



MARCEL MAFEI SERRACCHIANI

**“ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO POR IMAC DE
FRAGMENTO Fab DE IgG HUMANA ADICIONADO A
EXTRATO PROTEICO DE SOJA”**

Campinas – São Paulo



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Marcel Mafei Serracchiani

**“ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO POR IMAC DE FRAGMENTO Fab DE
IgG HUMANA ADICIONADO A EXTRATO PROTEICO DE SOJA”**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DEFENDIDA PELO ALUNO
MARCEL MAFEI SERRACCHIANI, E
ORIENTADO PELA PROF^a. DR^a. SÔNIA
MARIA ALVES BUENO

A handwritten signature in black ink, reading "Sônia Bueno", is written over a horizontal line.

Campinas - 2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Serracchiani, Marcel Mafei, 1986-
M269e Estratégia de purificação por IMAC de fragmento Fab de IgG humana
adicionado a extrato proteico de soja / Marcel Mafei Serracchiani. – Campinas, SP
: [s.n.], 2013.

Orientador: Sonia Maria Alves Bueno.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Engenharia Química.

1. Cromatografia. 2. Purificação. 3. Proteínas de soja. 4. Cromatografia de
afinidade. 5. Proteínas - Separação. I. Bueno, Sonia Maria Alves, 1961-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: IMAC purification strategy of human IgG Fab fragments added to soy
protein extract

Palavras-chave em inglês:

Chromatography

Purification

Soy protein

Affinity chromatography

Proteins - Separation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Sonia Maria Alves Bueno [Orientador]

Everson Alves Miranda

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

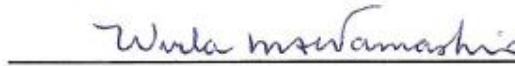
Data de defesa: 25-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

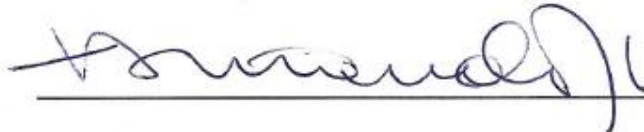
Dissertação de Mestrado defendida por Marcel Mafei Serracchiani e aprovada em 25 de Outubro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves Bueno
Orientadora: FEQ/Unicamp



Prof^a. Dr^a. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
IB/Unicamp



Prof. Dr. Everson Alves Miranda
FEQ/Unicamp

RESUMO

A produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas tem se mostrado uma forma segura, eficiente e barata de obtenção em grande escala de várias proteínas de interesse, tais como vacinas, enzimas industriais, bioativos, biofarmacos e anticorpos e seus fragmentos. Contudo, para que a produção de proteínas recombinantes em plantas se torne viável é necessário o desenvolvimento de um processo de recuperação e separação da molécula alvo que seja eficiente e reprodutivo, pois a produção de biomoléculas em plantas transgênicas, assim como os métodos tradicionais de produção, apresentam componentes indesejáveis que devem ser removidos. Neste trabalho, avaliou-se a purificação de fragmentos Fab de IgG humana adicionados artificialmente (*spiking*) a extrato proteico de soja não transgênica utilizando-se a técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Estudou-se o efeito dos quelatos IDA-Ni(II) e TREN-Ni(II), dos sistemas tamponantes Tris-HCl, fosfato de sódio e Mes, na presença e na ausência de sal (NaCl) na purificação de fragmentos Fab. Primeiramente foram realizados experimentos cromatográficos com as proteínas nativas do extrato proteico do grão de soja. Dos resultados obtidos, selecionou-se, para o adsorvente agarose-TREN-Ni(II), o sistema tamponante Tris-HCl/Tris-HCl na ausência de NaCl, e para o adsorvente agarose-IDA-Ni(II), selecionou-se o sistema tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio contendo NaCl. Estes sistemas tamponantes e adsorventes foram utilizados para purificação dos fragmentos Fab adicionados (*spiking*) ao extrato proteico de grãos de soja. Em agarose-TREN-Ni(II), os fragmentos Fab foram purificados por cromatografia negativa, obtendo-se 66% dos fragmentos Fab na etapa de *flowthrough* e lavagem, com um grau de pureza de 91% e fator de purificação de 1,4. Para o adsorvente agarose-IDA-Ni(II), os fragmentos Fab foram purificados por cromatografia tradicional (eluição a pH 5,8), obtendo-se alto grau de pureza do fragmento Fab purificados, com um fator de purificação de 2,5. Este estudo contribuiu para obter conhecimento de base para posterior aplicação da técnica de IMAC na purificação de proteínas recombinantes produzidas em sementes de plantas transgênicas.

Palavras-chave: IMAC, Fab, proteínas da soja, cromatografia, *spiking*, recuperação de bioprodutos, purificação.

Abstract

The recombinant proteins production using transgenic plants have been considered a safe, efficient and cheap way of producing on large scale innumerable proteins of interest, such as vaccines, industrial enzymes, bioactives, biopharmaceuticals and antibody and its fragments. However, for the production of recombinant proteins in plants become viable is necessary to develop a process for recovery and separation of the target molecule that is efficient and reproducible, because the production of biomolecules in transgenic plants, as well as traditional production methods, have components reactions which must be removed. In this work, the purification of Fab fragments of human IgG added artificially (*spiking*) to extract non-transgenic soy protein, using the technique of affinity chromatography on immobilized metal ions (IMAC), was evaluated. The effect of chelating agents IDA-Ni(II) and TREN-Ni(II), and the buffers Tris, sodium phosphate and Mes, in presence and the absence of NaCl, was studied for the Fab purification. First, the chromatographic experiments with the native proteins of soybean extract were performed. From the results obtained, it was selected, for the adsorbent TREN-Ni(II), the buffers system Tris-HCl/Tris-HCl without NaCl, and for the adsorbent IDA-Ni(II), the buffer system sodium phosphate/ sodium acetate with NaCl was selected. These adsorbents and buffer systems were used for purification of Fab fragments added (*spiking*) to soybean extract proteins. In the agarose adsorbent TREN-Ni (II), Fab fragments were purified by negative chromatography, obtaining 66% of Fab fragments in flowthrough and wash steps with a purity of 91% and purification factor of 1.4. For the adsorbent agarose-IDA-Ni (II), Fab fragments were purified by traditional chromatography (elution at pH 5.8), obtaining a high purity of the purified FAB, with a purification factor of 2.5. This study contributed to obtain knowledge base for application of the technique on the IMAC purification of recombinant proteins produced in transgenic plant seeds.

Keywords: IMAC, Fab, soy proteins, chromatography, spiking, recovery of bioproducts, purification.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
1.1.OBJETIVO.....	4
1.2.PLANO DE TRABALHO.....	5
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. PLANTAS COMO BIORREATORES.....	7
2.1.1 VANTAGENS E DESAFIOS DO USO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS COMO BIORREATORES.....	10
2.1.2. SOJA COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	11
2.1.3. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS EM PLANTAS COMO BIORREATORES.....	14
2.2. IMUNOGLOBULINA G (IgG) HUMANA E FRAGMENTO Fab	17
2.3. FRAGMENTOS DE FAB.....	18
2.3.1. TÉCNICAS EMPREGADAS NA RECUPERAÇÃO DE FRAGMENTOS FAB PROVENIENTES DE MEIOS DISTINTOS.....	20
2.4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR IONS METÁLICOS IMOBILIZADOS IMAC.....	21
2.4.1. EFEITO DE PH E DE FORÇA IÔNICA EM IMAC.....	22
2.4.2. ÍONS METÁLICOS UTILIZADOS EM IMAC.....	22
2.4.3. AGENTES QUELANTES EM IMAC.....	24
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. MATERIAL.....	27
3.1.1. GRÃOS DE SOJA.....	27
3.1.2. IMUNOGLOBULINA G HUMANA.....	27
3.1.3. REAGENTES.....	27

3.2. MÉTODOS.....	28
3.2.1. OBTENÇÃO DO FARELO DE SOJA.....	28
3.2.2. DESENGORDURAMENTO DA FARINHA DE SOJA.....	28
3.2.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DA SOJA	29
3.2.4. FRAGMENTAÇÃO DA IgG COM PAPAÍNA.....	29
3.2.5. ISOLAMENTO DOS FRAGMENTOS Fab.....	29
3.2.6. ATIVAÇÃO DO GEL COM EPICLORIDRINA.....	30
3.2.7. IMOBILIZAÇÃO DO TREN E IDA.....	31
3.2.8. EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS.....	31
3.2.9. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA.....	33
3.2.10. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
3.2.10.1. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PROTEICA.....	33
3.2.10.2. ELETROFORESE SDS-PAGE.....	34
3.2.10.3 ELETROFORESE DE FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA ("ISOELECTRIC FOCUSING" – IEF).....	34
3.2.10.4. WESTERN BLOT.....	35
3.2.10.5. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE METAL IMOBILIZADO.....	36
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. PROTEÍNAS EXTRAIDAS DOS GRÃOS DE SOJA.....	37
4.2. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS Fab POR CROMATOGRAFIA EM PROTEÍNA G E L.....	38
4.3. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NATIVAS DO GRÃO DE SOJA NOS QUELATOS TREN-Ni(II) E IDA-Ni(II).....	39
4.4. EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS COM FRAGMENTOS Fab.....	46
4.5. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab ADICIONADO ARTIFICIALMENTE A EXTRATO PROTEICO DE SOJA.....	49

4.5.1. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS FAB POR CROMATOGRAFIA NEGATIVA EM AGAROSE-TREN-Ni(II).....	49
4.5.2. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS FAB POR CROMATOGRAFIA TRADICIONAL EM AGAROSE-IDA-Ni(II).....	54
4.6. PONTO DE RUPTURA E CAPACIDADE DINAMICA DOS ADSORVENTES AGAROSE-TREN-Ni(II) E AGAROSE-IDA-Ni(II).....	60
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....	69
CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTURO.....	71
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS.....	73

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Aos meus pais, Edison e Neusa, pela compreensão incentivo apoio e o amor dado.

À Lívia, pelo amor, compreensão e ajuda dada para a finalização desta dissertação.

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Sônia Maria Alves Bueno, pelos conselhos e experiências que me foram passados, e pela competência e profissionalismo.

A todos meus companheiros de laboratório, principalmente a Luana, a Nemaila, a Gisele, o Igor e a Iara.

Aos meus amigos da república.

A todos meus familiares.

Aos professores e funcionários da FEQ que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. - Diagrama esquemático representando o trabalho desenvolvido. Página 5.

Figura 2.1. - Representação esquemática da estrutura da IgG e seus fragmentos gerados pelas enzimas proteolíticas papaína e pepsina. O fragmento cristalizável é identificado como Fc e o fragmento que apresenta porção de afinidade pelo antígeno é identificado como Fab ab – antigen-binding). As letras V e C referem-se às regiões variável e constante, respectivamente, e as letras L e H referem-se às cadeias leve e pesada, respectivamente (adaptado de IMGT Marie-Paule page - <http://imgt.cines.fr>). Página 18.

Figura 2.2. - Representação dos agentes quelantes (a) - IDA (b) TREN (BRESOLIN et. al. 2009). Página 25.

Figura 4.1. - Eletroforeses SDS-PAGE do extrato proteico de soja. Amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. (H) marcador de alta massa molecular; (L) marcador de baixa massa molecular; (S) extrato de proteínas da soja. Página 38.

Figura 4.2. - Perfil eletroforético dos fragmentos Fab obtidos por purificação da IgG humana digerida por papaína, por cromatografia de afinidade com Proteína-G seguido por Proteína-L. (M) Marcador de baixa massa molecular; (G) Marcador de IgG; (β) Marcador de IgG em β -mercaptoetanol; (I) Injeção contendo IgG digerido por papaína; (EL) Porção recuperada na eluição da cromatografia de afinidade com proteína L; (EG) Porção recuperada na eluição da cromatografia de afinidade com proteína G. Página 39.

Figura 4.3. Adsorção de proteínas do extrato de grãos de soja em adsorventes IMAC tampão sem acréscimo de NaCl. Volume de leito igual a 3,0 mL. (■)IDA-Ni(II) (■)TREN-Ni(II). Massa total de proteína de soja (mg): (a) não retida em diferentes sistemas tamponantes; (b) obtida na etapa de eluição; (c) obtida na etapa de regeneração. Sistemas tamponantes: Adsorção Mes 25 mmol/L pH 6,5; Lavagem Mes 25 mmol/L pH 6,5 e eluição Mes 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 6,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição fosfato de sódio 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 7,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0. Adsorção: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; Lavagem Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; eluição com Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0. Página 41.

Figura 4.4. Adsorção de proteínas do extrato de grãos de soja em adsorventes IMAC tampão sem acréscimo de NaCl. Volume de leite igual a 3,0 mL. (■)IDA-Ni(II) (■)TREN-Ni(II). Massa total de proteína de soja (mg): (a) não retida em diferentes sistemas tamponantes; (b) obtida na etapa de eluição; (c) obtida na etapa de regeneração. Sistemas tamponantes: Adsorção Mes 25 mmol/L pH 6,5; Lavagem Mes 25 mmol/L pH 6,5 e eluição Mes 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 6,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição fosfato de sódio 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 7,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0. Adsorção: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; Lavagem Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; eluição com Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0. Página 42.

Figura 4.5. - Perfis eletroforéticos (SDS-PAGE sob condições não redutoras, gel com concentração de 12%) das frações obtidas das cromatografias em gel de agarose-TREN-Ni(II) e agarose-IDA-Ni(II) para proteínas nativas de soja nos diferentes sistemas tamponantes na ausência de sal (NaCl) (M) Marcador de massa molecular; (I) Injeção (proteínas do extrato de soja); (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (E1) Eluição, fração 22; (E2) Eluição, fração 23; (E3) Eluição, fração 24; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH. Página 43.

Figura 4.6. - Perfis eletroforéticos (SDS-PAGE sob condições não redutoras, gel com concentração de 12%) das frações obtidas das cromatografias em gel de agarose-TREN-Ni(II) e agarose-IDA-Ni(II) para proteínas nativas de soja nos diferentes sistemas tamponantes com adição de sal (NaCl). (M) Marcador de massa molecular; (I) Injeção (proteínas do extrato de soja); (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (E1) *Pool* Eluição frações 13 a 15; (E2) *Pool* Eluição frações 16 a 18; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH. Página 44.

Figura 4.7. - Perfis eletroforéticos das frações obtidas das cromatografias com alimentação de fragmentos Fab humanos nos diferentes adsorventes e sistemas tamponantes selecionados. SDS-PAGE sob condições não redutoras (a) gel com concentração de 12%, (b) e (c) gel com concentração de 10%. Revelação com nitrato de prata. (M) Marcador de baixa massa molecular; (B) Marcador de IgG com β -mercaptoetanol; (I) Amostra da injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição (R) *Pool* das frações de regeneração. Página 47.

