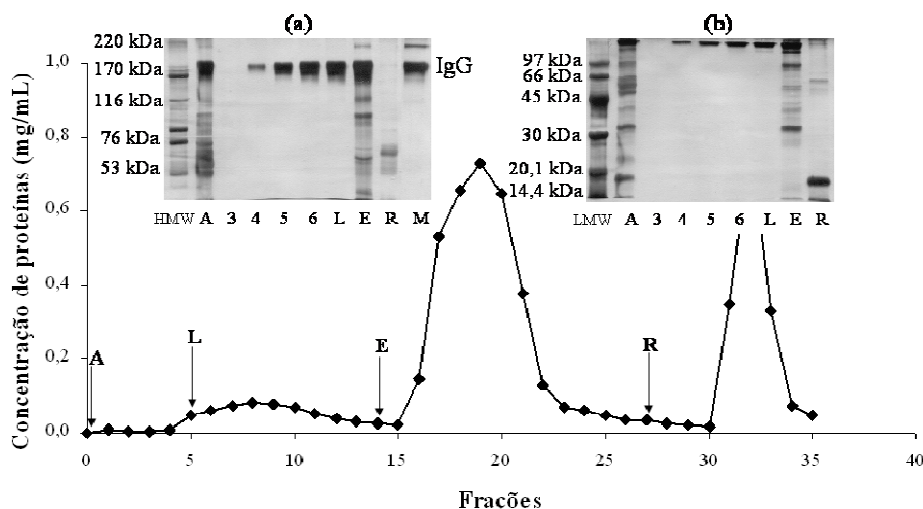


Figura 4-28. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Ni(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 8 e 9 da lavagem; (E) “pool” das frações 17 a 20 da eluição e (R) “pool” das frações 31 a 32 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-18. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	13,51	100,0	4,80	100,0	35,5	1,00
“Flowthrough”	0,27	2,0	0,28	5,8	103,7	2,92
Lavagem	0,77	5,7	0,84	17,5	109,1	3,07
Eluição	6,84	50,6	3,00	62,5	43,8	1,23
Regeneração	3,53	26,1	-	-	-	-
Recuperação	11,41	84,4	4,12	85,8	-	-
Proteínas adsorvidas	10,37	76,7	3,00	62,5	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

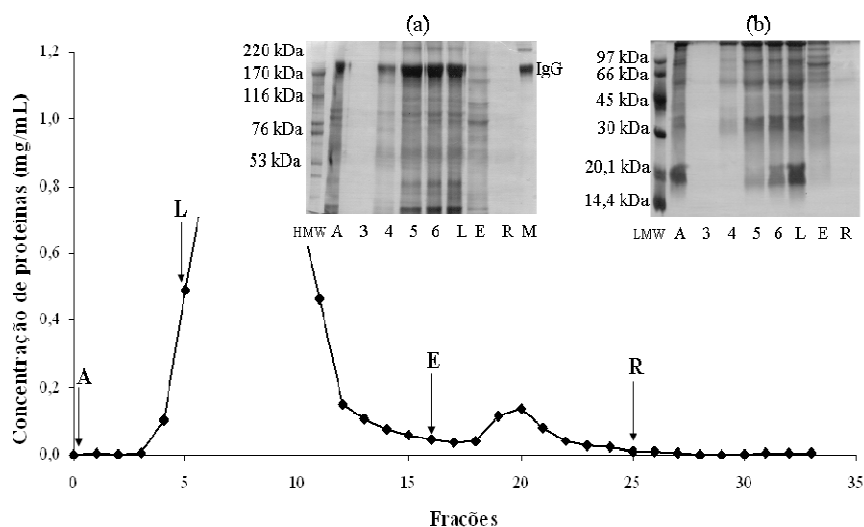


Figura 4-29. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-TREN-Ni(II), a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (3 a 6) frações “flowthrough”; (L) “pool” das frações 7 a 10 da lavagem; (E) “pool” das frações 19 e 20 da eluição e (R) “pool” das frações 26 e 27 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-19. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas em: MES 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, 2 mmol/L imidazol, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	13,11	100,0	5,00	100,0	38,1	1,00
“Flowthrough”	2,94	22,4	1,25	25,0	42,5	1,11
Lavagem	9,80	74,8	3,32	66,4	33,9	0,89
Eluição	1,06	8,1	0,05	0,1	4,7	0,12
Regeneração	0,08	0,6	-	-	-	-
Recuperação	13,88	105,9	4,62	92,5	-	-
Proteínas totais adsorvidas	1,15	8,8	0,05	0,1	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

Como observado na Figura 4-27, em tampão de adsorção na ausência de NaCl alimentando-se a coluna com extrato de soja com “spiking” de IgG humana (0,5 mg/mL), verificou-se que a IgG recuperada nas etapas “flowthrough” e lavagem (26,6% da IgG alimentada) é de elevada pureza. A IgG foi purificada por cromatografia negativa em IMAC, apesar de quase 57% de IgG permanecer adsorvida (sendo recuperada com impurezas do extrato de soja, contudo com fator de purificação de 1,21). Em relação à cromatografia utilizando Sepharose-TREN sem metal, o método de IMAC é mais complexo e demanda mais tempo de operação. Além destes aspectos, dependendo das condições operacionais utilizadas (tampão, pH, vazão, etc) pode ocorrer o desprendimento de metal durante a cromatografia, o que acarreta a inclusão de mais etapas na purificação da proteína de interesse.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 4-28 e Tabela 4-18, a ausência do imidazol no tampão não apresentou grande influência no processo de adsorção de proteínas em Sepharose-TREN-Ni(II), uma vez que 23,3% das proteínas alimentadas não foram adsorvidas, enquanto que 26,6% das proteínas não foram adsorvidas quando o imidazol fazia parte da constituição do tampão de adsorção (Figura 4-27 e Tabela 4-17).

De acordo com os resultados apresentados nas eletroforeses da Figura 4-29, parte das proteínas da soja foi adsorvida, enquanto outras foram detectadas nas frações “flowthrough” e lavagem. Foram detectadas 91,4% da IgG alimentada nas etapas “flowthrough” e lavagem, porém a pureza destas frações foram de apenas 42,5 e 33,9% respectivamente. A adição de NaCl no tampão de adsorção visou a minimização de ligações eletrostáticas, fazendo com que ligações de coordenação prevalecessem. Contudo, a predominância destas ligações de coordenação fez com que essa condição não fosse favorável à purificação de IgG humana de “spiking” em extrato de soja.

O quelato TREN-Ni(II) imobilizado em membranas de PEVA foi utilizado para purificação de anticorpos monoclonais murinos do isotipo IgG<sub>1</sub> por BRESOLIN (2006), em tampão Tris-HCl 50 mmol/L na presença e na ausência de NaCl, a partir de sobrenadante de cultura celular precipitado e dialisado. Em termos de capacidade de adsorção de proteínas totais, o autor mostrou que as capacidades de adsorção de PEVA-TREN-Ni(II) foi de 0,50 mg/g adsorvente em tampão contendo 1 mol/L de NaCl e 3,23 mg/g adsorvente quando utilizou-se o sistema tamponante sem sal. A adição de sal reprimiu principalmente

as interações entre o adsorvente (com carga líquida total positiva) e a albumina (com carga líquida negativa). Em contrapartida, a IgG<sub>1</sub> monoclonal foi adsorvida, pois possui pI entre 7,35 e 8,35 (SERPA, 2002), juntamente com alguns contaminantes, exceto a albumina.

RIBEIRO (2006) apresentou análise similar a de BRESOLIN (2006) visando a purificação de IgG a partir do plasma humano em PEVA-TREN-Ni(II). Segundo a autora, o tampão Tris-HCl, na ausência de sal, favoreceu maior adsorção de IgG na membrana, porém acompanhada de grande quantidade de albumina, demonstrando baixa seletividade para a purificação de IgG. O adsorvente encontra-se com carga geral positiva, enquanto a albumina (pI 4,8) e algumas moléculas de IgG ( $6,3 < pI < 9,0$ ) apresentam carga negativa em pH 7,0. O tampão Tris, na ausência de sal, favoreceu a adsorção de albumina e de IgGs, que se apresentam com carga líquida negativa em pH 7,0 devido às interações eletrostáticas. Quando o tampão Tris foi acrescido de NaCl, o adsorvente PEVA-TREN-Ni(II) apresentou baixa capacidade de adsorção de IgG (8% da IgG adsorvida em tampão sem sal), porém maior seletividade e forte retenção. Neste caso, IgG foi detectada somente nas frações de regeneração, enquanto que albumina não foi detectada nas frações retidas, comprovando que a albumina interage eletrostaticamente com PEVA-TREN-Ni(II) quando em presença do tampão de baixa força iônica Tris-HCl (ausência de NaCl).

