

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Cromatografia IMAC: estudos de adsorção de
glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺**

Cristiane Sanchez Farinas

Mestranda

Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Orientador

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Dissertação de Mestrado 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

Março de 2001



UNIDADE 100
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
F226c
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 44650
 PROC. 392/2001
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 01-06-01
 N.º CPD

CM00158131-5

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

F226c Farinas, Cristiane Sanchez
 Cromatografia IMAC: estudos de adsorção de
 glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺ / Cristiane
 Sanchez Farinas. —Campinas, SP: [s.n.], 2001.

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

1. Insulina. 2. Cromatografia de afinidade. 3.
 Quelatos. 4. Íons metálicos. 5. Adsorção. 6. Proteínas.
 I. Miranda, Everson Alves. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

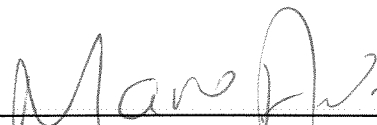
Cromatografia IMAC: estudos de adsorção de glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺, defendida por Cristiane Sanchez Farinas e aprovada em 30 de março de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Orientador: Everson Alves Miranda



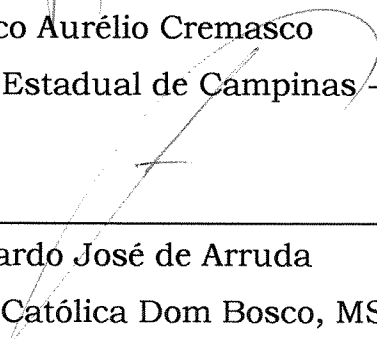
Prof.Dr. Everson Alves Miranda

Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

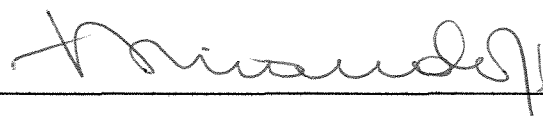
Universidade Estadual de Campinas - FEQ



Prof. Dr. Eduardo José de Arruda

Universidade Católica Dom Bosco, MS

Esta versão corresponde à redação final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela Eng^a Química Cristiane Sanchez Farinas e aprovada pela comissão julgadora em 30 de março de 2001.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Everson Alves Miranda', is positioned above a horizontal line.

Orientador: Prof. Dr. Everson Alves Miranda

Aos meus meninos, Pedro e Paulo.

Agradecimentos

À Deus.

Ao Paulo, pelo amor, companheirismo e paciência e ao Pedro, por ter se tornado essa criança tão doce que só me traz alegrias.

Ao meu pai e minhas irmãs, pela disposição em me ajudar sempre que preciso e à minha querida mãezinha, que mesmo não estando mais aqui, consegue estar sempre presente.

Ao Prof. Everson, pela orientação tão dedicada e pelo constante exemplo de profissionalismo.

À Prof. Sônia Maria Alves Bueno, Departamento de Processos Biotecnológicos, pela constante participação durante este trabalho com sugestões sempre acertadas e também essenciais no andamento do projeto.

Ao Prof. César Costapinto Santana, Departamento de Processos Biotecnológicos, que permitiu a realização de parte dos experimentos em seu laboratório.

Aos Profs. Théo Guenter Kieckbush e Marco Aurélio Cremasco, Departamento de Termofluidodinâmica, pelo empréstimo do HPLC, o que possibilitou a conclusão deste trabalho dentro do prazo.

Aos amigos de laboratório, Rosana, Ana Carolina, Líbia, Luciana, Adriano, Isa, André, Antenor, Lucas, Kátia, Chrissana, Christiane, Salah, Sindélia, Carla, Oselys, Vitor, Vinícius, Elcimar e Fábio, pela amizade e disposição em me ajudar em todos os momentos.

À Biobrás S/A, especialmente ao Eng. Luciano Vilela, Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento, pelas frutíferas discussões e pelo fornecimento das proteínas de alta pureza e frações de processamento de insulina.

À Capes, pelo suporte financeiro através da bolsa de estudo.

Aos demais professores e funcionários da FEQ que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

Glucagon é um hormônio que aumenta o nível de glicose sanguínea e sua principal aplicação como produto farmacêutico é no tratamento de hipoglicemia, especialmente associada ao diabetes. Além dessa importante aplicação e sendo o glucagon um produto de custo bastante elevado, existe a necessidade de se aprimorar seu processo de purificação. O objetivo deste trabalho foi realizar estudos de adsorção de glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺, através da técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC), visando desenvolver um processo de purificação de glucagon a partir de fração de processamento industrial de insulina de pâncreas. Na primeira etapa, realizou-se experimentos em tanques agitados para determinar a cinética, capacidade de adsorção e influência do pH, força iônica e agente competidor na eluição do glucagon adsorvido em matriz sílica-IDA-Cu²⁺. A segunda etapa consistiu em experimentos em colunas de cromatografia líquida com leito fixo, com o glucagon, a insulina e a mistura deles, utilizando os metais Cu²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺. A condição que se mostrou mais promissora na separação da insulina do glucagon foi utilizando o metal níquel e eluição com gradiente degrau de pH. Esta condição foi avaliada na purificação de glucagon presente em duas frações do processamento industrial de insulina, a primeira rica em glucagon e uma segunda rica em insulina. O resultados mostraram um enriquecimento de glucagon em ambas as frações, sendo que um fator de purificação de glucagon de cinco foi obtido para a fração rica em insulina.

Palavras chave: IMAC, glucagon, insulina, cromatografia, adsorção.

ABSTRACT

Glucagon is a hormone that increases blood glucose concentration and is used as a pharmaceutical product mainly in cases of hypoglycemia associated with diabetes. Given both its importance and currently high cost, improved purification processes are on demand. Adsorption studies of glucagon and insulin on adsorbents of silica-IDA-Me²⁺ were carried out. By using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), we conducted tests aimed at purifying glucagon present in an industrial insulin processing fraction. This method of separation is based on the selective interaction of a metal ion with aminoacid residues (specially histidine) present on the protein surface. Preliminary, experiments in stirred tanks were performed in order to determine the kinetics, adsorption isotherm and the influence of pH and ionic strength on adsorption. Next, fixed bed chromatographic experiments with glucagon, insulin and a mixture of them was carried. Strong adsorption has been verified for all metals tested (Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺). The most promising condition for glucagon and insulin separation was using Ni²⁺ as the metal ligant and desorption with pH step gradient. Studies with two industrial insulin processing fractions under this condition, one glucagon-rich and another insulin-rich showed an increase in glucagon purity for both fractions with a purification factor of five for the latter fraction.

Key words: IMAC, glucagons, insulin, chromatography, adsorption.

Sumário

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1. GLUCAGON E SUA RELEVÂNCIA.....	1
1.2. OBJETIVO.....	2
CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DO GLUCAGON.....	5
2.2. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE GLUCAGON.....	6
2.3. PROPRIEDADES DA INSULINA.....	9
2.4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍON METÁLICO – IMAC.....	11
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. MATERIAIS.....	15
3.1.1. Glucagon, insulina e frações de processamento industrial.....	15
3.1.2. Adsorvente IMAC.....	16
3.1.3. Reagentes.....	16
3.1.4. Equipamentos.....	16
3.2. METODOLOGIA.....	17
3.2.1. Determinação de concentração de proteína.....	17
3.2.2. Estimativa da solubilidade do glucagon.....	17
3.2.3. Preparação do adsorvente IMAC.....	18
3.2.4. Ensaios de adsorção e dessorção em tanques agitados.....	18
3.2.5. Determinação da cinética e isoterma de adsorção.....	18
3.2.6. Estudo da influência do sal, pH e agente competidor na dessorção de glucagon.....	19
3.2.7. Ensaios cromatográficos IMAC.....	20
3.2.8. Determinação de glucagon e insulina por HPLC.....	20
3.2.9. Cromatografia de filtração em gel.....	21
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	23
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES.....	23
4.1.1. Estimativa da solubilidade do glucagon.....	23
4.1.2. Determinação do coeficiente de absorção a 280 nm.....	29
4.1.3. Cinética e isoterma de adsorção de glucagon.....	29
4.1.4. Influência do sal, pH e agente competidor na dessorção de glucagon.....	30
4.1.5. Conclusão dos ensaios em tanques agitados.....	36

4.2. CROMATOGRAFIAS IMAC COM GLUCAGON E INSULINA.....	38
4.2.1. Cromatografias com PCI-Cu ²⁺	40
4.2.1.1. Influência do sistema tamponante em cromatografia com PCI-Cu ²⁺	40
4.2.1.2. Influência do NaCl na eluição em cromatografia com PCI- Cu ²⁺	47
4.2.1.3. Cromatografias em PCI-Cu ²⁺ com eluição em gradiente degrau de imidazol.....	49
4.2.2. Cromatografias com PCI-Ni ²⁺	55
4.2.2.1. Cromatografias em PCI-Ni ²⁺ com Eluição em Gradiente Degrau de pH.....	55
4.2.2.2. Cromatografias em PCI-Ni ²⁺ com eluição em gradiente degrau de imidazol.....	60
4.2.3. Cromatografias com PCI-Zn ²⁺	64
4.2.3.1. Cromatografias em PCI-Zn ²⁺ com eluição em gradiente degrau de pH.....	64
4.2.3.2. Cromatografias em PCI-Zn ²⁺ com eluição em gradiente degrau de imidazol.....	70
4.3. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE GLUCAGON E INSULINA EM PCI- Ni ²⁺	73
4.4. CROMATOGRAFIAS IMAC COM FRAÇÕES DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DE INSULINA.....	78
4.4.1. Cromatografias em PCI-Ni ²⁺ com a fração G-70.....	78
4.4.2. Cromatografias em PCI-Ni ²⁺ com a fração I-70.....	84
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	89
5.1. CONCLUSÕES.....	89
5.2. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	91
CAPÍTULO 6:REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXO.....	99

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. GLUCAGON E SUA RELEVÂNCIA

O glucagon é um hormônio que tem aplicação relacionada com uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo, o diabetes, e é um produto de custo bastante elevado (cerca de US\$ 5.000,00/g, grau reagente da Sigma, FOB EUA, 1999). A principal função do glucagon no metabolismo é o controle, juntamente com a insulina, do nível de glicose sanguínea. Ele tem, assim, um efeito antagônico ao da insulina e daí surge sua principal aplicação médica: tratamento de casos de hipoglicemia aguda e também persistente (Smith *et al.*, 1983). O glucagon também tem sido usado no tratamento de pancreatites e de pacientes com problemas cardíacos que não respondem a infusões salinas. Além disso, glucagon é ativo como diurético, broncodilatador e na redução do nível de lípideos e do colesterol do sangue (Siltz e Jackson, 1977).

Glucagon é produzido nas células A do pâncreas e a estrutura primária da molécula humana é idêntica à estrutura da molécula bovina e suína, sugerindo uma aplicação direta para uso farmacêutico do glucagon extraído dessas fontes, como um sub-produto na purificação de insulina. Sua clonagem em bactérias já foi relatada na literatura (Ishizaki *et al.*, 1992). No entanto, enquanto existir a demanda de insulina produzida por fontes convencionais (pâncreas de animais), a produção de glucagon como subproduto da produção desta será adequada em termos de oferta potencial (Andrade *et al.*, 1997). No Brasil, país com matéria-prima farta para a produção de glucagon, pois é possuidor de um dos maiores rebanhos suínos e bovinos no mundo, não há produção comercial de

glucagon.

1.2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos de adsorção de glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺ (sílica contendo como quelante, o ácido iminodiacético, IDA, e como ligante um íon metálico), através da técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC), visando desenvolver um processo de purificação de glucagon a partir de fração de processamento industrial de insulina de pâncreas (bovino ou suíno).

Esta estratégia de purificação de glucagon não foi encontrada na literatura. O glucagon possui um requerimento básico para purificação por IMAC: histidina N-terminal e, dependendo das condições da solução, se encontra não como uma molécula estruturada tridimensionalmente, mas com uma estrutura não enovelada, distendida, o que indica que a histidina deve estar acessível para interação com o íon metálico imobilizado.

A presença de uma grande variedade de proteínas de baixa massa molecular no pâncreas, torna a purificação de glucagon uma tarefa difícil. Os processos de recuperação e purificação de glucagon são, em sua grande maioria, cromatográficos de multi-etapas envolvendo técnicas como troca iônica e permeação em gel ou técnicas mais avançadas tais como HPLC e cromatografia de troca de subunidades. Tais processos são de alto custo, cujo reflexo aparece no preço do produto final. É, assim, necessário o desenvolvimento de processos de recuperação e de purificação que utilizem operações mais eficientes possibilitando a obtenção de um produto final competitivo no mercado em preço e, principalmente, em pureza.

Como a insulina é a principal impureza presente nas frações de processamento a ser purificada, propôs-se fazer um estudo desta proteína separadamente e também da mistura do glucagon e insulina, objetivando determinar a condição mais promissora para a separação destas proteínas. Assim, o alcance destes estudos vai além da recuperação e purificação de glucagon de pâncreas: uma vez que a insulina pode ser considerada como uma proteína modelo de impureza, os dados a serem obtidos fornecem

informações para a possível aplicação da técnica IMAC na purificação destas proteínas produzidas por fontes recombinantes.

As etapas do trabalho se dividem em estudos preliminares em batelada e em coluna de cromatografia líquida de leito fixo.

Os estudos preliminares em batelada consistiram em:

1. Estimativa da solubilidade do glucagon nas condições requeridas para a cromatografia IMAC. O glucagon possui o ponto isoelétrico próximo do pH 7,0 e apresenta baixa solubilidade na faixa de pH entre 4 e 8. Por sua vez, a adsorção em IMAC é favorecida na faixa de pH entre 6 e 8, sendo de extrema importância a verificação da solubilidade do glucagon, principalmente em tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 (tampão de adsorção), na viabilização do uso da técnica IMAC.
2. Estudos preliminares de adsorção e dessorção, em tanques agitados, de glucagon de alta pureza em sílica-IDA-Cu²⁺, para obter a cinética, capacidade de adsorção e a influência do pH, da força iônica e da concentração do agente competidor imidazol na etapa de dessorção.

Os estudos em coluna de cromatografia líquida em leito fixo consistiram em:

3. Seleção do sistema tamponante e influência do sal NaCl nas cromatografias sílica-IDA-Cu²⁺.
4. Estudo de diferentes tipos de eluição (degrau de pH ou imidazol) do glucagon, insulina e da mistura destas duas proteínas adsorvidas em sílica-IDA-Cu²⁺.
5. Aplicação das melhores condições obtidas na etapa anterior nas cromatografias IMAC com Ni²⁺ e Zn²⁺ imobilizados.
6. Aplicação das melhores condições de separação cromatográfica da insulina do glucagon na purificação do glucagon presente em frações de processamento industrial, uma delas rica em glucagon e a outra rica em insulina.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DO GLUCAGON

A molécula de glucagon possui uma cadeia de 29 resíduos de aminoácidos que lhe conferem uma massa molecular de 3,5 kDa. Uma das características desta molécula é que as estruturas da molécula de fontes bovina, suína e humana são idênticas. A seqüência de aminoácidos da molécula de glucagon de fontes bovina, suína e humana (Smith *et al.*, 1983) é a seguinte:

His ⁽¹⁾ -Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr ⁽²⁹⁾

Kimball e Murlin, em 1924, foram os primeiros a notar uma ação hiperglicêmica em certos extratos pancreáticos, durante experimentos de purificação de insulina, e sugeriram o nome de glucagon para o agente causador. O interesse em se investigar essa molécula aumentou quando pesquisadores observaram que, após a aplicação de algumas preparações de insulina em pacientes diabéticos, ocorria inicialmente um efeito hiperglicêmico tal como uma hiperglicemia transiente. A principal função do glucagon é estimular o aumento da concentração de glicose no sangue, agindo em conjunto com a insulina para manter o nível normal de glicose no metabolismo.

O cérebro possui dependência absoluta de glicose como fonte de

energia. Quando o nível de glicose diminui abaixo do normal, é imprescindível que glicose seja recomposta no sangue. Desta forma, o glucagon exerce controle sobre dois caminhos metabólicos no fígado, fazendo que o órgão libere glicose para o resto do corpo. Em um dos caminhos metabólicos, o glucagon estimula a quebra de glicogênio armazenado no fígado. Quando o nível de glicose está alto, grande quantidade de glicose é mantida no fígado. Sob a influência da insulina, a maior parte desta glicose é armazenada na forma de glicogênio. Quando o nível de glicose começa a cair, o glucagon é excretado e age ativando enzimas que despolimerizam o glicogênio e liberam a glicose. Na outra rota metabólica, o glucagon ativa a gliconeogênese hepática. Gliconeogênese é o caminho pelo qual substratos que não contêm hexoses, tais como aminoácidos, são convertidos em glicose. Desta forma, o glucagon fornece outras fontes de glicose sanguínea.

Estudos de estrutura e função do glucagon realizados por Bromer *et al.* (1972) descrevem a presença, em amostras comerciais purificadas de glucagon, de uma molécula similar ao glucagon, o mono-desamidoglucagon, que apresenta uma atividade biológica e imunológica menor que o glucagon. A perda do grupamento amino aparentemente ocorre aleatoriamente em três glutaminas nas posições 3, 20 e 24, gerando uma mistura dos três isômeros. Acredita-se que a perda do grupamento amino ocorre durante a purificação do hormônio que requer condições extremas de pH (pH abaixo de 2,5 e acima de 10,5).

2.2. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE GLUCAGON

Os processos de RPB (Recuperação e Purificação de Bioprodutos) de glucagon são, na sua maioria, centrados em cromatografias e, geralmente, utilizam como alimentação extrato pancreático parcialmente purificado por um processo principal, produção de insulina. Também como característica comum apresentam etapas de dessalinização em colunas cromatográficas.

O primeiro experimento de purificação de glucagon realizado com sucesso foi feito por Staub *et al.* e publicado em 1953 e depois com mais

detalhes em 1955. Uma fração amorfa obtida durante a purificação comercial de insulina foi usada como material de partida. O procedimento de purificação utilizado consistiu em três etapas de precipitação, sendo que a última incluiu três diálises, e duas etapas de cristalização. Como este procedimento visava a purificação de glucagon para estudos de estrutura e função, o número de etapas utilizadas possivelmente inviabiliza sua aplicação em larga escala.

Um dos experimentos de purificação de glucagon realizado em 1972 por Bromer *et al.* utilizou colunas de DEAE-celulose na presença de tampão contendo uréia 7 M. Esse estudo objetivou prioritariamente a análise das propriedades das moléculas glucagon e monodesamidoglucagon, sendo que a fonte protéica utilizada foi glucagon já purificado, isto é, livre de insulina. Aproximadamente 89% da proteína recuperada constituía-se de glucagon altamente purificado, segundo análise em eletroforese e composição de aminoácidos e 10% era a monodesamidoglucagon.

Andrade *et al.* (1997), tendo como referência processos desenvolvidos por Pollock e Kimmel (1975), baseado em troca iônica, e por Cole (1960), que utilizou uréia para evitar associação de moléculas de glucagon entre si, implantaram em escala piloto um processo de purificação de glucagon em três etapas cromatográficas a partir de um sobrenadante de precipitação alcalina de produção de insulina. Este sobrenadante sofreu precipitação com sulfato de amônio e precipitação isoeletrica e, a seguir, foi submetido a uma série de etapas cromatográficas a saber: troca iônica na presença de uréia, dessalinização por filtração em gel e, novamente, troca iônica. O rendimento final foi de 50% com um fator de purificação de cerca de 81, obtendo-se um produto com 84% de pureza. Apesar desta purificação ser dita suficiente para a aplicação farmacêutica, a competição de mercado exige valores mais altos. A utilização de várias etapas cromatográficas diminuiu o rendimento do processo, sendo que a pureza de 84% possivelmente não justifica o número de etapas envolvidas.

Cromatografia de troca de sub-unidades foi considerada como um

processo para a purificação de glucagon por Carrea *et al.* (1985). Neste método, o glucagon puro foi imobilizado covalentemente em Sepharose e, então, exposto a uma solução contendo o glucagon que se desejava recuperar. A partir de uma auto-associação ocorria a interação do glucagon imobilizado com o glucagon a ser purificado presente em solução (extrato pancreático pré-tratado com carvão-dextran para eliminação de lipídeos). Recuperou-se glucagon com 90% de pureza e um rendimento de aproximadamente 60%. Como desvantagens deste processo podemos citar a baixa estabilidade da ligação glucagon-Sepharose, sendo que 40% do glucagon imobilizado desprende-se da matriz quando esta era ativada com cianeto de bromo, após apenas 8 dias de utilização. Outra desvantagem é o custo inicial associado ao glucagon, além do dispendioso tempo e trabalho envolvido na preparação da matriz.

Um processo de recuperação de glucagon da fração de processamento de insulina utilizando cromatografia em adsorvente Amberlite XAD-7 foi desenvolvido por Angelova e Dimov (1996). A etapa de adsorção foi realizada em coluna com elevada concentração de sal e a etapa de dessorção foi realizada com gradientes de misturas de etanol e cloreto de sódio 0,1 M ajustada a um pH entre 9,8 e 10. A dessalinização do glucagon obtido foi feita no mesmo tipo de adsorvente. O glucagon foi então cristalizado e caracterizado biologicamente. A atividade hiperglicêmica obtida, 1,08 IU/mg, foi bem próxima a do glucagon padrão utilizado, 1,10 IU/mg. Os autores não apresentam dados de recuperação e pureza do glucagon e, portanto não é possível avaliar a viabilidade deste processo em larga escala.

Um processo não cromatográfico de purificação de glucagon recombinante (produto de fusão com interferon produzido como corpos de inclusão) expressado em *Escherichia coli* foi desenvolvido através de precipitação isoeletrica a 4 °C, pH 6,5 por 18 hs (Okamoto *et al.*, 1995). Em seguida, o glucagon parcialmente purificado foi cristalizado e finalmente analisado em HPLC comprovando uma pureza de 99,5%. Entretanto, este procedimento depende da estrutura da proteína de fusão,

sendo que sua aplicação quando se têm outras fontes não é explicitada.

Kim *et al.* (1996) também sintetizaram glucagon por via recombinante como um produto de fusão (porção N-terminal do fator alfa de necrose de tumor humano) e desenvolveram um processo de purificação, que além da etapa de HPLC, continha uma etapa de precipitação isoelétrica a pH 6,0 com 80% de rendimento nesta etapa. A desvantagem deste processo está associada ao HPLC preparativo que eleva consideravelmente os custos do processo.

Não foram encontrados estudos na literatura envolvendo a adsorção de glucagon em adsorventes IMAC, devido possivelmente à baixa solubilidade desta molécula na faixa de pH tradicionalmente utilizada para a etapa de adsorção e por ser esta técnica cromatográfica relativamente nova quando comparada à troca-iônica e permeação em gel.

2.3. PROPRIEDADES DA INSULINA

Sendo a insulina a principal impureza da fração de processamento a ser utilizada para a purificação de glucagon, torna-se necessário um estudo sobre algumas de suas características físico-químicas.

A insulina é uma proteína globular pequena de massa molecular 5,7 kDa e pouco solúvel em água no seu ponto isoelétrico, pH 5,4. O hormônio ativo possui duas cadeias de polipeptídeos, as cadeias A e B, com 21 e 30 resíduos em cada uma, respectivamente. A sequência de aminoácidos da molécula humana difere em apenas um aminoácido da molécula de fonte suína, o aminoácido C-terminal da cadeia B. A Figura 2.1 ilustra a sequência de aminoácidos da estrutura de insulina de fonte suína.

A insulina é normalmente armazenada no organismo na forma de hexâmeros, que consistem em seis moléculas de insulina estabilizadas por dois átomos de zinco. O estado de agregação da insulina em solução não é homogêneo, mas uma mistura de diferentes oligômeros (Torres *et al.*, 1998). Segundo Blundell *et al.* (1972) o hexâmero encontrado em cristais de insulina é o mesmo observado em solução de insulina e possui o grupo imidazol do resíduo de histidina B10 exposto ao solvente.

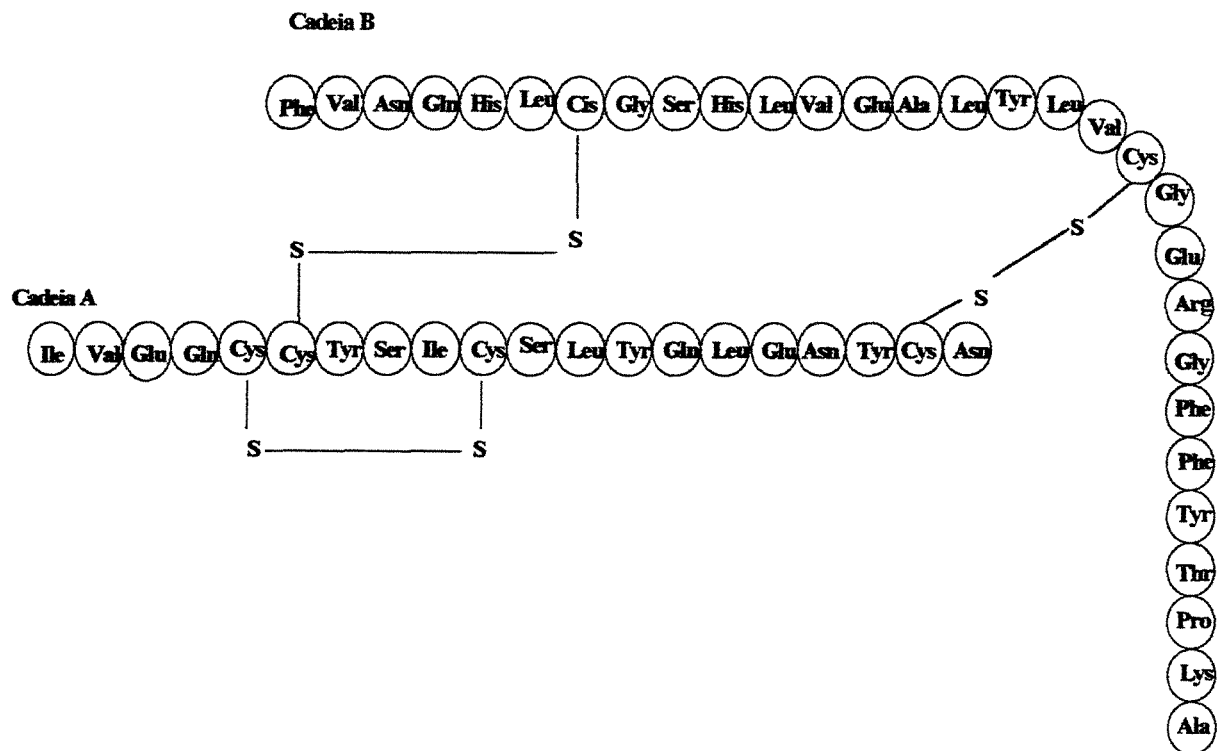


Figura 2.1. Cadeias A e B da sequência de aminoácidos da insulina de fonte suína (Adaptado de Gary e Headon, 1994).