Figura 4.8. - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas da solução de extrato protéico de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II) sem adição de NaCl. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. I - injeção: 2,5 mL contendo 0,82 mg/mL de extrato protéico de soja e 0,86 mg/mL de Fab em Mes 25 mmol/L pH 6,5, L - lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5; E – eluição: Mes 25 mmol/L imidazol 300 mmol/L pH 6,5; R - regeneração: EDTA 50 mmol/L; N - regeneração com NaOH 20 mmol/L. Eletroforese SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%. (S) Proteínas da soja; (F) Fragmento Fab; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH 20 mmol/L; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976); BSA como proteína de referência. Página 50.

Figura 4.9. - *Western blot* com as frações coletadas da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução proteica de soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante Mes/imidazol. S - Proteínas da soja; F - Fragmentos Fab; I - Injeção; L- *Pool* das frações de lavagem; E - *Pool* das frações de eluição; R - *Pool* das frações de regeneração com EDTA; N - *Pool* das frações de regeneração com NaOH; M - marcador de massa molecular. Página 51.

Figura 4.10. - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas da solução de proteína de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II) sem adição de NaCl. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. I - Injeção: 2,00 mL contendo 0,50 mg/mL de soja e 0,66 mg/mL de fragmento Fab em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0, L – lavagem Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0; E – eluição Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0; R- regeneração com EDTA 50 mmol/L; N – regeneração com NaOH 20 mmol/L. Eletroforese SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5% (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976); BSA como proteína de referência. Página 52.

Figura 4.11. - *Western Blot* com as frações coletadas da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução de proteína da soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante Tris-HCl sem adição de NaCl. (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (F) fragmentos Fab; (L) Lavagem; (E) Eluição; (R) Regeneração com EDTA; (N) Regeneração com NaOH; (M) marcador de massa molecular. Página 52.

Figura 4.12. - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas da soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (1,0 mg de soja e 0,44 mg de Fab), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,5; (E) Eluição em gradiente de pH com fosfato de sódio 25 mmol/L de pH 7,5 a 6,0 e acetato de sódio 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, de pH 6,0 a 4,0; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0; Eletroforeses SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%. (1) Proteínas da soja; (2) fragmentos Fab; (3) Injeção; (4) Lavagem; (5) Eluição, fração 28; (6) Eluição, fração 34; (7) Eluição, fração 42; (8) Regeneração com EDTA, fração 64; (9) Regeneração com EDTA, fração 65; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976), BSA como proteína de referência. Página 55.

Figura 4.13. - (a) Perfil cromatográfico e (b) eletroforético dos fragmentos Fab de alta pureza em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (0,58 mg de Fab/mL), (L) lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 7,5; (E) Eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 5,8; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Eletroforese SDS-PAGE gel a 10%. (L) Lavagem; (E) Eluição; (R) Regeneração: EDTA; (M) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976); BSA como proteína de referência. Página 56.

Figura 4.14. - *Western blot* das frações coletadas da cromatografia com fragmentos Fab de alta pureza em agarose-IDA-Ni(II) no sistema tamponante fosfato-acetato de sódio (referente a cromatografia apresentada Figura 4.15). L - *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (M) marcador de massa molecular. Página 58.

Figura 4.15. - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas da solução de proteína de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) realizada em degrau. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL contendo 0,49 mg de soja e 0,42 mg de fragmento Fab em fosfato de sódio 25 mmol/L, pH 7,5 contendo 1,0 mol/L de NaCl, L - lavagem fosfato de sódio pH 7,5 contendo 1,0 mol/L de NaCl; E - eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, pH 5,8 contendo 1,0 mol/L de NaCl; R - regeneração: EDTA 50 mmol/L; N - regeneração com NaOH 20 mmol/L. Eletroforese SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular; Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976), BSA como proteína de referência. Página 59.

Figura 4.16. - *Western blot* das frações coletadas da cromatografia em agarose-IDA-Ni(II) realizada com solução de proteína da soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio; (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (F) fragmentos Fab; (L) Lavagem; (E) Eluição; (R) Regeneração com EDTA; (N) Regeneração com NaOH; (M) marcador de alta massa molecular. Página 59.

Figura 4.17. - Curva de alimentação de proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab. Condição agarose-TREN-Ni(II) tampão Tris-HCl 50 mmol/L, em pH 7,0. Volume do leito: 1,0 mL. Vazão: 0,5 mL/L. (I) Injeção de 20,0 mL contendo de 0,31 mg/mL de proteínas da soja e 0,61 mg/mL de fragmentos Fab. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), com BSA como proteína de referência. Página 61.

Figura 4.18. - Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas na curva de ruptura com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab. Condição agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl. (a) Gel na concentração de 12%, (b) Gel na concentração de 7,5%. (I) Injeção; (S) Proteínas da soja; (F) Fragmentos Fab; (1 a 20) Frações do *flowthrough*; (L) *Pool* da lavagem; (E) *Pool* da eluição; (R) *Pool* da regeneração com EDTA; (N) *Pool* da regeneração com NaOH; (H) Marcador de alta massa molecular; (B) Marcador de baixa massa molecular. Página 62.

Figura 4.19. - *Western blot* com as frações coletadas da curva de ruptura realizada com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab. Condição agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl; (S) Proteínas da soja; (F) Fragmentos Fab; (1 a 20) Frações do *flowthrough*; (L) *Pool* da lavagem; (E) *Pool* da eluição; (R) *Pool* da regeneração com EDTA; (N) *Pool* da regeneração com NaOH; (M) Marcador de massa molecular. Página 62.

Figura 4.20. - Perfil cromatográfico da curva de ruptura e eluição das proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl; (F) *Flowthrough* (L) Lavagem com tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0; (E) Eluição com tampão Tris-HCl 700 mmol/L, pH 7,0; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), com BSA como proteína de referência. Página 63.

Figura 4.21. - Curva de ruptura das proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio 25 mmol/L, 1,0 mol/L de NaCl pH 7,5. Volume do leito: 0,7 mL. Vazão: 0,5 mL/L. (I) Injeção de 18,0 mL de solução contendo 0,35 mg/mL de proteínas da soja e 0,57 mg/mL de fragmento Fab. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (Bradford,1976), com BSA como proteína de referência. Página 64.

Figura 4.22 - Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas na curva de ruptura com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio (a): Gel na concentração de 12%, (b) Gel na concentração de 7,5%. (S) Proteínas da soja; (F) Fragmentos Fab; (I) Extrato proteico de soja com fragmentos Fab; (1 a 12) frações do *flowthrough*; (L) *Pool* da lavagem; (E) *Pool* da eluição; (R) *Pool* da regeneração com EDTA; (N) *Pool* da regeneração com NaOH; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Página 65.

Figura 4.23. - **Figura 4.23.** *Western Blot* com as frações coletadas da curva de ruptura realizada com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio (1 a 12) frações *flowthrough*; (L) *pool* da lavagem; (E) *pool* da eluição; (R) *pool* da regeneração com EDTA; (N) *pool* da regeneração com NaOH; (M) Marcador de massa molecular. Página 65.

Figura 4.24. - Cromatograma da curva de ruptura e da eluição das proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl; (F) *Flowthrough*; (L) Lavagem com tampão fosfato de sódio 25 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl, pH 7,5; (E) Eluição com tampão acetato de sódio 25 mmol/L, pH 4,0; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), com BSA como proteína de referência. Página 66.

LISTA DE TABELAS

Tabelas 2.1. - Plantas utilizadas como sistema de expressão de biomoléculas e suas respectivas biomoléculas sintetizadas (MA *et al.*, 2003). Página 9.

Tabela 2.2. - Comparação entre os diferentes sistemas de expressão de proteína (Ma, J.K-C *et al.*, 2003). Página 10.

Tabela 2.3. - Propriedades físicas das proteínas purificadas da soja (adaptado de ALLAN e SIDNEY, 1972 e ROBIC, 2005). Página 13.

Tabela 2.4. - Proteínas recombinantes produzidas através de plantas como biorreatores e métodos de recuperação e purificação (adaptação WILKEN *et al.*, 2012). Página 16.

Tabela 2.5. - Classificação dos Metais utilizados em IMAC e os átomos para coordenação (PORATH, 1988). Página 23.

Tabela 4.1. - Balanço de massa das cromatografias realizadas com fragmentos Fab nos adsorventes IMAC estudados. Página 48.

Tabela 4.2. - Balanço de massa de proteínas totais e fragmentos Fab da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução proteica de soja com *spiking* de fragmentos Fab no sistema tamponante Mes/imidazol sem acréscimo de NaCl. Lavagem – *Pool* das amostras 4 a 10; Eluição - fração 19; Regeneração EDTA - fração 36. Página 51.

Tabela 4.3. - Balanço de massa de proteínas totais e fragmento Fab da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução de proteína da soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante Tris-HCl sem adição de NaCl. Lavagem – *Pool* das amostras 4 a 7; Eluição - *Pool* das amostras 18 a 21; Regeneração - fração 38. Página 53.

Tabela 4.4. - Balanço de massa em termos de proteínas totais da cromatografia realizada com extrato proteico de soja e *spiking* de fragmentos Fab em coluna agarose-IDA-Ni(II). Página 56.

Tabela 4.5. - Balanço de massa em termos de proteínas totais da cromatografia realizada com fragmentos Fab em coluna agarose-IDA-Ni(II). Página 57.

Tabela 4.6. - Balanço de massa do experimento em agarose-IDA-Ni(II) em tampão fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl. Lavagem – Fração 7; Eluição - *Pool* das amostras 19 a 21; Regeneração - *Pool* das amostras 30 a 32. Página 60.

Tabela 4.7. - Balanço de massa por imunodifusão radial da curva de ruptura em agarose-TREN-Ni(II) utilizando sistema tamponante Tris-HCl sem adição de NaCl. *Pool* do *flowthrough*; *Pool* das amostras de lavagem; *Pool* das amostras de eluição; *Pool* das amostras de regeneração. Página 63.

Tabela 4.8. - Balanço de massa da curva de ruptura em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl. *Flowthrough* – *Pool* das amostras 10 a 18; Lavagem – *Pool* das amostras 22 a 27; Eluição - *Pool* das amostras 51 a 53; Regeneração - *Pool* 73 a 75. Página 67.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Com o sucesso da produção de proteínas recombinantes, sua demanda vem crescendo nas últimas décadas, sendo estas proteínas requeridas tanto para uso médico como para uso industrial. Os primeiros relatos de biomoléculas recombinantes produzidas em plantas transgênicas surgiram há mais de trinta anos, com a produção de hormônio do crescimento humano em tabaco (MA *et al.*, 2003; FISCHER *et al.*, 2004). Desde então, várias proteínas recombinantes têm sido produzidas em plantas tais como vacinas, anticorpos, enzimas industriais, biofarmacêuticos e fragmentos de anticorpos (CONLEY *et al.*, 2011; TWYMAN *et al.*, 2005). A produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas tem se mostrado uma forma eficiente e barata de produção em grande escala (PEETERS *et al.*, 2001).

Além disso, ao se comparar os sistemas de expressão de proteínas atualmente utilizados (bactérias, cultivo de células animais e outros) com a expressão em plantas, pode-se enumerar uma série de vantagens, como por exemplo, a produção de biomoléculas em órgãos específicos (semente, por exemplo), onde podem ser estocadas por longos períodos, possibilidade de síntese de proteínas com a glicosilação exata e de forma ativa, baixo custo de produção e baixo risco de contaminação por agentes patogênicos humanos (LAU e SUN, 2009; ROBIC, 2005).

Dentre as inúmeras plantas passíveis de serem utilizadas como sistema de expressão para produção de proteínas transgênicas, as sementes de leguminosas como soja, ervilha e feijão apresentam algumas vantagens para a produção de biomoléculas, pois possuem um elevado teor proteico (20 a 40%), baixa atividade de proteases, baixo teor de umidade, além de serem órgãos de estocagem naturais (LAU e SUN, 2009). Dentre estas leguminosas, a soja é a mais utilizada, tendo sido usada para a produção de diversas moléculas, tais como hormônio do crescimento humano, caseína bovina, fator IX humano, insulina humana, anticorpo contra o vírus da herpes e outros (LAU e SUN, 2009; CUNHA *et al.*, 2011a).

Devido a grande demanda por proteínas terapêuticas como anticorpos e seus fragmentos, tem-se investigado a possibilidade de produção de proteínas como os anticorpos (imunoglobulinas G) e seus fragmentos (Fab, F(ab')₂ e Fv) a partir de plantas transgênicas (PLATIS *et al.*, 2008). As imunoglobulinas G (IgG) são glicoproteínas com ampla gama de utilidades terapêuticas, tais como a imunização passiva contra infecções bacterianas ou virais e

em testes diagnósticos (AGATON *et al.*,2004). As imunoglobulinas são compostas de um par de cadeias polipeptídicas leves idênticas (L) e um par de cadeias polipeptídicas pesadas idênticas (H) ligadas entre si por pontes dissulfeto e por ligações não covalentes. Através da clivagem proteolítica, podem-se obter fragmentos de anticorpos (Fab e F(ab')₂), os quais são capazes de se ligar ao antígeno correspondente. Estes fragmentos contêm os domínios variáveis H e L. Pelo fato de apresentarem baixa imunogenicidade e tamanho reduzido, o qual amplia o poder de penetração nos tecidos e na corrente sanguínea, os fragmentos Fab vem sendo amplamente utilizados no tratamento de doenças como tumores, trombooses e algumas doenças crônicas, além de tratamentos de acidentes com ofídios e diagnóstico de doenças (COLEMAN e MAHLER, 2003; HOLLIGER e HUDSON, 2005; PERSSON, 2001; RÖTHLISBERGER *et al.*, 2005).

Atualmente, a técnica mais empregada para a purificação de fragmentos de anticorpos é a cromatografia de afinidade por ligantes bioespecíficos, sendo também utilizadas técnicas cromatográficas como de troca iônica, de pseudoafinidade e de exclusão molecular (ERNTEL *et al.*,1987). Apesar de ser a técnica mais empregada, a cromatografia de afinidade com ligantes bioespecíficos apresenta algumas desvantagens como alto custo, perda de capacidade de adsorção ao longo do tempo e os adsorventes são sensíveis a condições de sanitização (LAU *et al.*, 2010; BUCHNER, *et al.*, 1991).

Dentre as técnicas cromatográficas empregadas para a purificação dos fragmentos de IgG, as que apresentam menor custo quando comparadas a cromatografia de afinidade com ligantes bioespecíficos são as cromatografias de troca iônica e a cromatografia de pseudobioafinidade, como por exemplo, a cromatografia por íons metálicos imobilizados (IMAC).