#### **4.3.2.1. Pontos isoelétricos das moléculas de IgG retidas e não retidas em Sepharose-TREN-Ni(II)**

Como a IgG humana utilizada neste trabalho é policlonal e apresenta diferentes subclasses com valores de pI distintos, realizou-se eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) para determinação dos pI das moléculas presentes nas frações retidas e não retidas da cromatografia visando a elucidação da contribuição de interações eletrostáticas entre a IgG e Sepharose-TREN-Ni(II). Para o experimento de IEF, fez-se necessária a realização de uma cromatografia com 1,0 mL de injeção de IgG policlonal comercial de alta pureza na concentração de 5,0 mg/mL em MES 25 mmol/L, pH 6,5 com eluição por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol em leito de 5,0 mL de Sepharose-TREN-Ni(II). Esta condição foi utilizada por ser a que proporcionou os melhores resultados de purificação de IgG humana

em “spiking” de extrato de soja em Sepharose-TREN-Ni(II). Os resultados estão apresentados na Figura 4-30 e Tabela 4-20.

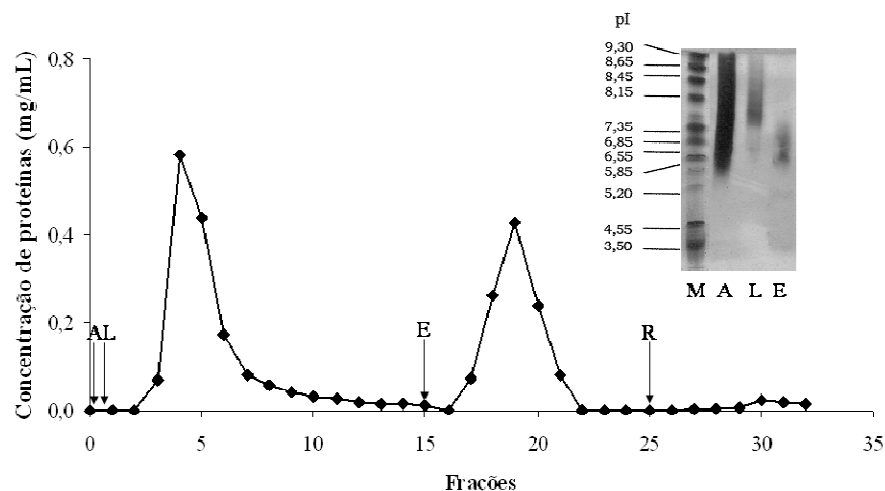


Figura 4-30. Perfil cromatográfico e eletroforese de focalização isoelétrica (IEF) de adsorção de IgG humana de alta pureza em Sepharose-TREN-Ni(II), em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 1,0 mL de IgG humana (5,0 mg/mL); (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição: MES 25 mmol/L, 300 mmol/L imidazol, pH 6,5; (R) regeneração: EDTA 50 mmol/L, pH 7,0. IEF - Faixas: (M) marcador de ponto isoelétrico; (A) amostra inicial; (L) fração 4 da lavagem; (E) fração 19 da eluição.

Tabela 4-20. Balanço de massa da cromatografia em Sepharose-TREN-Ni(II) realizadas com IgG humana de alta pureza em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	5,06	100,0
Lavagem	3,08	60,1
Eluição	2,21	43,7
Regeneração	0,15	2,9
Recuperação	5,44	106,8
Proteínas totais adsorvidas	2,36	46,6

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio de absorbância a 280 nm.

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

Volume do leito: 5,0 mL.

As moléculas de IgG obtidas na etapa de lavagem apresentam valores de pI na faixa de aproximadamente 6,85 e 9,3, sendo, então, moléculas que encontram-se com carga líquida total positiva no pH trabalhado (6,5), indicando que as mesmas sofreram repulsão

eletrostática devido à carga positiva do adsorvente. Por sua vez, moléculas de IgG com cargas negativas, neutras e levemente positivas em pH 6,5, com valores de pI na faixa de aproximadamente 5,5 a 7,35, foram adsorvidas, indicando que, possivelmente, as interações dessas moléculas de IgG com o adsorvente sejam predominantemente de natureza eletrostática.

O tampão MES, como se encontra em ausência de NaCl, pode possibilitar, além da formação de ligações de coordenação, a ocorrência de interações eletrostáticas entre proteína e metal imobilizado. O quelato TREN-Ni(II) em pH 6,5, encontra-se com carga líquida positiva, repelindo eletrostaticamente as proteínas de carga positiva e atraindo as de carga negativa, como demonstra a IEF apresentada.

Resultados similares de focalização isoeletrica foram apresentados por BRESOLIN *et al.* (2009a), onde os autores utilizaram alimentação de IgG humana comercial ( $5,8 < pI < 9,0$ ) em agarose-TREN (sem íon metálico quelatado), em sistema tamponante idêntico ao utilizado neste experimento (MES 25 mmol/L, pH 6,5). Detectou-se na etapa de lavagem IgG com valores de pI entre 6,3 a 9,0, enquanto na eluição (acréscimo de 0,4 mol/L NaCl no tampão de lavagem) detectou-se IgG de menores valores de pI (5,8 – 7,3).

Conclui-se, a partir destes resultados, que a presença do íon metálico não influenciou a purificação e a interação das moléculas IgG com a matriz cromatográfica.

#### **4.4. PURIFICAÇÃO DE IgG HUMANA ADICIONADA (“SPIKING”) EM EXTRATO DE SOJA POR CROMATOGRAFIA NEGATIVA: UTILIZAÇÃO DA RESINA DE TROCA IÔNICA SEPHAROSE-DEAE**

Utilizou-se o adsorvente Sepharose-DEAE (dietil aminoetil) como matriz de controle na purificação de IgG de “spiking” de extrato de soja, por ser um adsorvente clássico e largamente empregado como matriz de troca iônica e ter carga positiva como o TREN. O grupo funcional DEAE imobilizado em matriz celulose foi utilizado primeiramente por FAHEY e HORBETT (1959) para purificação de gama-globulinas por cromatografia de troca iônica. Por sua vez, LOWE *et al.* (1982), BIRD *et al.* (1984) e PERSSON (1987) utilizaram o gel DEAE-celulose em etapas de pré-purificação visando a

posterior separação de subclasses de IgG em colunas Sepharose contendo anticorpos monoclonais imobilizados. TANAKA e colaboradores (1998 e 2000) utilizaram Sepharose-DEAE em um processo multietapas de purificação de IgG humana por cromatografia negativa, a partir das frações Cohn e de criossobrenadante. Por sua vez, SOUZA (2009) utilizou o gel Sepharose-DEAE como controle na purificação de IgG a partir do soro humano por cromatografia negativa em um processo de única etapa, comparando a seletividade e capacidade com aquelas obtidas em adsorvente contendo diferentes diaminas lineares imobilizadas em agarose.

#### 4.4.1. Adsorção de proteínas da soja em Sepharose-DEAE

Realizou-se cromatografia com 10,0 mL de extrato de soja (sem “spiking”) na melhor condição encontrada para a adsorção das proteínas da soja em Sepharose-TREN (MES 25 mmol/L pH 6,5) em coluna com leito de 5,0 mL de Sepharose-DEAE, a fim de comparar os resultados obtidos nestas duas matrizes. Os resultados obtidos para Sepharose-DEAE estão apresentados na Figura 4-31 e na Tabela 4-21.