Smith *et al.* (1988) sugerem que este grupo é o responsável pela interação da pró-insulina em experimentos de IMAC-Ni²⁺. Estes autores utilizaram a pró-insulina com uma cauda de His-Trp como um modelo de proteína recombinante modificada para interagir com íons metálicos e com isso poder ser purificada pela técnica IMAC. Foram testadas as pró-insulinas de fonte natural e a recombinante com cauda de His-Trp e ambas proteínas adsorveram em matriz 4% agarose-IDA-Ni²⁺. Porém, a pró-insulina recombinante apresenta uma afinidade maior pelo ligante que é atribuída a forte interação da cauda de His-Trp com o íon metálico Ni²⁺ quando comparada à afinidade do sítio interação com metais endógeno da pró-insulina, a histidina B10.

Grant *et al.* (1972) concluíram que a conformação da insulina na molécula de pró-insulina é a mesma da molécula livre de insulina. Baseado nestas informações, pode-se sugerir que o grupamento B10 seja também o responsável pela interação da insulina em IMAC.

2.4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍON METÁLICO IMOBILIZADO - IMAC

A técnica de cromatografia "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography" (IMAC) baseia-se na separação de proteínas através da interação destas com íons metálicos imobilizados em um suporte sólido. A técnica foi inicialmente desenvolvida por Porath (1975) e é atualmente utilizada como um método de cromatografia de afinidade aplicável à uma grande variedade de biomoléculas e tem sido recentemente bastante utilizada na purificação de proteínas produzidas por vias recombinantes, principalmente através da incorporação de caudas de histidina na porção N-terminal das proteínas (Zhang *et al.*, 2000; Gibert *et al.*, 2000; Gabert-Porekar *et al.*, 1999 e Smith *et al.*, 1988).

A histidina é o grupamento de maior importância na retenção de proteínas por IMAC, seguida pela cisteína e pelo triptofano. As interações destes resíduos ocorrem através de uma coordenação entre um par de elétrons do grupamento aminoácido e o metal. Em associações envolvendo

histidina, o nitrogênio do anel imidazol é o grupo doador de elétrons possíveis de coordenação com o metal (Wong *et al.*, 1991; Beitle e Atai, 1992 e Vijayalakshmi, 1989). O quelato metálico imobilizado se encontra altamente solvatado por moléculas de água possuindo assim elevado número de grupos hidroxila na sua vizinhança. No caso de adsorventes IDA-Cu²⁺, sabe-se que o quelato apresenta uma rede de cargas negativas, sugerindo a participação de interações eletrostáticas ou indução de cargas envolvendo resíduos de aminoácidos positivamente carregados, tais como arginina, na associação da proteína com o quelato (Vijayalakshmi, 1989).

Existe uma série de vantagens da utilização de IMAC em relação aos demais métodos de cromatografia por afinidade. Uma delas, é a versatilidade do adsorvente, uma vez que diferentes ligantes (íons metálicos) podem alternadamente ser imobilizados num mesmo suporte. Os metais podem ser facilmente removidos da coluna através de uma lavagem utilizando-se ácido etileno-diamino-tetrácético (EDTA) e o adsorvente ser completamente recuperado sem perder sua funcionalidade (um determinado adsorvente pode ser regenerado centenas de vezes sem perda substancial da capacidade quelante e sem alto risco de contaminação microbiológica) (Porath, 1988; Wong *et al.*, 1991)

A imobilização dos íons metálicos ocorre através de um agente quelante covalentemente imobilizado ao suporte. O agente quelante mais utilizado é o ácido iminodiacético (IDA) que é um quelante tridentado, isto é, forma complexo com o metal ocupando três sítios de coordenação. Assim, no caso de íons hexacoordenados, com três sítios ocupados, outros três ficam disponíveis para ligação com a proteína.

Em princípio todos os metais susceptíveis de interagir com as proteínas podem ser utilizados em IMAC. No entanto, os íons metálicos mais utilizados são Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Ca²⁺ e Zn²⁺. Normalmente, íons Fe³⁺ e Al³⁺ são utilizados para separar fosfoproteínas e o íon Ca²⁺, com preferência de ligação com oxigênio, pode ser selecionado para a separação de proteínas contendo grupamentos carboxílicos.

Sulkowski (1989) determinou regras que governam a interação histidina-IDA com os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Co^{2+} :

- a) A presença de, pelo menos, um resíduo de histidina disponível para a coordenação é suficiente para a retenção da proteína em um adsorvente IDA- Cu^{2+} .
- b) A presença de dois resíduos de histidina disponíveis para a coordenação resulta em uma retenção mais forte da proteína em um adsorvente IDA- Cu^{2+} .
- c) A presença de dois resíduos de histidina acessíveis é requerida para a retenção em um adsorvente IDA- Ni^{2+} .
- d) A presença de dois resíduos de histidina espacialmente localizadas em uma α -hélice e separadas por dois ou três aminoácidos é requerida para a retenção em adsorventes IDA- Zn^{2+} e IDA- Co^{2+} .
- e) A retenção de uma proteína possuidora de dois resíduos de histidina vicinais será mais forte, em todas os adsorventes IDA- Me^{2+} em relação a retenção de uma proteína que possui dois resíduos de histidina bem espaçados na estrutura tridimensional.
- f) A força de retenção das proteínas nos íons metálicos segue a seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Co}^{2+}$.

Sidenius *et al.* (1999), explorando a diferença em força de retenção de diferentes metais para a separação de proteínas com características semelhantes, testaram diferentes metais e conseguiram a separação da proteína alvo, selênio-proteína P usando o metal cobalto.

A adsorção de proteínas em IMAC é normalmente conduzida a um pH no qual o grupo doador de elétrons, responsável pela interação com o íon metálico, esteja parcialmente desprotonado. Para proteínas possuidoras de histidinas, por exemplo, a seletividade para adsorção é favorecida a uma faixa de pH de 6,0 a 8,0. Além de pH, a força iônica é também uma variável importante na adsorção em IMAC. Concentrações altas de sal (normalmente em NaCl 1,0 M) devem ser consideradas para evitar interações não-específicas e aumentar a seletividade, uma vez que a presença de sal aumenta a estabilidade do complexo proteína-metal (Beitle

e Ataai, 1992 e Vijayalakshmi, 1989). A presença de eletrólitos, além de diminuir interações não-específicas, diminui o efeito da solvatação do íon metálico por moléculas de água, facilitando o processo de adsorção da proteína.

A remoção de moléculas retidas nos interstícios ou adsorvidas não especificamente faz-se através de uma lavagem do adsorvente com o próprio tampão de adsorção. Após etapa de lavagem, a molécula de interesse pode se eluir por três diferentes procedimentos: 1) através de abaixamento de pH; 2) adicionando-se um agente competitivo com estrutura similar à do resíduo de aminoácido da proteína envolvido na interação com o ligante e 3) deslocando-se o complexo metal-proteína, através de adição de um agente quelante.

O primeiro dos referidos métodos, protonação, é o mais utilizado e consiste no abaixamento de pH do meio. Com a presença de íons H^+ , ocorre uma protonação dos grupos doadores de elétrons na superfície da proteína e assim sua interação com o ligante metálico é enfraquecida e a proteína é deslocada para a fase móvel. No segundo método, adição de um agente competidor, as proteínas são eluídas em pH quase neutro através da adição de agentes competidores (histidina ou imidazol). No terceiro método, regeneração, faz-se passar através da coluna uma solução de agente quelante capaz de excluir o complexo metal-proteína da fase estacionária. O agente quelante mais utilizado é o EDTA. O método da regeneração não é seletivo, pois a interação desestabilizada pelo quelante adicionado é aquela entre suporte e metal e não entre metal-proteína.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Glucagon, insulina e frações de processamento industrial

As proteínas glucagon e insulina (suína e bovina) de alta pureza e a fração de processamento de insulina foram fornecidas pela Biobrás S/A (Montes Claros, MG):

- O glucagon, lote LIF2-001, produzido em março de 1997, tem uma pureza de 93,74%, segundo análise em HPLC realizada na Biobrás S/A.
- A insulina suína foi fornecida na forma de cristais e possui uma pureza de 96,57%, segundo análise em HPLC realizada na Biobrás S/A.
- A fração de processamento de insulina, rica em glucagon, lote GTB 0011, produzida em agosto de 1999, tem uma porcentagem de glucagon de cerca de 70%, segundo análise em HPLC realizada neste trabalho. Esta fração é chamada neste trabalho de “fração G-70”.
- A fração de processamento de insulina, rica em insulina, lote GSB 002, produzida em maio de 1999 é chamada de “fração I-70” neste trabalho. Esta fração é obtida na etapa de precipitação isoelétrica de glucagon em pH 7,0.

3.1.2. Adsorvente IMAC

A matriz IMAC utilizada, Prosep® Chelating I (Bioprocessing, Inglaterra) é chamada neste trabalho de PCI. Esta matriz é constituída, segundo o fabricante, de partículas de sílica porosa na faixa de 75 a 125 micra de tamanho de partícula com uma estreita distribuição de tamanho de poros (80% dos poros estão entre 10% do diâmetro nominal, cujo valor não é fornecido) e possui o agente quelante ácido iminodiacético (IDA) imobilizado. Este adsorvente possui uma estabilidade de pH na faixa de 1 a 9 e segundo o fabricante, PCI se mantém estável por repetidos ciclos operacionais, podendo ser usada em colunas de leito fixo, fluidizado e também em tanques agitados.

A matriz PCI possui densidade de 0,45 g/ml, determinada por Tamagawa (1999), capacidade de ligantes para íons cobre de 57 mM/ml e capacidade de adsorção de β -lactoglobulina em PCI-Cu²⁺ de 41 mg/ml, conforme o certificado de controle de qualidade fornecido pelo fabricante.

3.1.3. Reagentes

Para a preparação do tampão fosfato de sódio foi utilizado o fosfato monobásico e o dibásico da marca LabSynth (Brasil) e cloreto de sódio da marca Ecibra (Brasil). Os sulfato de cobre, de níquel e de zinco e o EDTA foram da Merck (Alemanha) e o imidazol da marca Sigma (EUA). A acetonitrila utilizada nas análises de HPLC foi marca Tedia (EUA). Todos os demais reagentes utilizados no decorrer deste trabalho foram de grau analítico.

3.1.4. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho foram um sistema de cromatografia líquida de baixa pressão composto por uma bomba peristáltica Minipuls 3 da marca Gilson (França), um monitor de UV modelo EM-1, um registrador modelo 1327 e um coletor de frações modelo 2110 (todos três da Bio-Rad, EUA). O acompanhamento da absorbância a 280 nm das frações coletadas durante a cromatografia

líquida foi feito em um espectrofotômetro DU 650 da Beckmam (EUA). A análise de cromatografia de alto desempenho de frações foi realizada em um sistema de HPLC da Shimadzu (Japão) composto por duas bombas LC-10 AD, um detector de UV- visível SPD-10AV e um integrador C-R6A. A água utilizada em todos os experimentos foi água ultra pura deionizada obtida de um equipamento Milli-Q System da Millipore (EUA).

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Determinação de concentração de proteína

A concentração de proteína em solução foi determinada por absorção a 280 e 320 nm. A medida da absorbância a 320 nm é feita para eliminar a possível influência da turbidez, segundo Gehle e Schügerl (1984). Foram determinados os coeficientes de absorção para a insulina suína e para o glucagon nos dois métodos de análise.

3.2.2. Estimativa da solubilidade do glucagon

Para determinar a concentração máxima de glucagon em solução que se poderia trabalhar nas condições impostas pela técnica IMAC, realizou-se alguns experimentos com glucagon em tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0, que foi o tampão de adsorção utilizado em todos os experimentos realizados. A solução-mãe de glucagon foi, primeiramente, preparada dissolvendo o glucagon em ácido fosfórico 0,05 M, pH final de 3,0 e as diluições foram realizadas com o tampão de adsorção em pH 9,0 a fim de obter um pH final de 7,0. As amostras em diferentes concentrações de glucagon foram preparadas em duplicata e mantidas sob agitação durante duas horas. Após este intervalo de tempo uma série de amostras foi centrifugada por 10 minutos a 4300 g e a outra série não foi centrifugada. Fez-se a medida da absorbância a 280 nm e 320 nm para as duas séries de amostras.

3.2.3. Preparação do adsorvente IMAC

O procedimento de quelação do adsorvente PCI seguiu o protocolo convencional de manuseio de adsorventes IMAC sugerido pelo fabricante e que se constitui em lavar o adsorvente com cinco volumes de água deionizada para eliminar contaminantes ou solução de regeneração, em seguida, saturá-lo com solução do íon metálico requerido, lavá-lo com cinco volumes de água deionizada para extrair traços de metal, lavá-lo com cinco volumes de tampão de dessorção para eliminar traços de proteína e, por último, lavá-lo novamente com no mínimo dez volumes de tampão de adsorção para acondicionamento do adsorvente com as condições de adsorção. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultra pura e degaseificadas previamente ao uso. A regeneração do adsorvente foi feita através de lavagem com solução 50 mM de EDTA com NaCl 1,0 M e pH 8,0, a qual proporciona eluição total dos íons metálicos do adsorvente.

3.2.4. Ensaios de adsorção e dessorção em tanques agitados

Nos estudos preliminares de adsorção e dessorção, foram utilizadas massas da ordem de 5,0 mg de adsorvente em tanques agitados (seringas de 3,0 ml contendo filtros acoplados no seu interior, de maneira a se reter as partículas do adsorvente e permitir a passagem das soluções por sucção e ejeção). A agitação foi feita através de movimentos rotacionais das seringas acopladas a um rotor de 10 cm de diâmetro, encaixado ao eixo de um motor, girando a 10 rpm.

3.2.5. Determinação da cinética e isoterma de adsorção

Massas da ordem de 10,0 mg de adsorvente foram quelatadas com o íon metálico e devidamente acondicionadas no tampão de adsorção, tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7, dentro dos tanques agitados (seringas de 3,0 ml). Volumes de 1,0 ml de soluções protéicas foram adicionados às seringas e estas mantidas sob agitação durante intervalos crescentes de tempo. As concentrações finais das soluções foram determinadas por medidas de absorbância a 280 nm e,

após determinado tempo, observando-se que elas se mantinham constantes, determinou-se o tempo de equilíbrio do sistema.

A isoterma de adsorção de glucagon foi realizada nas mesmas condições da determinação da cinética de adsorção. Massas de adsorvente da ordem de 5,0 mg foram adicionadas às seringas e após o preparo do adsorvente, como descrito no item 3.2.3, 1,0 ml de solução de glucagon em diferentes concentrações foram succionadas e mantidas sob agitação durante 30 minutos. O tampão de adsorção utilizado foi tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0. A concentração de proteína adsorvida foi calculada pela diferença entre a concentração inicial e a concentração de proteína no equilíbrio.

3.2.6. Estudo da influência de sal, pH e agente competidor na dessorção de glucagon

A influência destes três fatores foi analisada separadamente para determinar quais as melhores condições de dessorção do glucagon adsorvido na matriz IMAC utilizada. Primeiramente foi realizado um experimento para avaliar a influência do pH e da presença de 1,0 M NaCl no tampão de dessorção. Uma solução de glucagon de 0,5 mg/ml em tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 foi preparada e 1,0 ml desta solução succionado em seringas contendo aproximadamente 5,0 mg de PCI carregada com Cu^{2+} . Após 30 minutos de agitação, fez-se a ejeção da solução e mediu-se a absorbância a 280 nm para determinar a concentração de proteína em equilíbrio. Para a dessorção do glucagon que ficou adsorvido na matriz utilizou-se tampão fosfato 20 mM pH 5,1 com e sem NaCl 1,0 M, tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 com e sem NaCl 1,0 M e tampão glicina-HCl 20 mM pH 2,1 com e sem NaCl 1,0 M. A partir desses dados, calculou-se a porcentagem média de glucagon removida em cada sistema.

Para se avaliar a influência do agente competidor imidazol na dessorção de glucagon utilizou-se o mesmo procedimento de preparação da amostra descrito anteriormente. Após a quelação da matriz com o metal

Cu^{2+} , lavou-se a matriz com solução tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0M pH 7,0 contendo 100 mM de imidazol e equilibrou-se a matriz com o tampão de adsorção com 2 mM de imidazol. A dessorção foi feita com o mesmo tampão de adsorção contendo 30, 50 ou 100 mM de imidazol.

3.2.7. Ensaios cromatográficos IMAC

As cromatografias IMAC foram realizadas acoplando-se uma coluna C5/5 da Amersham Pharmacia Biotech (Suécia) contendo o adsorvente PCI a um sistema de cromatografia à baixa pressão. A coluna contendo aproximadamente 1,0 ml do adsorvente PCI foi preparada como descrito no item 3.2.3. Após a quelação, fez-se o equilíbrio com tampão de adsorção a temperatura ambiente. Na etapa de adsorção, alimentou-se a coluna com um volume de amostra de 5 ou 10 ml e fez-se a lavagem com tampão de adsorção. A etapa de dessorção foi realizada com tampões através do uso de um gradiente de pH ou agente competidor imidazol. Durante todo o processo, foram coletadas frações de 1,0 ml de volume e a vazão utilizada na maioria dos experimentos foi de 0,35 ml/min. Foram testados diferentes metais imobilizados (Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}) na matriz PCI, objetivando uma separação do glucagon de sua principal impureza, a insulina. Em alguns ensaios as frações coletadas durante a etapa de regeneração foram submetidas a uma troca de tampão para viabilizar a medida de absorbância a 280 nm. Para tal, utilizou-se colunas de filtração em gel pré-empacotadas com gel Sephadex G25 da Amersham Pharmacia Biotech (Suécia) e como eluente tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 3,0. Os ensaios utilizando as frações de processamento industrial da insulina foram realizados com o íon metálico Ni^{2+} e eluição com gradiente degrau de pH.

3.2.8. Determinação de glucagon e insulina por HPLC

As análises da mistura de glucagon e insulina foram realizadas em um sistema de HPLC da Shimadzu (Japão). Foi utilizada uma coluna de fase reversa C_{18} Asahipack ODS-H série STR da Shimadzu (Japão). Esta

coluna é recheada com sílica de diâmetro de partícula de 5 μm e possui 4 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento. A eluição das proteínas foi realizada com um gradiente descontínuo. Como eluente da fase móvel A foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 3,1 e como fase móvel B, 50% de acetonitrila na fase móvel A. A detecção foi feita por medida de absorção a 220 nm.

3.2.9. Cromatografia de filtração em gel

A cromatografia de filtração em gel foi utilizada para remover o zinco presente nas amostras de insulina purificadas. Neste experimento utilizou-se o gel Sephadex G-50 da Sigma (EUA). Como tampão de equilíbrio e corrida utilizou-se tampão fosfato 20 mM a pH 3,0. A coluna utilizada foi uma coluna de cromatografia líquida da Sigma (EUA) de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento. Esta coluna foi acoplada no sistema de cromatografia de baixa pressão e a vazão utilizada para arraste da amostra foi 0,5 ml/min. A remoção do zinco da amostra de insulina foi confirmada através da análise em espectrofotômetro de absorção atômica 905 AA da GBC (Austrália) do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Catalíticos da FEQ, Unicamp.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ENSAIOS PRELIMINARES

4.1.1. Estimativa da solubilidade do glucagon

Este experimento foi realizado para determinar a solubilidade do glucagon no tampão utilizado nos procedimentos de adsorção em cromatografia IMAC, tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M a pH 7,0. Primeiramente realizou-se um experimento para avaliar a solubilidade do glucagon em função do pH. O glucagon foi dissolvido em solução de ácido fosfórico 0,05 M, pois a solubilidade do glucagon é maior em pH ácido e alcalino e, segundo Staub *et al.* (1955), o ponto isoelétrico do glucagon está aproximadamente entre o pH 7,5 e 8,5. Preparou-se 10 diluições desta solução-mãe, na concentração de 1,0 mg/ml utilizando o tampão fosfato 20 mM a diferentes valores de pH. As amostras ficaram em agitação durante duas horas e em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 4300 *g*. Este experimento foi depois repetido com a adição de 1,0 M de NaCl nos tampões.

A Figura 4.1 apresenta os resultados da medida de absorbância a 280 nm destas soluções após a centrifugação, com e sem a presença de 1,0 M NaCl, em função do pH. Muito embora o tempo de duas horas não tenha sido determinado a partir de um estudo cinético que garantisse uma condição de equilíbrio, este tempo é longo o suficiente para se conseguir uma solubilidade aparente do glucagon nas condições dos ensaios.

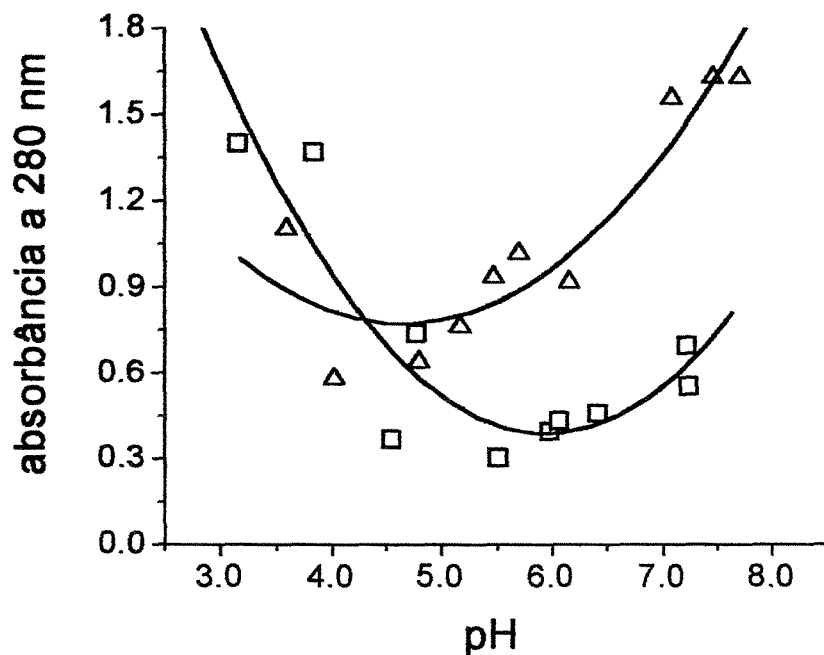


Figura 4.1. Curva de solubilidade do glucagon em função do pH do tampão fosfato de sódio 20 mM sem NaCl (□) e com 1,0 M de NaCl (Δ). Suspensão inicial com 1,0 mg/ml de glucagon. Valores de absorbância medidos após agitação por duas horas a temperatura ambiente e centrifugação a 4300 g por 10 minutos.

Os dados apresentados para as duas condições indicam que o ponto de mínimo da curva para a solução sem o sal NaCl é menor e também em um pH diferente do ponto de mínimo da curva para a solução com NaCl 1,0 M. Isto indica que a presença do sal favorece a solubilidade do glucagon, especialmente no pH em que realizou-se a adsorção em IMAC, pH 7,0. A absorbância a 280 nm a pH 7,0 é de aproximadamente 1,4 para o tampão com sal e de aproximadamente 0,5 para o tampão sem sal.

Segundo Rothstein (1994), quando a concentração de um determinado sal aumenta, aumentando portanto, a força iônica da solução, a solubilidade também aumenta (salting-in) e o pH de solubilidade mínima diminui. Entretanto, essas mudanças não são totalmente dependentes da força iônica, mas são fortemente relacionadas ao ânion do sal no meio. Os íons em solução irão mudar a carga da proteína e, conseqüentemente, sua solubilidade. A ligação de um ânion simples, tal como Cl^- , a um sítio positivo da proteína irá reduzir o número total de cargas positivas, reduzindo o pI e o pH de solubilidade mínima. Essa explicação se adequa aos resultados obtidos, sugerindo também que a solubilidade obtida neste experimento é válida somente para esta condição.

A solubilidade do glucagon em tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 foi também avaliada em um experimento no qual mediu-se a variação da absorbância a 280 e 320 nm de suspensões em diferentes concentrações de glucagon. Neste experimento, preparou-se diferentes concentrações de glucagon, em duplicata, e estas suspensões ficaram em agitação durante duas horas. Uma das séries de suspensões foi submetida a centrifugação por 10 minutos a 4300 g e a outra série não foi centrifugada. Mediu-se a absorbância a 280 nm e a 320 nm do sobrenadante da centrifugação e das suspensões não centrifugadas e os resultados são apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3 para as soluções centrifugadas e não centrifugadas, respectivamente. O experimento com centrifugação (Figura 4.2) mostrou que as partículas presentes na suspensão foram eliminadas, resultando numa absorbância a 320 nm bem

próxima de zero, não sendo possível determinar quando começa a aparecer material precipitado, pois só com este experimento não foi possível concluir se o “plateau” obtido é devido ao fato da curva de extinção molar ter atingido o ponto de limite de linearidade ou o glucagon não se dissolve mais nestas condições.

Já o experimento em que as suspensões não são centrifugadas (Figura 4.3) mostra o aparecimento de material particulado, ou seja, passou do limite de solubilidade. Porém, este experimento pode apresentar possíveis desvios, pois a mobilidade das partículas em suspensão geram instabilidade na medida de absorbância. Portanto, os dois experimentos se complementam na análise dos resultados, permitindo concluir que a curva de absorbância a 280 nm da Figura 4.2 atinge um “plateau”, porque não se dissolve mais glucagon nestas condições.