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) é uma técnica baseada na interação entre um íon metálico imobilizado a uma matriz sólida e resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície da proteína. Essa técnica tem sido empregada para a purificação de IgG e de fragmentos F(ab')₂ (PORATH *et al.*, 1975; PORATH, 1988; WONG *et al.*, 1991, TOROROVA-BALVAY *et al.*, 2004). IMAC é uma técnica robusta, de fácil sanitização da fase estacionária e alta capacidade de ligação com proteínas, características bem vistas pela indústria (PLATIS *et al.*,2008).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a purificação de fragmentos de anticorpos produzidos em plantas transgênicas utilizando a técnica de IMAC. Há trabalhos que relatam a

purificação de fragmentos de anticorpos recombinantes com uma única cadeia leve contendo cauda de histidina (scFv), na maioria dos casos produzidos em folha tabaco transgênico (RAMIREZ *et al.*, 2000; PUJOL *et al.*, 2005; ALMQUIST *et al.*, 2006; PLATIS *et al.*, 2008).

Além disso, nota-se a escassez de publicações sobre a purificação de anticorpos ou de fragmentos produzidos em plantas diferentes do tabaco transgênico, o qual apresenta um longo histórico de produção de proteínas transgênicas, pois é facilmente engenheirado e apresenta uma grande quantidade de biomassa. Quando são utilizados promotores específicos, os anticorpos e fragmentos podem ser obtidos em sementes (soja, milho, tabaco), destacando-se a vantagem da proteína alvo poder ser estocada de maneira estável por longo período de tempo (LEE e FORCINITI, 2010). Dentre as várias espécies de sementes usadas como biorreatores, as sementes de soja oferecem o mais baixo custo de produção de proteínas recombinantes (ROBIC *et al.*, 2010).

Por se tratar de um organismo complexo, a produção de proteínas recombinantes em uma planta transgênica é um processo longo e custoso, assim uma estratégia muito empregada em estudos de purificação de proteínas em plantas é a adição artificial destas a um extrato de planta, simulando o extrato de uma planta transgênica (MENKHAUS *et al.*, 2002, PLATIS e LABROU, 2008). Devido à insuficiência de dados de literatura na área de purificação de anticorpos e fragmentos recombinantes produzidos em sementes de plantas transgênicas, este estudo contribui para obter conhecimento de base para posterior aplicação desta técnica na purificação de proteínas recombinantes produzidas em sementes de plantas transgênicas.

1.1. OBJETIVO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial de utilização da Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos (IMAC) como técnica de captura de proteínas nativas do extrato de grãos de soja visando uma futura aplicação na purificação de fragmentos de anticorpos que podem vir a ser produzidos nestas sementes. Neste estudo, os fragmentos Fab de IgG humana, de cadeia leve kappa, sem cauda de histidina, foram adicionados artificialmente (*spiking*) a extrato proteico de grãos de soja não-transgênica.

Avaliou-se neste trabalho o comportamento da adsorção das proteínas nativas do extrato de grãos de soja, dos fragmentos Fab humanos e dos fragmentos Fab adicionados artificialmente ao extrato proteico de soja em IMAC. Foram estudados os efeitos dos agentes quelantes ácido iminodiacético (IDA, tridentado) e Tris (2-aminoetil amina) (TREN, tetradentado), dos sistemas tamponantes MES (zwiteriônico), Tris-HCl (competitivo) e fosfato de sódio (competitivo), e da presença ou ausência de NaCl nos tampões utilizados. Uma vez que as interações entre proteína e íon metálico são fortemente influenciadas pelo tipo de sistema tamponante e pela presença ou ausência de sal (NaCl) no tampão de adsorção, estes se apresentam como fatores importantes a serem estudados na exploração do potencial destes ligantes.

1.2. PLANO DE TRABALHO

Para atingir o objetivo do trabalho foram realizadas as etapas exemplificadas na Figura 1.1.

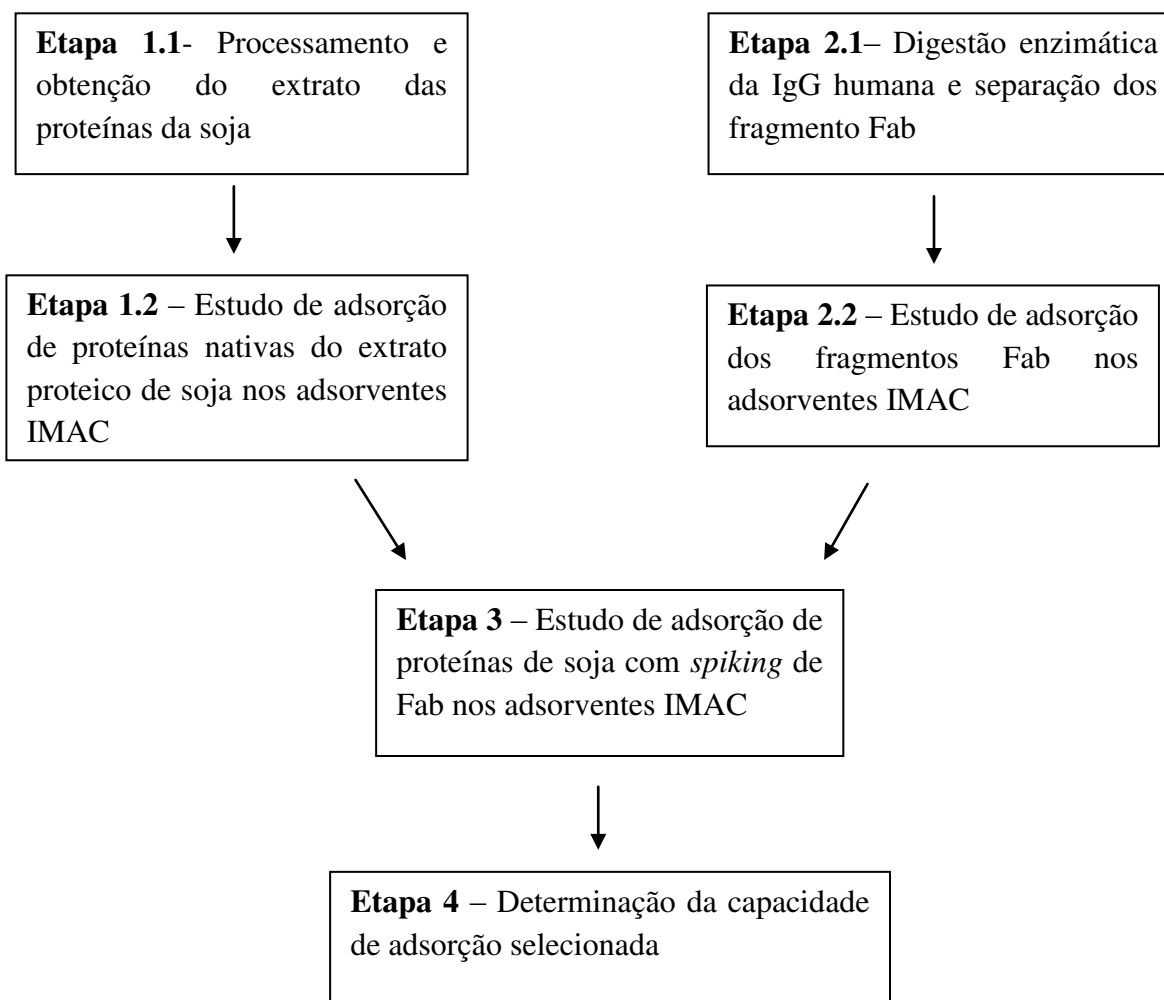


Figura 1.1. - Diagrama esquemático representando o trabalho desenvolvido.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No capítulo 2 são abordados alguns tópicos necessários para compreensão do trabalho. A revisão da literatura está dividida nas seguintes partes: utilização de plantas como biorreatores, soja como sistema de expressão de proteínas recombinantes, vantagens e desafios do uso de plantas transgênicas como biorreatores, recuperação e purificação de proteínas recombinantes obtidas em plantas transgênicas como biorreatores, purificação de fragmentos Fab provenientes de métodos de produção distintos, imunoglobulina G (IgG) humana, fragmentos Fab e cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC).

2.1. PLANTAS COMO BIORREATORES

Plantas são utilizadas a milhares de anos em tratamentos de doenças e terapias, e atualmente, com o avanço das técnicas de biologia molecular, plantas vêm sendo utilizadas como biorreatores para produção de moléculas de interesse, que não eram encontradas ou produzidas naturalmente. Em 1983, apareceram os primeiros relatos sobre o uso da tecnologia do DNA recombinante para a produção de plantas transgênicas, que inicialmente era utilizada, principalmente, para se obter plantas com características agrônômicas favoráveis, tais como resistência a insetos, déficit hídrico, aumento de produtividade, entre outros (MENKHAUS *et al.*, 2004). Os primeiros relatos de plantas transgênicas capazes de produzir proteínas para fins farmacêuticos ocorreram somente no final dos anos 80 com a produção de hormônio do crescimento humano em tabaco transgênico e com a produção de albumina sérica humana em tabaco e batata geneticamente modificados em 1990 respectivamente. Anos depois, mais de 100 diferentes tipos de proteínas foram produzidas em plantas transgênicas, assim como anticorpos, hemoderivados, peptídeos bioativos, antígenos, citosinas, hormônios, suplementos nutricionais, plásticos biodegradáveis, enzimas e vacinas para uso humano e veterinário (TWYMAN *et al.*, 2005; SHARMA e SHARMA, 2009; SPÖK *et al.*, 2008).

Atualmente pesquisadores de todo mundo trabalham para criar uma base de plantas modificadas geneticamente capazes de produzir desde vacinas comestíveis para as mais distintas doenças a métodos anticoncepcionais, estimando um mercado de cerca de 100 bilhões de dólares

para 2015 (LESNEY, 2004). Na Tabela 2.1. são apresentadas algumas das plantas transgênicas utilizadas e das moléculas produzidas por estas.

Uma das questões mais importantes na utilização de plantas como biorreatores é a escolha da espécie adequada. Para cada variedade de produto produzido haverá uma espécie de planta mais adequada, atendendo as exigências necessárias para a produção da molécula. Contudo, não há uma espécie ideal para todos os produtos; o importante é se aquela planta atenderá as necessidades de produção, levando em consideração variáveis como o ciclo de vida da planta, custo de produção, armazenamento, produção de biomassa, adaptações climáticas e geográficas, entre outras (SHARMA e SHARMA, 2009).

Um das plantas mais utilizadas para produção de biomoléculas é o tabaco que, além de ser bastante estudado, muitas das primeiras moléculas recombinantes foram produzidas nesta planta. Além disto, o tabaco apresenta uma série de características favoráveis, tais como: o *expression host*, que permite uma transformação robusta, a alta produção de biomassa e o fato de não ser uma cultura utilizada para alimentação, que reduz a possibilidade de contaminação de alimentos por moléculas transgênicas. Entretanto, o tabaco possui desvantagens como a grande quantidade de nicotina e alcaloides tóxicos (FISCHER *et al.*, 2004). Muitas outras espécies de plantas têm sido utilizadas como sistema de expressão de proteínas heterólogas, podendo citar os vegetais folhosos (alfafa e alface), os cereais (milho, arroz e trigo), os legumes (batatas), as frutas (tomates e bananas) e as sementes (soja, canola, girassol e tabaco) (EVANGELISTA *et al.*, 1998, GIDDINGS *et al.*, 2000, MENKHAUS *et al.*, 2004), entre outras, cada uma apresentando vantagens e desvantagens.

Tabelas 2.1. - Plantas utilizadas como sistema de expressão de biomoléculas e suas respectivas biomoléculas sintetizadas (MA *et al.*, 2003).

Biomolécula	Planta Transgênica	Comentários	Referências
Biofarmacêuticos			
Hormônio de crescimento	Tabaco e couve-flor	Primeira proteína humana expressa em plantas, inicialmente expressa como proteína de fusão com o gene do tabaco transgênico, mais tarde, a primeira proteína humana expressa em cloroplastos.	Barta <i>et al.</i> , 1986 ; Staub <i>et al.</i> , 2000
Albumina sérica humana	Tabaco e batata	Primeira proteína humana completa expressa em plantas	Fernandez-San <i>et al.</i> , 2003
α -interferon	Arroz e nabo	Primeira proteína humana produzida em arroz	Zhu <i>et al.</i> , 2004
Anticorpos Recombinantes			
IgG ₁	Tabaco	Primeiro anticorpo expresso em plantas	Hiatt <i>et al.</i> , 1989
IgM	Tabaco	Primeira IgM expressa em plantas	Düring <i>et al.</i> , 1990
scFv-briodina1- imunotoxina (CD 40)	Tabaco	Primeiro scFv produzida em plantas, primeiro anticorpo produzido em suspensão celular	Francisco <i>et al.</i> , 1997
IgG (HSV)	Soja	Primeira proteína farmacêutica produzido em soja	Zeitlin <i>et al.</i> , 1998
LSC (HSV)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Primeiro exemplo de agricultura molecular de algas	Mayfield <i>et al.</i> , 2003
Subunidades de vacinas recombinantes			
Envelope proteico do vírus da Hepatite B	Tabaco	Primeira vacina expressa em plantas	Mason <i>et al.</i> , 1992
Glicoproteína do vírus da raiva	Tomate	Primeiro exemplo de uma "vacina comestível", expresso em tecido vegetal	McGarvey <i>et al.</i> , 1995
Endotoxina termolábil da <i>Escherichia coli</i>	Tabaco, batata	Primeira vacina produzida em planta a atingir fase de ensaios clínicos	Tacket <i>et al.</i> , 1998
Autoantígeno da diabetes	Tabaco, batata	Primeira vacina de origem vegetal contra uma doença autoimune	Ma <i>et al.</i> , 1997
Subunidade B da toxina da cólera	Tabaco, batata	Primeira vacina expressa em cloroplasto	Daniell <i>et al.</i> , 2001

2.1.1. VANTAGENS E DESAFIOS DO USO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS COMO BIORREATORES

Atualmente bactérias, fungos e células animais ainda são os sistemas mais empregados para a produção de proteínas recombinantes quando comparado com o uso de animais e plantas transgênicas. Contudo, plantas transgênicas apresentam uma série de vantagens quando comparadas com os outros sistemas citados, podendo ser ainda mais explorado para a substituição dos tradicionalmente utilizados (SHARMA e SHARMA, 2009), A Tabela 2.2. apresenta uma comparação dos diferentes sistemas de expressão de proteínas atualmente empregados.

Tabela 2.2. – Comparação entre os diferentes sistemas de expressão de proteína (Ma *et al.*, 2003)

Sistema	Custo total	Prazo para Produção	Tempo Scale-up	Qualidade do Produto	Glicosilação	Risco de contaminação	Custo de estoque
Bactéria	Baixo	Curto	Alto	Baixo	Não realiza	Endotoxinas	Moderado
Levedura	Médio	Médio	Alto	Médio	Incorreto	Baixo risco	Moderado
Cultivo de células animais	Alto	Longo	Muito baixo	Muito alto	Correto	Vírus, príons e DNA	Elevado
Animais transgênicos	Alto	Muito Longo	Baixo	Muito alto	Correto	Vírus, príons e DNA	Elevado
Cultivo de células vegetais	Médio	Médio	Médio	Alto	Pequenas diferenças	Baixo risco	Moderado
Plantas transgênicas	Muito baixo	Longo	Muito baixo	Alto	Pequenas diferenças	Baixo risco	Baixo

Uma das principais vantagens do sistema de expressão em plantas é o custo. Em uma simulação de processo, estimou-se que o custo de produção e purificação de uma proteína recombinante produzida em milho transgênico seria de aproximadamente 43 dólares por grama (EVANGELISTA *et al.*, 1998; MISON e CURLING, 2000). Para fins de comparação, YOUNG *et al.* (1997) estimaram que o custo da produção e purificação de uma proteína recombinante produzida no leite de cabra transgênica seria de 105 dólares por grama. Quando se compara este valor ao custo de produção e purificação de uma proteína recombinante produzida por cultivo de

células animais, que se encontra entre 300 a 3.000 dólares o grama, a produção de proteínas em plantas transgênicas torna-se ainda mais atrativa (MENKHAUS *et al.*, 2004).