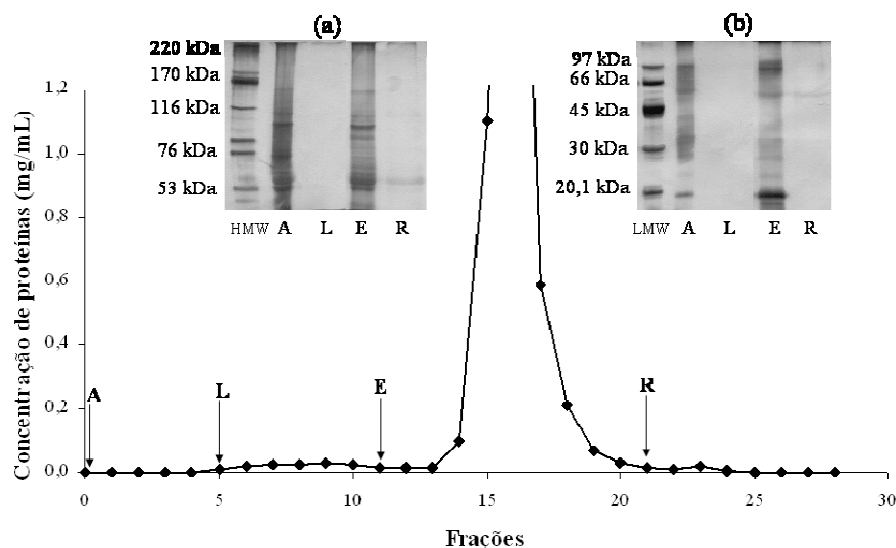


Figura 4-31. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-DEAE, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 8 e 9 da lavagem; (E) “pool” das frações 15 a 17 da eluição e (R) “pool” das frações 22 e 23 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (LMW) marcador de baixa massa molecular.



Tabela 4-21. Balanço de massa de proteínas totais da cromatografia em Sepharose-DEAE realizada com extrato de soja puro em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)
Amostra inicial	11,51	100,0
“Flowthrough”	0,07	0,6
Lavagem	0,21	1,8
Eluição	10,04	87,3
Regeneração	0,29	2,5
Recuperação	10,60	92,2
Proteínas totais adsorvidas	10,33	89,8

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com o balanço de massa apresentado na Tabela 4-21, apenas 2,4% das proteínas da soja foram detectadas nas frações de lavagem. As eletroforeses apresentadas na Figura 4-31 confirmam que esta matriz se apresentou favorável na adsorção de proteínas do extrato de soja e a indicam como candidata para a purificação de IgG de “spiking” em extrato de soja por cromatografia negativa.

#### 4.4.2. Purificação de IgG humana adicionada (“spiking”) em extrato de soja por cromatografia negativa em Sepharose-DEAE

A partir dos resultados apresentados no item 4.4.1 realizou-se nova cromatografia em coluna contendo 5,0 mL de Sepharose-DEAE, alimentando-se 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100 µL de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL. Uma vez que Sepharose-DEAE é uma matriz aniônica e que se encontra carregada positivamente na condição trabalhada (MES 25 mmol/L pH 6,5), espera-se que as IgGs de pI superior a 6,5 (estarão carregadas positivamente) não sejam adsorvidas e sejam detectadas na etapa de lavagem. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4-32 e Tabela 4-22.

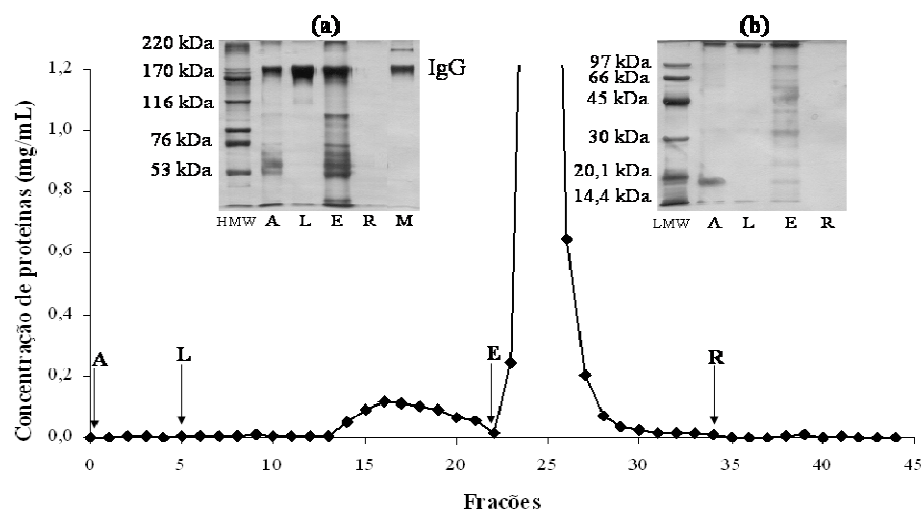


Figura 4-32. Perfil cromatográfico e eletroforético de adsorção de proteínas da soja com “spiking” de IgG humana em Sepharose-DEAE, a partir de extrato de soja em MES 25 mmol/L, pH 6,5. Volume do leito: 5,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 2,0 mL. (A) alimentação: 10,0 mL de extrato de soja com “spiking” de 100  $\mu$ L de IgG humana (50 mg/mL), perfazendo uma concentração de IgG de 0,5 mg/mL; (L) lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) eluição MES 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 6,5; (R) regeneração: NaOH 50 mmol/L. Eletroforeses SDS-PAGE, amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. Faixas: (A) amostra inicial; (L) “pool” das frações 16 a 18 da lavagem; (E) “pool” das frações 23 a 26 da eluição e (R) “pool” das frações 39 e 40 da regeneração; (HMW) marcador de alta massa molecular; (M) marcador de IgG; (LMW) marcador de baixa massa molecular.

Tabela 4-22. Balanço de massa de proteínas totais e de IgG da cromatografia em Sepharose-DEAE realizadas com “spiking” de IgG em: MES 25 mmol/L, pH 6,5 e desorção por acréscimo de 1,0 mol/L de NaCl no tampão de adsorção.

Etapas	PT <sup>a</sup> (mg)	PT <sup>b</sup> (%)	IgG <sup>c</sup> (mg)	IgG <sup>d</sup> (%)	Pureza <sup>e</sup> (%)	FP <sup>f</sup>
Amostra inicial	15,56	100,0	5,00	100,0	32,1	1,00
“Flowthrough”	0,04	0,3	0,02	0,4	50,0	1,56
Lavagem	1,04	6,7	0,90	18,0	86,5	2,69
Eluição	12,38	79,6	4,00	80,0	32,3	1,01
Regeneração	0,08	0,5	-	-	-	-
Recuperação	13,54	87,1	4,92	98,4	-	-
Proteínas adsorvidas	12,46	80,1	4,00	80,0	-	-

<sup>a</sup> Proteína Total: Massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (método de Bradford, 1976).

<sup>b</sup> Massa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína alimentada no processo x 100.

<sup>c</sup> Imunoglobulina G: Massa determinada por nefelometria.

<sup>d</sup> Massa de IgG em cada etapa dividida pela massa de IgG alimentada no processo x 100.

<sup>e</sup> Pureza: Massa de IgG dividida pela massa de proteína total de cada etapa x 100.

<sup>f</sup> Fator de Purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Volume do leito: 5,0 mL.

De acordo com a eletroforese da Figura 4-32a foi possível purificar IgG humana adicionada em extrato de soja por cromatografia negativa em Sepharose-DEAE. Foram detectados 18,4% de proteínas nas frações não adsorvidas da cromatografia (Tabela 4-22) com pureza de 86,5%. Comparativamente aos resultados obtidos em Sepharose-TREN (Figura 4-17 e Tabela 4-7) nas mesmas condições de trabalho, foram detectados 35,8% de proteínas nas frações não adsorvidas, com pureza de 100%, indicando que o adsorvente Sepharose-TREN se mostrou mais eficiente para purificação de IgG humana adicionada artificialmente em extrato de soja quando comparado ao adsorvente clássico Sepharose-DEAE.

SOUZA (2009) obteve IgG livre de impurezas nas frações “flowthrough” na curva de ruptura em leito de 3,0 mL de DEAE-agarose, alimentando 30,0 mL de solução de soro humano diluído vinte vezes em tampão HEPES pH 6,8, recuperando 52% da IgG alimentada, indicando que, com a utilização deste adsorvente clássico de troca iônica, é possível realizar a purificação de IgG humana por cromatografia negativa em um única etapa.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que Sepharose-TREN adsorveu eficientemente proteínas nativas de grãos de soja quando o extrato foi alimentado em tampão MES 25 mmol/L pH 6,5.