Através da análise da Figura 4.2 pode-se estimar que a solubilidade de glucagon neste tampão está entre 0,50 e 0,75 mg/ml, pois neste intervalo é que começa a se formar um “plateau” na absorbância a 280 nm e conseqüentemente na diferença entre as absorbâncias de 280 nm e 320 nm. Quanto aos dados do experimento em que as suspensões não foram centrifugadas (Figura 4.3), observa-se que os valores de absorbância a 280 nm começam a sair da linearidade também nesta faixa, tendo um aumento da absorbância a 320 nm mais significativo em 1,0 mg/ml de glucagon, indicando uma presença maior de material particulado. Como no decorrer deste trabalho a solução de glucagon precisa estar sempre livre de qualquer precipitado, tomou-se como limite de concentração 0,55 mg/ml de glucagon neste tampão.

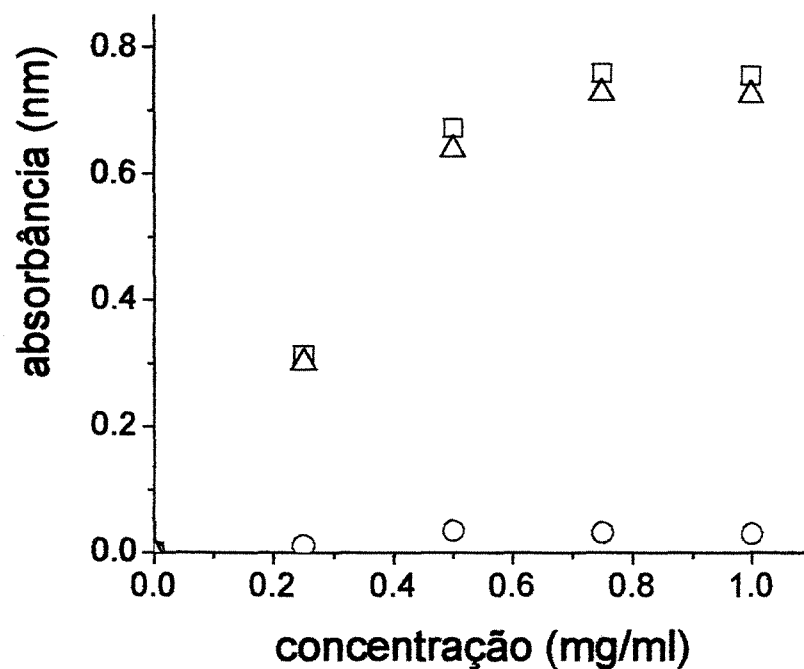


Figura 4.2. Variação da absorbância em função da concentração de glucagon em tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. Amostras centrifugadas por 10 minutos a 4300 g. □ - absorbância a 280 nm, ○ - absorbância a 320 nm, Δ - diferença entre as absorbâncias a 280 e 320 nm.

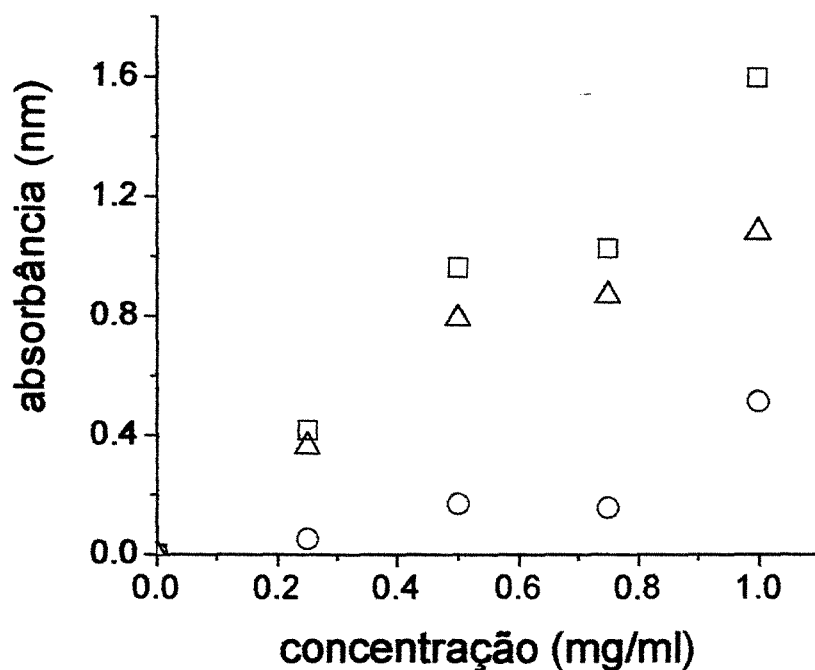


Figura 4.3. Variação da absorbância em função da concentração de glucagon em tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. Amostras não foram centrifugadas. □- absorbância a 280 nm, ○- absorbância a 320 nm, Δ- diferença entre as absorbâncias a 280 e 320 nm.

4.1.2. Determinação do coeficiente de absorção a 280 nm

Para estimar a concentração de proteína em solução determinou-se o coeficiente de absorção específica para o glucagon e também para a insulina suína. O tampão utilizado no preparo destas soluções foi o tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0. O coeficiente de extinção obtido para o glucagon foi 1,35 cm²/mg para a faixa de concentração na linearidade de 0,1 a 0,5 mg/ml com coeficiente de correlação de 0,999 e para a insulina suína 0,96 cm²/mg para a faixa de concentração na linearidade de 0,1 a 1,0 mg/ml com coeficiente de correlação de 0,999.

4.1.3. Cinética e isoterma de adsorção de glucagon

Determinou-se o tempo necessário para que o equilíbrio entre a solução de glucagon e a matriz PCI carregada com íons Cu²⁺ fosse atingido utilizando seringas como tanques agitados. Massas de PCI da ordem de 10,0 mg foram preparadas conforme descrito no item 3.2.3 e 1,0 ml de solução de glucagon em tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 e pH 7,0 na concentração inicial de 0,3 mg/ml foram succionadas para o interior das seringas. Durante intervalos de tempo crescentes, uma das seringas tinha sua solução ejetada e a concentração de glucagon em solução determinada através da medida da absorbância a 280 nm. A Figura 4.4 mostra a cinética de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺. Pode-se observar que o equilíbrio é atingido em um tempo relativamente pequeno, isto é, a partir de 5 minutos de agitação a concentração de glucagon em solução não varia significativamente. Estabeleceu-se como 30 minutos o tempo necessário para que o equilíbrio fosse atingido nos experimentos seguintes.

Para a determinação da isoterma de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ utilizou-se seringas como tanques agitados. Massas de adsorvente da ordem de 5,0 mg foram preparadas conforme descrito no item 3.2.3. Soluções de glucagon em diferentes concentrações iniciais foram succionadas para o interior das seringas e estas mantidas em agitação durante 30 minutos. Após este intervalo de tempo as amostras foram

ejetadas e a concentração em equilíbrio determinada através da medida de absorbância a 280 nm. Os valores de capacidade foram calculados pela diferença entre a massa inicial de glucagon em solução e a massa final em solução dividida pela massa de adsorvente em cada seringa. A isoterma de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ à temperatura ambiente é apresentada na Figura 4.5. Este experimento nos permitiu estimar o valor da capacidade máxima de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ nas condições testadas, aproximadamente 30 mg de glucagon/ml de matriz PCI-Cu²⁺ (massa seca), conforme a leitura no gráfico da Figura 4.5.

A isoterma de adsorção nos mostra um “plateau” bem definido, porém o modelo de Langmuir, que é normalmente utilizado para descrever a adsorção de proteínas, não se ajustou bem aos dados experimentais. Segundo Vunnum *et al.* (1995), este modelo nem sempre é ajustável a adsorção em matrizes IMAC devido a dois fenômenos importantes que divergem das hipóteses do modelo de Langmuir. O primeiro deles é relacionado a possibilidade de formação de múltiplas ligações de coordenação quando a proteína é exposta a um íon metálico imobilizado. O segundo fenômeno está associado ao fato da capacidade de adsorventes IMAC para proteínas ser geralmente menor do que para moléculas menores. Isto pode ser o resultado de ligações múltiplas, mas alguns resultados experimentais também sugerem que a proteína bloqueia alguns sítios de interação do metal.

4.1.4. Influência do pH, força iônica e agente competidor na dessorção de glucagon

A influência do pH e da força iônica na dessorção de glucagon foi avaliada para determinar quais as melhores condições para eluir a proteína adsorvida. Este experimento foi realizado em seringas simulando tanques agitados. Massas da ordem de 5,0 mg de PCI foram preparadas, em duplicatas, como descrito no item 3.2.3 e quelatadas com íons Cu²⁺.

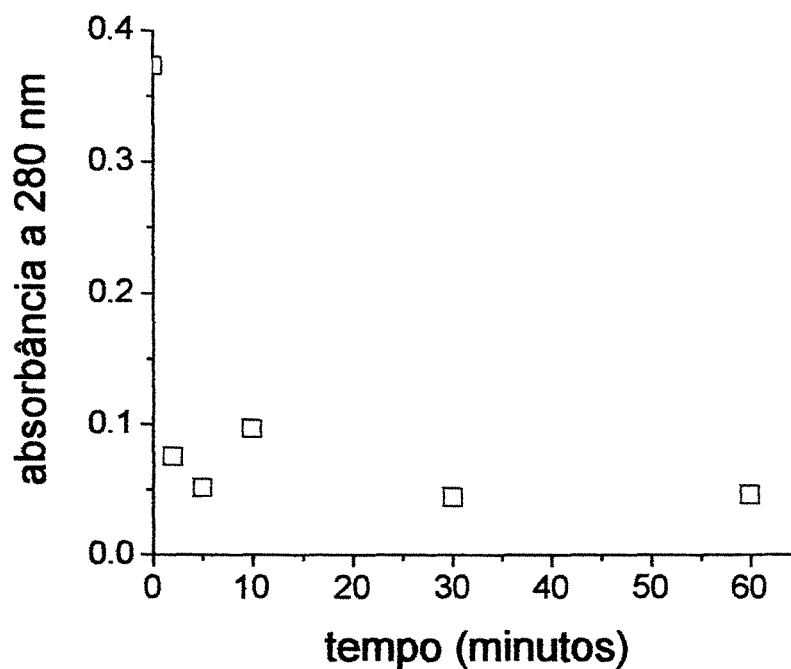


Figura 4.4. Cinética de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ e tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0 para os ensaios em tanques agitados a temperatura ambiente.

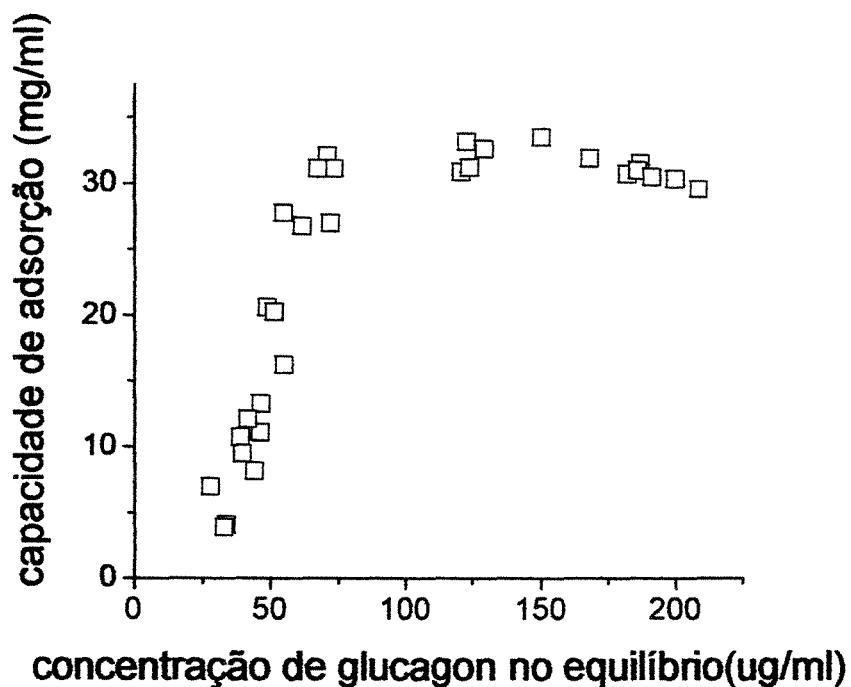


Figura 4.5. Isoterma de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ a temperatura ambiente. Solução tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M a pH 7,0. Ensaio em tanques agitados com 5,0 mg de PCI e volume de solução de 1,0 ml.

Após o equilíbrio da matriz, injetou-se 1,0 ml de solução de glucagon dissolvido no tampão de adsorção (tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0) na concentração inicial de 0,54 mg/ml. As seringas foram mantidas em agitação por 30 minutos e após esse intervalo de tempo, a solução protéica foi ejetada e fez-se a lavagem da matriz com o mesmo tampão de adsorção. Na dessorção testou-se o tampão fosfato 20 mM a pH 5,1 com 1,0 M NaCl e sem NaCl; o tampão acetato de sódio a pH 4,0 com 1,0 M NaCl e sem NaCl e o tampão glicina/HCl 20 mM a pH 2,1 com 1,0 M NaCl e sem NaCl. A Figura 4.6 apresenta a porcentagem média de recuperação de glucagon para todas as condições testadas. Nota-se que a porcentagem de glucagon eluída é maior na ausência de NaCl e em pH mais ácidos. Este resultado está de acordo com a teoria descrita para os experimentos IMAC (Wong *et al.*, 1991). A diminuição do pH irá favorecer a protonação do nitrogênio do anel imidazol do resíduo de histidina, fazendo com que o equilíbrio seja deslocado para a fase líquida. A ausência do sal NaCl também facilita a eluição, pelo mesmo fenômeno que envolve o sal na adsorção: o sal irá remover as moléculas de água envolvidas na solvatação do metal, facilitando o deslocamento do equilíbrio na direção da adsorção, e portanto, dificultando a dessorção.

A influência da concentração de imidazol na eluição de glucagon adsorvido em resina PCI quelatada com íons Cu^{2+} foi avaliada como uma outra estratégia de dessorção da proteína adsorvida. A matriz PCI foi preparada conforme descrito no item 3.2.3 e então equilibrada com tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0 contendo 2 mM de imidazol. Injetou-se 1,0 ml de solução de glucagon na concentração de 0,27 mg/ml. Após a lavagem com o tampão de equilíbrio fez-se a eluição com o mesmo tampão de adsorção acrescido de 30, 50 e 100 mM de imidazol e a porcentagem de glucagon dessorvida nestas condições é apresentada na Figura 4.7.

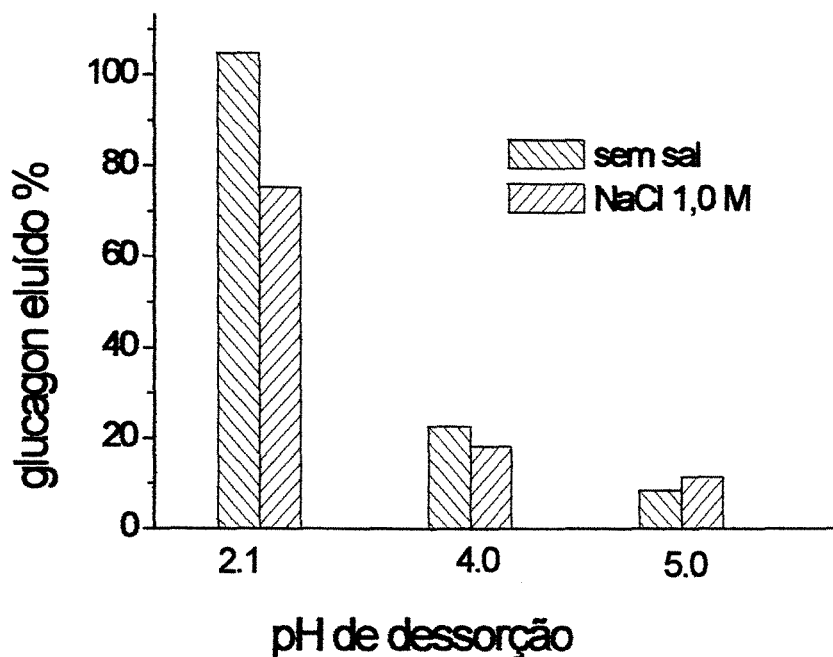


Figura 4.6. Porcentagem média de recuperação de glucagon em função do pH e da força iônica. Tampão de adsorção: fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0. Tampões de dessorção: tampão fosfato 20 mM a pH 5,1; tampão acetato de sódio a pH 4,0 e o tampão glicina/HCl 20 mM a pH 2,1. Concentração inicial de 0,54 mg/ml.

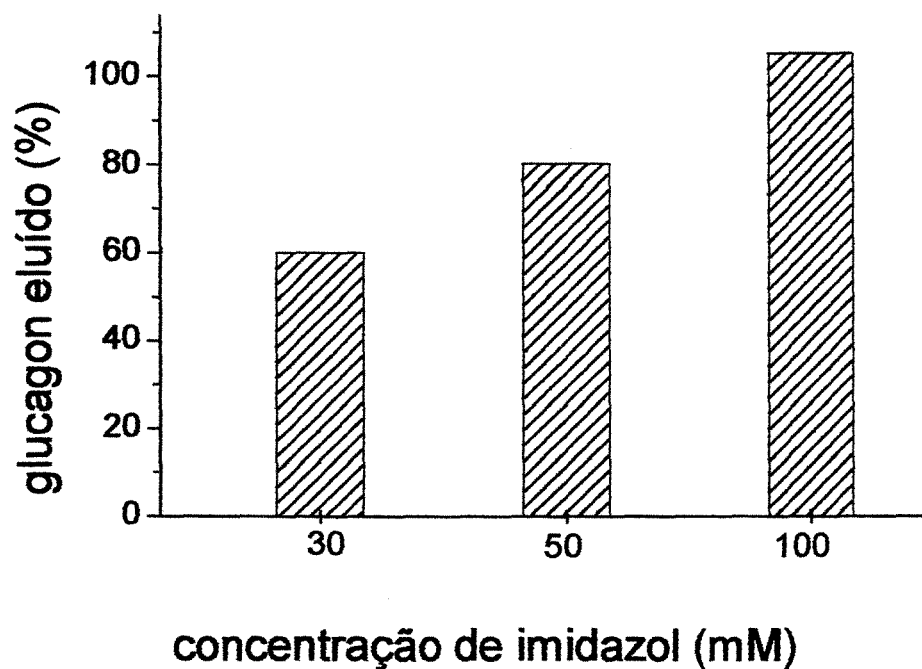


Figura 4.7. Porcentagem de glucagon desorvido em função da concentração de imidazol no tampão de adsorção, fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M a pH 7,0. Concentração inicial de glucagon: 0,27 mg/ml.

Outra informação obtida neste experimento foi a perda de cerca de 50% na capacidade da matriz quando se adiciona 2 mM de imidazol no tampão de equilíbrio. A capacidade média obtida neste experimento foi de 14,2 mg de glucagon/ml de matriz para uma concentração de equilíbrio média de 84,6 ug/ml. Para este mesmo valor de concentração de equilíbrio, a isoterma de adsorção da Figura 4.5 nos indica uma capacidade superior a 30 mg de glucagon/ml de matriz. Segundo Sulkowski (1985) quando a coluna é carregada com a solução de proteína, seguindo este procedimento, o imidazol adsorvido não interfere na adsorção da molécula adicionada, uma vez que a proteína possui alta afinidade pelo metal e consegue deslocar o imidazol e se adsorver na matriz. Como este experimento foi realizado em tanques agitados e a quantidade de adsorvente era pequena (cerca de 5,0 mg), há a possibilidade de existir uma ausência de quelatos livres dificultando a mobilidade do imidazol e a conseqüente perda da capacidade.

Podemos concluir que o glucagon adsorvido em PCI-Cu²⁺ é virtualmente 100% eluído da matriz quando se usa tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M a pH 7,0 contendo 100 mM de imidazol e que a concentração mínima de imidazol para a dessorção total do glucagon está entre 50 e 100 mM. A utilização de imidazol para a eluição de proteínas tem a vantagem de se realizar todo o processo em pH neutro, evitando desta forma condições drásticas de eluição que poderiam ocasionar a desnaturação da proteína. Porém, este método de eluição tem a desvantagem de se estar adicionando uma substância ao meio que deverá ser removida posteriormente. Essa etapa adicional pode ser justificada quando se consegue uma boa seletividade na purificação da proteína de interesse.

4.1.5. Conclusão dos ensaios em tanques agitados

Os ensaios em tanques agitados foram realizados com o objetivo de se avaliar a viabilidade do uso da técnica IMAC na purificação de glucagon. Esse procedimento permite o uso de pequenas quantidades de matriz e

baixos volumes de solução protéica. A realização destes ensaios preliminares nestas condições é justificada, pois o glucagon de alta pureza possui um custo bastante elevado.

A cinética de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ em tanques agitados, permitiu determinar o tempo de equilíbrio necessário para a adsorção de glucagon na matriz. Como a adsorção é relativamente rápida, acredita-se que os ensaios em colunas, nos quais normalmente não há tempo suficiente para se atingir o equilíbrio, devido à efeitos de transferência de massa, não serão influenciados significativamente por esse parâmetro. A isoterma de adsorção de glucagon nos permitiu calcular a capacidade máxima de adsorção de glucagon em PCI-Cu²⁺ nas condições testadas, 31,5 mg de glucagon/ml de matriz PCI-Cu²⁺ (massa seca).

A influência do pH e da força iônica na dessorção de glucagon foi avaliada para determinar quais as melhores condições para eluir a proteína adsorvida em PCI-Cu²⁺. Os resultados obtidos mostram que a afinidade de glucagon pela matriz é grande e que a eluição total da proteína só ocorre quando o pH 2,1 é usado na ausência de NaCl 1,0 M. A eluição do glucagon adsorvido em PCI-Cu²⁺ utilizando o agente competidor imidazol também se mostrou viável. Como o procedimento utilizando imidazol 2 mM no tampão de equilíbrio resultou na diminuição da capacidade, optou-se por realizar os experimentos em coluna sem imidazol no tampão de equilíbrio.

Os experimentos em tanques agitados permitiram a obtenção de informações aplicáveis nos experimentos em coluna, de forma simples e utilizando pouca quantidade de materiais. Os experimentos em coluna, por sua vez, vêm a complementar esses ensaios, aplicando essas condições na forma contínua, semelhante às condições utilizadas em larga escala.

4.2. CROMATOGRAFIAS IMAC COM GLUCAGON E INSULINA

A proposta deste estudo foi avaliar diferentes metais como ligantes em IMAC, utilizando colunas de baixa pressão, com o objetivo de desenvolver um método simples e eficiente de purificação de glucagon, uma vez que os experimentos em coluna são conduzidos no modo contínuo, semelhantes ao processo de larga escala. Como a insulina é a principal impureza presente na fração de processamento a ser purificada, fez-se também um estudo com essa proteína separadamente e com a mistura de glucagon e insulina. Utilizou-se proteínas de alta pureza dissolvidas no tampão de equilíbrio para se avaliar o comportamento isolado de cada proteína e das duas proteínas em mistura.

A mistura destas duas proteínas em solução pode ter alguma influência na interação com os íons metálicos devido a efeitos estéricos, pois a insulina é uma proteína globular cuja massa é uma vez e meia maior que a massa do glucagon, sugerindo uma competição pelos sítios de adsorção e conseqüentemente uma possível separação na eluição. Com base nesta hipótese realizou-se ensaios cromatográficos utilizando a mistura destas duas proteínas em solução tampão mesmo nas condições que a separação se mostrava desfavorável. A eficiência da separação das proteínas foi avaliada em HPLC.

Foram realizadas cromatografias em uma coluna C5/5 da Amersham Pharmacia Biotech (Suécia). Esta coluna possui um diâmetro interno de 5 mm e altura de 5 cm. A Figura 4.8 apresenta um diagrama de blocos que ilustra a seqüência das cromatografias realizadas. Foram testados diferentes íons metálicos imobilizados em PCI (Cu^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}) para avaliar a influência da força de retenção destes metais na purificação de glucagon.

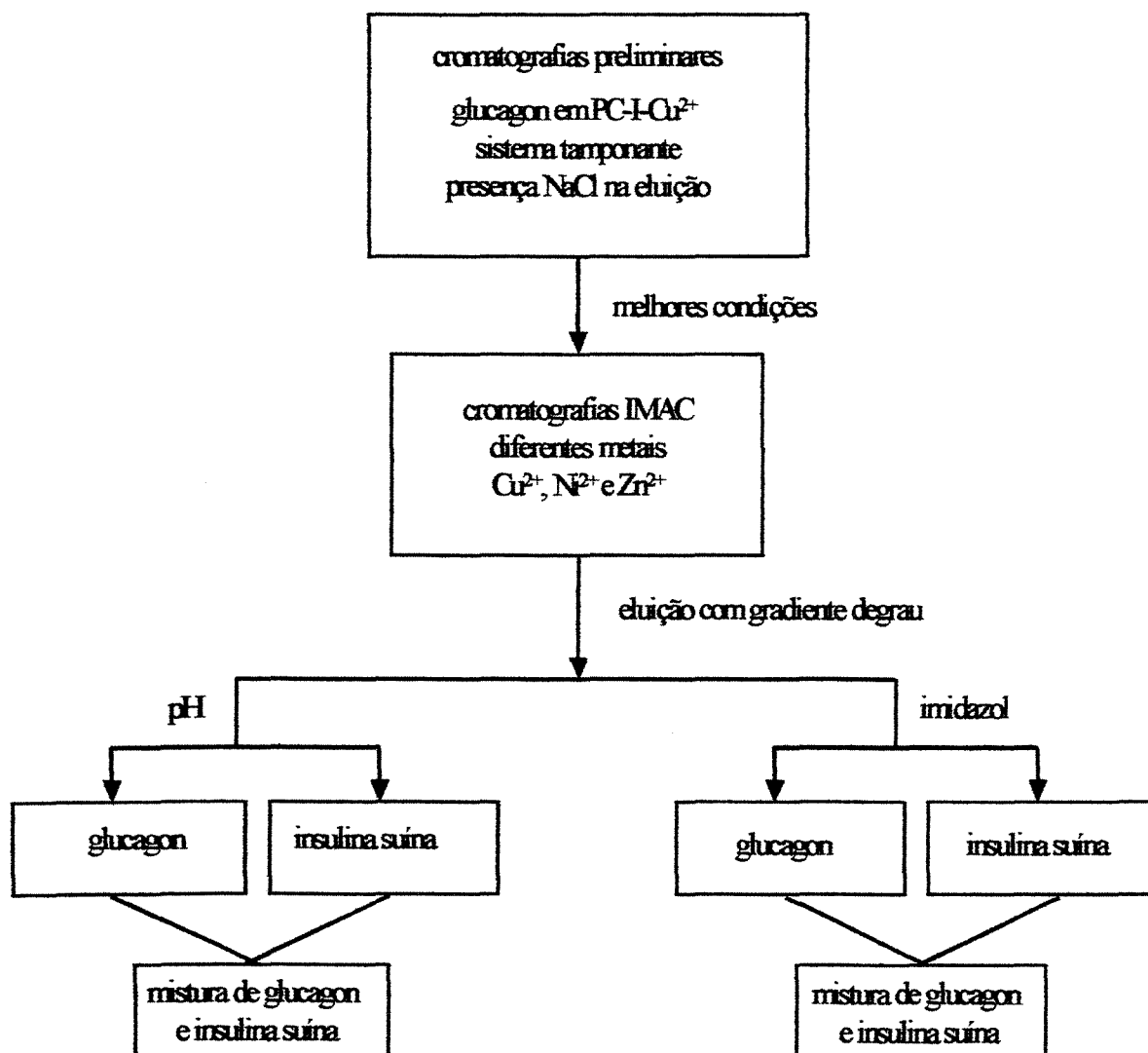


Figura 4.8. Esquema dos experimentos de cromatografia com proteínas de alta pureza.