Além do custo, o cultivo de plantas transgênicas oferece uma série de vantagens, como facilidade de escalonamento, expressão da proteína de interesse em órgãos da planta naturalmente especializados em armazenamento, os quais são desprovidos de proteases e outras atividades enzimáticas (NIKOLOV e HAMMES, 2002), facilidade de armazenamento, risco reduzido de contaminação (com patógenos humanos, endotoxinas e vírus) e modificações pós-traducionais (WILKEN e NIKOLOV, 2012; MENKHAUS *et al.*, 2004; PEREIRA, 2009; MENKHAUS e GLATZ, 2005).

Como mostrado na Tabela 2.2., a produção de biomoléculas a partir de plantas transgênicas permite a glicosilação das proteínas por elas produzidas, sendo este um mecanismo celular não presente em bactérias e incorreto em leveduras. A glicosilação de proteínas por plantas apresenta perfil levemente diferenciado da glicosilação realizada por células animais, contudo, estudos com anticorpos produzidos em plantas e injetados em ratos mostraram que os anticorpos e os resíduos não apresentam imunogenicidade (CHARGELEGUE *et al.*, 2000 e BAKKER *et al.*, 2001).

Contudo, ainda há alguns entraves na área de produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas, como dados insuficientes na área de biosseparação (HUSSACK *et al.*, 2010, LEE e FORCINITI, 2010). Separar eficientemente proteínas recombinantes a partir de extratos de plantas ainda permanece um desafio, tanto em escala laboratorial como em escala industrial, visto que os processos de purificação disponíveis são, de maneira geral, multietapas, longos e de alto custo (50 a 80% do custo total de produção) (PLATIS *et al.*, 2008, HUSSACK *et al.*, 2010, LEE e FORCINITI, 2010). Outro desafio é o tempo de produção de uma variedade de planta transgênica, juntamente com as incertezas regulatórias e conflitos éticos relativos ao tema de produção de transgênicos que possui repercussão mundial (WILKEN e NIKOLOV, 2012).

2.1.2. SOJA COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A soja é uma leguminosa da família das *Fabaceae*, cuja semente é constituída por 90% de cotilédones (WOLF e COWAN, 1975). A soja é formada por proteínas (37%), carboidratos

(30%) e óleo (20%). Estes óleos são constituídos por 12% de ácidos saturados e 88% de ácidos não-saturados. Os principais açúcares são os dissacarídeos sacarose, o trissacarídeo rafinose e o tetrassacarídeo estatióse. A concentração de glicose e de outros açúcares redutores diminui durante a maturação. Os polifenóis representam aproximadamente 0,02% da massa da semente (SMITH e SIDNEY, 1972). Na soja, o óleo e as proteínas encontram-se em organelas distintos, sendo as armazenadoras de proteínas conhecidas como corpos proteicos e as armazenadoras de lipídios conhecidas como órgão de lipídio (*spherosomes*) (WOLF e COWAN, 1975).

Proteínas de sementes, em geral, são divididas de acordo com a solubilidade em quatro grupos (OSBORNE, 1924): 1) albuminas, solúveis em água; 2) globulinas, solúveis em soluções aquosas salinas; 3) prolaminas, solúveis em soluções alcoólicas e 4) glutelinas, solúveis em soluções aquosas de valores de pH alcalino ou com agente redutor. As proteínas das sementes de soja estão presentes somente em dois destes grupos: as albuminas, as quais representam menos de 10% da proteína total e possuem baixa massa molecular (cerca de 20 kDa) e as globulinas, que representam 90% da proteína total e são constituídas de proteínas de massa molecular de 20 a 700 kDa. As globulinas da soja são classificadas em quatro grupos baseados nos coeficientes de sedimentação: 2S, 7S, 11S e 15S (22, 37, 31 e 1% das globulinas, respectivamente). A α -conglucina, também conhecida por 2S, consiste de proteínas com massa molecular entre 8 e 50 kDa e solubilidade em ampla faixa de pH. A β -conglucina, presente no grupo 7S, consiste de pelo menos sete isômeros, os quais são compostos de diferentes combinações das mesmas três subunidades. As diferentes isoformas de β -conglucina têm massa molecular entre 130 e 180 kDa e ponto isoelétrico (pI) próximo de 4,9. As demais proteínas encontradas na fração 7S são hemaglutinina, lipoxigenase e β -amilase. No grupo 11S encontram-se a glicinina, um heteromultímero complexo composto de 11 ou 12 subunidades. A glicinina tem massa molecular entre 300 e 350 kDa e ponto isoelétrico entre 4,5 e 4,8. As maiores proteínas da soja são as proteínas 15S, com massa molecular em torno de 700 kDa e com ponto isoelétrico perto de 4,5 (MENKHAUS *et al.*, 2004). As propriedades físicas de algumas proteínas da soja estão apresentadas na Tabela 2.3.

A soja representa uma fonte de biomassa abundante, de baixo custo e rica em proteína. Esta abundância de proteínas é devido principalmente ao acúmulo destas moléculas em vacúolos que são organelas especializadas em armazenamento. Este é o fato da soja possuir um ciclo

reprodutivo fácil de ser manipulado permitem que a planta seja cultivada em casa de vegetação aumentando a produção por área e diminuindo a possibilidade de fecundação de plantas transgênicas com plantas não transgênicas, tornando-a uma boa plataforma de expressão para a produção de biomoléculas recombinantes (VIANNA *et al.*, 2011). Outra variável que faz da soja uma boa plataforma de expressão é a auto-fecundação, que diminui os riscos de contaminação (LAU e SUN, 2009).

Tabela 2.3. - Propriedades físicas das proteínas purificadas da soja (adaptado de ALLAN e SIDNEY, 1972; ROBIC, 2005).

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

Hoje algumas biomoléculas já são produzidas em soja, como hormônio do crescimento humano (CUNHA *et al.*, 2011b), fator IX humano, que já é cultivado em estufa (CUNHA *et al.*, 2011a), a proinsulina humana, que comprovou sua estabilidade mantendo sua produtividade mesmo depois de 7 anos de cultivo (CUNHA *et al.*, 2010) e ainda em fase de desenvolvimento mas em estado avançado, a EMBRAPA (Empresas Brasileira de Agropecuária) tem desenvolvido sementes de soja capazes de produzir 20 μ g do fragmento de anticorpo scFv por semente de soja, a ser utilizado para diagnóstico de câncer de mama (RECH, 2005).

2.1.3. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS EM PLANTAS COMO BIORREATORES

Para se tornar viável a produção de proteínas recombinantes em plantas transgênicas, é essencial uma etapa de recuperação e purificação do produto eficiente, pois as plantas contêm moléculas indesejadas (proteínas, óleos, compostos fenólicos, etc) que devem ser removidas durante a purificação. O processo de recuperação e purificação da biomolécula (RPB) é composto por várias operações unitárias tais como partição em duas fases aquosas e técnicas cromatográficas como de exclusão molecular, troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa, afinidade, entre outras, que vêm sendo testadas e melhoradas ao longo do tempo. Em geral, as etapas de RPB de proteínas recombinantes obtidas em plantas ou mesmo de culturas celulares é dividida em recuperação primária (operações unitárias clássicas como precipitação, moagem, filtração, extração sólido-líquido, etc.) e purificação (operações de maior especificidade, como cromatografias, precipitação de afinidade entre outras) (BASARAN e RODRIGUEZ-CEREZO, 2008; HARRISON *et al.*, 2003; PEREIRA, 2009).

A etapa primária de recuperação de produtos de plantas (como também em outros sistemas) tem como objetivo a redução de volume e obtenção de solução homogênea e clarificada que possa ser utilizada na etapa de purificação do produto. Em geral, para a recuperação das proteínas produzidas em plantas são necessárias três etapas:

- 1) Liberação do produto a partir da biomassa;
- 2) Separação sólido-líquido;
- 3) Clarificação e pré-tratamento.

Contudo, as estratégias de purificação são definidas em função da composição do extrato, tamanho das partículas, propriedades do extrato e estabilidade do produto. As plantas, por exemplo, possuem muitas moléculas como proteínas, óleos, fenóis e clorofila que necessitam ser removidas e devem ser consideradas na hora de escolha do método de purificação (WILKEN e NIKOLOV, 2012; MARK, 2004). O processo de extração de proteínas recombinantes da soja, por exemplo, necessita de várias operações para se obter o produto final. Para se extrair proteínas

da soja é necessário, primeiramente, a trituração dos grãos de modo a permitir uma maior interação dos seus constituintes com o tampão. Tanto na soja como em todas as oleaginosas, a presença de gordura pode interferir negativamente na etapa de purificação, sendo necessária sua remoção. A gordura presente na soja pode ser removida utilizando hexano ou éter de petróleo, e os farelos desengordurados resultantes podem ter suas proteínas extraídas utilizando um sistema de extração sólido-líquido, obtendo-se uma solução passível de ser utilizada em um processo de purificação mais refinado, como processos cromatográficos, sem que haja obstruções ou interferências pela gordura ou pela presença de sólidos (VIANNA *et al.*, 2011).

Na etapa de purificação, visa-se a obtenção da biomolécula de interesse com o grau de pureza requerido para a finalidade de uso da biomolécula. O grau de pureza que será almejado nesta etapa varia com a finalidade do produto, sendo que proteínas utilizadas para diagnóstico ou tratamento médico necessitam de grau de pureza elevado. Após o pré-tratamento, os processos de purificação empregam técnicas semelhantes às já desenvolvidas para biofarmacêuticos, tais como cromatografia de troca-iônica, interação hidrofóbica, exclusão por tamanho, afinidade e afinidade com íons metálicos imobilizados (WILKEN e NIKOLOV, 2012; PEREIRA, 2009). Outro fator importante a ser levado em conta para a escolha das etapas empregadas em um processo é o custo de cada etapa. Segundo LABROU e CLONIS (1994), o fator chave para o desenvolvimento da biotecnologia são os processos de recuperação e purificação que, frequentemente, podem chegar até a 90% do custo total de produção.

Muitos autores vêm relatando dificuldades nos processos de purificação de proteínas recombinantes, principalmente das proteínas recombinantes provenientes de plantas. Isto se deve a baixa taxa de expressão destas proteínas e a complexidade dos extratos de plantas. Estes extratos provenientes de plantas são muitas vezes compostos por lipídios, fenóis, polissacarídeos e uma ampla gama de proteínas que podem influenciar o processo de purificação (BOOTHE *et al.* 2010; CHEN, 2008; XU *et al.*, 2011). Na Tabela 2.4. são apresentadas algumas plantas transgênicas, as biomoléculas nelas produzidas e as técnicas de RPB utilizadas.

Tabela 2.4. - Proteínas recombinantes produzidas em plantas como biorreatores e métodos de recuperação e purificação utilizados (adaptação WILKEN *et al.*, 2012).

Planta hospedeira	Proteína recombinante	Recuperação	Purificação	Referência
Semente de soja	β -Glucuronidase	-Centrifugação -Filtração	-Cromatografia de troca iônica -Cromatografia de interação hidrofóbica	(ROBIC <i>et al.</i> , 2010)
Semente de milho	IgG	-Centrifugação -Filtração	- Separação PEG/PO ₄ (10%/15%), 11% NaCl -Separação PEG/PO ₄ (9%/11%)	(LEE e FORCINITI, 2010)
Semente de milho	Aproteína	-Filtração	-Cromatografia de afinidade em agarose-tripsina -IMAC-Cu(II)	(AZZONI <i>et al.</i> , 2002)
Semente de arroz	Lisozima humana	-Centrifugação -Separação sólido-líquido -Precipitação	-Cromatografia de troca iônica	(WILKEN e NIKOLOV, 2010)
Semente de arroz	Transferrina	-Centrifugação -Separação sólido-líquido	- Cromatografia de troca iônica	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
Folha de tabaco	IgG	-Centrifugação -Filtração	- Cromatografia de afinidade com Proteína A	(PADILLA <i>et al.</i> , 2009)
Folha de tabaco	IgG (C5-1)	-Extração sólido-líquido -Centrifugação -Filtração	-Cromatografia de afinidade com Proteína G	(VÉZINA <i>et al.</i> , 2009)

2.2. IMUNOGLOBULINA G (IgG) HUMANA

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são glicoproteínas compostas por 82 a 96% de cadeias polipeptídicas e de 4 a 18% carboidratos apresentando uma massa molecular de 150 kDa. Elas estão presentes no soro humano e animal, e constituem defesas imunológicas contra infecções provocadas por microrganismos. A estrutura da molécula de imunoglobulina possui uma configuração básica em forma de “Y”, constituída de duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, sempre em pares idênticos, ligadas entre si por meio de ligações covalentes de dissulfeto (pontes de dissulfeto). As cadeias leves, de massa molecular aproximada de 25 kDa, podem ser do tipo kappa ou lambda; ambas as cadeias são comuns a todas as classes de imunoglobulinas. As cadeias pesadas, com valores de massa molecular variando entre 50 e 70 kDa, possuem estruturas e composição distintas e ocorrem em cinco tipos moleculares, isto é, γ , μ , α , δ e ϵ , que correspondem às classes de imunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (HOLT *et al.*, 2003; VLUG e VAN REMORTEL, 1989; PRIN *et al.* 1995).

As imunoglobulinas da classe G (IgG) podem ser clivadas através do uso de enzimas proteolíticas formando diferentes fragmentos. A papaína produz três fragmentos, sendo dois Fab idênticos, cada um contendo um sítio de ligação ao antígeno, e um fragmento Fc. A pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ e o restante da molécula é clivada em fragmentos menores, do tipo pFc'. A Figura 2.1. exemplifica a ação destas enzimas (NEWCOMBE e NEWCOMBE, 2007).

Os fragmentos Fab produzidos pela digestão das imunoglobulinas pela papaína podem ser purificados através de técnicas cromatográficas de afinidade, filtração em gel, IMAC e outras (MAGE e LAMOYI, 1987).