O estudo do efeito da diluição do extrato na adsorção de proteínas em Sepharose-TREN mostrou que a concentração máxima de proteínas da soja a ser utilizada na amostra inicial deve ser em torno de 1,0 mg/mL para evitar a precipitação de proteínas na coluna. A capacidade dinâmica de adsorção de proteínas da soja em Sepharose-TREN foi de 25,4 mg de proteínas totais/mL de gel, a uma vazão de 0,5 mL/min, similar a valores encontrados na literatura para adsorção de proteínas do soro humano.

A adição artificial de IgG humana (proteína de ampla faixa de pI: 5,8 a 9,0) aos extratos dos grãos de soja permitiu que a mesma fosse purificada por cromatografia negativa em Sepharose-TREN em MES 25 mmol/L pH 6,5, recuperando-se 38% da IgG na etapa de lavagem com pureza de 86%. A realização de “spiking” de proteínas de pI ácido (HSA e BSA) e pI básico (aprotinina e lisozima) mostrou que, de fato, ocorreu uma predominância de interações eletrostáticas entre o ligante TREN e as proteínas.

Experimentos controle de IMAC realizados com os quelatos TREN-Cu(II) e TREN-Ni(II) mostraram que foi possível purificar IgG humana adicionada artificialmente (“spiking”) aos extratos de grãos de soja, com purezas similares àquelas obtidas na cromatografia negativa em Sepharose-TREN, porém com menor recuperação de IgG.

Experimentos com Sepharose-DEAE (adsorvente clássico de troca iônica) mostram que o DEAE, assim como o TREN, se apresentou favorável na adsorção de proteínas do extrato de soja. Foi possível purificar IgG humana adicionada em extrato de soja por cromatografia negativa em Sepharose-DEAE, porém com menor recuperação na etapa de lavagem, sendo detectado 18,4% de proteínas nas frações não adsorvidas da cromatografia com pureza de 86,5%.

## **CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, torna-se relevante a continuação da pesquisa envolvendo este tema. Assim, as sugestões àqueles que darão continuidade a este trabalho são:

- 1) Estudo das interações entre aprotinina e Sepharose-TREN;
- 2) Estudo das interações entre as proteínas do extrato de soja e a lisozima;
- 3) Realização de experimentos cromatográficos com extrato de grãos de milho, a fim de se obter a condição tamponante que proporcione maior adsorção das proteínas do milho em Sepharose-TREN;
- 4) Adição artificial de IgG humana, assim como de outras proteínas de diferentes valores de pI aos extratos de milho a fim de se purificar estas proteínas por cromatografia negativa em Sepharose-TREN.

## CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS

ALLAN K.S.; SIDNEY J.C. Soybeans: Chemistry and Technology, The Avi Publishing Company, Westport, p. 27-144, 1972.

ALMQUIST, K.C.; McLEAN, M.D.; NIU, Y.; BYRNE, G.; OLEA-POPELKA, F.C.; MURRANT, C.; BARCLAY, J.; HALL, J.C. Expression of an anti-botulinum toxin A neutralizing single-chain Fv recombinant antibody in transgenic tobacco. *Vaccine*, v. 24, p. 2079-2086, 2006.

ARNOLD, F.H. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology*, v. 9, p. 151-156, 1991.

AUGUSTO, E.F.P.; OLIVEIRA, M.S. Biotecnologia Industrial, Volume 3 – Processos Fermentativos e Enzimáticos. Editado por LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. 1ª ed., Edgard Blücher, 2001. Cap. 24: Processos com células animais, p. 547-582.

AZZONI, ADRIANO RODRIGUES. *Plantas transgênicas como biorreatores: recuperação e purificação de aprotinina recombinante a partir de semente de milho transgênico*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002, s.n., Tese (Doutorado).

AZZONI, A.R.; KUSNADI, A.R.; MIRANDA, E.A.; NIKOLOV, Z.L. Recombinant aprotinin from transgenic corn seed: extraction and purification studies. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, p. 268-276, 2002.

AZZONI, A.R.; TAKAHASHI, K.; WOODARD, S.L.; MIRANDA, E.A.; NIKOLOV, Z.L. Purification of recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: separation from CTI utilizing ion-exchange chromatography. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, p. 323-330, 2005.

BAUM, T.J.; HIATT, A.; PARROTT, A.; PRATT, L.H.; HUSSEY, R.S. Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the Root-Knot nematode. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 9, p. 382-387, 1996.

BARTA, A.; SOMMERGRUBER, K.; THOMPSON, D.; HARTMUTH, K.; MATZKE, M.; MATZKE, A. The expression of a nopaline synthase human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology*, v. 6, p. 347-357, 1986.

BEAUCHEMIN, R.; N'SOUKPOÉ-KOSSI, C.N.; THOMAS, T.J.; THOMAS, T.; CARPENTIER, R.; TAJMIR-RIAH, H.A. Polyamine analogues bind human serum albumin. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 3177-3183, 2007.

BIRD, P.; LOWE, J.; STOKES, R.P.; BIRD, A.G.; LING, N.R.; JEFFERIS, R. The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity. *Journal of Immunological Methods*, v. 71, p. 97-105, 1984.

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

BOULIS, Y.; GRENIER-DE MARCH, G.; GOMORD, V. ; ADENIER, H. ; FAYE, L. ; VIJAYALAKSHMI, M.A. Analysis of sporamin forms expressed in different subcellular compartments of transgenic tobacco plants by IMAC and ESI-MS. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 215-221, 2003.

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

BRESOLIN, I.T.L.; BORSOI-RIBEIRO, M.; CARO, J.R.; SANTOS, F.P.; CASTRO, M.P. Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: Purification of human IgG by negative chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 17-23, 2009a.

BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas, *Química Nova*, IN PRESS, 2009b.

BRESOLIN, I.T.L.; PACIONI, T.R.; PEREIRA, I.R.A.; BUENO, S.M.A.; MIRANDA, E.A. IMAC como técnica de captura de proteínas a partir de extratos vegetais de tabaco. In

7º Encontro Brasileiro sobre Adsorção e I Simpósio Sul-Americano sobre Ciência e Tecnologia da Adsorção, Campina Grande - PB. (2008)

BROOKS, S.P.J.; STOREY, K.B.; Purification and characterization of a protein phosphatase that dephosphorylates pyruvate kinase in an anoxia tolerant animal. *Biochemical and Molecular Biology International*, v. 38, p. 1223-1234, 1996.

BURNOUF, T.; RADOSEVICH, M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 575-586, 2001.

CHEN, W.-Y.; LEE, J.-F.; WU, C.-F.; TSAO, H.K. Microcalorimetric Studies of the Interactions of Lysozyme with immobilized Cu(II): effects of pH value and salt concentration, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 190, p. 49–54, 1997.

CHEN, W.-Y.; LIU, Z.-C.; LIN, P.-H.; FANG, C.-I.; YAMAMOTO, S. The hydrophobic interactions of the ion-exchanger resin ligands with proteins at high salt concentrations by adsorption isotherms and isothermal titration calorimetry. *Separation and Purification Technology*, v. 54, p. 212-219, 2007.

COLE, K.; COUSIN, S.L. Size exclusion chromatography of soybean proteins and isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 2713-2720, 1994.

DE LUCCA, PAULO CÉSAR. *Produção dos hormônios recombinantes de crescimento e pró-insulina humanos em plantas transgênicas de milho*. Campinas: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2003. sn. Tese (Doutorado).

DESAI, U.A.; SUR, G.; DANUERT, S.; BABBITT, R.; LI, Q. Expression and affinity purification of recombinant proteins from plants. *Protein Expression and Purification*, v. 25, p. 195-202, 2002.

DE WILDE, C.; DE NEVE, M.; DE RYCKE, R.; BRUYNS, A.M.; DE JAEGER, G.; VAN MONTAGU, M.; DEPICKER, A.; ENGLER, G. Intact antigen-binding MAK33 antibody and F<sub>ab</sub> fragment accumulate in inter-cellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant science*, v. 114, p. 233-241, 1996.

DE WILDE, C.; DE RYCKE, R.; BEECKMAN, T.; DE NEVE, N.; VAN MONTAGU, M.; ENGLER, G.; DEPICKER, A. Accumulation Pattern of IgG Antibodies and F<sub>ab</sub>



Fragments in Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants. *Plant and Cell Physiology*, v. 39, p. 639-646, 1998.