Segundo Hutchens e Yip (1990) a interação de proteínas com íons metálicos imobilizados ocorre por mecanismos que são influenciados principalmente pelo tipo de metal e grau de coordenação, pela variação dos constituintes da fase móvel e pela distribuição dos resíduos de aminoácidos na superfície da proteína ou próximos do sítio de interação com o metal e que a contribuição de cada uma dessas variáveis na afinidade da proteína pelo íon metálico imobilizado é determinada empiricamente. Justifica-se, desta maneira, a série de experimentos cromatográficos em diferentes condições realizadas neste trabalho.

Primeiramente realizou-se cromatografias exploratórias com o íon metálico Cu^{2+} imobilizado em PCI e diferentes sistemas tamponantes. Esses experimentos objetivaram a melhora na estabilidade da linha de base dos cromatogramas visando a concordância com o balanço de massa. Além disso, a adição de sal nos tampões de eluição (NaCl) foi testada na separação de glucagon e insulina para determinar as melhores condições de eluição.

4.2.1. Cromatografias com PCI- Cu^{2+}

O íon metálico Cu^{2+} foi o primeiro metal a ser estudado e sua escolha se baseou em dados da literatura, especialmente na regra de Sulkowski (1989), a qual diz que a adsorção de proteínas em íons metálicos é mais forte de acordo com a seqüência: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} = \text{Co}^{2+}$. Esta regra também diz que é necessário ao menos um resíduo de histidina disponível para a coordenação para a adsorção da proteína em íons Cu^{2+} . Como o glucagon possui apenas um resíduo de histidina N-terminal, optou-se por partir os estudos com esse metal.

4.2.1.1. Influência do sistema tamponante em cromatografia com PCI- Cu^{2+}

O primeiro experimento realizado em coluna utilizou o íon Cu^{2+} como ligante e como tampão de equilíbrio e adsorção o tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 (Figura 4.9). A eluição foi realizada

através de um gradiente degrau de pH: 5,0; 4,0 e 2,1 e a regeneração da matriz foi feita com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M pH 8,0. A vazão utilizada neste experimento foi de 0,5 ml/min e o volume de amostra injetada foi de 10,0 ml na concentração de 0,39 mg/ml. O volume das frações coletadas foi de 1,0 ml, portanto o volume indicado nos cromatogramas corresponde ao número da fração.

Como este cromatograma apresentou algumas flutuações na linha de base e não houve concordância no balanço de massa global do sistema, decidiu-se testar um outro sistema tamponante na dessorção do glucagon adsorvido a fim de minimizar tais flutuações na linha de base. Realizou-se, portanto, um experimento utilizando somente o tampão fosfato durante todas as etapas cromatográficas (Figura 4.10).

Os dois sistemas tamponantes apresentaram, qualitativamente, o mesmo perfil cromatográfico, porém quando o sistema fosfato é utilizado em todas as etapas cromatográficas nota-se uma melhor estabilidade na linha de base e uma concordância melhor no balanço de massa. A comparação dos dois sistemas foi feita com base na recuperação de glucagon, calculada em relação a massa que foi eluída durante a lavagem e no gradiente de pH (Tabelas 4.1 e 4.2), sendo que as quantidades em massa computadas na etapa de lavagem incluem também a massa de proteína que deixa a coluna durante a alimentação. Baseando-se nestes resultados optou-se por continuar os experimentos utilizando o sistema tamponante fosfato em todas etapas da cromatografia.

A porcentagem de glucagon eluída durante a lavagem com o tampão de adsorção (que é o mesmo nestes dois sistemas tamponantes: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0) é relativamente baixa nos dois experimentos, indicando uma forte adsorção do glucagon em PCI-Cu^{2+} , sendo que a eluição total só ocorre quando o tampão em pH 2,1 passa pela coluna. Esses resultados estão de acordo com os obtidos para os experimentos em tanque agitado. A quantidade de glucagon removida através da regeneração com solução de EDTA não foi significativa nestes dois experimentos.

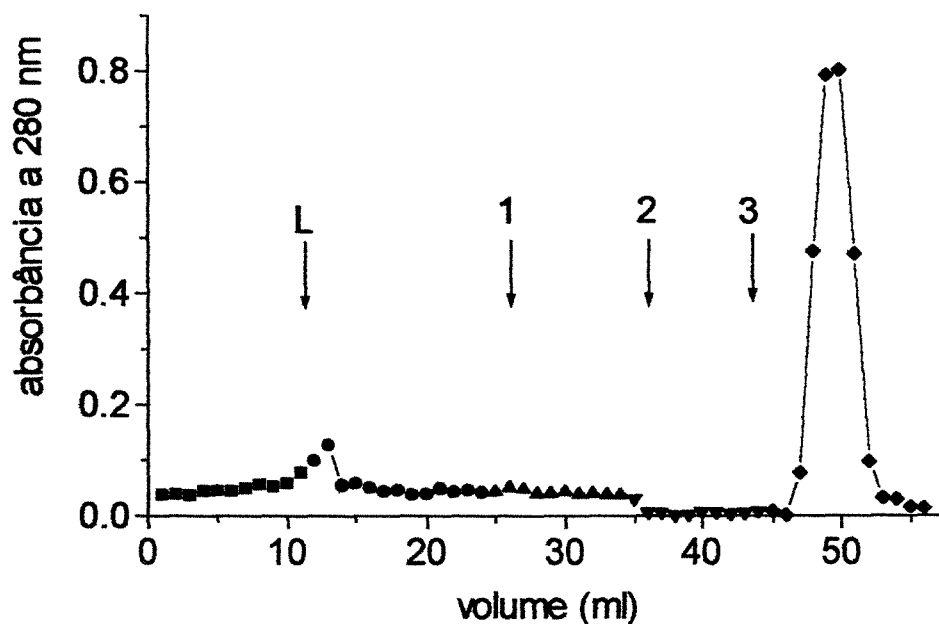


Figura 4.9. Perfil cromatográfico **PCI-Cu²⁺** de **glucagon** em solução tampão. Vazão utilizada: 0,50 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1** (▲)- eluição com tampão fosfato 20 mM a pH 5,0; **2** (▼)- eluição com tampão acetato de sódio 100 mM a pH 4,0 e **3** (♦)- eluição com tampão glicina/HCl 20 mM a pH 2,1.

Tabela 4.1. Balanço de massa do cromatograma de **glucagon** em **PCI-Cu²⁺**.

proteína total	alimentação	lavagem	eluição em pH			recuperação total
			5,0	4,0	2,1	
massa (mg)	3,9	0,8	0,3	0,1	2,1	3,3
(%)	100,0	20,5	7,7	2,6	53,8	84,6

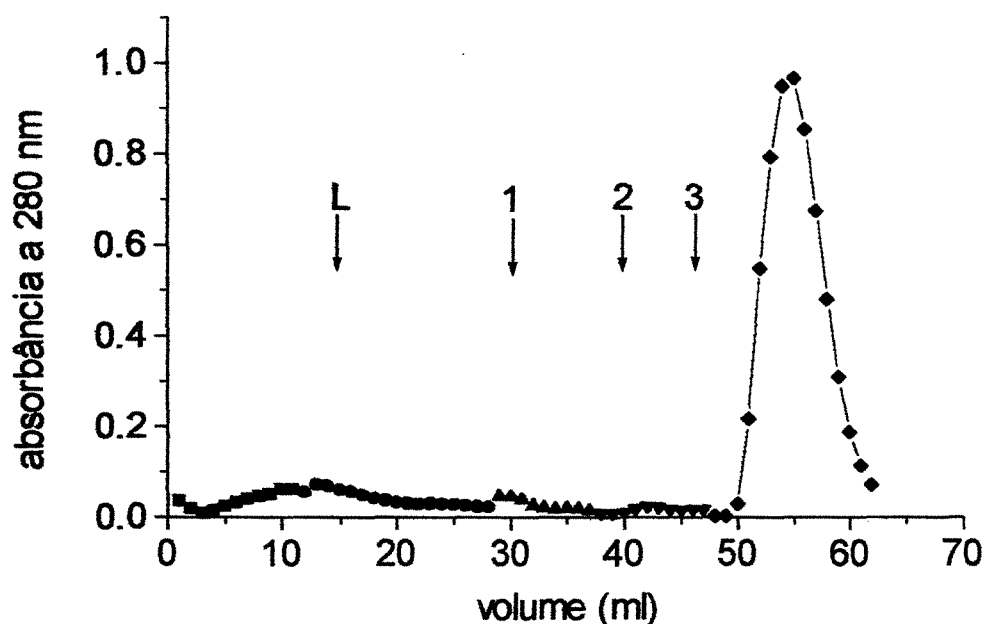


Figura 4.10. Perfil cromatográfico de **glucagon** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼) e **3**(♦), - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM a pH 5,0; 3,0 e 2,1; respectivamente.

Tabela 4.2. Balanço de massa do cromatograma de **glucagon** em **PCI-Cu²⁺** com tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas.

<i>proteína total</i>	<i>alimentação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>			<i>recuperação Total</i>
			<i>5,0</i>	<i>3,0</i>	<i>2,1</i>	
<i>massa (mg)</i>	5,6	0,7	0,2	0,1	4,6	5,6
<i>(%)</i>	100,0	12,5	3,6	1,8	82,1	100,0

O ensaio cromatográfico com a insulina suína de alta pureza nas mesmas condições do ensaio anterior com glucagon tem seu perfil cromatográfico na Figura 4.11 e as respectivas quantidades em massa obtidas em cada etapa listadas na Tabela 4.3. Observando os cromatogramas de glucagon e de insulina suína (cromatografias em separado) em PCI-Cu^{2+} utilizando o sistema tamponante fosfato durante todas as etapas da cromatografia pode-se perceber que as duas proteínas adsorvem fortemente ao íon metálico Cu^{2+} e a dessorção só ocorre quando o pH atinge 2,1 em ambos os casos. Estes dois ensaios indicam uma difícil separação destas duas proteínas nesta condição testada, entretanto realizou-se um ensaio cromatográfico com a mistura de glucagon e insulina nas mesmas condições dos dois últimos ensaios (Figura 4.12 e Tabela 4.4) para avaliar se a mistura poderia influenciar no processo de adsorção propiciando algum tipo de separação durante a eluição.

Foi feita a análise em HPLC das frações correspondentes a amostra injetada na coluna IMAC, ao pico obtido em pH 2,1 (fração 55) e ao pico obtido durante a regeneração com solução de EDTA (fração 84) do cromatograma da Figura 4.12. As análises foram feitas em duplicatas e calculou-se para cada análise, a porcentagem de cada proteína considerando somente as áreas correspondentes aos picos do glucagon e da insulina e fez-se a média das duplicatas. A amostra de proteína injetada na coluna IMAC possuía 64,72% de insulina e 35,28% de glucagon. A análise do pico obtido em pH 2,1 (fração 55) apresenta a presença das duas proteínas eluindo juntas, porém em porcentagens bastante distintas, 77,54% de glucagon e 22,46% de insulina. Já a fração 84 que foi obtida durante a regeneração da coluna com solução de solução de EDTA apresentou 97,7% de insulina segundo a análise em HPLC. Estes valores indicam que a afinidade da insulina pelo íon metálico cobre é maior que a do glucagon, sendo que são necessárias condições ainda mais drásticas para a completa eluição da insulina.

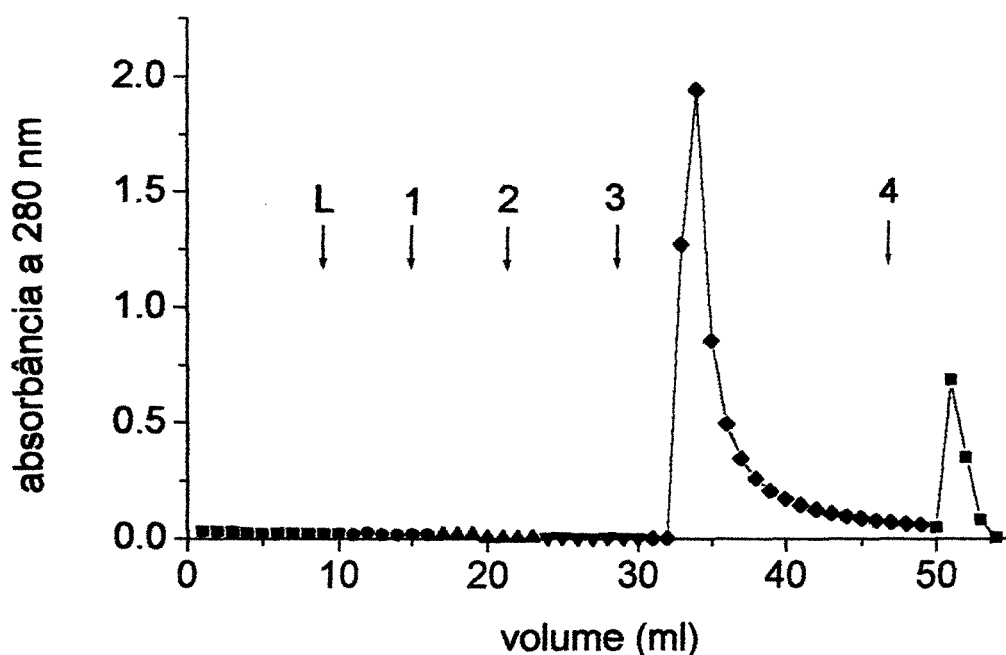


Figura 4.11. Perfil cromatográfico de **insulina suína** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼) e **3**(◆) - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0; 3,0 e 2,1, respectivamente. **4** (■)- Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.3. Balanço de massa do cromatograma da **insulina suína** em **PCI-Cu²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição em pH			regene- ração	recupe- ração total
			4,0	3,0	2,1		
massa (mg)	8,1	0,3	0,8	0,0	6,6	1,2	8,9
(%)	100,0	3,7	9,9	0,0	81,5	14,8	109,9

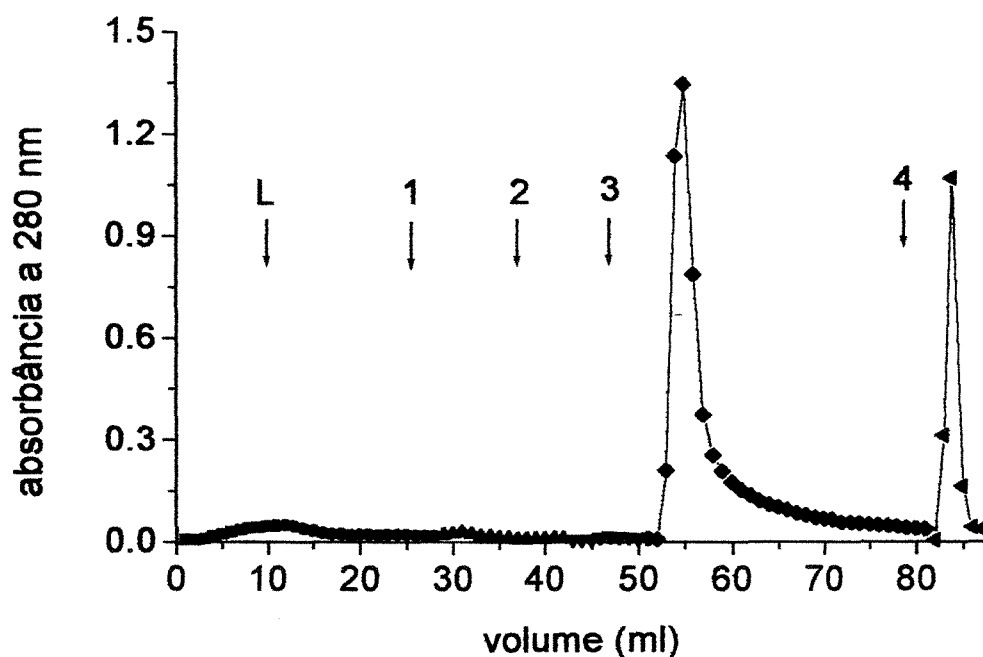


Figura 4.12. Perfil cromatográfico da **mistura de insulina suína e glucagon** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1(▲)**, **2(▼)** e **3(◆)** eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0; 3,0 e 2,1, respectivamente. **4 (◄)**- Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.4. Balanço de massa do cromatograma da **mistura de insulina suína e glucagon** em **PCI-Cu²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>			<i>regene- ração</i>	<i>recupe- ração total</i>
			4,0	3,0	2,1		
<i>massa (mg)</i>	7,9	0,8	0,2	0,1	6,3	1,7	9,1
<i>(%)</i>	100,0	10,1	2,5	1,3	79,8	21,5	115,2

Apesar destas condições indicarem uma possível separação do glucagon e insulina, o fato de se estar usando um tampão em pH 2,1 limita as possibilidades de se aprimorar o gradiente utilizado na eluição. As alternativas encontradas para otimizar a separação foram a eluição através de um agente competidor, imidazol, e através da adição de NaCl nos tampões em diferentes pH.

Foi feito também um ensaio utilizando insulina bovina e o comportamento desta proteína foi semelhante à de fonte suína (anexo). Como o glucagon possui uma estrutura primária igual para as duas fontes não houve a necessidade de se testar as proteínas das duas fontes.

Nota-se que o balanço de massa para alguns dos cromatogramas foi superior a 100%. Este fato pode estar relacionado com as múltiplas etapas envolvidas na somatória das massas presente em dezenas de frações. Outro ponto a se considerar é que o coeficiente de extinção da curva de calibração de absorção a 280 nm foi obtido em uma determinada condição de pH e, portanto para as outras condições este valor é apenas uma aproximação. No entanto, o objetivo maior era se obter uma condição de boa seletividade, ficando a recuperação em segundo plano.

4.2.1.2. Influência do NaCl na eluição em cromatografia com PCI-Cu²⁺

Avaliou-se a influência do sal NaCl no tampão de eluição na cromatografia com PCI-Cu²⁺ realizando o mesmo experimento descrito anteriormente, adicionando-se NaCl na concentração de 1,0 M nos tampões utilizados para eluir a mistura de proteínas glucagon e insulina suína. A presença do sal influencia as interações eletrostáticas, podendo propiciar melhor seletividade na separação destas moléculas, caso interações eletrostáticas tenham relevâncias diferentes na adsorção de insulina e glucagon. A Figura 4.13 apresenta o perfil cromatográfico obtido neste experimento e a Tabela 4.5 o respectivo balanço de massa.

Comparando-se as Figuras 4.12 e 4.13 pode-se observar que a presença de 1,0 M de NaCl nos tampões de eluição influencia significativamente na dessorção das proteínas.

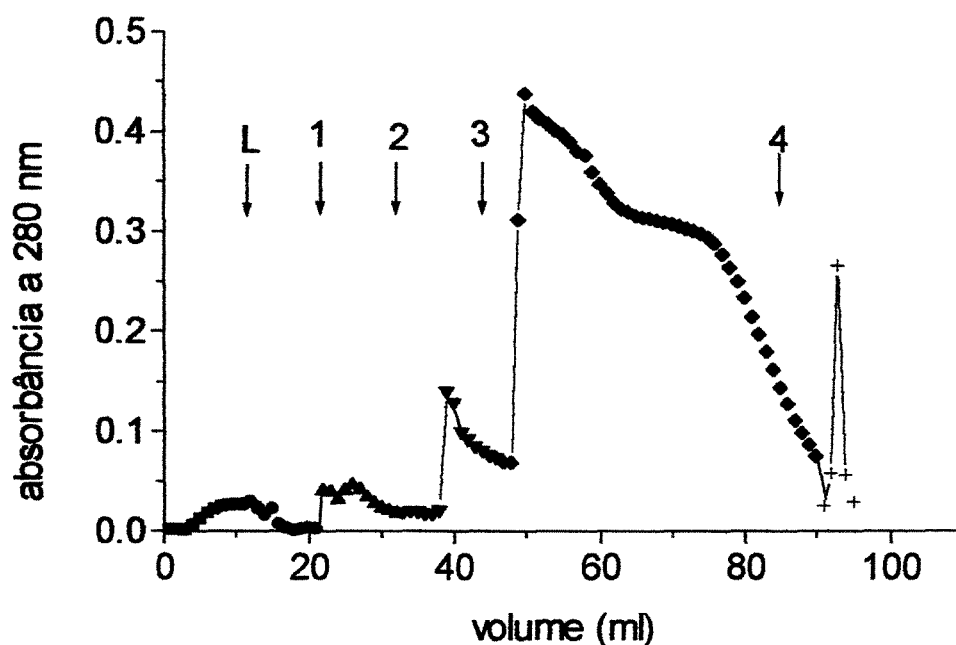


Figura 4.13. Perfil cromatográfico da **mistura de insulina suína e glucagon** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato com **NaCl 1,0M** em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**-lavagem com o tampão de equilíbrio; **1(▲)**, **2(▼)** e **3(◆)** - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M e pH 4,0; 3,0 e 2,1, respectivamente. **4(+)** - Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.5. Balanço de massa do cromatograma da **mistura de insulina suína e glucagon** em **PCI-Cu²⁺** em tampão fosfato com NaCl 1,0M.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição em pH			regene- ração	recupe- ração total
			4,0	3,0	2,1		
massa (mg)	10,8	0,3	0,4	0,9	12,7	0,4	14,7
(%)	100,0	2,8	3,7	8,3	117,6	3,7	136,1

No cromatograma da Figura 4.13 aparece um pico em pH 3,0 que não era observado nos cromatogramas sem o sal na eluição. Apesar do pico obtido em pH 2,1 ser bastante alargado, há uma indicação de separação das proteínas. Aparentemente o sal NaCl está dificultando a eluição das proteínas, pois o volume de eluição até a linha de base aumentou de cerca de 15 ml para cerca de 50 ml (na presença de sal). Este resultado está de acordo com a literatura (Wong *et al.*, 1991) e com os dados obtidos para os experimentos realizados em tanques agitados. A análise em HPLC de algumas destas frações indicou na fração correspondente ao pico obtido em pH 3,0 a presença de alguma impureza não identificada. A fração correspondente ao pico do pH 2,1 (fração 50) apresentou concentrações relativamente próximas de insulina e glucagon, 46,0% de insulina e 54,0% de glucagon e a fração correspondente ao pico da regeneração (fração 93) apresentou 80,7% de insulina e 19,3% de glucagon, calculados considerando somente as áreas correspondentes aos picos do glucagon e da insulina.

Apesar da análise em HPLC do pico em pH 2,1 ter apresentado um resultado menos favorável do que na cromatografia realizada sem o sal, houve uma indicação maior de separação quando se adicionou o sal NaCl nos tampões de eluição. Talvez as outras frações obtidas ainda em pH 2,1 apresentassem melhores porcentagens de separação. Dada ao aparente indício de seletividade, optou-se por prosseguir os experimentos com os outros metais nesta condição.

4.2.1.3. Cromatografias em PCI-Cu²⁺ com eluição em gradiente degrau de imidazol

Uma segunda estratégia comum na eluição em cromatografias IMAC, gradiente de imidazol, foi testada. O tampão utilizado para equilíbrio e adsorção foi o tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 e a este tampão foi adicionado 10, 20, 40, 70, 100, 200 e 300 mM de imidazol. A coluna foi preparada lavando a matriz PCI com tampão de adsorção contendo 100 mM de imidazol previamente ao equilíbrio. As Figuras 4.14,

4.15 e 4.16 mostram os cromatogramas destes experimentos com o glucagon, com a insulina suína e com a mistura destas duas proteínas, respectivamente e as Tabelas 4.6, 4.7 e 4.8 os respectivos balanço de massa destes cromatogramas.

A análise dos cromatogramas de glucagon e insulina, isoladamente, sugere uma possível separação do glucagon da insulina nestas condições, pois enquanto o glucagon elui em 40 mM de imidazol no tampão de adsorção, a insulina começa a eluir em 40 mM mas só completa a eluição em 100 mM de imidazol no tampão de adsorção. Observa-se a presença de um pico logo no início do gradiente degrau, nos três cromatogramas, em 10 mM de imidazol. Porém a análise em HPLC da fração correspondente a este pico do cromatograma da Figura 4.16 (fração 29) não revelou a presença de nenhuma das proteínas injetadas na coluna. Uma possível explicação para este pico é que este seja um pico “artefato” e que tenha se formado devido a liberação de imidazol dos sítios de adsorção durante a eluição, pois o análise em HPLC indicou a presença do pico correspondente ao imidazol. Uma outra observação relativa a estes cromatogramas é a elevação da linha de base durante todo o gradiente degrau. A linha de base não volta a posição inicial, provavelmente devido ao fato que imidazol também absorve a 280 nm.