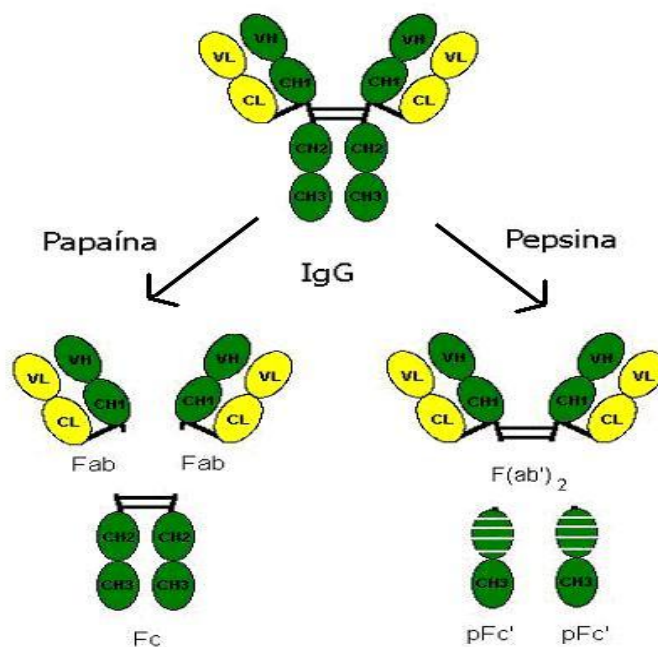


Figura 2.1. - Representação esquemática da estrutura da IgG e seus fragmentos gerados pelas enzimas proteolíticas papaína e pepsina. O fragmento cristalizável é identificado como Fc e o fragmento que apresenta porção de afinidade pelo antígeno é identificado como Fab (ab – antigen-binding). As letras V e C referem-se às regiões variável e constante, respectivamente, e as letras L e H referem-se às cadeias leve e pesada, respectivamente (adaptado de IMGT Marie-Paule page - <http://imgt.cines.fr>).

2.3. FRAGMENTOS Fab

Os fragmentos Fab, formados por uma cadeia leve completa (L) e a metade N-terminal (Fd) da cadeia pesada (H), apresentam uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa, e possuem a região ativa da imunoglobulina. Tanto a cadeia leve (L) quanto a metade N-terminal da cadeia pesada (Fd) podem ser subdivididas (CL e CH1 para cadeia leve, e VL e VH para metade da cadeia pesada) em unidades contendo 110 resíduos de aminoácidos (POLJAK *et al.*, 1973).

Por possuírem a região de combinação ao antígeno da imunoglobulina e por terem um tamanho reduzido, os fragmentos Fab possuem uma ampla aplicabilidade, sendo utilizados em tratamentos para picadas de cobra, determinação estrutural de proteínas através de co-cristalização, ensaios imunológicos baseados em biossensores e como reagentes de diagnósticos

in vivo, além de possuir potencial no tratamento de tumores (CORNELL *et al.*, 1997; COHEN *et al.*, 2000; PERSSON, 2001; MOFFATT *et al.*, 1999). Estes fragmentos apresentam algumas vantagens quando comparado ao uso da IgG intacta, como tamanho molecular menor, rápida penetração em tecidos e baixa imunogenicidade (MAGE, 1980).

O método mais comum de obtenção dos fragmentos Fab é por digestão enzimática da IgG intacta pela enzima papaína. Contudo, os fragmentos Fab também podem ser obtidos através de plantas e microrganismos geneticamente modificados. VENTURI *et al.* (2002), relataram que os fragmentos de anticorpos produzidos em organismos geneticamente modificados são mais homogêneos e eficazes que os fragmentos Fab provenientes da digestão enzimática com papaína, de anticorpos monoclonais intactos.

Dentre os trabalhos publicados para a produção de fragmentos Fab por organismos geneticamente modificados, a produção em *Escherichia coli* geneticamente modificada tem sido um dos temas mais abordados na literatura, sendo obtido por alguns autores valores de até 500 mg de Fab/L de meio (HUMPHERYYS *et al.* 2002).

Fragmentos Fab também já foram obtidos por cultivo de células animais. SCHATZ *et al.* (2003) utilizaram células CHO para produção de fragmento Fab, no qual foram testadas diferentes temperaturas de cultivo para se obter uma alta taxa de expressão.

O primeiro relato de utilização de plantas geneticamente modificadas para a produção de fragmentos Fab ativos data de 1993 (NEVES *et al.*, 1993) e para isso as plantas *Nicotiana e Arabidopsis*, foram utilizados como sistema de expressão. Contudo, a expressão proteica não foi muito elevada, obtendo-se valores abaixo de 1% das proteínas totais presentes. Anos depois, PEETERS *et al.* (2001) obtiveram expressão de fragmentos Fab em valores maiores que 5% das proteínas totais em *Arabidopsis thaliana*.

Independentemente de como são obtidos os fragmentos de anticorpos, estes representam um mercado de cerca de 6 bilhões de dólares por ano para aplicações terapêuticas e diagnósticas *in vitro* (HOLLIGER e HUDSON, 2005).

2.3.1. TÉCNICAS EMPREGADAS NA RECUPERAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab PROVENIENTE DE MEIOS DISTINTOS.

No processo de produção de anticorpos e seus fragmentos, a etapa de purificação é a mais custosa, representando de 50 a 80% dos custos de produção (ROQUE *et. al.*, 2004). Tradicionalmente os fragmentos Fab são obtidos a partir da digestão enzimática do anticorpo intacto pela enzima papaína ou através de plantas, bactérias e células animais geneticamente modificadas. Já o processo de purificação é realizado, na maioria das vezes, por cromatografia de afinidade com proteínas A, G ou L imobilizadas. A proteína A é uma proteína ligada aos dois lados da parede e da membrana celular da bactéria *Staphylococcus aureus* e a proteína G é uma proteína de superfície celular produzida pelas bactérias *Streptococci* do grupo C e G. Tanto a proteína A quanto a G ligam-se à região Fc dos anticorpos e são utilizadas como ligantes em cromatografia negativa para purificação dos fragmentos Fab provenientes da digestão enzimática. A proteína L, isolada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, possui afinidade pela cadeia leve do tipo Kappa e é capaz de purificar os fragmentos Fab por um processo cromatográfico tradicional (ZHAO *et al.*, 2009; ROQUE *et al.*, 2004). Na tentativa de superar a dependência de ligantes de origem biológicas, novas pesquisas visam desenvolver ligantes artificiais que apresentem as mesmas características dos ligantes naturais (ROQUE *et al.*, 2005). Apesar de serem amplamente utilizadas, estas proteínas de origem natural apresentam muitas desvantagens como alto custo, toxicidade em caso de desprendimento do ligante e sensibilidade a um grande número de agentes sanitizantes (ROQUE *et al.*, 2004).

Os primeiros fragmentos Fab produzidos por bactérias foram isolados por cromatografia de afinidade a fosforilcolina, que apresenta afinidade pela região Fv ao anticorpo nativo (SKERRA e PLUCKTHUN 1988; ANTONY *et al.*, 1992). No entanto, o ideal seria o acesso a um sistema de purificação simples e genérico que não dependa de interações específicas do tipo antígeno-anticorpo. Com esse intuito, as caudas de afinidade começaram a ser utilizadas. Essa técnica consiste na inserção de pequenos peptídeos que podem conferir alguma afinidade ao fragmento (CHEADLE *et al.*, 1992; MUNRO *et al.*, 1986). As primeiras caudas utilizadas foram as com o polipeptídeo myc, produzidas através do uso da engenharia genética. As caudas de e-Myc apresentam interações muito fortes, sendo necessárias condições praticamente desnaturantes

para a eluição. Assim, com o intuito de superar este problema, as caudas de histidina começaram a ser utilizadas, uma vez que possibilita a recuperação dos fragmentos em condições brandas, através de técnicas de cromatografia por íons metálicos imobilizados (SKERRA *et al.*, 1991; MOLLOY *et al.*, 1995). Contudo, o uso de cauda de histidina também traz alguns problemas, como efeitos colaterais em imunizações ou em outras aplicações *in vivo*, e sua remoção através de proteases podem danificar as propriedades da molécula (FIEDLER e SKERRA, 1999).

Uma alternativa para a purificação de fragmentos de Fab é o emprego de técnicas não cromatográficas (LABROU e CLONIS, 1994), como sistemas de separação em duas fases aquosas (ANDREWS, 1996; ZIJLSTRA *et al.*, 1998), eletroforese preparativa, (LIM *et al.*, 1998; THOMAS *et al.* 2002), focalização isoelétrica (MULLER *et al.*, 1998), precipitação por afinidade (POWERS *et al.*, 2001) ou através da combinação de técnicas não cromatográficas com técnicas cromatográficas. Contudo, como o uso de vários métodos torna o processo mais demorado e mais dispendioso, pesquisadores buscam o desenvolvimento de metodologias de purificação dos fragmentos Fab em uma única etapa (ROQUE *et al.*, 2004).

2.4. CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC)

Em 1975, PORATH e colaboradores introduziram a técnica de Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC - *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) para a purificação de biomoléculas. Esta técnica, relativamente simples quando comparada à técnica de afinidade bioespecífica, possui inúmeras aplicações analíticas, preparativas e industriais, como a separação e purificação de diferentes biomoléculas (peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos), a separação de células a partir de extratos biológicos e estudos de estrutura-função de proteínas (BRESOLIN *et al.*, 2009).

A técnica de IMAC explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelatados imobilizados em um suporte sólido. Esta interação resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre íons metálicos quelatados e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, tiol da

cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para os íons metálicos, atuando como base de Lewis (PORATH, 1988; WONG *et al.*, 1991; CHAGA, 2001).

Para fazer uso da técnica de IMAC é necessário o estudo de diversas variáveis, como íon metálico, agente quelante e condições operacionais (vazão, concentração proteica da alimentação, sistema tamponante, força iônica, pH e temperatura) para que possa ocorrer a purificação da biomolécula alvo (PORATH, 1988; WONG *et al.*, 1991; CHAGA, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Uma das grandes vantagens deste método para a purificação de biomoléculas é que os adsorventes IMAC apresentam estabilidade física e química, baixo custo e alta capacidade de adsorção, qualidade estas de grande interesse para o uso analítico e comercial (ARNOLD, 1991).

2.4.1 EFEITO DO pH E DA FORÇA IÔNICA EM IMAC

Em IMAC, o valor de pH ótimo de adsorção depende do íon metálico e dos grupos doadores de elétrons. Em geral, a adsorção é favorecida numa faixa de valores de pH de 6,0 a 8,0 para proteínas que possuem resíduos de histidinas e cisteínas acessíveis, porém para proteínas ricas em ácidos carboxílicos ou grupos fosfato (fosfoproteínas) a adsorção ocorre a valores de pH mais baixos (pH 5,0). Assim as ligações de coordenação são favorecidas em condições na qual os grupos ionizáveis estão desprotonados (PORATH, 1990; BELEW e PORATH, 1990)

O aumento da força iônica, na maioria dos casos, aumenta a seletividade em IMAC, fazendo com que a ligação de coordenação seja o principal elemento responsável pela adsorção. Além disso, as proteínas são estabilizadas e o processo de agregação tende a ser retardado (UEDA *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

2.4.2. ÍONS METÁLICOS UTILIZADOS EM IMAC

As interações entre os íons metálicos imobilizados e as cadeias laterais de aminoácidos têm um caráter reversível, e podem ser exploradas para adsorção e, em seguida para a dessorção em condições brandas (CHAGA, 2001). Em IMAC os íons metálicos mais empregados são Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} , devido ao caráter ácido duro e intermediário apresentado por estes metais (WONG *et al.*, 1991; UEDA *et al.*, 2003). Em geral os íons metálicos são

classificados em três classes pela maioria dos autores (duros, intermediários e moles), baseando-se em sua reatividade preferencial (Tabela 2.5.).

Tabela 2.5. - Classificação dos íons metálicos utilizados em IMAC e os átomos para coordenação (PORATH, 1988).

Grupo	Metais	Coordenação
Duro	Fe ³⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺	Oxigênio
Intermediário	Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺	Nitrogênio, Oxigênio, Enxofre
Mole	Cu ⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺	Enxofre

Para a purificação de proteínas que possuem resíduos de histidina, triptofano e cisteína, os íons metálicos intermediários são os mais utilizados, pois são capazes de interagir com o nitrogênio do anel aromático dos grupos imidazol, indol e com enxofre do grupo tiol, respectivamente, de cada aminoácido (SULKOWSKI, 1989). Contudo, SULKOWSKI (1989) demonstrou que a interação que mais contribui para purificação é a do par de elétrons presente no nitrogênio do anel imidazol da histidina e que a presença de múltiplas histidinas expostas na superfície da proteína a ser separada aumenta o grau desta interação. Os aminoácidos aromáticos, como o triptofano, também são importantes na retenção de proteínas, porém a contribuição de um resíduo de triptofano é considerada pequena quando comparado ao efeito da histidina (SULKOWSKI, 1989; BEITL e ATAAI, 1992). A cisteína também afeta a retenção de proteínas em IMAC quando este resíduo estiver na forma reduzida.

Outro fator que influencia a adsorção de uma proteína em IMAC quando usado metais intermediários é a acessibilidade dos resíduos de histidina na estrutura tridimensional da proteína e a sequência de resíduos de aminoácidos adjacentes, pois mesmo resíduos que não se ligam aos íons metálicos podem contribuir indiretamente para coordenação através de uma geometria adequada. Os grupos NH₂ da extremidade N-terminal das proteínas também podem participar diretamente na interação quando o valor de pH estiver acima de 8,0, quando o nitrogênio do grupo amina está desprotonado (ARNOLD, 1991; WONG *et al.*, 1991; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009).

2.4.3. AGENTES QUELANTES EM IMAC

Nos processos de purificação de proteínas por IMAC, o agente quelante tem um grande efeito na capacidade e na seletividade do íon metálico em adsorver proteínas. Existem vários tipos de agentes quelantes utilizados em IMAC, contendo as mais variadas estruturas. Contudo, quanto mais polidentado é o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos, porém menor será a quantidade de sítios disponíveis para a ligação com a biomolécula, tornando mais fracamente adsorvida. Desta forma, o ideal em um agente quelante é que ele forneça uma boa estabilidade do íon metálico, mas ao mesmo tempo possua sítios capazes de se ligar com a molécula alvo (PORATH, 1988; SULKOWSKI, 1985). Os átomos doadores de elétrons (em geral O ou N) que participam da coordenação com o metal também influenciam na estabilidade quelato. Átomos de oxigênio dos grupamentos carboxílicos dos agentes quelantes são mais estáveis em valores de pH ácidos que átomos de nitrogênio, estes mais susceptíveis a protonação em baixos valores de pH (PORATH, 1988).

O ácido iminodiacético (IDA) é um dos agentes quelantes mais empregados em IMAC. É um agente quelante tridentado que possui um átomo de nitrogênio e dois átomos de oxigênio para a coordenação, capazes de quelatar íons metálicos intermediários e pesados, ocupando três sítios de coordenação (WONG *et al.*, 1991; UEDA *et al.*, 2003; BRESOLIN *et al.*, 2009). As constantes de dissociação pK_1 e pK_2 do IDA são 1,73 e 2,73 respectivamente, e o valor de pI está entre pH 2,0 e 3,0 (Sigma-Aldrich Technical Service). Em baixos valores de pH, a protonação do nitrogênio do IDA torna esse átomo menos disponível para coordenação, enquanto que a capacidade de coordenação do oxigênio é menos afetada.