DE ZOETEN, G.A.; PENSWICK, J.R.; HORISBERGER, M.A.; AHL, P.; SCHULTZE, M.; HOHN, T. The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology*, 172: 213–222, 1989.

DHARMADI, Y.; CHANG, Q.; GLATZ, C. E. Recovery of enzyme byproducts from potential plant hosts for recombinant protein production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 596-605, 2003.

EVANGELISTA, R.L.; KUSNADI, A.R.; HOWARD, J.A.; NIKOLOV, Z.L.; Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant  $\beta$ -glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnology Progress*, v. 14, p. 607-614, 1998.

FAHEY, J.L., HORBETT, A.P. Human gamma globulin fractionation on anion exchange cellulose columns. *Journal of Biological Chemistry*, v. 234, p. 2645-2651, 1959.

FERNÁNDEZ, E.G.; VALDÉS, R.; MONTERO, J.A.; FIGUEROA, A.; ALVAREZ, T.; TAMAYO, A.; MEDINA, Y.; GUEVARA, Y.; FERRO, W.; LÓPEZ, J.; LA O, M.; DORTA, L.; CECILIA, D.; ALDAMA, Y.; GEADA, D.; PADILLA, S.; SÁNCHEZ, K.M. Application of the partial least square technique to identify critical variables in the immunosorbent manufacturing. *Chromatographia*, v. 68, p. 375-380, 2008.

FERREIRA, C.V.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H.; Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. *Plant physiology and Biochemistry*, v. 36, p. 487-494, 1998.

FISHER, R.; EMANS, N. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, v. 9, p. 279-299, 2000.

FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; HORSCH, R.B. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceeding of National Academy of Science*, v. 80, p. 4803-4807, 1983.

FRANCO-FRAGUAS, L.; PLA, A.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H.; SUAREZ N.; BATISTA-VIERA F. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 365-372, 2003.

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

GALEFFI, P.; LOMBARDI, A.; DI DONATO, M.; LATINI, A.; SPERANDEI, M.; CANTALE, C.; GIACOMINI, P. Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. *Vaccine*, v. 23, p. 1823-1827, 2005.

GENARO, A.C.B.; TAMAGAWA, R.E.; AZZONI, A.R.; BUENO, S.M.A.; MIRANDA, E.A. Recovery and purification of aprotinin from industrial insulin processing effluent by immobilized chymotrypsin and negative IMAC. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1413-1420, 2002.

GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 1151-1155, 2000.

GOLDSTEIN, D.A.; THOMAS, J.A. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants *Quarterly Journal of Medicine: An International Journal of Medicine*, v. 97, p. 705-716, 2004.

GOOD, N.E.; WINGET, G.D.; WINTER, W.; CONNOLLY, T.N.; IZAWA, S.; SINGH, R.M.M. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, v. 5, p. 467-477, 1966.

GUTIÉRREZ, R.; MARTÍN DEL VALLE, E.M.; GALÁN, M.A.; Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. *Separation and Purification Reviews*, v. 36, p. 71-111, 2007.

HALE, J.E.; BEIDLER, D.E. Purification of humanized murine and murine monoclonal antibodies using immobilized metal-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 222, p. 29-33, 1994.

HAMMOND, J.B.; KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. In *Methods in Molecular Biology, New Protein Techniques*, v. 3, Walker, J.M. (ed.), Springer Verlag, NY, p. 25-33, 1988.

HEMDAN, E.S.; PORATH, J. Development of immobilized metal affinity chromatography. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. *Journal of Chromatography*, v. 323, p. 255-264, 1985.

HIATT, A. Antibodies produced in plants. *Nature*, v. 344, p. 469-470, 1990.

HIATT, A.C.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, v. 342, p. 76-78, 1989.

HOLLER, E.; RUPLEY, J.A.; HESS, G.P. Productive and unproductive lysozymechitosaccharide complexes - equilibrium measurements. *Biochemistry*, v.14, p. 1088-1094, 1975.

HORN, M.E.; WOODARD, S.L.; HOWARD, J.A. Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Reports*, v. 22, p. 711-720, 2004.

JOLLES, P. Lysozymes - a chapter of molecular biology. *Angewete Chemie-International Edition*, v. 8, p. 227, 1969.

KHOUDI, H.; LABERGE, S.; FERULLO, J.M.; VEZINA, L.P. Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, p. 135-143, 1999.

KO, K.; KOPROWSKI, H. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Research*, v. 111, p. 93-100, 2005.

KO, K.; TEKOAH, Y.; RUDD, P.M.; HARVEY, D.J.; DWEK, R.A.; SPITSIN, S.; HANLON, C.A.; RUPPRECHT, C.; DIETZSCHOLD, B.; GOLOVKIN, M.; KOPROWSKI, H. Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. *Proceedings of National Academy of Science*, v. 100, p. 8013-8018, 2003.

KOPLIK, R.; PAVELKOVA, H.; CINCIBUCHOVA, J.; MESTEK, O.; KVASNICKA, F.; SUCHANEK, M. Fractionation of phosphorus and trace elements species in soybean flour and common white bean seeds by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 770, p. 261-273, 2002.

KUSNADI, A.R.; NIKOLOV, Z.L.; HOWARD, J.A. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 56, p. 473-484, 1997.

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

LARRICK, J.W.; YU, L.; NAFTZGER, C.; JAISWAL, S.; WYCOFF, K. Production of secretory IgA antibodies in plants. *Biomolecular Engineering*, v. 18, p. 87-94, 2001.

LARSEN K. Purification of nodule-specific uricase from soybean by arginine-sepharose affinity-chromatography. *Preparative Biochemistry*, v. 20, p. 1-9, 1990.

LAU, O.S.; SUN, S.S.M. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production, *Biotechnology Advances*, IN PRESS, 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios da bioquímica, 2ª ed., São Paulo, Sarvier, 1995.

LEROY, D.; HERICHÉ, J.-K.; FILHOL, O.; CHAMBAZ, E.M.; COCHET, C. Binding of polyamines to an autonomous domain of the regulatory subunit of protein kinase CK2 induces a conformational change in the holoenzyme: a proposed role for the kinase stimulation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 20820-20827, 1997.

LEYVA, A.; FRANCO, A.; GONZÁLEZ, T.; SÁNCHEZ, J.C.; LÓPEZ, I.; GEADA, D.; HERNÁNDEZ, N.; MONTAÑÉS, M.; DELGADO, I.; VALDÉS, R. A rapid and sensitive ELISA to quantify an HBsAg specific monoclonal antibody and a plant-derived antibody during their downstream purification process. *Biologicals*, v. 35, p. 19-15, 2007.

LÓPEZ, E.; SILVA, R.; ACEVEDO, B.; BUXADÓ, J.A.; AGUILERA, A.; HERRERA, L. TAKING STOCK OF CUBAN BIOTECH, *NATURE BIOTECHNOLOGY*, V. 25, P. 1215-1216, 2007.

LOWE, J.; BIRD, P.; HARDIE, D.; JEFFERIS, R.; LING, N.R. Monoclonal antibodies (McAbs) to determinants on human gamma chains: properties of antibodies showing subclass restriction or subclass specificity. *Immunology*, v. 47, p. 329-336, 1982.