Nota-se que, no conjunto de cromatografias realizadas com o agente competidor imidazol, os resultados obtidos para cada proteína isoladamente difere do resultado obtido com a mistura delas. Enquanto o glucagon eluía em 40 mM de imidazol e a insulina em 70 mM de imidazol quando separadamente analisados, na cromatografia da mistura houve uma inversão destes resultados e o pico de 70 mM continha ambas as proteínas. No cromatograma da mistura de proteínas (Figura 4.16), quando se inicia a eluição com 40 mM de imidazol no tampão de adsorção observa-se uma indicação de um pico que parece estabilizar pois a linha de base não retorna a posição inicial.

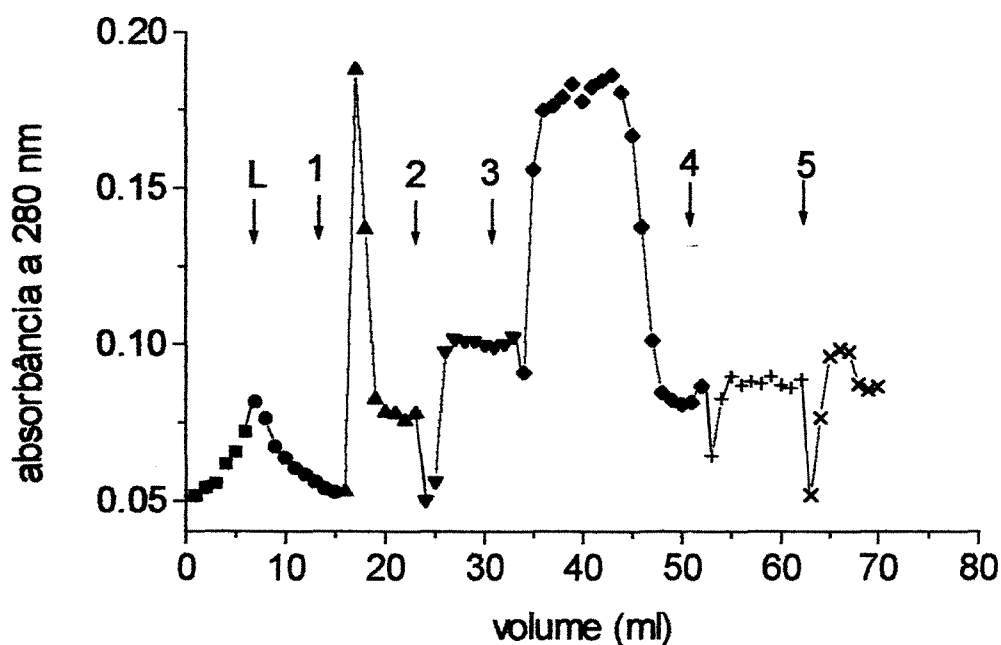


Figura 4.14. Perfil cromatográfico de **glucagon** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1** (▲), **2** (▼), **3** (◆), **4** (+) e **5** (×)- eluição com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 10, 20, 40, 70 e 100 mM, respectivamente.

Tabela 4.6. Balanço de massa do cromatograma de **glucagon** em **PCI-Cu²⁺** e eluição com gradiente degrau de **imidazol**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição com imidazol (mM)					recupe- ração total
			10	20	40	70	100	
massa (mg)	1,5	0,1	0,3	0,3	1,0	0,1	0,1	1,9
(%)	100,0	6,7	20,0	20,0	66,7	6,7	6,7	126,7

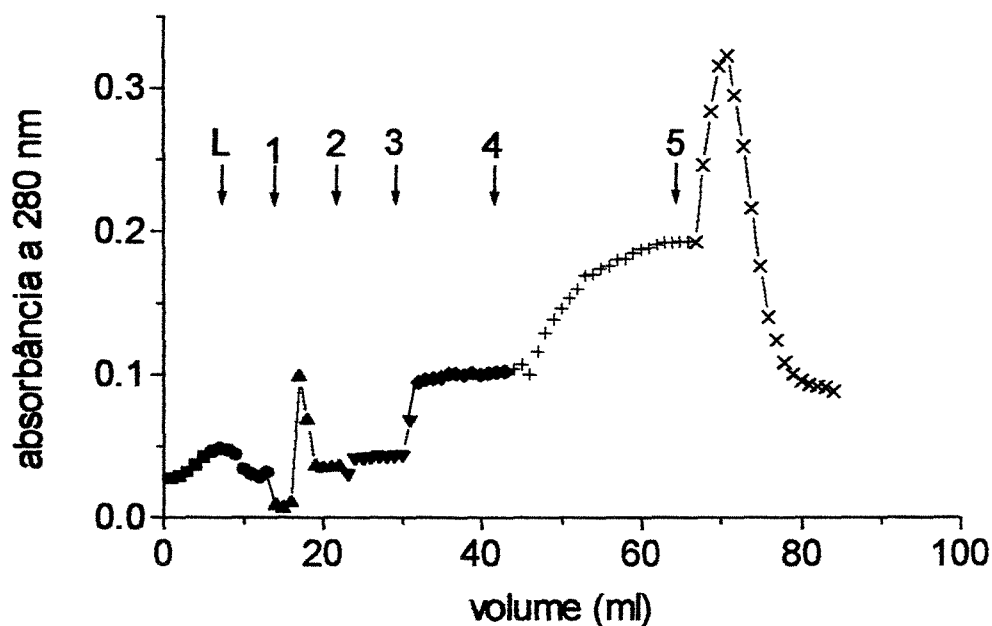


Figura 4.15. Perfil cromatográfico de **insulina suína** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼), **3**(◆), **4** e **5**(×)- eluição com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 10, 20, 40, 70 e 100 mM, respectivamente.

Tabela 4.7. Balanço de massa do cromatograma de **insulina suína** em **PCI-Cu²⁺** e eluição com gradiente degrau de **imidazol**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição com imidazol (mM)					recupe- ração total
			10	20	40	70	100	
massa (mg)	4,3	0,5	0,3	0,4	0,2	1,9	1,9	5,2
(%)	100,0	11,6	7,0	9,3	4,6	44,2	44,2	120,9

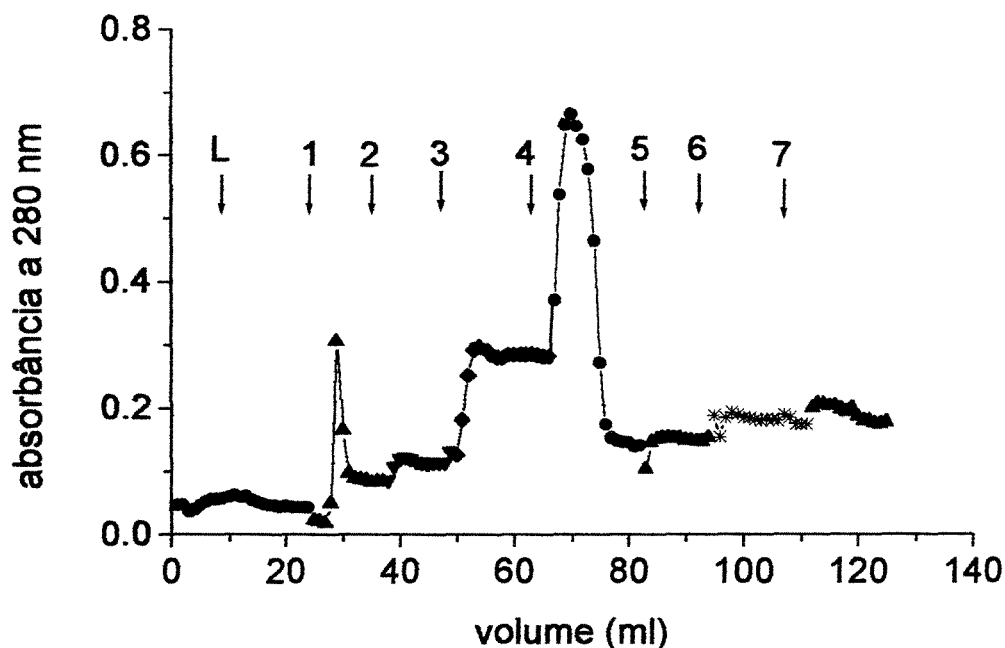


Figura 4.16. Perfil cromatográfico da **mistura de glucagon e insulina suína** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1(▲)**, **2(▼)**, **3(◆)**, **4(●)**, **5(▲)**, **6(*)** e **7(▲)**- eluição com com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 10, 20, 40, 70, 100, 200 e 300 mM, respectivamente.

Tabela 4.8. Balanço de massa do cromatograma da **mistura de glucagon e insulina suína** em **PCI-Cu²⁺** e eluição com gradiente degrau de **imidazol**.

proteína total	alimen- tação	lava- gem	eluição com imidazol (mM)							recupe- ração total
			10	20	40	70	100	200	300	
massa (mg)	8,7	1,2	1,2	0,1	2,8	4,2	0,5	1,3	1,2	12,5
(%)	100,0	13,8	13,8	1,15	32,2	48,3	5,7	14,9	13,8	143,6

A análise da fração inicial deste pico em HPLC revelou a presença majoritária de insulina, 95,6% de insulina (calculados considerando somente as áreas correspondentes aos picos do glucagon e da insulina). O glucagon aparentemente só elui com 70 mM de imidazol, juntamente com o restante da insulina que não eluiu em 40 mM de imidazol. A análise da fração 70, que corresponde ao pico em 70 mM de imidazol, indicou 72,6% de insulina e 23,8% de glucagon. A baixa concentração de glucagon na amostra injetada na coluna IMAC, 62,9% de insulina e 37,1% de glucagon, pode ter influenciado nestes resultados. Outra possível explicação é o fato do glucagon possuir afinidade por íons cobre aparentemente semelhante à do imidazol. Nos experimentos em tanques agitados, observou-se a queda da capacidade da matriz quando o imidazol era adicionado no tampão de equilíbrio, sugerindo que a força de interação do glucagon não é o suficiente para deslocar completamente o imidazol. O mesmo fenômeno é observado nos experimentos em coluna, apesar da concentração de imidazol requerida para a eluição de glucagon isoladamente ser relativamente baixa, 40 mM de imidazol, ocorre uma diluição significativa da amostra injetada, aparentando uma cinética de dessorção lenta.

Da série de ensaios realizados utilizando o metal cobre como ligante e a mistura de glucagon e insulina, conclui-se que a presença do sal na eluição favoreceu a seletividade. Apesar das condições testadas com o gradiente de pH terem dados alguns resultados promissores, a necessidade de condições drásticas para a eluição sugere que se avaliem outros metais cujas interações são de menor intensidade. A estratégia de eluição com gradiente de imidazol não mostrou adequada para eluir o glucagon, pois a amostra recuperada foi bastante diluída, porém obteve-se frações durante este experimento ricas em insulina.

4.2.2. Cromatografias com PCI-Ni²⁺

A regra de Sulkowski (1989) diz que é requerida a presença de dois resíduos de histidina disponíveis para coordenação para a retenção da proteína em IMAC-Ni²⁺. Apesar da molécula de glucagon possuir apenas um resíduo de histidina, sabe-se que o glucagon pode formar trímeros em solução e que os resíduos de histidina ficam superficialmente localizados (Sazaki, 1975). Quanto a insulina, que possui dois resíduos de histidina, é de se esperar que esta também adsorva neste metal. Assim, realizou-se experimentos utilizando o íon metálico Ni²⁺ imobilizado no adsorvente PCI.

4.2.2.1. Cromatografias em PCI-Ni²⁺ com eluição em gradiente degrau de pH

A primeira cromatografia com este metal foi feita injetando-se glucagon na coluna previamente equilibrada e carregada com solução de sulfato de níquel 50 mM. A eluição foi conduzida através de um gradiente degrau de pH. O sistema tamponante utilizado foi tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 para o equilíbrio e adsorção e pH 6,0; 5,0; 4,0 e 3,0 para as etapas de eluição. A Figura 4.17 apresenta o perfil cromatográfico obtido neste experimento e a Tabela 4.9 o respectivo balanço de massa. Cromatografias nas mesmas condições descritas foram realizadas também com a insulina suína e com a mistura de glucagon e insulina suína. O cromatograma do experimento com a insulina suína está apresentado na Figura 4.18 e o da mistura destas proteínas na Figura 4.19 e as Tabelas 4.10 e 4.11 apresentam os balanços de massa destes cromatogramas.

Os cromatogramas das proteínas glucagon e insulina isoladamente, sugerem uma separação destas proteínas nestas condições pois enquanto o glucagon elui majoritariamente em tampão fosfato pH 4,0 com NaCl 1,0 M (Figura 4.17) a insulina elui em tampão fosfato pH 5,0 com NaCl 1,0 M (Figura 4.18).

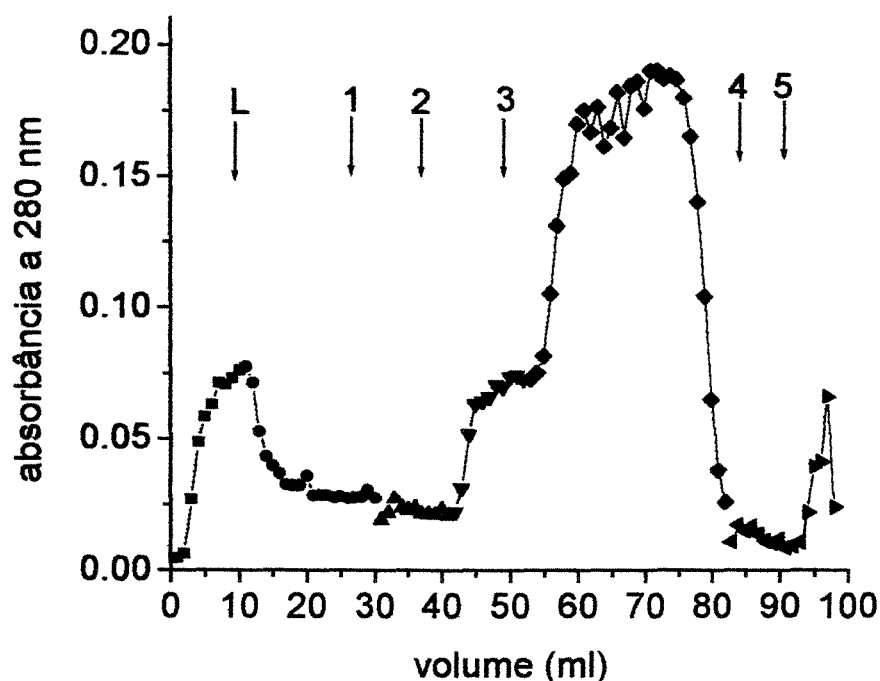


Figura 4.17. Perfil cromatográfico de **glucagon** em **PCI-Ni²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼), **3**(◆) e **4**(▼)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,0; 5,0; 4,0 e 3,0, respectivamente. **5**(►) - Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.9. Balanço de massa do cromatograma da **glucagon** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição em pH				regene- ração	recupe- ração total
			6,0	5,0	4,0	3,0		
massa (mg)	5,7	0,9	0,2	0,5	3,2	0,1	0,1	5,0
(%)	100,0	15,8	3,5	8,8	56,1	1,7	1,7	87,7

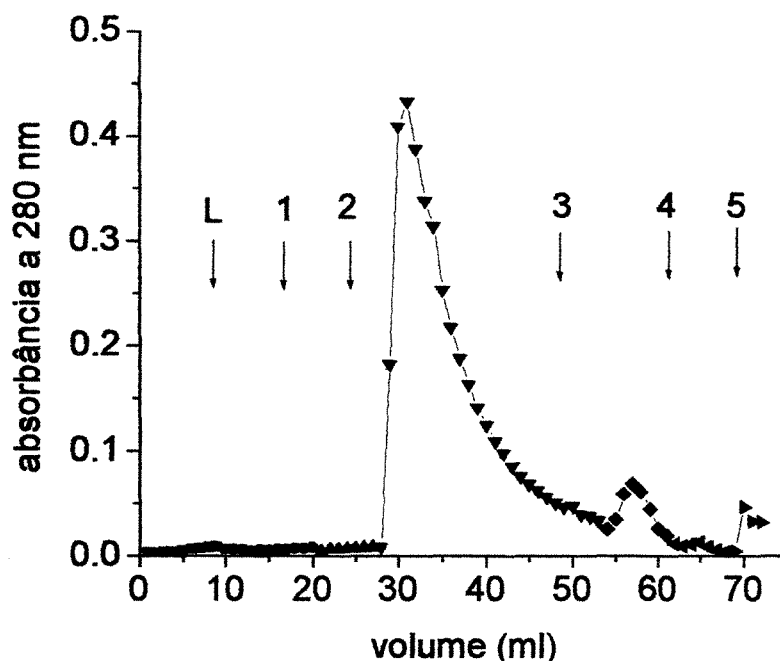


Figura 4.18. Perfil cromatográfico de **insulina suína** em **PCI-Ni²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼), **3**(◆) e **4**(▼)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,0; 5,0; 4,0 e 3,0, respectivamente. **5**(►)- Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.10. Balanço de massa do cromatograma da **insulina suína** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição em pH				regene- ração	recupe- ração total
			6,0	5,0	4,0	3,0		
massa (mg)	5,0	0,1	0,1	4,1	0,3	0,1	0,1	4,8
(%)	100,0	2,0	2,0	82,0	6,0	2,0	2,0	96,0

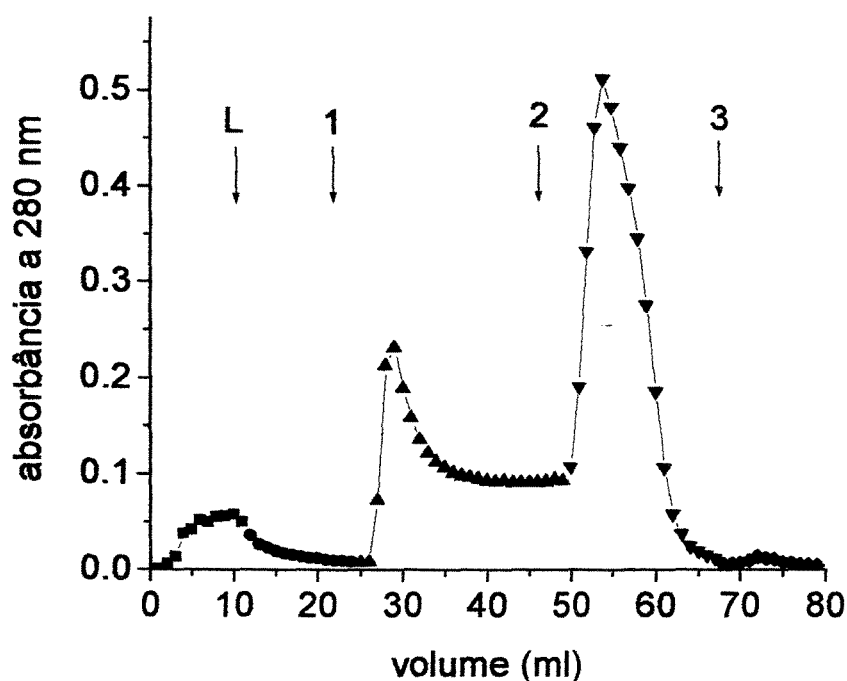


Figura 4.19. Perfil cromatográfico da **mistura de glucagon e insulina suína** em **PCI-Ni²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1(▲)**, **2(▼)** e **3(◆)**- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 5,0; 4,0 e 3,0, respectivamente.

Tabela 4.11. Balanço de massa do cromatograma da **mistura de glucagon e insulina suína** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição em pH			recuperação total
			5,0	4,0	3,0	
massa (mg)	8,2	0,7	2,8	4,2	0,1	7,8
(%)	100,0	8,5	34,1	51,2	1,2	95,1

Esse resultado mostra a diferença de afinidade destas proteínas por PCI-Ni²⁺. Apesar da porcentagem de glucagon que não adsorve durante a cromatografia ser bem maior do que a porcentagem de insulina: 15,8% do glucagon injetado na coluna é removido durante a alimentação e lavagem, enquanto para insulina somente 2,0%, a insulina elui em um pH maior do que o glucagon. A nítida diferença em afinidade do glucagon e da insulina pelo íon metálico níquel indica a possibilidade de separação destas proteínas utilizando este metal como ligante.

A análise do cromatograma da mistura de proteínas (Figura 4.19) nos indica uma tendência de separação entre a insulina e o glucagon, pois há a formação de dois picos. Segundo a análise em HPLC, a insulina elui primeiro, no pico obtido em pH 5,0, porém a cauda deste pico apresenta a presença de glucagon. Aparentemente, a insulina começa a eluir em pH 5,0 mas entra em equilíbrio e com isso a linha de base não é restabelecida. Quando se aplica uma condição mais favorável para a eluição, isto é, pH 4,0, o glucagon elui juntamente com a insulina restante que ainda permanecia adsorvida. A análise em HPLC da fração 29 que corresponde ao pico obtido em pH 5,0 indica uma porcentagem de insulina de 96,9%, porém esse valor cai para 62,5 na fração 48 que corresponde a cauda deste mesmo pico. Na fração 54, que corresponde ao pico do pH 4,0 a quantidade de insulina ainda é superior a do glucagon, 76,1% de insulina e 23,9% de glucagon. Considerando que a quantidade de insulina injetada na coluna IMAC foi superior a quantidade de glucagon, 80,9% de insulina e 19,1% de glucagon, esses resultados se mostram bastante promissores, sugerindo que novos experimentos sejam realizados com o íon metálico níquel, testando novas condições de eluição, por exemplo, um gradiente linear de pH ou então a diminuição do sal nos tampões de eluição. Hemdan *et al.* (1989) conseguem uma boa resolução de proteínas que diferem em apenas um resíduo de histidina disponível para interação através de um gradiente linear de pH.

4.2.2.2. Cromatografias em PCI-Ni²⁺ com eluição em gradiente degrau de imidazol

Similarmente aos experimentos com PCI-Cu²⁺, descrito no item 4.2.1.3, realizou-se experimentos utilizando PCI-Ni²⁺ e diferentes concentrações de imidazol no tampão de adsorção durante as etapas de eluição. As Figuras 4.20, 4.21 e 4.22 contêm os cromatogramas obtidos nos experimentos com glucagon, insulina e com a mistura das duas proteínas, respectivamente e nas Tabelas 4.12, 4.13 e 4.14 estão os balanços de massa destes cromatogramas.

Comparando-se os experimentos das proteínas isoladamente, nota-se novamente a diferença em afinidade pelo íon metálico Ni²⁺. O glucagon aparentemente apresentou uma afinidade menor do que a insulina, pois enquanto a maior parte do glucagon adsorvido elui em 50 mM de imidazol (Figura 4.20), para a insulina é necessária uma concentração de 70 mM de imidazol para completar a eluição (Figura 4.21). Durante a alimentação e lavagem a porcentagem de glucagon liberada também foi superior a da insulina: 11,8% do glucagon injetado não adsorveu, enquanto que toda a insulina injetada foi virtualmente adsorvida.

A análise em HPLC das frações obtidas na eluição com 50 mM de imidazol (Figura 4.22) indica que as duas proteínas eluem juntas nestas condições. Esse resultado já era previsto pelos dados dos cromatogramas isolados do glucagon e insulina (Figuras 4.20 e 4.21, respectivamente), pois parte da insulina, no cromatograma em separado, começa a eluir em 50 mM de imidazol. A análise em HPLC da amostra injetada na coluna IMAC indicou 65,6% de insulina e 34,4% de glucagon. A fração 56 correspondente ao pico em 50 mM de imidazol indicou 56,9% de insulina e 43,1% de glucagon e o “pool” das frações deste pico indicou 70,5% de insulina e 29,5% de glucagon. Nota-se que esta porcentagem é próxima à da amostra inicial. Portanto, a eluição com gradiente degrau de imidazol não possibilitou uma melhor seletividade na separação da insulina do glucagon, quando comparada à eluição em gradiente degrau de pH.

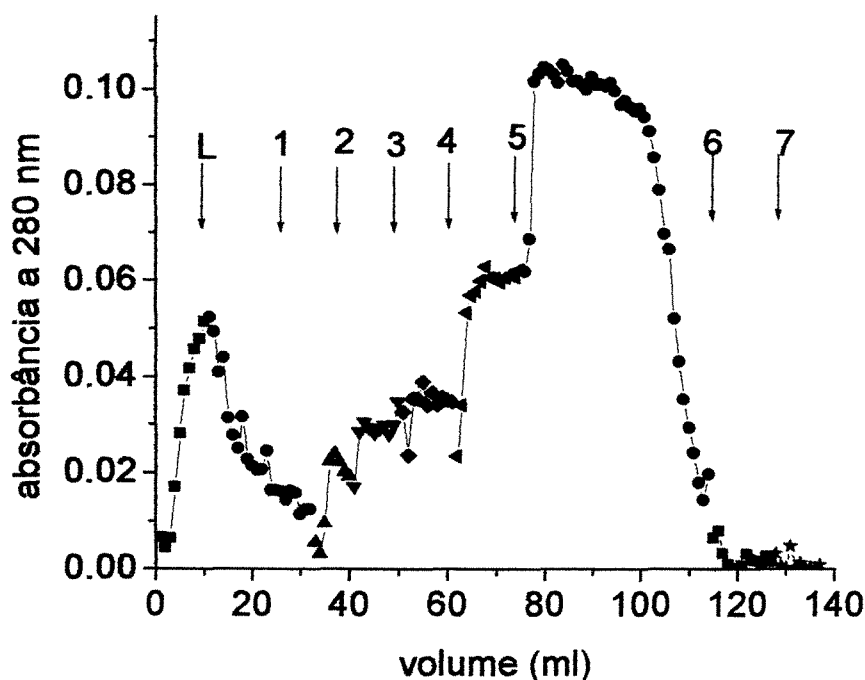


Figura 4.20. Perfil cromatográfico de **glucagon** em **PCI-Ni²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1 (▲)**, **2 (▼)**, **3 (◆)**, **4 (▼)**, **5 (●)**, **6 (■)** e **7 (★)**- eluição com com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 50, 70 e 100 mM, respectivamente.