O tris-2(aminoetil)amina (TREN) é um agente quelante tetradentado, menos empregado em IMAC, que possui quatro átomos de nitrogênio disponíveis para a ligação com o íon metálico, tendo dois grupos amina primária, uma secundária e uma terciária. Seu ponto isoelétrico encontra-se próximo de pH 10,5, muito acima do apresentado pelo IDA (PEREIRA, 2009). A Figura 2.2 apresenta a estrutura dos agentes quelantes IDA e TREN.

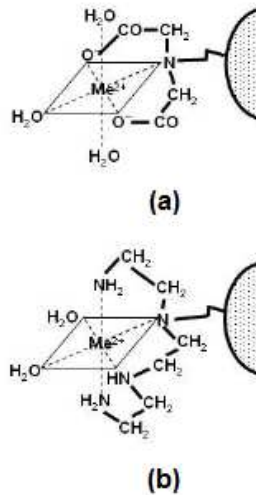


Figura 2.2. - Representação dos agentes quelantes (a) IDA (b) TREN (BRESOLIN *et al.*, 2009)

Estudos comparativos das características de coordenação dos agentes quelantes IDA (tridentado) e TREN (tetradentado) imobilizados em géis de agarose mostraram que a capacidade de quelação para os íons metálicos Cu^{2+} são maiores que para os íons metálicos Ni^{2+} , para ambos os agentes quelantes. Porém, partindo-se do pressuposto de que quanto mais polidentado for o agente quelante maior é a estabilidade do quelato, e que o agente quelante TREN é mais polidentado que o agente quelante IDA, poderia então o agente quelante TREN ser mais estável.

Contudo, estudos mostraram que esta afirmação não é válida para todas as condições, uma vez que parâmetros como natureza do tampão, valores de pH, de força iônica e concentração do íon metálico na solução alimentada na coluna, além de características intrínsecas dos átomos doadores de elétrons dos agentes quelantes, desempenham um importante papel no que diz respeito à estabilidade dos quelatos metálicos e capacidade máxima de adsorção de proteínas (BRESOLIN *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1. GRÃOS DE SOJA

Os grãos de soja utilizados para a extração das proteínas (seção 3.2.3) foram gentilmente doados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) de Brasília (amostras de grãos BRS232).

3.1.2. IMUNOGLOBULINA G HUMANA

A imunoglobulina G humana (IgG), com pureza de mínima de 95% e concentração de 160 mg/mL, foi adquirida da CSL Behring, Alemanha.

3.1.3. REAGENTES

O gel de agarose Sepharose 4B - contendo 4% de agarose reticulada e tamanho de partícula entre 45 a 165 µm - foi obtido da GE Healthcare (EUA). Sulfato de níquel, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), acetato de sódio, carbonato de sódio, formaldeído, hexano e isopropanol foram obtidos da Merck (Alemanha). Borohidreto de sódio, fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio bibásico anidro, ácido clorídrico, ácido acético, ácido cítrico, hidróxido de sódio, ácido acético, cloreto de sódio, carbonato de sódio, metanol e etanol foram obtidos da Synth (Brasil). L-cisteína, iodoacetamina, acrilamida, bis-acrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS), glicina e N, N, N', N'-tetra-metilenodiamina (TEMED) foram obtidos da BioRad (EUA). Persulfato de amônio, ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES), tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), tris-(2-aminoetil)amina (TREN), papaína, ácido iminodiacético (IDA), agarose para eletroforese, polietilenoglicol (PEG 10.000), anticorpo anti-IgG humana (Fab específico) conjugado com peroxidase (produzido em cabra), glicerol, e os géis agarose-proteína G (4% de agarose altamente reticulada, Fast Flow) e agarose-proteína L (6% de agarose

reticulada) foram obtidos da Sigma (EUA). Ditiotrietol foi obtido da Plusone (Suécia). Azul de Comassie brilhante G 250, glutaraldeído e azul de bromofenol foram obtidos da Vetec (Brasil). Para os ensaios de eletroforese utilizaram-se marcadores de alta e baixa massa molecular, ambos provenientes de *kits* da GE Healthcare (Suécia). O marcador de alta massa molecular é constituído das seguintes proteínas: miosina (220 kDa), α 2-macroglobulina (170 kDa), β -galactosidase (116 kDa), transferina (76 kDa) e desidrogenase glutâmica (53 kDa). O marcador de baixa massa molecular contém as seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Para as análises de *Western blot* utilizaram-se anticorpo anti-IgG humana (Fab específico produzidos em cabra e conjugados com peroxidase) da Sigma (EUA), membrana de nitrocelulose Trans-Blot da BioRad (EUA) e marcador *full Range Rainbow* da GE Healthcare (Suécia). Este marcador contém as seguintes massas moleculares: 225 kDa (azul), 150 kDa (vermelho), 102 kDa (verde), 76 kDa (amarelo), 52 kDa (púrpura), 38 kDa (Azul), 24 kDa (laranja), 17 kDa (azul), 12 kDa (vermelho). Foi utilizada água ultrapura purificada por sistema Milli-Q (Millipore, EUA) para a preparação de todas as soluções.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. OBTENÇÃO DA FARINHA DE SOJA

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

3.2.2. DESENGORDURAMENTO DA FARINHA DE SOJA

O desengorduramento da farinha de soja foi feito conforme o protocolo descrito por ROBIC (2005) utilizando aparelho tipo *soxhlet* (Laborglas, Brasil). A extração da gordura presente em 100 g de farinha foi feita a 60°C com 400 mL de hexano (Merck, Alemanha) durante 6 horas. Após isso, a farinha de soja desengordurada obtida foi deixada por 8 horas a temperatura ambiente na capela para a evaporação do hexano.

3.2.3. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SOJA

Para a extração das proteínas da soja foram pesados 5 g de farinha desengordurada em béquer de 250 mL, no qual foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0. Agitou-se a mistura em agitador mecânico modelo Q-251D (IKA Labortechnik, Alemanha) com impelidor tipo pá inclinada a 500 rpm por 30 minutos e temperatura de 20°C. Após tal procedimento, a solução obtida foi centrifugada a 10000 g, por 20 minutos a 5°C em centrífuga 5804R (Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana com diâmetro nominal de corte de 3 µm (Inlab, Brasil), utilizando-se de bomba a vácuo (Quimis, Brasil). O extrato de proteína de soja obtido foi guardado em freezer a -20°C (ROBIC, 2005).

3.2.4. FRAGMENTAÇÃO DA IgG COM PAPAÍNA

A fragmentação de IgG humana foi realizada segundo método desenvolvido por Ternyncky e Avrameas (1987) utilizando-se papaína. Para a fragmentação utilizou-se solução com concentração final de 20 mg/mL de IgG contendo 1% de papaína. O volume final da reação foi de 1,7 mL, assim foi necessário uma solução inicial de 1,0 mL contendo 30 mg de IgG, na qual se adicionou 0,085 mL de EDTA 0,04 mol/L, 0,085 mL de L-cisteína 0,2 mol/L e 0,3 mL de papaína 1 mg/mL. Por fim adicionou-se 0,23 mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,4. Esta solução foi colocada em banho maria a 37°C por 2 horas e, ao término deste período, adicionou-se 0,17 mL de iodoacetamina 0,4 mol/L para interromper a reação e completou-se o volume da reação para 2,5 mL com fosfato de sódio 100 mmol/mL pH 7,4. Após isso, a solução final permaneceu a temperatura ambiente por 30 minutos sendo posteriormente estocado em freezer -20°C.

3.2.5. ISOLAMENTO DOS FRAGMENTOS Fab

Para a separação do fragmento Fab a partir da solução de clivagem da IgG com papaína, foi empregada a técnica de cromatografia por afinidade utilizando-se duas colunas

cromatográficas conectadas em série (*in-tandem*), a primeira coluna contendo o gel agarose-proteína G e a segunda contendo o gel agarose-proteína L. A proteína-G, tendo afinidade pela porção Fc da IgG, é capaz de capturar IgG intacta e fragmentos Fc, enquanto que a proteína-L, por ter afinidade pela cadeia leve do tipo kappa das imunoglobulinas, é capaz de adsorver os fragmentos Fab contendo essas cadeias. As colunas com 5 mL de gel agarose-proteína-G e 5 mL de gel agarose-proteína-L foram ligadas em série e equilibradas com 10 volumes de coluna de tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,4. Em seguida, foi feita a injeção das amostras da solução de IgG humana digerida. Após isso, a etapa de lavagem foi realizada com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,4 até normalização da linha de base.

Terminada esta etapa, as colunas foram separadas e fez-se a eluição das moléculas adsorvidas com tampão glicina-HCl 100 mmol/L pH 3,0, até a normalização da linha de base, fracionando-se a cada 2 mL. Somente a coluna contendo o adsorvente agarose-proteína L possui a capacidade de reter os fragmentos Fab, por isso apenas as frações correspondentes a sua eluição foram utilizadas no trabalho. Tais frações tiveram seu pH estabilizados com 100 µL de tampão 1,0 mol/L Tris-HCl pH 8,0. As frações provenientes da eluição da coluna contendo proteína G como ligante foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e em seguida, descartadas. Ao término da etapa de eluição, ambas as colunas foram estabilizadas com tampão de equilíbrio e lavadas com água Milli-Q; tais procedimentos foram realizados segundo recomendação do fabricante. As frações contendo o fragmento Fab foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e estocadas em freezer a -20°C.

3.2.6. ATIVAÇÃO DO GEL DE AGAROSE COM EPICLORIDRINA

A ativação do gel de agarose foi feita com epicloridrina de acordo com o protocolo descrito por HEMDAN e PORATH (1985). Primeiramente a agarose foi degaseificada em sonicador por 60 min. Após isso, filtrou-se 20 g de gel em vidro sinterizado que, posteriormente foi adicionado a um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5,0 mL de epicloridrina, 50,0 mL de NaOH 2,0 mol/L e 0,266 g de boroidreto de sódio (NaBH₄). O frasco Erlenmeyer foi colocado em agitador orbital sob agitação de 50 rpm a temperatura de 25°C durante 15 min. Seguindo esta reação, foram gotejados simultaneamente 50,0 mL de NaOH e 23,3 mL de epicloridrina a uma

vazão de 0,27 e 0,13 mL/min, respectivamente, para evitar o aumento de temperatura durante a reação. A suspensão foi deixada sob agitação por um período de 16 h a 25°C. Após este período, o gel foi lavado em funil de vidro sinterizado sob vácuo com água Milli-Q, em capela, até que o pH da água de lavagem (descarte) fosse igual ao pH da água Milli-Q, indicando que todo o excesso de solução foi removido (solução com epícloridrina, NaOH e NaBH₄ com pH em torno de 10,0). O gel ativado foi armazenado em etanol a 6°C.

3.2.7. IMOBILIZAÇÃO DO TREN E IDA

A imobilização do tris-(2-aminoetil)amina (TREN) foi realizada como descrito por BODEN *et al*(1995). Preparou-se uma solução contendo 5,0 mL de TREN (96 % m/v) em 25,0 mL de água Milli-Q (o frasco contendo o reagente TREN foi aberto em uma capela com atmosfera de argônio, uma vez que o mesmo adsorve umidade e CO₂ do ar). Em um frasco Erlenmeyer colocou-se a agarose previamente ativada e a solução contendo TREN, que foram mantidos sob agitação por 48 h a temperatura ambiente em capela. Após este período, o gel foi lavado com água Milli-Q, até verificação de valores semelhantes entre o pH da água ultrapura e da água de lavagem, indicando a remoção do excesso de TREN do gel.

A imobilização do ácido imídioacético (IDA) foi realizada como descrito por PORATH e OLIN (1983). Preparou-se uma solução contendo 26 g de IDA em 65 mL de NaOH 2 mol/L pH 10,0. Em paralelo, foi preparado 65,0 mL de outra solução contendo carbonato de sódio 2 mol/L. Misturou-se as soluções de IDA e carbonato mantendo o pH 10,0. A solução resultante foi adicionada a agarose previamente ativada e mantida sob agitação por 24 h a 65°C. Após o término deste período, a matriz foi lavada com água ultra pura, até verificação de valores semelhantes entre o pH da água ultrapura e da água de lavagem, indicando a remoção do excesso de IDA do gel.

3.2.8. EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS

Nos experimentos cromatográficos utilizaram-se colunas cromatográficas modelo C 10/20 de 10 mm de diâmetro interno por 20 cm de altura (GE Healthcare, EUA), empacotadas com 3,0

mL de gel agarose-TREN e agarose-IDA. As colunas foram conectadas a um sistema de cromatografia de baixa pressão (Bio-Rad, EUA). Os experimentos foram conduzidos a uma vazão de 0,5 mL/min. Inicialmente, a coluna contendo IDA foi saturada com 50 mmol/L de sulfato de níquel em água e a coluna contendo TREN foi saturada com solução contendo 50 mmol/L de sulfato de níquel em acetato de sódio 20 mmol/L pH 6,5 (SHARMA E AGARWAL, 2002). Em seguida as colunas foram lavadas com 10 volumes de coluna utilizando o tampão de dessorção conforme o experimento (fosfato de sódio 25 mmol/L pH 4,0; Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0; Mes 25 mmol/L 300 mmol/L de imidazol, pH 6,5 e fosfato de sódio 25 mmol/L, 300 mmol/L de imidazol pH 7,0), a fim de se retirar o metal fracamente quelatado. As colunas foram equilibradas com 10 volumes de coluna com os tampões Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0, Mes 25 mmol/L pH 6,5 e fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5. As colunas também foram equilibradas com estes mesmo tampões contendo 1,0 mol/L de NaCl, de acordo com cada experimento. Com as colunas devidamente equilibradas, injetou-se a amostras contendo proteínas da soja, fragmentos Fab ou proteínas da soja acrescidas de fragmentos Fab, estando a concentração de aproximadamente 1 mg/mL e o volume em torno de 2 mL, salvo alguns experimentos específicos em que a amostra injetada apresentava valores diferentes.

A lavagem foi realizada com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna e, em seguida, a eluição foi realizada por acréscimo de 300 mmol/L de imidazol nos tampões de equilíbrio fosfato de sódio e Mes, por abaixamento de pH (acetato de sódio), ou aumento da concentração de Tris no tampão de equilíbrio (Tris-HCl). A cromatografia com eluição em gradiente linear de pH, foi realizada no sistema de cromatografia de baixa pressão ÄKTA Purifier (GE Healthcare, EUA). O gradiente de valores de pH utilizado foi de 7,5 a 4,0, sendo que para a faixa de pH 7,5 a 6,0 utilizou-se tampão fosfato de sódio 25 mmol/L com 1,0 mol/L de NaCl e para a faixa de valores de pH 6,0 a 4,0, acetato de sódio 25 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl. Finalizada a eluição, a coluna foi regenerada com EDTA 50 mmol/L e, posteriormente, com NaOH 20 mmol/L. Ao término da regeneração, as colunas foram lavadas com água Milli-Q e armazenadas em geladeira. Os experimentos foram realizados em duplicata, no mínimo.