- LUI, D.Y.M.; WHITE, E.T.; LITSTER, J.D. Dissolution behavior of soy proteins and effect of initial concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 2467-2473, 2007.
- MA, J. K-C.; HIATT, A.; HEIN, M.; VINE, N.D.; WANG, F.; STABILA, P.; VAN DOLLEWEERD, G.; MOSTOV, K.; LEHNER, T. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science*, v. 268, p. 716-719, 1995.
- MA, J.K.; HEIN, M.B. Immunotherapeutic potential of antibodies produced en plants. *Trends in biotechnology*, v. 13, p. 522-527, 1995.
- MA, J.K.; DRAKE, P.M.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, p. 794-805, 2003.
- MA, J.K.; BARROS, E.; BOCK, R.; CHRISTOU, P.; DALE, P.J.; DIX, P.J.; FISHER, R.; IRWIN, J.; MAHONEY, R.; PEZZOTTI, M.; SCHILLBERG, S.; SPARROW, P.; STOGER, E.; TWYMAN, R.M. Molecular farming for new drugs and vaccines: Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants, *European Molecular Biology Organization Reports*, v. 6, p. 593-599, 2005.
- MENKHAUS, T.J.; ERIKSSON, S.U.; WHITSON, P.B.; GLATZ, C. E. Host selection as a downstream strategy: Polyelectrolyte precipitation of  $\beta$ -glucuronidase from plant extracts, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, p. 148-154, 2002
- MENKHAUS, T.J.; BAI Y.; ZHANG C.; NIKOLOV Z.L.; GLATZ C.E. Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 1001-1014, 2004a.
- MENKHAUS, T.J.; PATE, C.; KRECH, A.; GLATZ, C.E. Recombinant protein purification from pea. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 86, p. 108-114, 2004b.
- MCLEAN, M.D.; ALMQUIST, K.C.; NIU, Y.; KIMMEL, R.; LAI, Z.; SCHREIBER, J.R.; HALL, J.C. A human anti-*Pseudomonas aeruginosa* serotype O6ad Immunoglobulin G<sub>1</sub> expressed in transgenic tobacco is capable of recruiting immune system effector function in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 3322-3328, 2007.
- MICHNIK, A.; MICHALIK, K.; DRZAZGA, Z. Stability of bovine serum albumin at different pH, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 80, p. 399-406, 2005.

- MILSTEIN, C. Monoclonal Antibodies. *Scientific American*, v. 243, n. 4, p. 66-74, 1980.
- MIRANDA, M. V.; MAGRI, M. L.; CANIZO, A. A. N.; CASCONE, O. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on concavalin-A agarose. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 437-543, 2002.
- MONQUERO, P.A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. *Bragantia, Campinas*, v. 64, p. 517-531, 2005.
- MORRIN, M.; REEN, D.J.; Role of IgG subclass response to outer-membrane proteins in inhibiting adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, v. 39, p. 459-466, 1993.
- MORRISSEY, 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.L.; WOODARD, S.L. Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 479-486, 2004.
- NORRIS, K.; NORRIS, F.; BJORN, S.A.; DIERS, I.; PETERSEN, L.C. Aprotinin and Aprotinin analogues exoressed in yeast. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 371, p. 37-42, 1990.
- OSBORNE, T.B. The vegetable proteins, Longman Green and Co., London, 1924.
- PARIZOTTO, E.A.; DE LUCCA, P.C.; JUNGSMANN, L.; KEMPER, E.L.; DA SILVA, A.C.; LEITE, A. Plantas como biorreatores. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 17, p. 12-17, 2000.
- PEETERS, K.; DE WILDE, C.; DE JAEGER, G.; ANGENON, G.; DEPICKER, A. Production of antibodies and antibodies fragments in plants. *Vaccine*, v. 19, p. 2756-2761, 2001.
- PERSSON, M.A.A. Preparation of human sera containing one single IgG subclass using affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*, v. 98, p. 91-98, 1987.
- PITOT, O.; NEDONCHELLE, E.; LEGALLAIS, C.; VIJAYALAKSHMI, M.A. Protein adsorption on histidyl-aminoheyl-Sepharose 4B II. Application to the negative one-step

affinity purification of human 2-microglobulin and immunoglobulin G. *Journal of Chromatography B*, v. 758, p. 173-182, 2001.

PLATIS, D.; LABROU, N.E. Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. *Journal of Chromatography A*, v. 1128, p. 114-124, 2006.

PLATIS, D.; DROSSARD, J.; FISHER, R.; MA, J.K.-C.; LABROU, N.E. New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *Journal of Chromatography A*, v. 1211, p. 80-89, 2008

PORATH, J. IMAC – Immobilized metal ion affinity based chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 7, p. 254-259, 1988.

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

PORTER, J.E.; LADISH, M.R.; HERMANN, K.M. Ion-exchange and affinity chromatography in the scale-up of the purification of alpha-galactosidase from soybean seeds. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, p. 356-363, 1991.

PRIN, C.; BENE, M.C.; GOBERT, B.; MONTAGNE, P.; FAURE, G.C. Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1243 p. 287-290, 1995.

PUTNAM, F.W. The plasma proteins: structure, function, and genetic control. Academic Press. p. 1-55, New York, 1987.

RAMESSAR, K.; RADEMACHER, T.; SACK, M.; STADLMANN, J.; PLATIS, D.; STIEGLER, G.; LABROU, N.; ALTMANN, F.; MA, J.; STOGER, E.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, p. 3727-3732, 2008.

RIBEIRO, C.W.; SOARES-COSTA, A.; FALCO, M.C.; CHABREGAS, S.M.; ULIAN, E.C.; COTRIN, S.S.; CARMONA, A.K.; SANTANA, L.A.; OLIVA, M.L.V.; HENRIQUE-SILVA, F. Production of a his-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. *Biotechnology Progress*, v. 24, p. 1060-1066, 2008a.

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

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

ROBIC, GORAN. *Soja como biorreator: estudo de extração e purificação de proteína recombinante utilizando  $\beta$ -glucuronidase*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 82p., Dissertação (Mestrado).

ROBIC, G.; FARINAS, C.S.; RECH, E.L.; BUENO, S.M.A.; MIRANDA, E.A. Downstream process engineering evaluation of transgenic soybean seeds as host for recombinant protein production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 32, p. 7-12, 2006.

RUDNEY, J.D.; KAJEER, K.C.; SMITH, Q.T. Correlations among human salivary levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase and secretory immunoglobulin-A with different stimulatory states and over time. *Archives of Oral Biology*, v. 30, p. 765-771, 1985.

SANTOS, F.P.; CASTRO, M.P.; BRESOLIN, I.T.L.; RIBEIRO, M.B.; BUENO, S.M.A. Cromatografia em Gel Agarose-TREN: Purificação de Imunoglobulina G Humana, In XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Santos - SP, 2006a.

SANTOS, F.P.; CASTRO, M.P.; RIBEIRO, M.B.; BRESOLIN, I.T.L.; BUENO, S.M.A. Adsorção de proteínas do soro humano em agarose-TREN: cromatografia negativa para purificação de IgG. Em 6o Encontro Brasileiro de Adsorção (EBA), Maringá - PR, 2006b.

SCOPES, R.K. Protein purification: principles and practices. Springer Verlag, New York, p. 30-40, 1994.

SENA, J.A.D.; GOLDMAN, M.H. Plantas produtoras de anticorpos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 23, p. 20-26, 2001.



SERPA, G.; AUGUSTO, E. F. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; RIBEIRO, M. B.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A., Evaluation of immobilized metal membrane affinity chromatography for purification of an immunoglobulin G1 monoclonal antibody. *Journal of Chromatography B*, v. 816, p. 259-268, 2005.

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

SIJMONS, P.C.; DEKKER, B.M.M.; SCHRAMMEIJER, B.; VERWOERD, T.C.; VAN DEN ELZEN, P.J.M.; HOEKEMA, A. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology*, v. 8, p. 217-221, 1990.

SMITH, A.K.; SIDNEY, J.C.; Soybeans: Chemistry and technology, The AVI Publishing Company, 1972, 470 p.

SORENSEN, S.; JUSTESEN, S.J.; JOHNSEN, A.H. Purification and characterization of osteopontin from human milk. *Protein Expression and Purification*, v. 30, p. 238-245, 2003

SOUZA, MARIA CRISTIANE MARTINS. *Purificação de IgG humana por cromatografia negativa em diaminas imobilizadas em géis de agarose*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 192p., Dissertação (Mestrado).

SPECTOR, A.A. Fatty acid binding to plasma albumin, *Journal of Lipid Research*, v. 16, p. 165-179, 1975.

SPERB, FERNANDA. *Expressão transgênica da eritropoietina humana em plantas*. Porto Alegre: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 70p., Dissertação (Mestrado).

STEPHENS, A.S.; GELBHARDT, J.S.; MATTHEWS, B.F.; WADSWORTH, G.J.; Purification and preliminary characterization of the soybean glycosomal aspartate aminotransferase isozyme. *Plant Science*, v. 139, p. 233-242, 1998.

SU, C.K.; CHIANG, B.H. Partitioning and purification of lysozyme from chicken egg white using aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 257-263, 2006.

SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M.; KOBAYASHI, K. CRYSTAL structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, v. 12, p. 439-446, 1999.