Tabela 4.12. Balanço de massa do cromatograma de **glucagon** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lava- gem	eluição com imidazol (mM)							recupe- ração total
			5	10	20	30	50	70	100	
massa (mg)	5,1	0,6	0,1	0,2	0,3	0,6	2,3	0,0	0,1	4,2
(%)	100,0	11,8	1,9	3,9	5,9	11,8	45,1	0,0	1,9	82,3

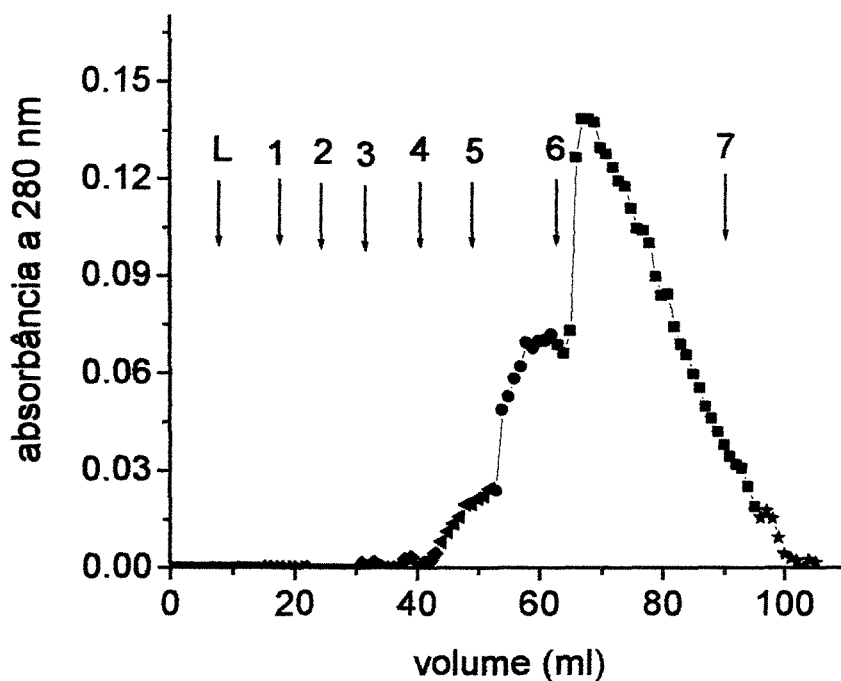


Figura 4.21. Perfil cromatográfico de **insulina suína** em **PCI-Ni²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1 (▲)**, **2 (▼)**, **3 (◆)**, **4 (▼)**, **5 (●)**, **6 (■)** e **7 (★)** - eluição com com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 50, 70 e 100 mM, respectivamente.

Tabela 4.12. Balanço de massa de cada pico do cromatograma de **insulina suína** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lava- gem	eluição com imidazol (mM)							recupe- ração total
			5	10	20	30	50	70	100	
massa (mg)	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6	2,8	0,1	3,7
(%)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,1	15,4	71,8	2,6	94,9

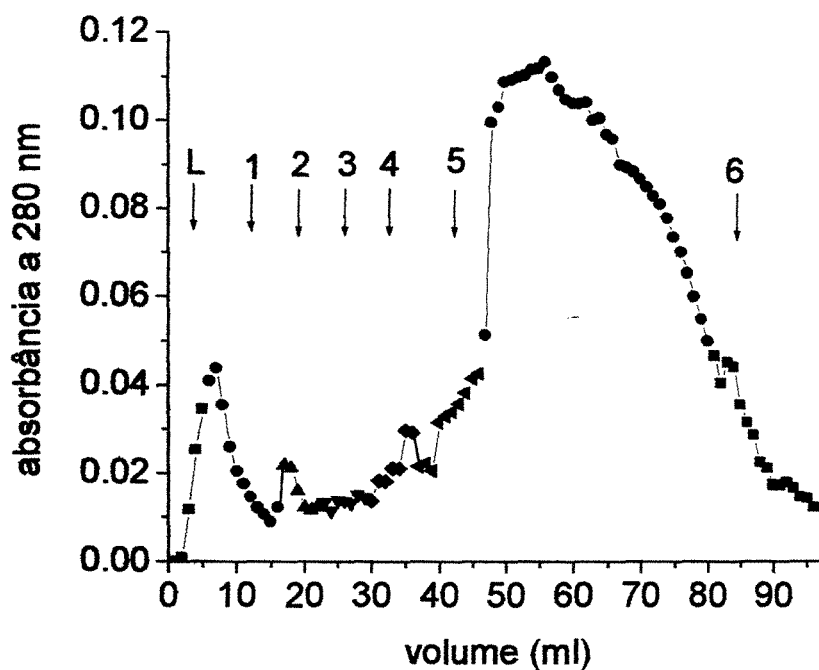


Figura 4.22. Perfil cromatográfico da **mistura de glucagon e insulina suína** em **PCI-Ni²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de imidazol. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L (●)**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1(▲)**, **2(▼)**, **3(◆)**, **4(▼)**, **5(●)** e **6(■)**- eluição com com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 50 e 70 mM, respectivamente.

Tabela 4.13. Balanço de massa do cromatograma da **mistura de glucagon e insulina suína** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lava- gem	eluição com imidazol (mM)						recupe- ração total
			5	10	20	30	50	70	
massa (mg)	4,8	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	3,2	0,4	4,6
(%)	100,0	6,3	2,1	2,1	4,2	6,3	66,7	8,3	95,8

4.2.3. Cromatografias com PCI-Zn²⁺

O Zn²⁺ é o íon metálico que possui uma força de interação mais fraca dentre os metais testados. Porém, seguindo a mesma justificativa dada para os testes com o Ni²⁺ e objetivando uma separação do glucagon e insulina realizou-se a mesma seqüência de cromatografias com esse metal. Como a insulina suína contém o metal zinco em sua estrutura, que é adicionado no processo de cristalização da proteína, esse metal foi parcialmente removido por filtração em gel, como descrito no item 3.2.9. A concentração de zinco foi reduzida de 2,45 para 0,33% (% em massa) determinada por análise de absorção atômica. Cromatografias foram feitas para avaliar se o zinco da molécula estaria competindo significativamente com o zinco imobilizado na matriz PCI pelos sítios de interação na insulina.

4.2.3.1. Cromatografias em PCI-Zn²⁺ com eluição em gradiente degrau de pH

Na primeira cromatografia com este metal injetou-se glucagon na coluna previamente equilibrada e carregada com solução de sulfato de zinco 20 mM. A eluição foi conduzida através de um gradiente degrau de pH. O sistema tamponante utilizado foi tampão fosfato 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 para o equilíbrio e adsorção e pH 6,0, 5,0, 4,0 e 3,0 para as etapas de eluição. A Figura 4.23 apresenta o perfil cromatográfico obtido neste experimento e a Tabela 4.15 o respectivo balanço de massa. Foram realizadas também cromatografias nas mesmas condições descritas com a insulina suína e com a mistura de glucagon e insulina suína. Os perfil cromatográfico do experimento com a insulina suína está apresentado na Figura 4.24 e o da mistura destas proteínas na Figura 4.25 e nas Tabelas 4.16 e 4.17 estão os respectivos balanços de massa. A insulina suína utilizada nestes experimentos foi a insulina de alta pureza contendo 2,45% de zinco em massa.

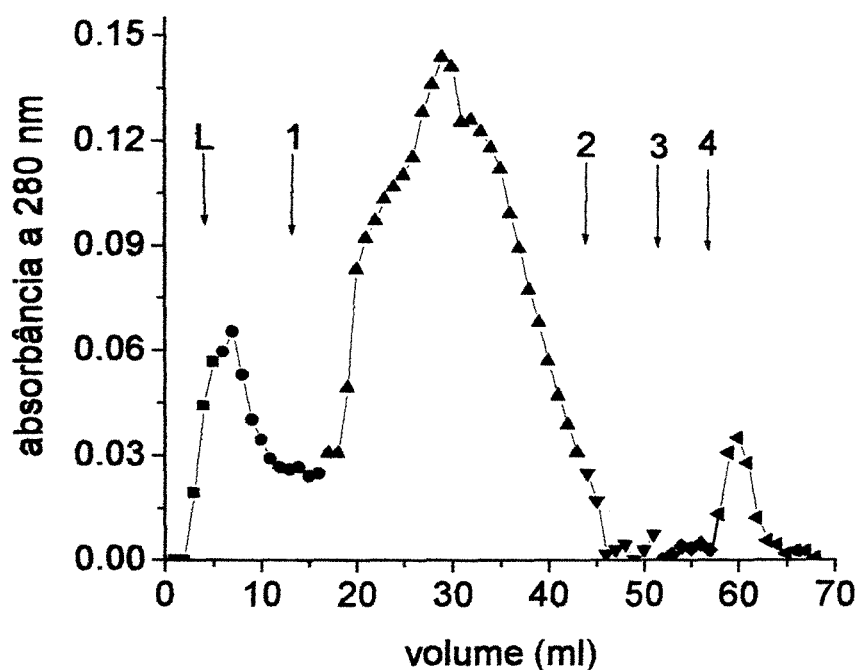


Figura 4.23. Perfil cromatográfico de **glucagon** em **PCI-Zn²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼) e **3**(◆)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,0; 5,0 e 4,0, respectivamente. **4** (◄)- Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.15. Balanço de massa do cromatograma da **glucagon** em **PCI-Zn²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lava- gem	eluição em pH			regene- ração	recuperação total
			6,0	5,0	4,0		
massa (mg)	2,5	0,4	1,8	0,0	0,0	0,1	2,3
(%)	100,0	16,0	72,0	0,0	0,0	4,0	92,0

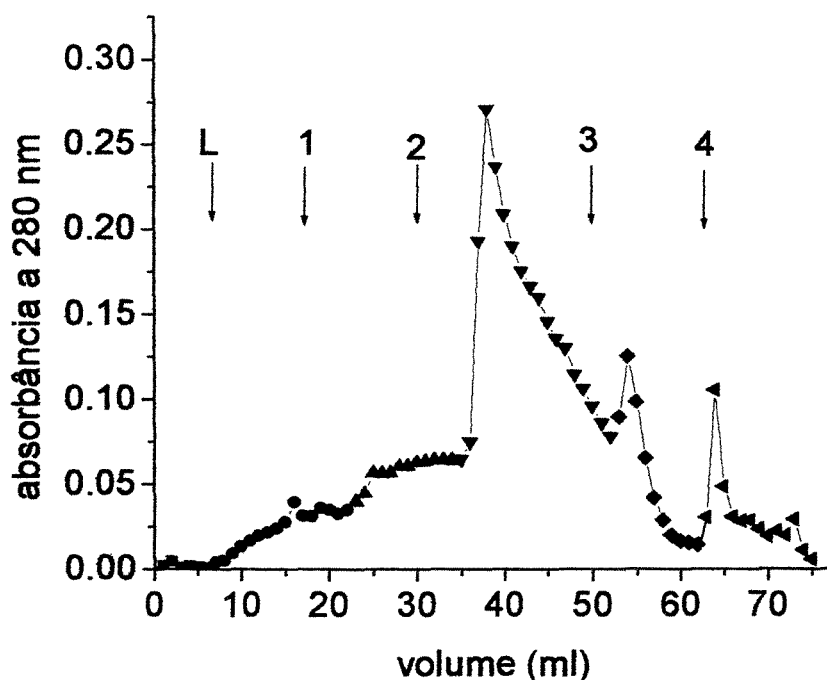


Figura 4.24. Perfil cromatográfico de **insulina suína** em **PCI-Zn²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼) e **3**(◆)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,0; 5,0 e 4,0, respectivamente. **4** (◄)- Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.16. Balanço de massa do cromatograma de **insulina suína** em **PCI-Zn²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lava- gem</i>	<i>eluição em pH</i>			<i>regene- ração</i>	<i>recupe- ração total</i>
			6,0	5,0	4,0		
<i>massa (mg)</i>	4,5	0,4	0,7	2,7	0,5	0,4	4,7
<i>(%)</i>	100,0	8,9	15,6	60,0	11,1	8,9	104,5

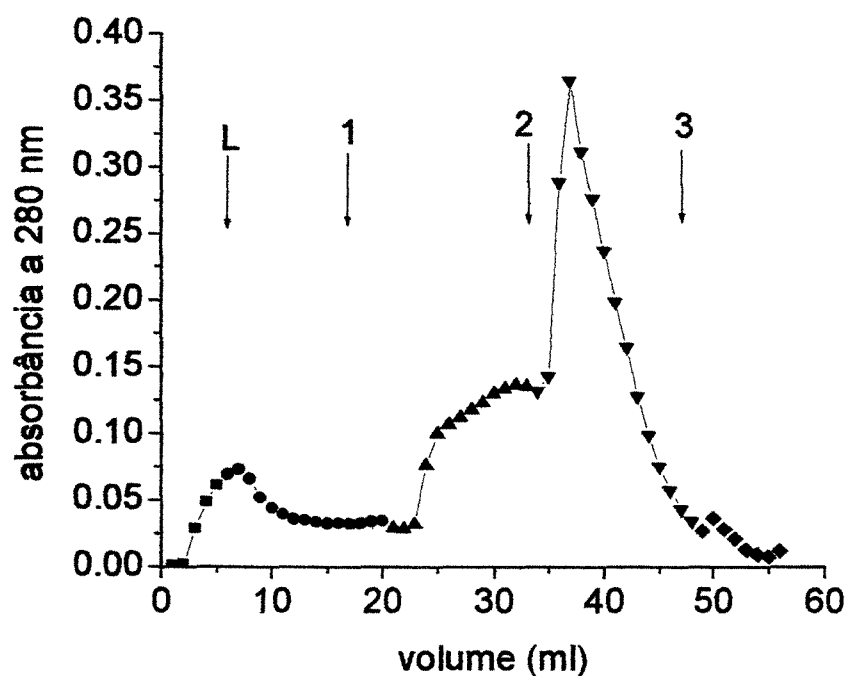


Figura 4.25. Perfil cromatográfico da **mistura de insulina suína e glucagon** em **PCI-Zn²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)-lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼) e **3**(♦) - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,0; 5,0 e 4,0, respectivamente.

Tabela 4.17. Balanço de massa do cromatograma da **mistura de insulina suína e glucagon** em **PCI-Zn²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição em pH			recuperação total
			6,0	5,0	4,0	
massa (mg)	5,2	0,8	1,3	2,7	0,2	5,0
(%)	100,0	15,4	25,0	51,9	3,8	96,2

Os cromatogramas das proteínas separadamente indicam uma menor afinidade do glucagon por PCI-Zn²⁺ do que a insulina. A recuperação do glucagon injetado que elui durante a alimentação e lavagem foi de 16,0%, enquanto que para a insulina foi de 8,9%. Esses dados corroboram com o fato do glucagon eluir majoritariamente no pH 6,0 e a insulina em pH 5,0.

A análise em HPLC da fração correspondente ao pico obtido em pH 5,0 da Figura 4.25 (fração 37) indica a predominância de insulina, (considerando só as áreas dos picos de glucagon e insulina no cromatograma do HPLC, esta fração possui 80% de insulina). O “pool” das frações do pico em pH 6,0 continha 70,4% de glucagon e o “pool” obtido em pH 5,0 continha 87,8% de insulina (novamente, considerando somente as áreas dos picos de glucagon e insulina).

Essa condição também se mostra promissora, indicando a necessidade de um aprimoramento no procedimento experimental utilizado, uma vez que o objetivo do trabalho é a purificação do glucagon.

A verificação do efeito do zinco presente nos cristais de insulina foi feita através da cromatografia em PCI-Zn²⁺ da insulina parcialmente livre de zinco, 0,33% em massa (Figura 4.26 e Tabela 4.18). A remoção parcial do zinco dos cristais de insulina foi realizada através de cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50. Observa-se que ocorre uma diferença significativamente pequena durante a lavagem da matriz com o tampão de adsorção, mas o restante do cromatograma é bastante similar para as duas amostras testadas. Baseado-se nestes resultados, optou-se por continuar os experimentos com a insulina sem a remoção do zinco.

Para o conjunto de experimentos com insulina e glucagon e eluição com gradiente de grau de pH conclui-se que o glucagon obedece a regra de Sulkowski (1989). Para eluição do glucagon adsorvido em PCI-Cu²⁺ é necessário um tampão em pH 2,1, já de PCI-Ni²⁺ a eluição ocorre em pH 4,0 e de PCI-Zn²⁺ em pH 6,0.

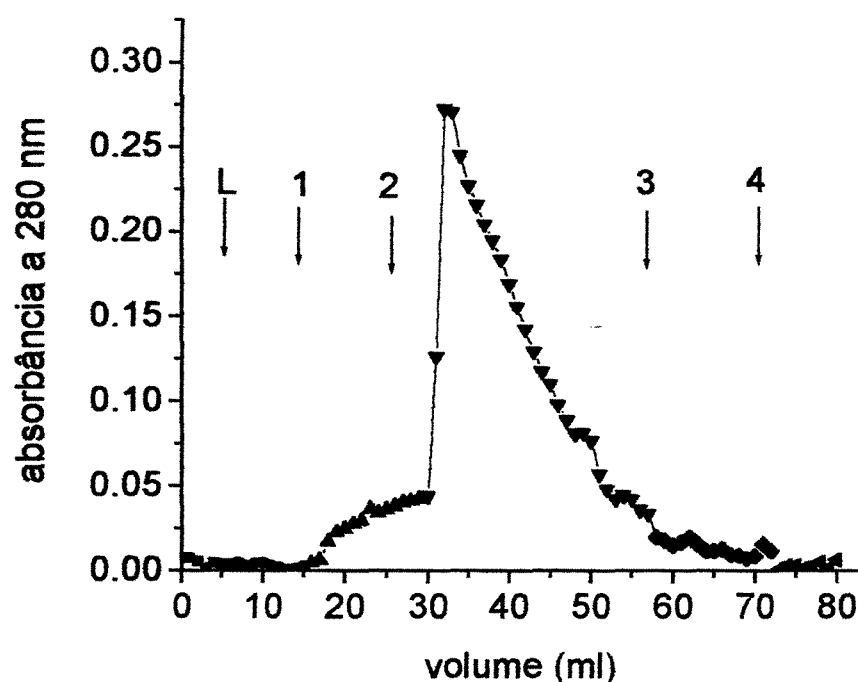


Figura 4.26. Perfil cromatográfico de **insulina suína parcialmente livre de zinco** em **IMAC-Zn²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)-lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼), **3**(◆) e **4**(◐)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 6,0; 5,0; 4,0 e 3,0, respectivamente.

Tabela 4.18. Balanço de massa do cromatograma da **insulina suína** parcialmente livre de zinco em **PCI-Zn²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>				<i>recupe- ração total</i>
			6,0	5,0	4,0	3,0	
<i>massa (mg)</i>	4,6	0,1	0,4	3,7	0,2	0,0	4,4
<i>(%)</i>	100,0	2,2	8,7	80,4	4,3	0,0	95,7

A insulina se desvia da regra para os metais Ni^{2+} e Zn^{2+} , pois nestes dois casos o pH necessário para a eluição é o mesmo, pH 5,0. Porém não foi testado um pH intermediário entre pH 6,0 e 5,0 para confirmar essa semelhança. Quando se comparam as figuras 4.18 e 4.24, nota-se que a interação por PCI-Zn^{2+} é aparentemente mais fraca.

4.2.3.2. Cromatografias em PCI-Zn^{2+} com eluição em gradiente degrau de imidazol

Objetivando uma melhor seletividade na eluição das proteínas em estudo, realizou-se experimentos utilizando diferentes concentrações de imidazol no tampão de adsorção durante as etapas de eluição, seguindo o mesmo procedimento utilizado para o metal cobre (descrito no item 4.2.1.3). As Figuras 4.27, 4.28 mostram os perfis cromatográficos obtidos nos experimentos com glucagon e insulina, respectivamente e as Tabelas 4.19 e 4.20 os seus respectivos balanços de massa.

O experimento com a mistura das duas proteínas e eluição com imidazol não foi realizado, porém a análise dos cromatogramas de glucagon e insulina separadamente sugerem uma possível separação, pois enquanto o glucagon só elui em 20 mM de imidazol, a insulina começa a eluir em 10 mM de imidazol.

Nota-se que a força de interação da insulina para os experimentos com imidazol diminui de acordo com a regra de Sulkowski (1985), pois no experimento realizado com PCI-Cu^{2+} e eluição com gradiente degrau de imidazol, a concentração de imidazol necessária para eluir a insulina foi de 100 mM, enquanto que para o experimento com PCI-Ni^{2+} foi 70 mM e caiu para 10 mM quando se usou o PCI-Zn^{2+} . Já o glucagon não obedece tanto a esta regra quando se usa o imidazol na eluição, possivelmente pelos motivos já descritos anteriormente, ou seja, a afinidade do glucagon por íons metálicos é equivalente à do imidazol.

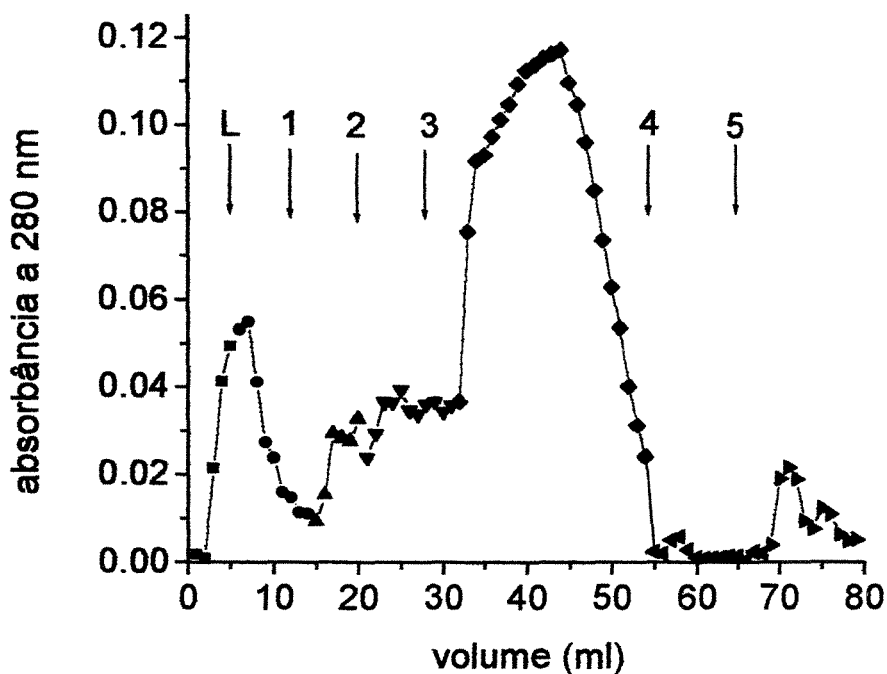


Figura 4.27. Perfil cromatográfico de **glucagon** em **PCI-Zn²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1** (▲), **2** (▼), **3** (◆) e **4** (◄) - eluição com com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 mM, respectivamente. **5** (►)- Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 4.19. Balanço de massa do cromatograma de **glucagon** em **PCI-Zn²⁺** e eluição com gradiente degrau de **imidazol**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição com imidazol (mM)				regene- ração	recupe- ração total
			5	10	20	30		
massa (mg)	2,6	0,3	0,1	0,3	1,5	0,0	0,1	2,3
(%)	100,0	11,5	3,8	11,5	57,7	0,0	3,8	88,5

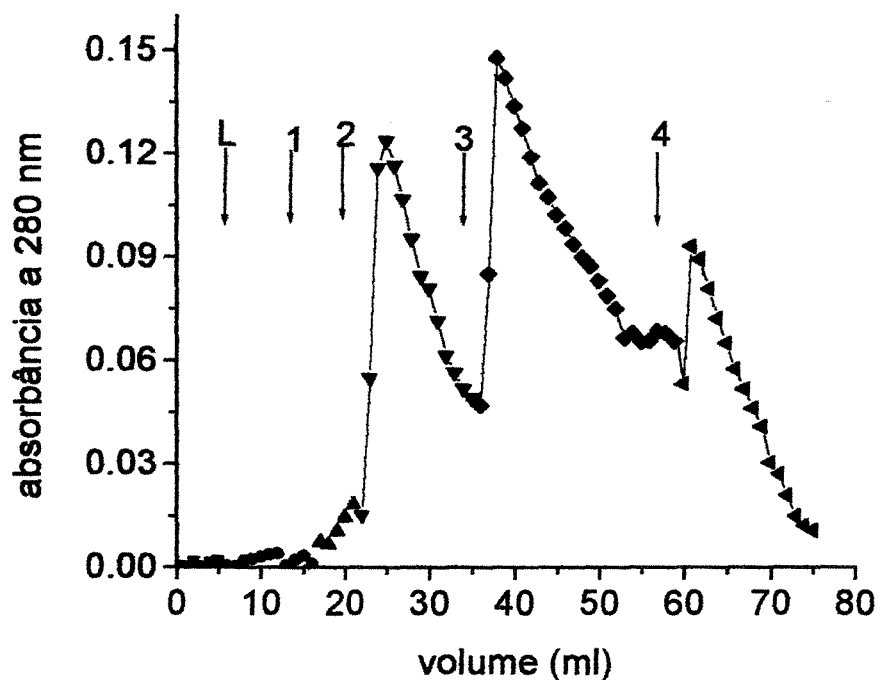


Figura 4.28. Perfil cromatográfico de **insulina suína** em **PCI-Zn²⁺** utilizando o tampão fosfato e eluição com gradiente degrau de **imidazol**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼), **3**(◆) e **4**(◄) - eluição com com tampão de adsorção contendo imidazol nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 mM, respectivamente.