3.2.9. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA

Para avaliar a capacidade dinâmica dos adsorventes foram realizadas curvas de ruptura em coluna cromatográfica contendo 1,0 mL de gel de agarose com os agentes quelantes IDA e TREN imobilizados. As colunas contendo o gel foram carregadas com sulfato de níquel 50 mmol/L, lavadas com o tampão de dessorção e equilibradas com o tampão de adsorção, seguindo o procedimento descrito no item 3.2.8. Em seguida, a coluna foi alimentada com 20 mL de extrato proteico de soja contendo fragmentos Fab (aproximadamente 30% de proteínas da soja e 70% de fragmento Fab). Ao término da alimentação, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. A eluição e a regeneração foram realizadas de acordo com os passos descritos em 3.2.8. Na cromatografia negativa, o ponto de ruptura foi definido como sendo o ponto no qual se inicia a detecção de proteínas da soja no *flowthrough*. Na cromatografia tradicional, o ponto de ruptura foi definido como sendo o ponto no qual se inicia a detecção de fragmentos Fab no *flowthrough*.

3.2.10. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.10.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a determinação da concentração de proteína total nas amostras, utilizou-se o método descrito por BRADFORD (1976), com albumina do soro bovino e IgG humana como proteínas de referência.

A quantificação de fragmento Fab foi realizada em triplicata, por imunodifusão radial, segundo o protocolo proposto por LU e MILLER (1996). O gel para a imunodifusão radial foi preparado com 1,2% de agarose e 2% de PEG 10.000 dissolvidos em 500,0 mL de tampão Tris-HCl 90 mmol/L, ácido bórico 90 mmol/L e EDTA 3 mmol/L pH 8,3, deixados em banho maria a 90°C sob agitação por 30 minutos. Após total dissolução da agarose, a solução foi resfriada até atingir 55°C e adicionou-se o anticorpo anti-IgG humana (Fab específico) conjugado com peroxidase na proporção de 1/100 anti-IgG para agarose. A agarose contendo o anti-IgG foi vertida imediatamente em filme transparente de poliéster (gel bond).

Após a gelificação foram feitos poços de aproximadamente 2 mm de raio, onde foram colocadas 10,0 µL das amostras selecionadas. O gel foi colocado em câmara úmida por 48 horas. Em seguida, o mesmo foi seco e corado com solução de coloração (90,0 mL de etanol, 20,0 mL de ácido acético, 90,0 mL de água Milli Q e 1,0 g de Coomassie brilliant blue R-250) por 30 minutos. Passado este tempo, o gel foi descorado com repetitivas lavagens com solução descorante (90,0 mL de etanol, 20,0 mL de ácido acético e 90,0 mL de água Milli Q). Os halos apresentados no gel decorrentes da reação antígeno-anticorpo foram medidos utilizando-se um paquímetro e as concentrações das amostras analisadas foram determinadas com a curva analítica (determinada com concentrações conhecidas de fragmento Fab de alta pureza (grau de pureza de 95%, Calbiochem, EUA).

3.2.10.2. ELETROFORESE SDS-PAGE

Para análise das proteínas obtidas em diferentes etapas do experimento cromatográfico utilizou-se a técnica de eletroforese SDS-PAGE em aparelho Mini Protean III (BioRad, EUA), utilizando gel na concentração de 7,5% e 12% em acrilamida para os experimentos realizados contendo extrato proteico de soja e 10% para os experimentos realizados somente com fragmento Fab humano. As amostras foram tratadas com tampão contendo SDS (sem adição de β-mercaptoetanol) e aquecidas em banho maria a 100°C por 8 minutos, conforme protocolo apresentado por LAEMMLI (1970). Para análise das bandas no gel utilizou-se marcador de baixa massa molecular nos géis de 10% e 12% e marcadores de alta massa molecular nos géis de 7,5% e 10% em acrilamida, além de amostras de fragmento Fab e IgG de alta pureza. A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata, conforme MORRISSEY (1981).

3.2.10.3. ELETROFORESE DE FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (IEF)

A eletroforese de focalização isoelétrica foi realizada em aparelho de eletroforese PhastSystem (Pharmacia, Suécia), com géis de gradientes de pH de 3 a 9 (GE Healthcare, EUA), de acordo com o método descrito pelo fabricante. Utilizou-se o kit contendo as seguintes

proteínas como marcadores de pI: tripsinogênio, pI 9,30; lectina, pI 8,65; lectina, pI 8,45; lectina, pI 8,15; mioglobina de cavalo, pI 7,35; mioglobina de cavalo, pI 6,85; anidrase carbônica II humana, pI 6,55; anidrase carbônica II humana, pI 5,85; β -lactaglobulina A, pI 5,20; tripsina inibidora de soja, pI 4,55; amiloglucosidade, pI 3,50 (GE Healthcare, EUA). A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata, também de acordo com o protocolo desenvolvido pelo fabricante.

3.2.10.4. WESTERN BLOT

As proteínas separadas por eletroforese SDS-PAGE em gel de 12% em acrilamida, os fragmentos Fab foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA) em tampão de transferência (25 mmol/L de Tris-HCl, 192 mmol/L de glicina e metanol 20% v/v) no equipamento Mini Transblotting (BioRad, EUA), aplicando-se uma voltagem de 100 V por uma hora. A transferência dos fragmentos foi verificada através da presença do marcador Full Range Rainbow (GE Healthcare, EUA) na membrana de nitrocelulose. Confirmada a presença do marcador, a membrana de nitrocelulose, foi mergulhada em tampão de bloqueio (leite em pó 5% e Tween 20 0,1% em PBS) por 1 hora. Em seguida, removeu-se o tampão de bloqueio e adicionou-se solução de lavagem (0,1 g de Tween 20, para 100 mL de PBS) por 5 minutos sob agitação. Este procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, adicionou-se o anticorpo anti-IgG humana (Fab específico) conjugado com peroxidase, apropriadamente diluído em tampão de bloqueio sem adição de Tween (PBS contendo 2% de leite desnatado) e deixado em temperatura ambiente por 1 hora. Após esta etapa, descartou-se a solução contendo o anticorpo e adicionou-se tampão de lavagem por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se tampão de substrato (1,0 mL de diaminobenzidina a 6 mmol/L, 5 μ L de H₂O₂ 30% e 9,0 mL de Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,4) até aparecimento das bandas. A reação foi interrompida pelo descarte do tampão de substrato e adição de água Milli Q. Todo o procedimento de *Western blot* foi realizado baseado no procedimento proposto por TOWBIN e colaboradores (1979).

3.2.10.5. DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÍON METÁLICO IMOBILIZADO

Para se determinar a quantidade de íon metálico imobilizado, utilizou-se colunas contendo 1,0 mL de gel agarose-IDA e agarose- TREN, as quais foram alimentadas até a saturação com solução de sulfato de níquel 50 mmol/L. Em seguida, as colunas foram lavadas com 10 volumes de coluna de água ultra pura e com tampão de eluição. Removidos os íons metálicos fracamente quelatados, eluiu-se os íons metálicos imobilizados com 10 mL de EDTA 50 mmol/L pH 7,0. A quantidade de íons níquel presente na eluição com EDTA foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica de chama (modelo Analyst 100 da PERKIN ELMER, EUA), seguindo procedimentos fornecidos pelo fabricante.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são abordados os resultados obtidos da purificação do fragmento Fab humano não recombinante adicionado artificialmente ao extrato proteico de grãos de soja não transgênicos pela técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Em sequência são apresentados, primeiramente, os dados referentes à adsorção das proteínas nativas da soja (sem adição de fragmentos Fab) em IMAC em diferentes sistemas tamponantes (Mes/ imidazol, fosfato de sódio/imidazol, fosfato de sódio/acetato de sódio, Tris-HCl/Tris-HCl). Selecionadas as condições que propiciaram a maior retenção das proteínas da soja nos adsorventes IMAC, experimentou-se estas condições para os fragmentos Fab produzidos através da digestão de IgG por papaína e pré-purificados por cromatografia de afinidade. Finalmente são apresentados os resultados obtidos dos experimentos cromatográficos com o extrato protéico de soja acrescido de fragmento Fab; Para avaliar a purificação dos fragmentos realizou-se análise qualitativa dos fragmentos Fab por SDS-PAGE e *Western blot* e quantitativa, pela técnica de imunodifusão radial (RIA).

4.1. PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DOS GRÃOS DE SOJA

De acordo com ALLAN e SIDNEY (1972), as proteínas nativas das sementes de soja possuem massas moleculares que variam de 7,9 a 356 kDa. Neste trabalho, a preparação do extrato proteico de soja foi obtido por extração de proteínas de grãos de soja em tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0, condição que melhor favorece a extração das proteínas de soja segundo Robic (2005) (entre 5,0 a 5,5 mg/mL). De acordo com a massa molecular das proteínas da soja observadas na eletroforese SDS-PAGE da Figura 4.1., foi realizado uma comparação com as massas moleculares das proteínas lipoxigenase, hemaglutinina, β -amilase, alantoinase, α -conglucina e inibidor de tripsina, descritas por ALLAN e SIDNEY (1972) e ROBIC (2005). Com isto, foi possível observar proteínas com massa molecular semelhante, como mostrado no perfil eletroretico da Figura 4.1.

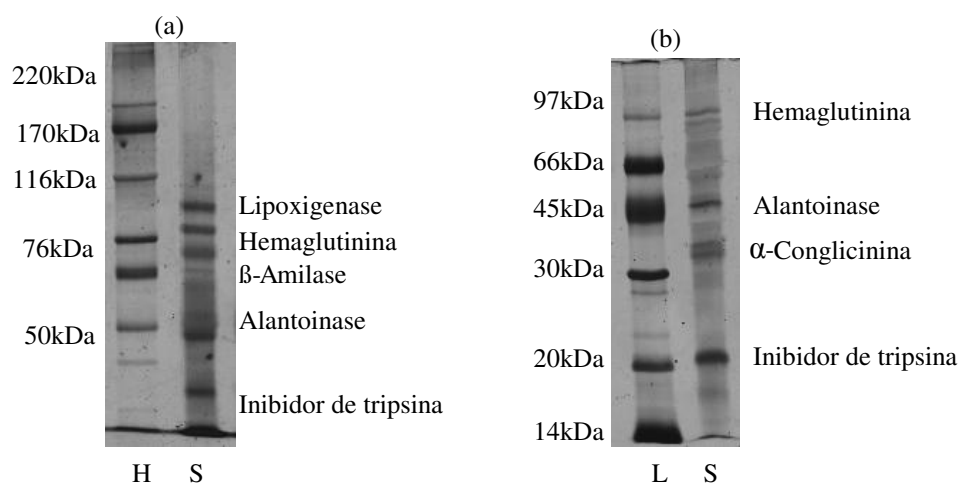


Figura 4.1. Eletroforeses SDS-PAGE do extrato proteico de soja. Amostras em condições desnaturantes e não-redutoras: (a) gel a 7,5%; (b) gel a 12,5%. (H) marcador de alta massa molecular; (L) marcador de baixa massa molecular; (S) extrato de proteínas da soja.

Comparou-se também o perfil eletroforético das proteínas de soja extraídas neste trabalho com aquele obtido por Pereira (2009) que realizou o mesmo processo de extração com grãos de soja da marca Jasmine (PR, Brasil), lote 402. Observa-se uma pequenas variações na disposição das proteínas e bandas mais bem definidas referentes a Hemaglutinina e a Lipoxigenase; estas pequenas variações podem estar relacionadas ao fato de os grãos de sojas utilizados não serem os mesmos, e pequenas variações em suas composições proteica. Contudo, de maneira geral, os perfis eletroforéticos de ambos se assemelham em sua composição.

4.2. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS Fab POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE (COLUNAS *IN TANDEM*)

Obteve-se os fragmentos Fab por cromatografia de afinidade bioespecífica em procedimento realizado com duas colunas colocadas em série, a primeira coluna contendo o gel agarose-proteína-G, seguida da segunda coluna contendo o gel agarose-proteína-L (descrito no item 3.2.5). Os fragmentos Fab foram recuperados nas frações de eluição da coluna cromatográfica empacotada com agarose-proteína-L, como mostrado no perfil eletroforético apresentado na Figura 4.2. Utilizou-se estas duas colunas com o intuito de remover os fragmentos

Fc e IgG não clivada nas frações de lavagem das colunas em série e recuperar somente o fragmento Fab nas frações de eluição da coluna agarose-proteína-L. Contudo, observa-se na Figura 4.2 a presença de fragmentos Fab na etapa de eluição da coluna agarose-proteína G. Segundo DERRICK e WIGLEY, (1994), a proteína-G apresenta 3 domínios, dois dos quais apresenta afinidade pela região Fc da IgG e um que apresenta afinidade pela região Fab. Nos experimentos de purificação de fragmentos Fab por afinidade biospecífica foi constatado a presença de IgG não clivada nas frações de eluição da coluna de agarose-proteína-L. Este fato pode ser explicado pela ineficiente captura da IgG pela agarose-proteína-G (IgG não clivada obtida no *flowthrough* da coluna agarose-proteína G).

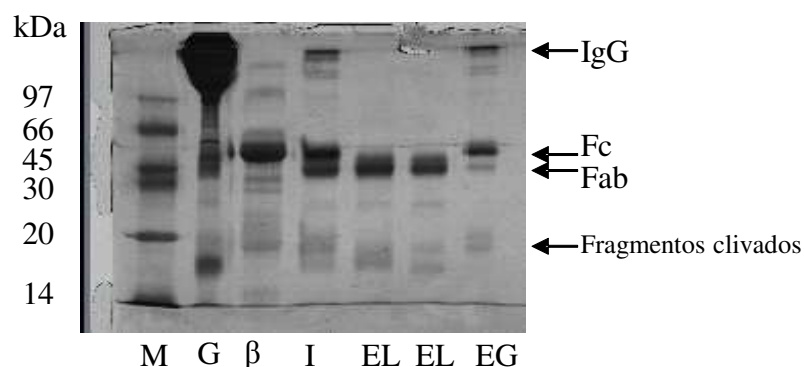


Figura 4.2. - Perfil eletroforético dos fragmentos Fab obtidos por purificação da IgG humana digerida por papaína, por cromatografia de afinidade em Proteína-G seguido por Proteína-L. (M) Marcador de baixa massa molecular; (G) Marcador de IgG; (β) Marcador de IgG em β -mercaptoetanol; (I) Injeção contendo solução de IgG clivada por papaína; (EL) fração recuperada na etapa de eluição da cromatografia de afinidade com proteína L; (EG) fração recuperada na etapa de eluição da cromatografia de afinidade com proteína G.