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

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

TANAKA, K.; SAWATANI, E.; DIAS, G.A.; SHIGUEOKA, E.M.; NAKAO, H.C.; ARASHIRO, F. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 27-30, 2000.

TANAKA, K.; SAWATANI, E.; SHIGUEOKA, E.M.; CAMPOS, T.C.X.B; NAKAO H.C.; DIAS, G.A.; FUGITA, R.K.; ARASHIRO, F.; A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1375-1381, 1998.

TEIXEIRA JR., S. O doutor soja. *Exame*, 29 de Agosto, p. 95-96, 2007.

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

TISHCHENKO, G.; DYBAL, J.; MESZAROSOVA, K.; SEDLAKOVA, Z.; BLEHA, M. Purification of the specific immunoglobulin G1 by immobilized metal ion affinity chromatography using nickel complexes of chelating porous and nonporous polymeric sorbents based on poly(methacrylic esters). Effect of polymer structure. *Journal of Chromatography A*, v. 954, p. 115-126, 2002.

TIWARI, S.; VERMA, P.C.; SINGH, P.K.; TULI, R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 449-467, 2009.

TORDOROVA-BALVAY, D.; PITIOT, O.; BOURHIM, M.; SRIKRISHNAM, T.; VIJAYALAKSHMI, M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 57-62, 2004.

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

VALDES, R.; REYES, B.; ALVAREZ, T.; GARCIA, J.; MONTERO, J.A.; FIGUEROA, A.; GOMEZ, L.; PADILLA, S.; GEADA, D.; ABRAHANTES, M.C. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochemical and Biophysical Communications*, v. 310, p. 742-747, 2003.

VALDEZ-ORTIZ, A.; RASCÓN-CRUZ, Q.; MEDINA-GODOY, S.; SINAGAWA-GARCÍA, S.R.; VALVERDE-GONZÁLEZ, M.E.; PAREDES-LÓPEZ, O. One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology*, v. 115, p. 413-423, 2005.

VANÇAN, S.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc and cobalt ions and different buffer systems. *Process biochemistry*, v. 37, p. 573-579, 2002.

VERCH, T.; YUSIBOV, V.; KOPROWSKI, H. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods*, v. 220, p. 69-75, 1998.

VIJAYALAKSHMI, M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. *Trends in Biotechnology*, v. 7, p. 71-76, 1989.

VLUG, A.; VAN REMORTEL, P. The structure and function of human IgG subclasses. *American Clinical Laboratory*, v. 8, p.28-36, 1989.

WANG, C.; DELCROS, J.-G.; CANNON, L.; KONATE, F.; CARIAS, H.; BIGGERSTAFF, J.; GARDNER, R.; PHANSTIEL, O. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine-conjugates into cells containing active polyamine transporters. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 5129-5138, 2003.

WHITELAM, G.C. The production of recombinant proteins in plants. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 68, p. 1-9, 1995.

WINZERLING, J.J.; BERNA, P.; PORATH, J. *Em Methods: a companion to Methods in Enzymology* 4. Academic Press, New York, 1992, p. 4-13.

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

YANO, A.; MAEDA, F.; TAKEKOSHI, M. Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Medical Virology*, v. 73, p. 208-215, 2004.

YOON, S.O.; LEE, Y.S.; LEE, S.H.; CHO, Y.D. Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1475, p. 17-26, 2000.

YOSHIDA, S.; IOKA, D.; MATSUOKA, H.; ENDO, H.; ISHII A. Bateria expressing single-chain immunoitoxin inhibit malaría parasite development in mosquitoes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 17, p. 290-298, 2001.

YU, D.; McLEAN, M.D.; HALL, J.C.; GHOSH, R. Purification of a human immunoglobulin G<sub>1</sub> monoclonal antibody from transgenic tobacco using membrana chromatographic processes. *Journal of Chromatography A*, v. 1187, p. 128-137, 2008.

ZHANG, C.M.; RESLEWIC, S.A.; GLATZ, C.E. Suitability of Immobilized Metal Affinity Chromatography for Protein Purification from Canola. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, p. 52-58, 2000.

ZEITLIN, L.; OLMSTED, S.S.; MOENCH, T.R.; CO, M.S.; MARTINELL, B.J.; PARADKAR, V.M.; RUSSELL, D.R.; QUEEN, C.; CONE, R.A.; WHALEY, K.J. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnology*, v. 16, p. 1361-1364, 1998.

## APÊNDICE A

Esta tabela é referente aos experimentos citados no item 4.2.3.2, onde estão apresentados os resultados de pH e condutividade de cada fração coletada da cromatografia realizada com alimentação de 82,0 mL de extrato de soja nas proporções (% v/v) extrato de soja/tampão: 50/50 (1,33 mg/mL de proteínas totais) e 45/55 (1,09 mg/mL de proteínas totais) em coluna de 5,0 mL de Sepharose-TREN.

Tabela A.1. pH e condutividade das frações coletadas das cromatografias em MES 25 mmol/L pH 6,5 e dessorção por acréscimo de 1,0 M NaCl no tampão de adsorção, nas concentrações de alimentação de 1,33 e 1,09 mg/mL.

Frações	Concentração 1,33 mg/mL		Concentração 1,09 mg/mL	
	pH	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	pH	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )
Alimentação	6,60	1128	6,61	1107
1	6,61	1088	6,63	1138
2	6,58	1108	6,63	1199
3	6,60	1105	6,70	1157
4	6,61	1115	6,69	1104
5	6,61	1140	6,70	1115
6	6,62	1090	6,69	1140
7	6,66	1128	6,69	1172
8	6,59	1190	6,70	1203
9	6,59	1191	6,66	1199
10	6,59	1120	6,61	1066
11	6,59	1075	6,58	1175
12	6,60	1115	6,60	1174
13	6,59	1068	6,61	1117
14	6,58	1098	6,61	1169
15	6,59	1125	6,60	1117
16	6,55	1029	6,59	1205
17	6,55	1198	6,60	1198
18	6,56	1175	6,61	1090

---

19	6,57	1203	6,61	1128
20	6,60	1199	6,62	1190
21	6,58	1171	6,66	1191
22	6,59	1089	6,59	1155
23	6,60	1011	6,59	1171
24	6,61	1117	6,59	1089
25	6,61	1205	6,61	1011
26	6,62	1198	6,62	1012
27	6,61	1157	6,61	1103
28	6,59	1209	6,59	1119
29	6,60	1012	6,60	1098
30	6,60	1103	6,61	1125
31	6,60	1119	6,59	1029
32	6,60	1003	6,60	1198
33	6,61	1089	6,60	1012
34	6,62	1104	6,60	1110
35	6,61	1138	6,59	1180
36	6,63	1199	6,55	1120
37	6,63	1157	6,55	1075
38	6,70	1175	6,56	1115
39	6,69	1174	6,57	1128
40	6,70	1117	6,60	1087
41	6,69	1169	6,58	1108
42	6,69	1012	-	-
43	6,70	1110	-	-
44	6,66	1180	-	-
“Pool” lavagem	6,68	1108	6,68	1108
“Pool” eluição	6,84	47,0 x 10 <sup>3</sup>	6,84	52,0 x 10 <sup>3</sup>
“Pool” regeneração	11,7	21,6 x 10 <sup>3</sup>	11,7	23,4 x 10 <sup>3</sup>

---

## APÊNDICE B

Neste apêndice está apresentado o laudo da análise de espectrometria de massa das amostras de aprotinina (item 4.2.5.1) realizada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Unicamp.



### RELATÓRIO TÉCNICO DE ANÁLISE

Aprotinina

01/06/2009

1. **Amostras:** Soluções de aprotinina fornecidas pelo grupo da Prof. Dra. Sônia - FEQ (Faculdade de Engenharia Química –UNICAMP).

Amostra 1: aprotinina alimentação em água.

Amostra 2: aprotinina alimentação em tampão.

Amostra 3: aprotinina adsorvida na coluna ( recuperação 20 %).

Amostra 4: aprotinina eluída ( recuperação 80 %).

2. **Análises:** Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS), utilizando o equipamento LTQ FT Ultra (ThermoScientific).