Tabela 4.20. Balanço de massa do cromatograma de **insulina suína** em **PCI-Zn²⁺** e eluição com gradiente degrau de **imidazol**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	eluição com imidazol (mM)				recupe- ração total
			5	10	20	30	
massa (mg)	4,6	0,1	0,1	1,1	2,3	0,8	4,4
(%)	100,0	2,2	2,2	23,9	50,0	17,4	95,7

4.3. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE GLUCAGON E INSULINA EM PCI-Ni²⁺

Uma vez que o íon metálico níquel propiciou resultados mais promissores nos experimentos em coluna, isotermas de adsorção destas proteínas, separadamente, em diferentes valores de pH foram construídas com o objetivo de otimizar a separação entre a insulina e o glucagon, obtendo-se alguma seletividade já na etapa de adsorção.

Para a determinação das isotermas de adsorção de glucagon e insulina de alta pureza em PCI-Ni²⁺ utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.2.5. Avaliou-se a influência do pH na capacidade de adsorção para ambas proteínas. A partir daí, calculou-se a inclinação da parte linear das isotermas, isto é, o coeficiente de distribuição K e comparou-se os valores obtidos das razões entre o K da isoterma da insulina (K_i) e do glucagon (K_g), para cada pH, razão esta chamada de fator de separação α . As Figuras 4.29, 4.30 e 4.31 apresentam as isotermas de adsorção do glucagon e da insulina no pH 7,0, 6,0 e 5,0, respectivamente. A Tabela 4.21 apresenta os valores dos coeficientes de distribuição K e os respectivos fatores de correlação, bem como o fator de separação α para os diferentes pH de adsorção. Comparando-se as isotermas de adsorção das proteínas para os diferentes valores de pH, nota-se que para o pH 7,0 as isotermas de insulina e glucagon apresentam uma inclinação com valores mais distintos. Conforme o pH de adsorção diminui de 7,0 para 5,0, as isotermas das duas proteínas tendem a se sobrepor, indicando que a adsorção diferencial nestas condições seria inviável. A partir daí, deu-se continuidade aos experimentos em colunas conduzindo a adsorção no mesmo tampão fosfato de sódio 20 mM em pH 7,0 com 1,0 M de NaCl. Deve-se, no entanto, observar que o fator de separação α tende a aumentar com o aumento do pH, indicando que a adsorção a um pH acima de 7,0 poderia propiciar a adsorção seletiva desejada.

Tabela 4.21. Comparação entre as isotermas de adsorção de glucagon e de insulina para diferentes valores de pH.

<i>proteína</i>	<i>pH</i>	<i>coeficiente de distribuição (K)</i>	<i>faixa linear (Ceq* em mg/ml)</i>	<i>fator de correlação</i>	<i>Fator de separação α (Ki/Kg)</i>
<i>insulina</i>	7,0	186,5	0,01 a 0,15	0,969	2,2
<i>glucagon</i>		84,9	0,00 a 0,20	0,979	
<i>insulina</i>	6,0	79,8	0,00 a 0,80	0,976	1,5
<i>glucagon</i>		53,9	0,00 a 0,10	0,994	
<i>insulina</i>	5,0	101,0	0,00 a 0,35	0,895	0,8
<i>glucagon</i>		132,3	0,10 a 0,30	0,921	

*Ceq é a concentração de proteína em equilíbrio na solução.

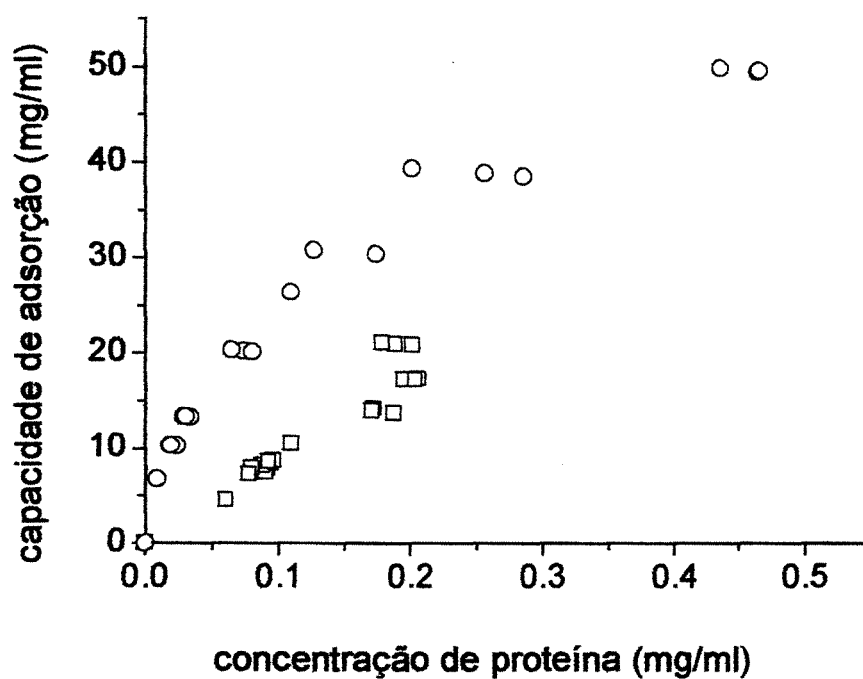


Figura 4.29. Isoterma de adsorção de glucagon e insulina em PCI-Ni²⁺ a temperatura ambiente. Solução tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M a pH 7,0. Ensaio em tanques agitados com 5,0 mg de PCI e volume de solução de 1,0 ml.

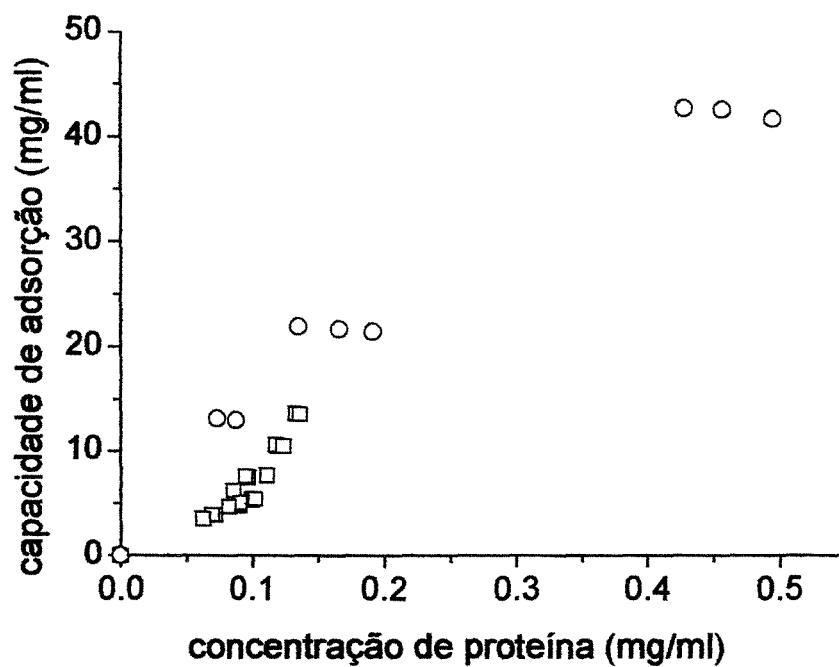


Figura 4.30. Isotherma de adsorção de glucagon e insulina em PCI-Ni²⁺ a temperatura ambiente. Solução tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M a pH 6,0. Ensaio em tanques agitados com 5,0 mg de PCI e volume de solução de 1,0 ml.

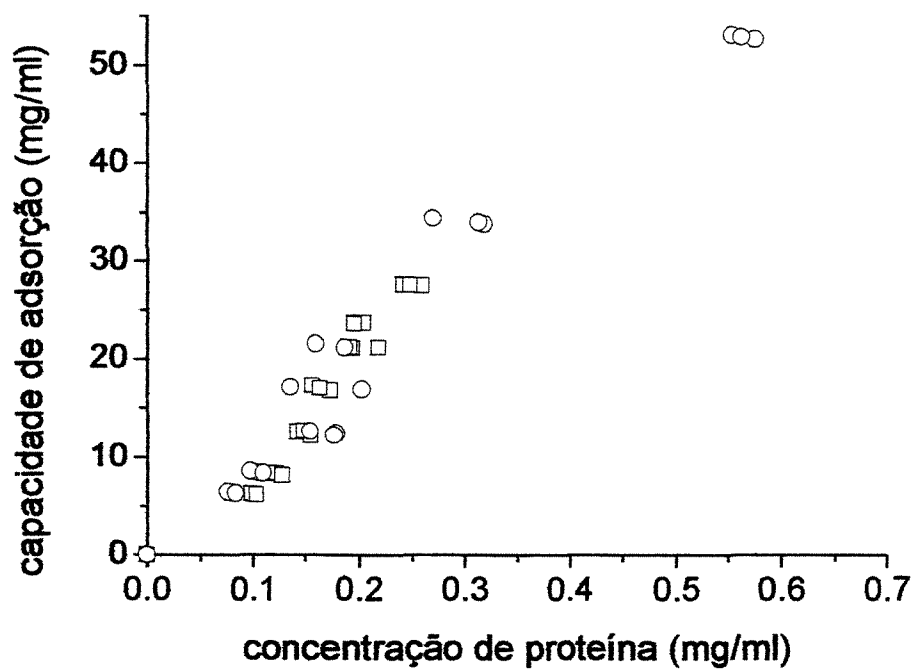


Figura 4.31. Isoterma de adsorção de glucagon e insulina em PCI-Ni²⁺ a temperatura ambiente. Solução tampão fosfato 20 mM, NaCl 1,0 M a pH 5,0. Ensaio em tanques agitados com 5,0 mg de PCI e volume de solução de 1,0 ml.

4.4. CROMATOGRAFIAS IMAC COM FRAÇÕES DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DE INSULINA

Com base nos resultados das cromatografias IMAC obtidos utilizando as proteínas insulina e glucagon de alta pureza, selecionou-se a condição com maior potencial para a separação destas proteínas para a avaliação de duas frações de processamento industrial de insulina. A condição selecionada para prosseguir com os experimentos foi com o metal Ni^{2+} imobilizado em PCI e eluição com gradiente degrau de pH, porém sem o NaCl. Apesar da seletividade ser menor na ausência de NaCl, os experimentos em tanques agitados mostraram que a dessorção de glucagon é favorecida nesta condição.

A primeira fração avaliada foi a fração resultante de uma precipitação com acetato de zinco, que contém cerca de 70% de glucagon, chamada neste trabalho de “fração G-70”. A segunda fração testada foi uma fração obtida em uma etapa anterior do processo, resultante de uma precipitação isoeletrica, e que possui cerca de 70% de insulina, chamada neste trabalho de “fração I-70”.

Utilizou-se as mesmas condições operacionais dos experimentos em coluna realizados anteriormente. Como tampão de equilíbrio e adsorção utilizou-se o tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 . A eluição foi realizada através de um gradiente degrau de pH e a regeneração da matriz foi feita com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M pH 8,0. A vazão utilizada nestes experimentos foi de 0,35 ml/min e o volume de alimentação foi de 5,0 ml.

4.4.1. Cromatografias em PCI- Ni^{2+} com a fração G-70

O cromatograma das proteínas glucagon e insulina, de alta pureza, isoladamente em PCI- Ni^{2+} (Figuras 4.17 e 4.18, respectivamente) indicam que a eluição de ambas proteínas ocorre entre o pH 5,0 e 4,0, sendo que em pH 3,0 nada mais é eluído. Baseando-se nestes dados, realizou-se a cromatografia com a fração G-70 nestas mesmas condições, porém com tampões de eluição sem NaCl (Figura 4.32 e Tabela 4.22).

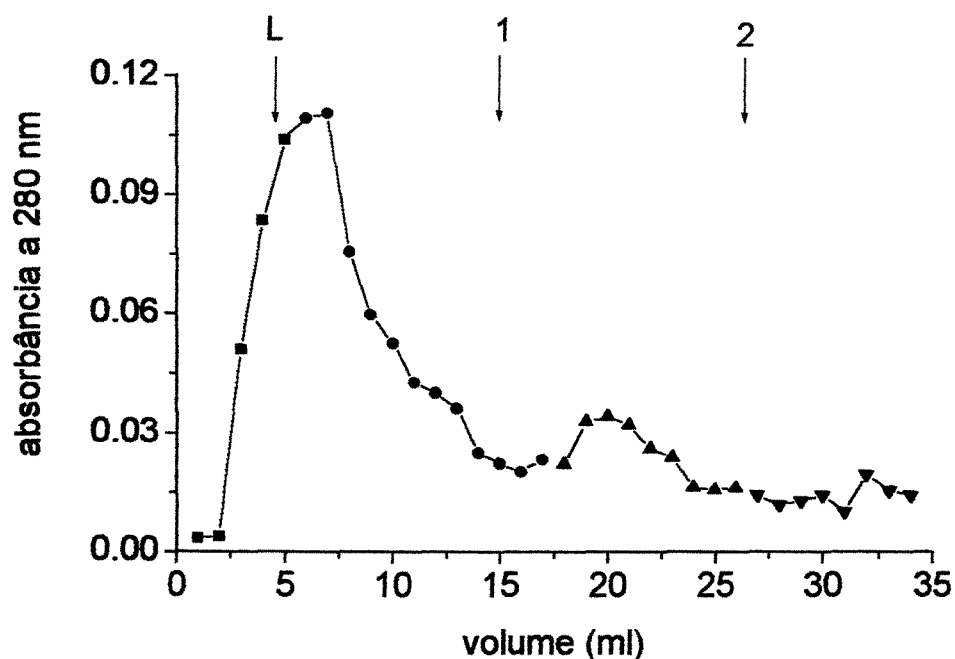


Figura 4.32. Perfil cromatográfico da **fração G-70** em **PCI-Ni²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1** (▲) e **2** (▼)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 5,0 e 4,0, respectivamente.

Tabela 4.22. Balanço de massa do cromatograma da **fração G-70** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimentação	lavagem	eluição em pH		recuperação total
			5,0	4,0	
massa (mg)	1,3	0,6	0,2	0,1	0,9
(%)	100,0	46,2	15,4	7,7	69,2

O resultado desta cromatografia se mostrou, a princípio, fora do previsto, pois a maior parte da proteína injetada na coluna foi eluída durante a fase de lavagem. A análise em HPLC da fração 7, referente a etapa de lavagem, indicou uma concentração muito baixa de glucagon, não sendo possível concluir se o glucagon injetado na coluna IMAC não estava adsorvendo em PCI-Ni²⁺. A partir daí, testou-se algumas variações nas condições experimentais, na tentativa de elucidar o porquê deste comportamento.

Uma possível explicação seria a deterioração da amostra, pois esta fração estava acondicionada a 4 °C por um período superior a um ano. Optou-se por realizar uma cromatografia com o íon metálico Cu²⁺ imobilizado (Figura 4.33 e Tabela 4.23). O resultado desta cromatografia foi bastante semelhante ao obtido com a mistura de proteínas de alta pureza (Figura 4.12). Com este dado descartou-se a possibilidade de deterioração da amostra. Entretanto, esta condição, utilizando o íon metálico Cu²⁺ e gradiente de pH, não possibilitou a separação entre o glucagon e a insulina, separação que também não ocorreu com o experimento com as substâncias de alta pureza. A análise em HPLC da fração 30, correspondente ao pico obtido em pH 2,3 da Figura 4.33, mostrou que houve apenas uma concentração tanto do glucagon, quanto da insulina, e que estas duas proteínas eluem, exatamente, na mesma proporção existente na alimentação da coluna IMAC.

A realização da cromatografia em PCI-Ni²⁺ com a fração G-70 e a continuação da eluição até o pH 2,3 (Figura 4.34 e Tabela 4.24) veio a esclarecer os resultados. A análise em HPLC do pico obtido em pH 3,0 mostrou a presença majoritária de glucagon na fração 43. A Figura 4.35 apresenta os cromatogramas da análise em HPLC da alimentação da coluna IMAC e da fração obtida no pico de pH 3,0 com suas respectivas áreas fornecidas pelo integrador. Como o pico referente a insulina apresentou uma área menor do que a área mínima programada no equipamento (50.000), não foi possível calcular de quanto foi a purificação do glucagon em relação a insulina.

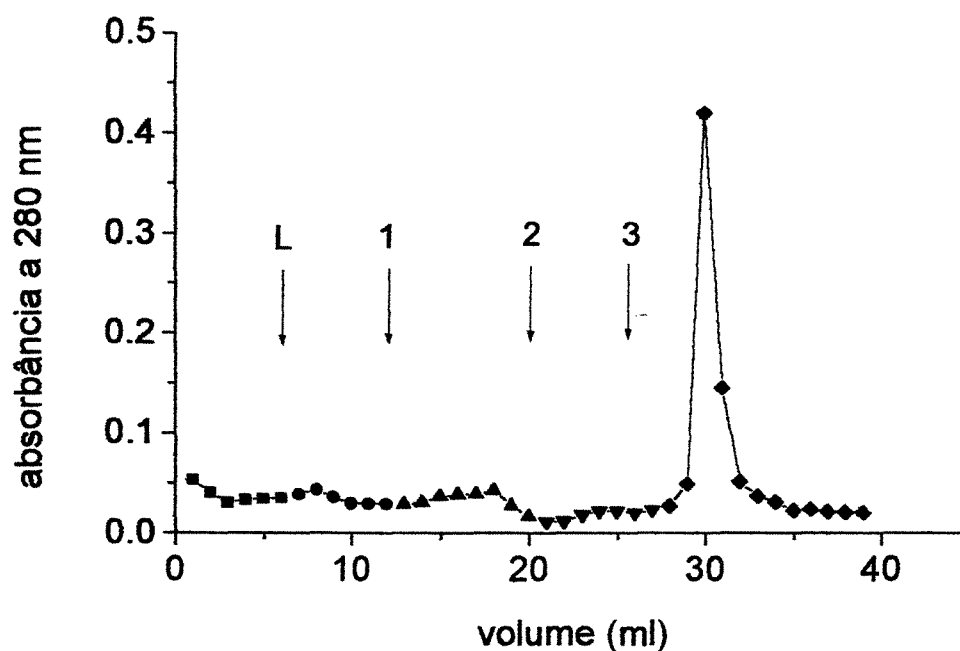


Figura 4.33. Perfil cromatográfico da **fração G-70** em **PCI-Cu²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼) e **3**(◆) - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0, 3,0 e 2,3, respectivamente.

Tabela 4.23. Balanço de massa do cromatograma da **fração G-70** em **PCI-Cu²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>			<i>recuperação total</i>
			<i>4,0</i>	<i>3,0</i>	<i>2,3</i>	
<i>massa (mg)</i>	0,8	0,2	0,2	0,2	0,1	0,7
<i>(%)</i>	100,0	25,0	25,0	25,0	12,5	87,5

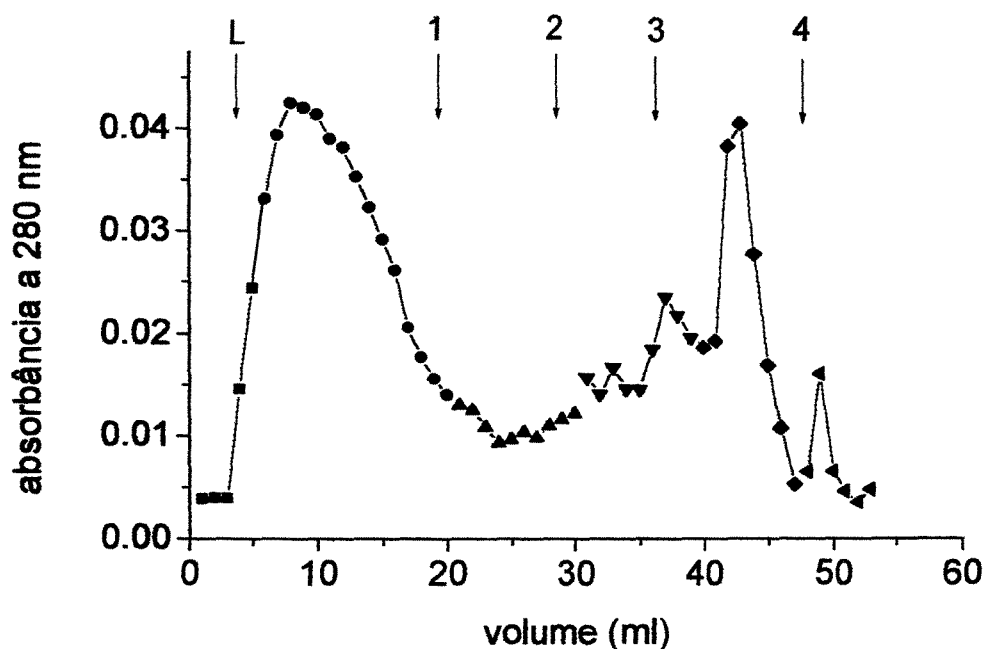


Figura 4.34. Perfil cromatográfico da **fração G-70** em **PCI-Ni²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1** (▲), **2** (▼), **3** (◆) e **4** (◄)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 5,0; 4,0 3,0 e 2,3, respectivamente.

Tabela 4.24. Balanço de massa do cromatograma da **fração G-70** em **PCI-Ni²⁺**.

proteína total	alimen- tação	lavagem	massa eluída em pH				Recuperação total
			5,0	4,0	3,0	2,3	
massa (mg)	0,9	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	0,7
(%)	100,0	44,4	11,1	11,1	11,1	0,0	77,8

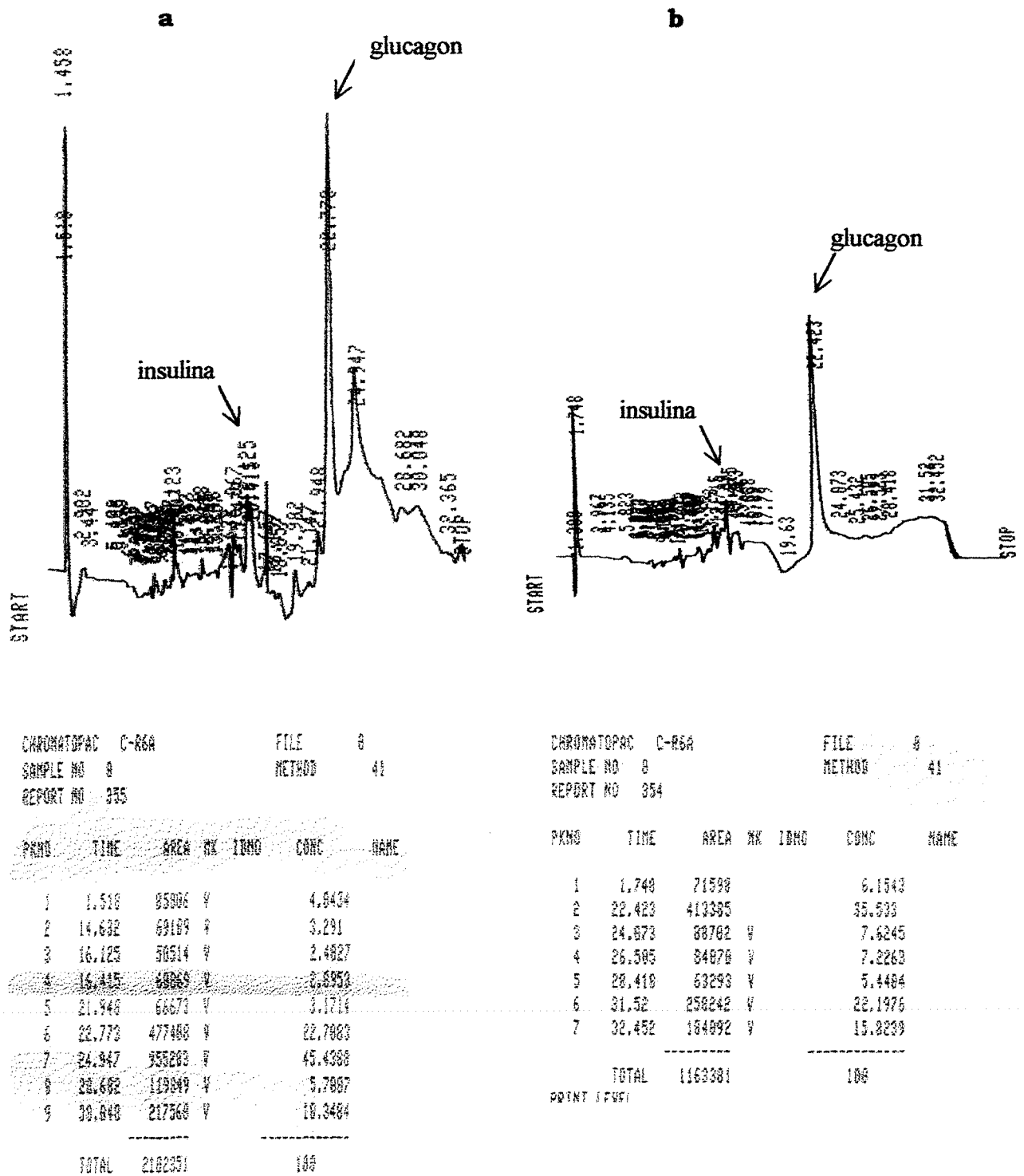


Figura 4.35. Análise em HPLC das frações G-70 da alimentação (a) e do pico eluído em pH 3,0 (b).

A análise obtida revela um resultado bastante promissor, pois levando-se em consideração que o pico obtido no tempo de retenção 1,748 é referente ao tampão em que a amostra está diluída e os picos após 30 minutos são devido a oscilações decorrentes do tipo de gradiente utilizado na análise, o pico com tempo de retenção de 22,423, referente ao glucagon, é majoritário e portanto o glucagon eluído em pH 3,0 é de pureza elevada.

4.4.2. Cromatografias em PCI-Ni²⁺ com a fração I-70

Uma vez obtidos resultados satisfatórios com a fração G-70, partiu-se para a realização da cromatografia com a fração I-70, que vem a ser uma fração rica em insulina. Repetiu-se as mesmas condições operacionais do experimento anterior e o cromatograma obtido está apresentado na Figura 4.36 e o balanço de massa de proteína total na Tabela 4.25. Nota-se neste cromatograma, que novamente, a maior parte da alimentação é eluída na etapa de lavagem. Os picos obtidos em pH 5,0 e 2,3 foram analisados em HPLC, bem como a amostra alimentada na coluna IMAC e a fração 7, correspondente a etapa de lavagem. Esta análise indicou que o glucagon só elui em pH 2,3 e a insulina somente nas frações da regeneração. A Figura 4.37 apresenta os cromatogramas das análises em HPLC da amostra injetada na coluna IMAC e da fração 57, correspondente ao pico em pH 2,3. Apesar de não haver uma purificação completa do glucagon em relação à insulina, a razão entre as concentrações de insulina e glucagon na alimentação da coluna IMAC e na fração do pico em pH 2,3 (dada pela razão entre a área dos picos de insulina e glucagon, com os tempos de retenção de 15,6 e 21,4, respectivamente) passou de 2,6 para 0,5, ou seja, houve um enriquecimento em termos de glucagon de 5 vezes. A insulina eluiu majoritariamente durante a etapa de regeneração, conforme indicou a análise em HPLC.

Verifica-se também com estes experimentos que a força de interação das proteínas pelo adsorvente variou de acordo com a fonte inicial. Para os tipos de amostra testadas neste trabalho (proteína de alta pureza, fração

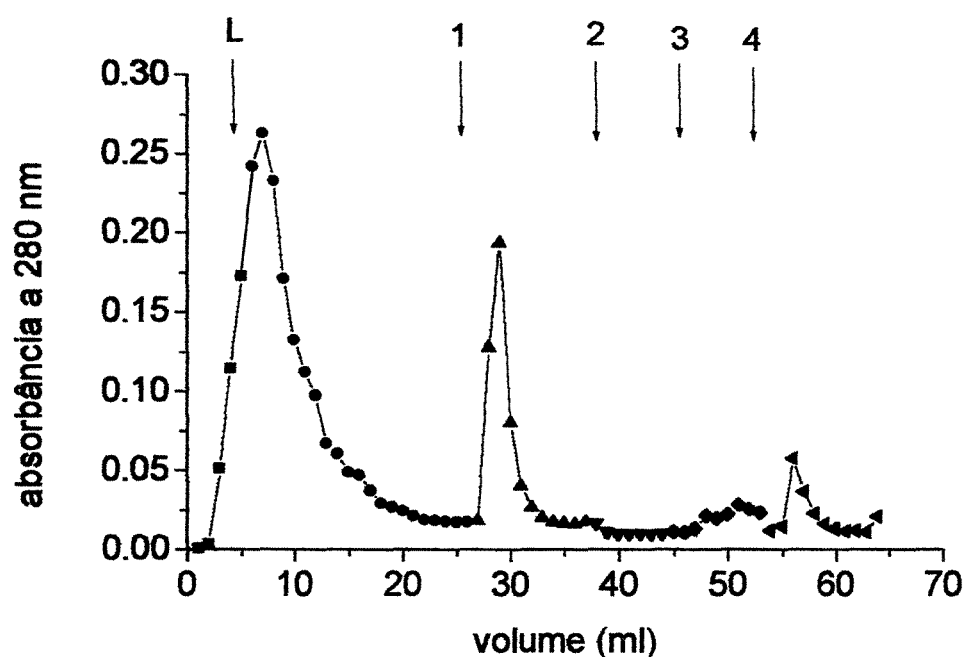


Figura 4.36. Perfil cromatográfico da **fração I-70** em **PCI-Ni²⁺**. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L** (●)- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1**(▲), **2**(▼), **3**(◆) e **4**(◐)- eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 5,0, 4,0, 3,0 e 2,3, respectivamente.

Tabela 4.25. Balanço de massa do cromatograma da **fração I-70** em **PCI-Ni²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>				<i>recuperação total</i>
			5,0	4,0	3,0	2,3	
<i>massa (mg)</i>	4,5	2,1	0,6	0,1	0,2	0,2	3,2
<i>(%)</i>	100,0	46,7	13,3	2,2	4,4	4,4	71,1

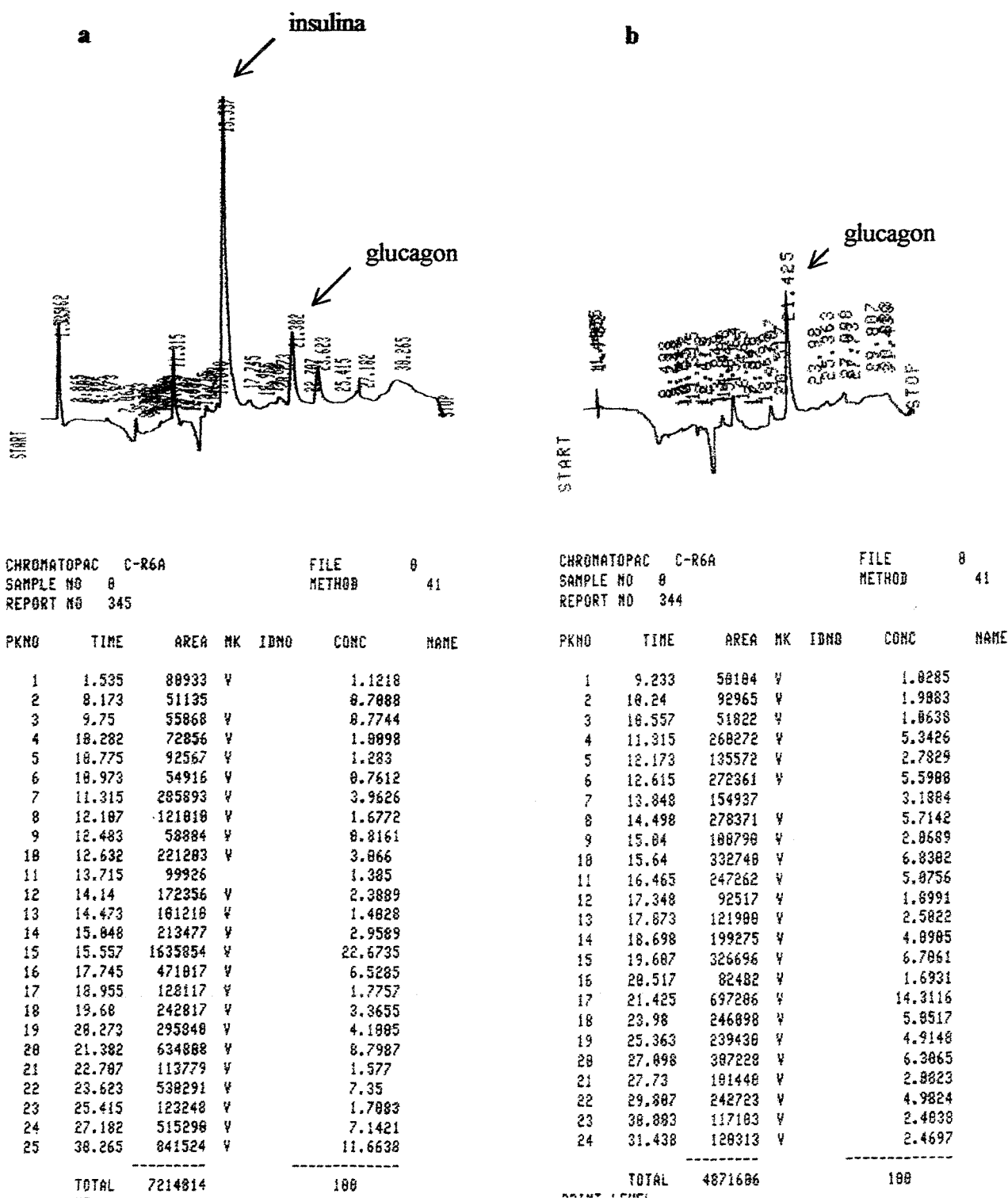


Figura 4.37. Análise em HPLC das frações I-70 da alimentação (a) e do pico eluído em pH 2,3 (b).

rica em glucagon e fração rica em insulina) a condição requerida para a eluição de glucagon variou, sendo que o aumento da concentração de impurezas fez com que o glucagon passa-se a eluir em valores de pH cada vez mais ácidos: o glucagon de alta pureza eluiu do adsorvente PCI-Ni²⁺ em pH 4,0 com 1,0 M de NaCl (Figura 4.17), o glucagon presente na fração G-70 eluiu em pH 3,0 (Figura 4.34) e o glucagon presente na fração I-70 eluiu somente em pH 2,3 (Figura 4.35).

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

5.1. CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo realizar estudos de adsorção de glucagon e insulina em sílica-IDA-Me²⁺ através da técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC) visando desenvolver um processo de purificação de glucagon a partir de fração de processamento industrial de insulina. Para tal, foram realizados experimentos preliminares em tanques agitados e posteriormente passou-se a utilizar uma coluna de cromatografia líquida de baixa pressão, empacotada com sílica-IDA e foram testados os metais Cu²⁺, Ni²⁺ e Zn²⁺ na imobilização. Esses experimentos foram realizados com proteínas de alta pureza em solução tampão. Uma vez determinada a condição mais promissora de separação da insulina do glucagon, passou-se para os ensaios com as frações de processamento industrial de insulina.

A principal conclusão resultante deste trabalho foi que a aplicação da técnica IMAC, utilizando PCI-Ni²⁺ e eluição com abaixamento de pH, na purificação de glucagon a partir de fração industrial de insulina é potencialmente viável. No entanto, o pH requerido para eluir o glucagon variou de acordo com o conteúdo de impurezas na amostra inicial, sendo necessário um ajuste no pH de eluição para a aplicação da técnica com outras fontes de glucagon.

Outras conclusões relevantes obtidas foram:

- a) A solubilidade do glucagon no tampão fosfato de sódio 20 mM com NaCl 1,0 M e pH 7,0 de até 0,55 mg/ml viabilizou o uso da técnica IMAC nestas condições.
- b) Os experimentos em tanques agitados, utilizando PCI-Cu²⁺ e glucagon de alta pureza, mostraram que a afinidade do glucagon pelo íon metálico cobre é forte e a eluição total só ocorre em pH 2,1 na ausência de NaCl 1,0 M ou com a adição de de imidazol a uma concentração de 100 mM no tampão de adsorção.
- c) A cromatografia em PCI-Cu²⁺ de glucagon de alta pureza utilizando o tampão fosfato de sódio 20 mM em todas as etapas apresentou uma maior estabilidade na linha de base.
- d) A presença do sal NaCl 1,0 M nos tampões de eluição em PCI-Cu²⁺ indicou uma melhor seletividade na separação de glucagon e insulina, apesar da baixa resolução.
- e) A interação, tanto do glucagon quanto da insulina, pelo ligante Cu²⁺ foi intensa, não sendo possível eluir toda a insulina durante o gradiente de pH; somente com a regeneração usando EDTA esta eluição foi possível.
- f) O glucagon e a insulina apresentaram diferença na afinidade por todos os íons metálicos testados. Porém, os experimentos realizados com o Ni²⁺ e Zn²⁺ mostraram diferenças de afinidade mais significativas em relação ao Cu²⁺, sendo que a cromatografia com o ligante Ni²⁺ e eluição com gradiente degrau de pH apresentou resultado mais promissor para a separação da insulina do glucagon.
- g) O fator de separação α entre a insulina e o glucagon aumentou com o aumento do pH.

- h) A purificação de glucagon a partir fração de processamento industrial de insulina rica em glucagon, fração G-70, utilizando o íon metálico Ni^{2+} e eluição com gradiente degrau de pH, possibilitou um enriquecimento do glucagon presente no pico em pH 2,3.
- i) A aplicação da técnica IMAC a partir de uma fração rica em insulina, fração I-70, e a dessorção com gradiente degrau de pH, apresentou um pico em pH 2,3 rico em glucagon com fator de purificação igual a 5.

5.2 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

As sugestões para a continuidade deste trabalho podem ser divididas em três grupos principais que incluem:

1. Aprimoramento nos parâmetros operacionais que favoreçam uma melhor separação das proteínas de interesse. Os experimentos sugeridos para tal incluem a determinação das isotermas de adsorção a um pH maior que 7,0, pois como o fator de separação α aumentou com o aumento do pH, é possível que se consiga alguma seletividade já na etapa de adsorção usando o pH 7,5 ou 8,0. Outra sugestão seria testar um gradiente linear de pH na cromatografia com o íon metálico Ni^{2+} para uma melhor separação do glucagon presente na fração industrial. Uma terceira sugestão seria testar a purificação do glucagon presente na fração industrial em uma cromatografia com o íon metálico Zn^{2+} imobilizado. Apesar deste metal ter sido desconsiderado com base nos experimentos com as proteínas puras, o comportamento do glucagon presente na fração industrial se mostrou diferir do glucagon de alta pureza para os experimentos com o íon metálico Ni^{2+} . Como o glucagon presente na fração I-70 só eluiu da coluna com PCI- Ni^{2+} no pH 2,3, um experimento com o Zn^{2+} e eluição com gradiente linear de pH poderia propiciar melhores resultados de purificação.

2. Caracterização do glucagon obtido após a purificação. Os experimentos sugeridos incluem o mapeamento proteolítico e a eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida que forneceria uma análise qualitativa da pureza do produto obtido.

3. Determinação dos parâmetros utilizados para a ampliação de escala do processo. Sugere-se a realização das curvas de ruptura (curvas de “breakthrough”) a várias concentrações e vazões de alimentação para determinação de capacidade dinâmica, dos efeitos de diferentes vazões na separação do glucagon da insulina e a perda de eficiência frente à capacidade determinada em ensaios de equilíbrio. Ainda neste grupo de experimentos, sugere-se a caracterização das partículas do adsorvente quanto à porosidade, área superficial e densidade de ligante.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, A. S. R., Vilela, L. e Tunes, H. Purification of Bovine Pancreatic Glucagon as a By-Product of Insulin Production. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **30**, 1421-1426, 1997.
- Angelova, M. e Dimov, N. Effect of Mobile Phase Composition on Selectivity in Preparative Hydrophobic Interaction Chromatographic Purification of Glucagon. *Biomedical Chromatography*, **10**, 251-255, 1996.
- Beitle, R. e Ataii, M. M. Immobilized Metal Affinity Chromatography and Related Techniques. *AIChE Symposium Series*, **8**, 34-44, 1992.
- Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D. e Mercola, D. Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology. *Advances in Protein Chemistry*, **26**, 279-402, 1972.
- Bromer, W. W., Boucher, M. E., Patterson, J. M., Pekar, A. H. e Frank, B. H. Glucagon Structure and Function. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 2581-2585, 1972.
- Carrea, G., Pasta P. e Antonini E. Purification of Glucagon by Subunit Exchange Chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 704-710, 1985.
- Cole, R. D. Ion Exchange Chromatography of Glucagon in Urea-Containing

- Buffers. *Journal of Biological Chemistry*, **235**, 2300-2301, 1960.
- Gaberec-Porekar, V., Menart, V., Jevserver, S., Vidensek, A. e Stalc A. Histidines in Affinity Tags and Surface Clusters for Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography of Trimeric Tumor Necrosis Factor α . *Journal of Chromatography A*, **852**, 117-128, 1999.
- Gary, W. e Headon, D. Protein Biotechnology. John Wiley & Sons, Inglaterra, 1994.
- Gehle, R. D. e Schugerl, K. Protein Recovery by Continuous Flotation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **20**, 133-138, 1984.
- Gibert, S., Bakalara, N. e Santarelli, X. Three-step Chromatographic Procedure for the Production of a His-tag Recombinant Kinesin Overexpressed in *E-coli*. *Journal of Chromatography B*, **737**, 1, 143-150, 2000.
- Grant, P. T., Coombs T. L. e Frank, B. H. Differences in the Nature of the Interactions of Insulin and Proinsulin with Zinc. *Biochemical Journal*, **126**, 433-440, 1972.
- Hemdan, E. S., Zhao, Y. J., Sulkowisk, E. e Porath, J. Surface Topography of Histidine Residues: A Facile Probe by Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**, 1811-1815, 1989.
- Hutchens, T. W. e Yip, T. T. Protein Interactions with Immobilized Transition Metal Ions: Quantitative Evaluations of Variations in Affinity and Binding Capacity. *Analytical Biochemistry*, **191**, 160-168, 1990.

- Ishizaki, J., Tamaki, M., Shin, M., Tsuzuki, H., Yoshikawa, K., Teraoka, H. e Yoshida, N. Production of Recombinant Human Glucagon in the Form of a Fusion Protein in *Escherichia coli*; Recovery of Glucagon by Sequence-Specific Digestion. *Applied Microbiology Biotechnology*, **36**, 483-486, 1992.
- Kim, D. Y., Shin, N. K., Chang, S. G. e Shin, H. C. Production of Recombinant Human Glucagon in *Escherichia coli* by a Novel Fusion Protein Approach. *Biotechnology Techniques*, **10**, 669-672, 1996.
- Kimball, C. P. e Murlin, J. R. Aqueous Extracts of Pancreas. III. Some Precipitation Reactions of Insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, **58**, 337-346, 1923.
- Okamoto, H., Iwamoto, H., Tsuzuki, H., Teraoka, H. e Yoshida, N. An Improved Method for Large-Scale Purification of Recombinant Human Glucagon. *Journal of Protein Chemistry*, **14**, 521-526, 1995.
- Pollock, H. J. e Kimmel J. R. Chicken Glucagon: Isolation and Amino Acid Sequence Studies. *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 9377-9380, 1975.
- Porath, J. e Olin, B. Immobilized Metal Ion Affinity Adsorption and Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Biomaterials. Serum Protein Affinities for Gel-Immobilized Iron and Nickel Ions. *Biochemistry*, **22**, 1621-1630, 1983.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. e Belfrage, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, A New Approach to Protein Fractionation. *Nature*, **258**, 589-599, 1975.
- Porath, J. IMAC-Immobilized Metal Ion Affinity Based Chromatography.

Trends in Analytical Chemistry, **7**, 254-259, 1988.

Rothstein, F. Differential Precipitation of Proteins in Protein Purification Process Engineering (Harrison, R., eds.). Marcel Decker, Nova York, 1994.

Sasaki, K., Dockerill, S., Adamiak, D. A., Tickle, I. J. e Blundell, T. X-Ray Analysis of Glucagon and its Relationship to Receptor Binding. *Nature*, **237**, 751-757, 1975.

Sidenius, U., Farver, O., Jons O. e Gammelgaard, B. Comparision of Different Transition Metal Ions for Immobilized Metal Affinity Chromatography of Selenoprotein P from Human Plasma. *Journal of Chromatography B*, **735**, 85-91, 1999.

Siltz, J. G. e Jackson, R. L. Process for Purifying Glucagon. US Patente 4.033.941, 1977.

Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P. e White, A. Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry. Editora McGraw-Hill, Singapura, 1983.

Smith, M. C., Furman, T. C., Ingolia, T. D. e Pidgeon, C. Chelating Peptide-Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 7211-7215, 1988.

Staub, A., Sinn, L. e Behrens, O. K. Purification and Cristallization of Hyperglycemic Glycogenolytic Factor (HGF). *Science*, **117**, 628-629, 1953.

Staub, A., Sinn, L. e Behrens, O. K. Purification and Cristallization of Glucagon. *The Journal of Biological Chemistry*, **214**, 619-632, 1955.

- Sulkowski, E. Purification of Proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, **3**, 1, 1985.
- Sulkowski, E. The Saga of IMAC and MIT. *BioEssays*, **10**, 170-175, 1989.
- Tamagawa, R.E., comunicação pessoal, 1999.
- Torres, A. M., Grieve, S. M. e Kuchel P. W. NMR Triple-quantum Filtered Relaxation Analysis of ^{17}O -Water in Insulin Solutions: an Insight into the Aggregation of Insulin and the Properties of its Bound Water. *Biophysical Chemistry*, **70**, 231-239, 1998.
- Vijayalakshmi, M. A.. Pseudobiospecific Ligand Affinity Chromatography. *Trends in Biotechnology*, **7**, 71-76, 1989.
- Vunnum, S., Gallant, S. R., Kim, Y. J. e Cramer, S. M. Immobilized Metal Affinity Chromatography: Modeling of Nonlinear Multicomponent Equilibrium. *Chemical Engineering Science*, **50**, 1785-1803, 1995.
- Wong, J., Albright, R.L. e Wang, N.H.W. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) – Chemistry and Bioseparation Applications. *Separation and Purification Methods*, **20**, 49-106, 1991.
- Zhang, C. M., Reslewic, S. A. e Glatz, C. E. Suitability of Immobilized Metal Affinity Chromatography for Protein Purification from Canola. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**, 52-58, 2000.

ANEXO

Este capítulo apresenta as cromatografias em PCI-Cu²⁺ de insulina bovina utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas (Figura 7.1 e Tabela 7.1) e da mistura de insulina bovina e glucagon (Figura 7.2 e Tabela 7.2). A análise em HPLC desta mistura indicou a presença de 72% de insulina e 28% de glucagon na alimentação da coluna IMAC. No pico obtido em pH 2,1, correspondente a fração 51, esta relação se inverte, sendo que a análise em HPLC indicou 25% de insulina e 75% de glucagon. A insulina desorve majoritariamente durante a etapa de regeneração, 96% da proteína da fração 71 corresponde a insulina.

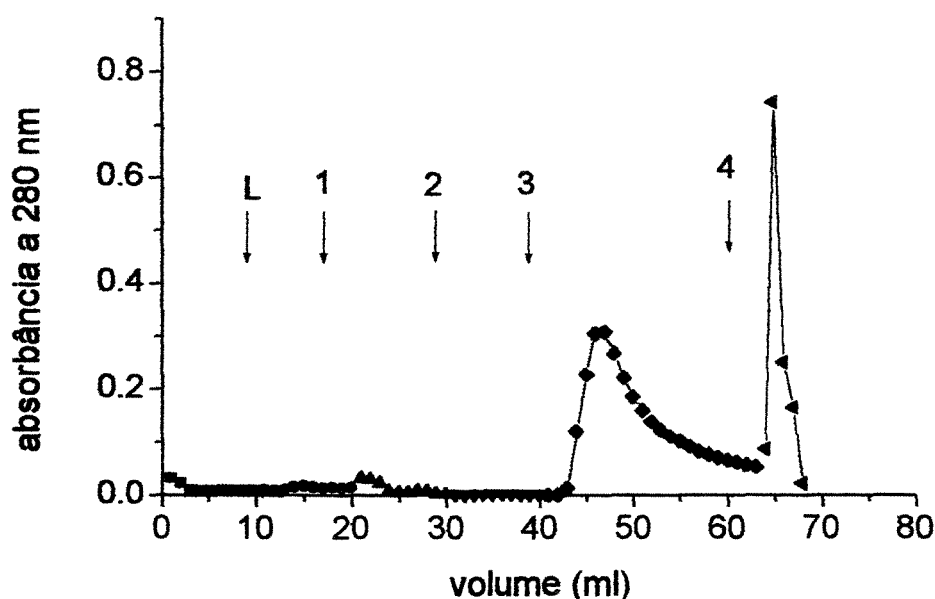


Figura 7.1. Perfil cromatográfico de **insulina bovina** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1, 2, 3** - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0; 3,0 e 2,1, respectivamente. **4** - Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 7.1. Balanço de massa do cromatograma da **insulina bovina** em **PCI-Cu²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>			<i>regene- ração</i>	<i>recupe- ração total</i>
			<i>4,0</i>	<i>3,0</i>	<i>2,1</i>		
<i>massa (mg)</i>	4,7	0,3	0,1	0,0	3,0	1,3	4,7
<i>(%)</i>	100,0	6,4	2,1	0,0	63,8	27,7	100,0

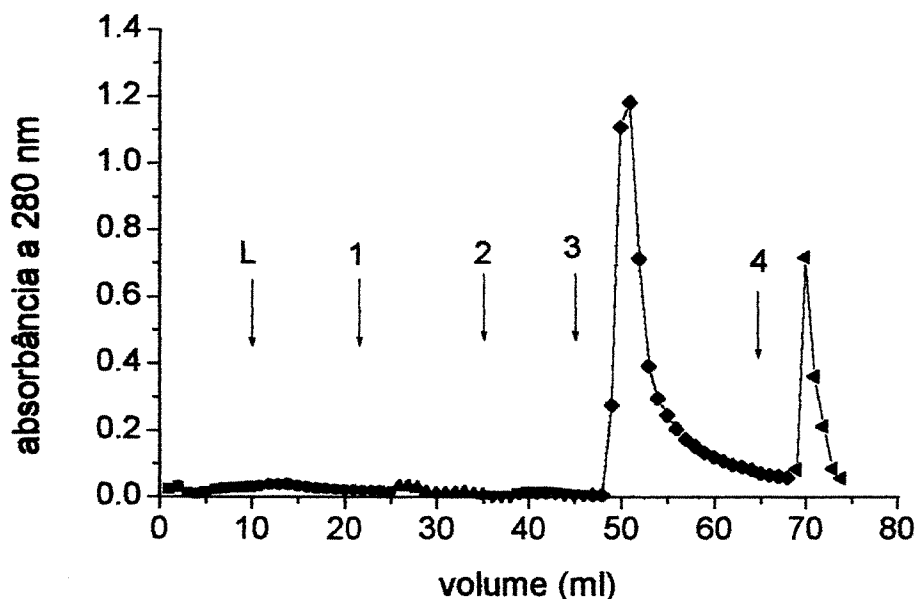


Figura 7.2. Perfil cromatográfico de **insulina bovina e glucagon** em **PCI-Cu²⁺** utilizando o tampão fosfato em todas as etapas cromatográficas. Vazão utilizada: 0,35 ml/min. Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 1,0 M, pH 7,0. **L**- lavagem com o tampão de equilíbrio; **1, 2, 3** - eluição com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0; 3,0 e 2,1, respectivamente. **4** - Regeneração com solução de EDTA 50 mM, NaCl 1,0 M, pH 8,0.

Tabela 7.2. Balanço de massa do cromatograma da **insulina bovina e glucagon** em **PCI-Cu²⁺**.

<i>proteína total</i>	<i>alimen- tação</i>	<i>lavagem</i>	<i>eluição em pH</i>			<i>regene- ração</i>	<i>recupe- ração total</i>
			<i>4,0</i>	<i>3,0</i>	<i>2,1</i>		
<i>massa (mg)</i>	6,1	0,5	0,1	0,1	4,2	1,1	6,0
<i>(%)</i>	100,0	8,2	1,6	1,6	68,9	18,0	98,4