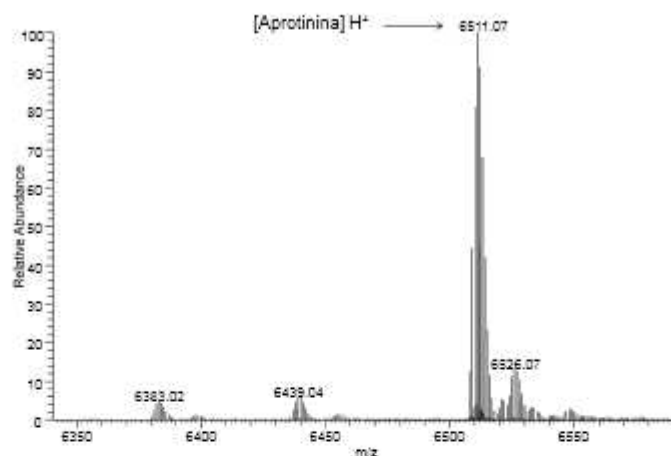
3. **Metodologia:**

As soluções de aprotinina foram diluídas em uma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O (50% v,v e 0,1% v,v de ácido fórmico). A solução foi introduzida no equipamento de ESI-MS através de um sistema automatizado (Nanomate – Advion, UK), com vazão de 10 µL min<sup>-1</sup>. Os espectros foram adquiridos no modo positivo.

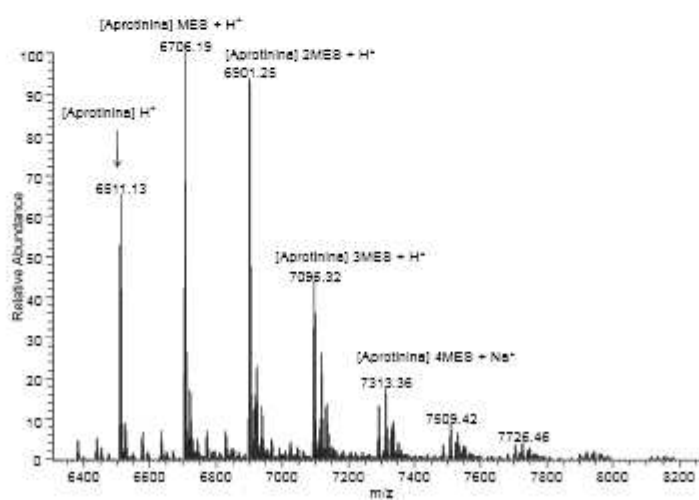
4. **Resultados:**

Foram observados os íons característicos da aprotinina nas amostras 1, 2 e 4. Na amostra 3 observou-se um íon característico de um peptídeo resultante de uma hidrólise ácida da aprotinina. A seguir encontram-se os espectros de ESI-MS de todas as amostras ( Figura 1 à 4).

Errata - amostra 4: lê-se aprotinina não adsorvida.

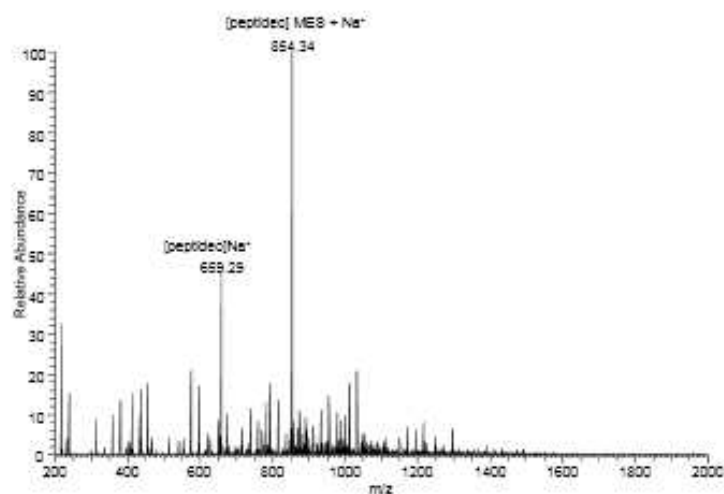


**Figura 1:** Espectro de ESI(+)-MS deconvolvido da solução de aprotinina em água diluída em MeOH/H<sub>2</sub>O.

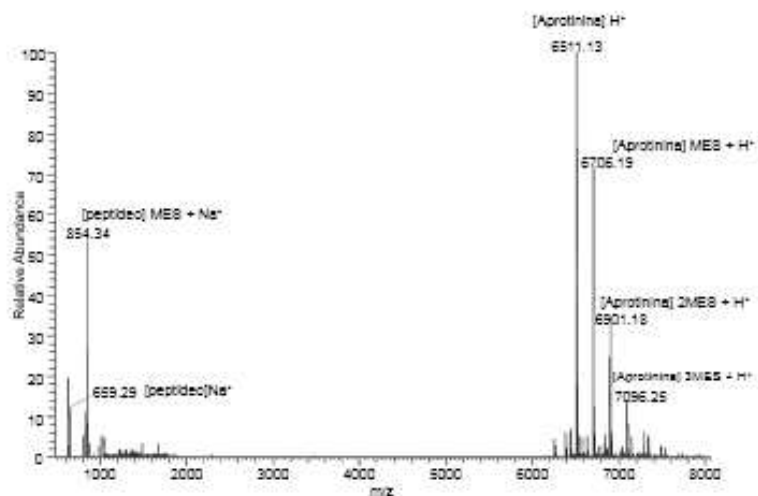


**Figura 2:** Espectro de ESI(+)-MS deconvolvido da solução de aprotinina em tampão (MES) diluída em MeOH/H<sub>2</sub>O.





**Figura 3:** Espectro de ESI(+)-MS da solução de aprotinina adsorvida na coluna diluída em MeOH/H<sub>2</sub>O.



**Figura 4:** Espectro de ESI(+)-MS deconvolvido da solução de aprotinina eluída da coluna diluída em MeOH/H<sub>2</sub>O.

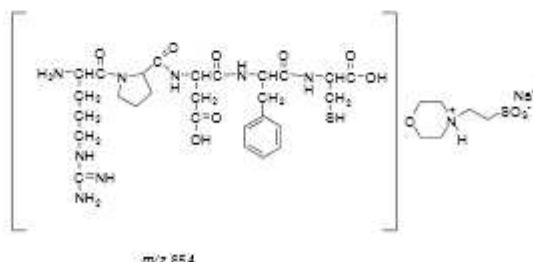
No espectro da Figura 1 – aprotinina em água – observou-se o íon de  $m/z$  6511 referente à aprotinina protonada. Este espectro foi deconvolvido utilizando o software

Errata - Figura 4: lê-se aprotinina não adsorvida da coluna



Xcalibur –ThermoScientific – Germany. Já na Figura 2 o espectro de ESI(+)-MS da aprotinina na solução de tampão (ácido 2-morfolinoetanosulfônico – MES) observou-se íons referente a aprotinina protonada e como adutos com o MES sodiado. No espectro de ESI(+)-MS da solução de aprotinina adsorvida (Figura 3) na coluna cromatográfica não observou-se nenhum íon da aprotinina. Contudo, constatou-se a presença de um peptídeo oriundo de hidrólise ácida da aprotinina pelo N-terminal. Na Figura 4 – espectro de ESI(+)-MS da aprotinina eluída – foram observados os íons da aprotinina protonada, dos respectivos adutos desta com MES e sódio além dos peptídeos encontrados na Figura 3.

Os dados obtidos dos espectros de ESI(+)-MS revelam que a perda de 20% de aprotinina ao ser eluída na coluna cromatográfica de troca iônica com o ligante tris-(2-aminoetil)amina (TREN) refere-se a hidrólise ácida da aprotinina durante a eluição na coluna formando o peptídeo mostrado na Figura 5. Esta hidrólise foi evidenciada pela análise do espectro da Figura 3 e 4, que nos revela a presença deste peptídeo.



**Figura 5:** Estrutura do peptídeo oriundo da hidrólise ácida da aprotinina. Este foi detectado por ESI(+)-MS como aduto de MES sodiado.

## 5. Conclusão.

Com base nos resultados apresentados, constatou-se que a solução de aprotinina em água e na solução de tampão não encontra-se hidrolisada. A hidrólise ocorre quando a aprotinina elui pela coluna cromatográfica de troca iônica, formando o peptídeo: Arg – Pro – Asp – Phe – Cys . A formação deste peptídeo é a causa provável da redução observada da recuperação da aprotinina em torno de 20 %.

Marcos N Eberlin