4.3. ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS NATIVAS DO GRÃO DE SOJA NOS QUELATOS TREN-Ni(II) E IDA-Ni(II)

Os experimentos cromatográficos iniciais foram conduzidos com extrato proteico de soja isentos de fragmentos Fab, a fim de avaliar o perfil de adsorção das proteínas nativas de soja em

agarose-IDA-Ni(II) e agarose-TREN-Ni(II). Nesta etapa utilizaram-se os sistemas tamponantes (tampão de adsorção/tampão de eluição): fosfato de sódio 25 mmol/L/fosfato de sódio 25 mmol/L com 300 mol/L imidazol; fosfato de sódio 25 mmol/L/acetato de sódio 25 mmol/L; Mes 25 mmol/L/Mes 25 mmol/L com 300 mmol/L imidazol e Tris-HCl 50 mmol/L/Tris-HCl 700 mmol/L. Tais concentrações foram usadas baseando-se em experimentos realizados por PEREIRA (2009) em agarose-TREN sem metal, com exceção do tampão de adsorção Tris-HCl o qual utilizou concentração de 50 mmol/L, com o intuito de aumentar a seletividade, uma vez que o Tris age como um agente competidor pelo sítio de ligação da proteína em IMAC (SERPA et. al, 2005). Os valores de pH dos tampões de adsorção utilizados variaram entre 6,5 a 7,5, (fosfato de sódio a pH 7,5, Tris-HCl a pH 7,0 e Mes a pH 6,5) e os tampões de eluição tiveram o pH igual aos seus respectivos tampões de adsorção, com exceção do tampão acetato de sódio utilizado em pH 4,0. Estes valores de pH foram utilizados baseando-se em experimentos preliminares realizados por PEREIRA (2009). Com o intuito de se estudar o efeito da adição do sal na adsorção das proteínas do extrato de grãos de soja por IMAC, as cromatografias foram realizadas com e sem adição de 1,0 mol/L de NaCl nos tampões de adsorção e eluição. Os resultados obtidos para a adsorção de proteínas de extrato de grãos de soja não transgênicas nos adsorventes agarose-IDA-Ni(II) e agarose-TREN-Ni(II) estão apresentados nas Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6.

Os experimentos cromatográficos com extrato protéico de soja no sistema tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio não foram realizados para o adsorvente agarose-TREN-Ni(II) (tanto na ausência como na presença de sal), visto que há desprendimento do íon metálico em valores de pH abaixo de 5,0. O efeito do pH na capacidade de quelação do Ni(II) pelo agente quelante TREN foi estudado por SHARMA e AGARWAL (2002), tendo determinado que a capacidade de quelação do TREN diminui 6,8% em valores de pH abaixo de 6,0 e mais de 28% em valores de pH abaixo de 5,0, fato relacionado com a protonação dos quatro átomos de nitrogênio doadores de elétrons presentes no TREN.

Observa-se, para ambos adsorventes (Figuras 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6), maior retenção das proteínas do extrato de soja nos sistemas tamponantes na ausência de sal, sendo que para o quelato TREN-Ni(II), nas condições tamponantes Mes/imidazol, fosfato/imidazol e Tris-HCl/Tris, muitas proteínas da soja foram dessorvidas na etapa de regeneração do adsorvente com NaOH.

Sistemas tamponantes sem adição de NaCl

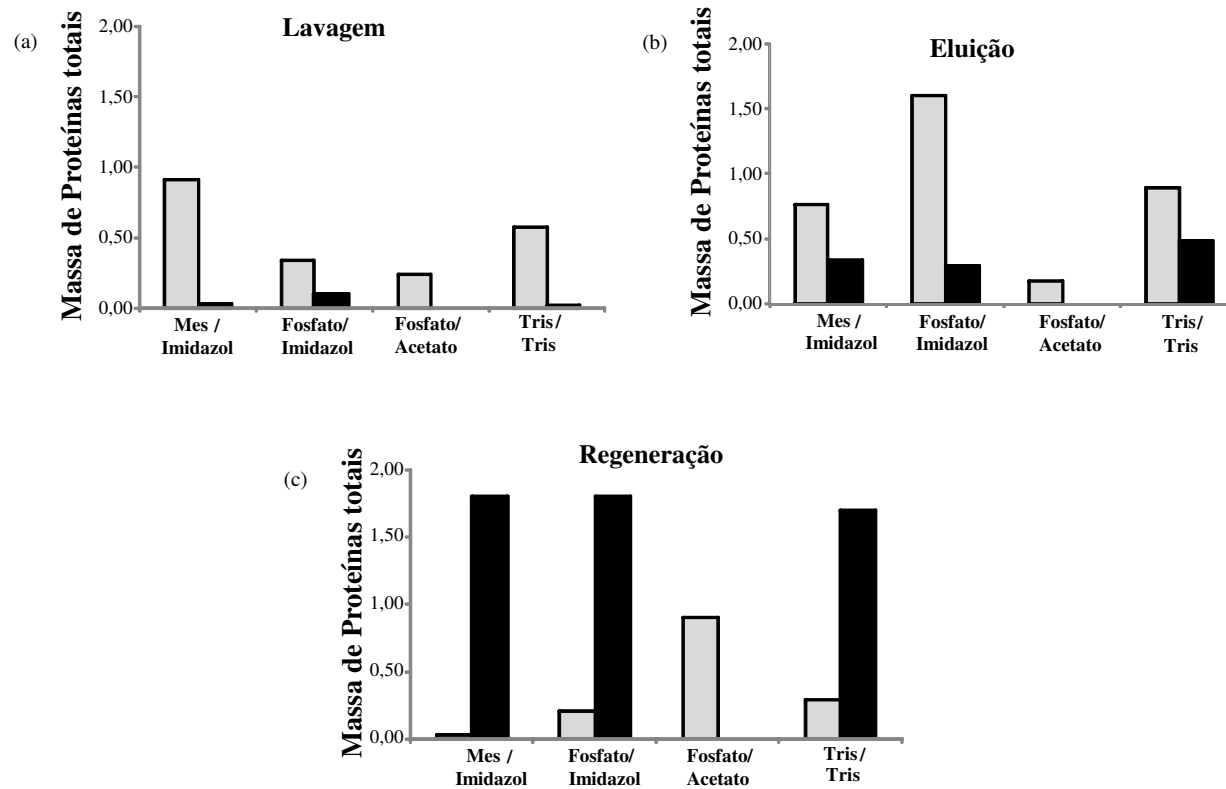


Figura 4.3. Adsorção de proteínas do extrato de grãos de soja em adsorventes IMAC tampão sem acréscimo de NaCl. Volume de leite igual a 3,0 mL. (■)IDA-Ni(II) (■)TREN-Ni(II). Massa total de proteína de soja (mg): (a) não retida em diferentes sistemas tamponantes; (b) obtida na etapa de eluição; (c) obtida na etapa de regeneração. Sistemas tamponantes: Adsorção Mes 25 mmol/L pH 6,5; Lavagem Mes 25 mmol/L pH 6,5 e eluição Mes 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 6,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição fosfato de sódio 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 7,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0. Adsorção: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; Lavagem Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; eluição com Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0.

Sistemas tamponantes com 1,0 mol/L de NaCl

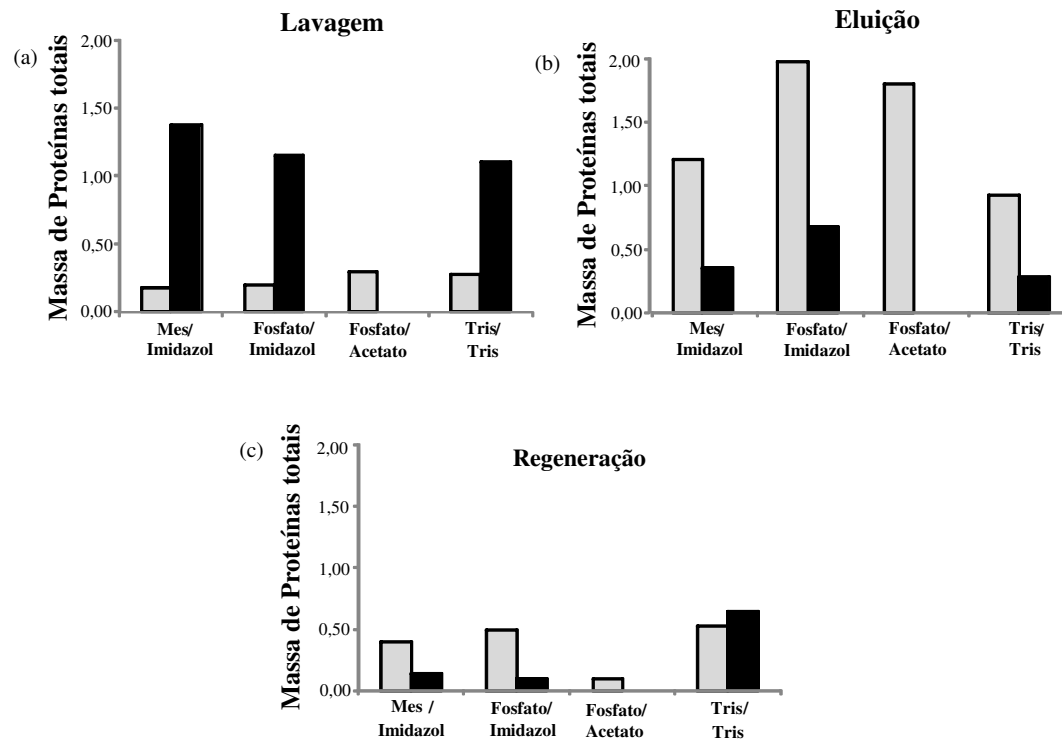


Figura 4.4. Adsorção de proteínas do extrato de grãos de soja em adsorventes IMAC tampão sem acréscimo de NaCl. Volume de leite igual a 3,0 mL. (■)IDA-Ni(II) (■)TREN-Ni(II). Massa total de proteína de soja (mg): (a) não retida em diferentes sistemas tamponantes; (b) obtida na etapa de eluição; (c) obtida na etapa de regeneração. Sistemas tamponantes: Adsorção Mes 25 mmol/L pH 6,5; Lavagem Mes 25 mmol/L pH 6,5 e eluição Mes 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 6,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição fosfato de sódio 25 mmol/L com 300 mmol/L de imidazol pH 7,5. Adsorção fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; Lavagem fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; eluição acetato de sódio 25 mmol/L pH 4,0. Adsorção: Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; Lavagem Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,0; eluição com Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0.

Experimento sem acréscimo de sal

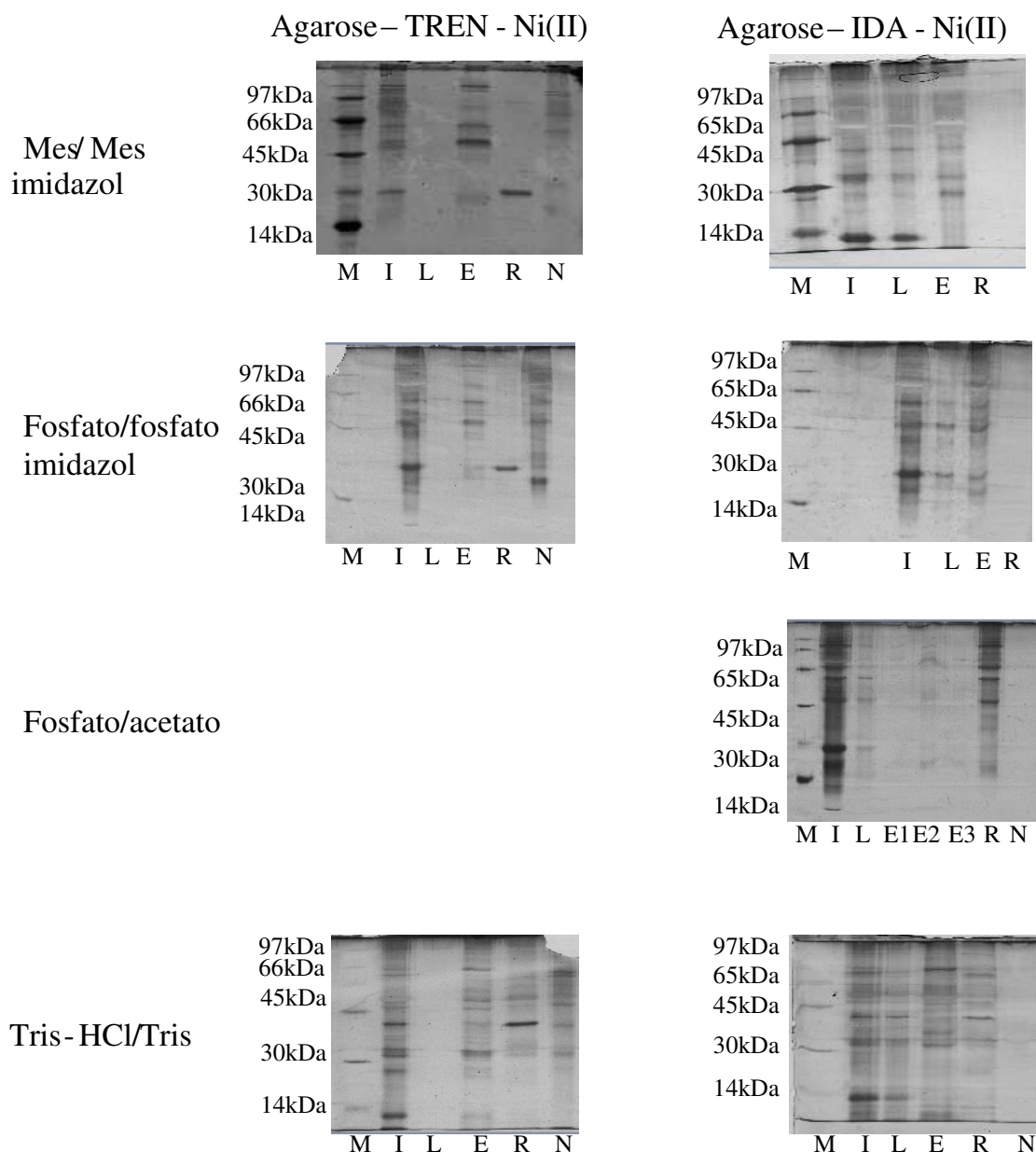


Figura 4.5. Perfis eletroforéticos (SDS-PAGE sob condições não redutoras, gel com concentração de 12%) das frações obtidas das cromatografias em gel de agarose-TREN-Ni(II) e agarose-IDA-Ni(II) para proteínas nativas de soja nos diferentes sistemas tamponantes na ausência de sal (NaCl) (M) Marcador de massa molecular; (I) Injeção (proteínas do extrato de soja); (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (E1) Eluição, fração 22; (E2) Eluição, fração 23; (E3) Eluição, fração 24; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH.

Experimentos com tampões acrescidos de sal

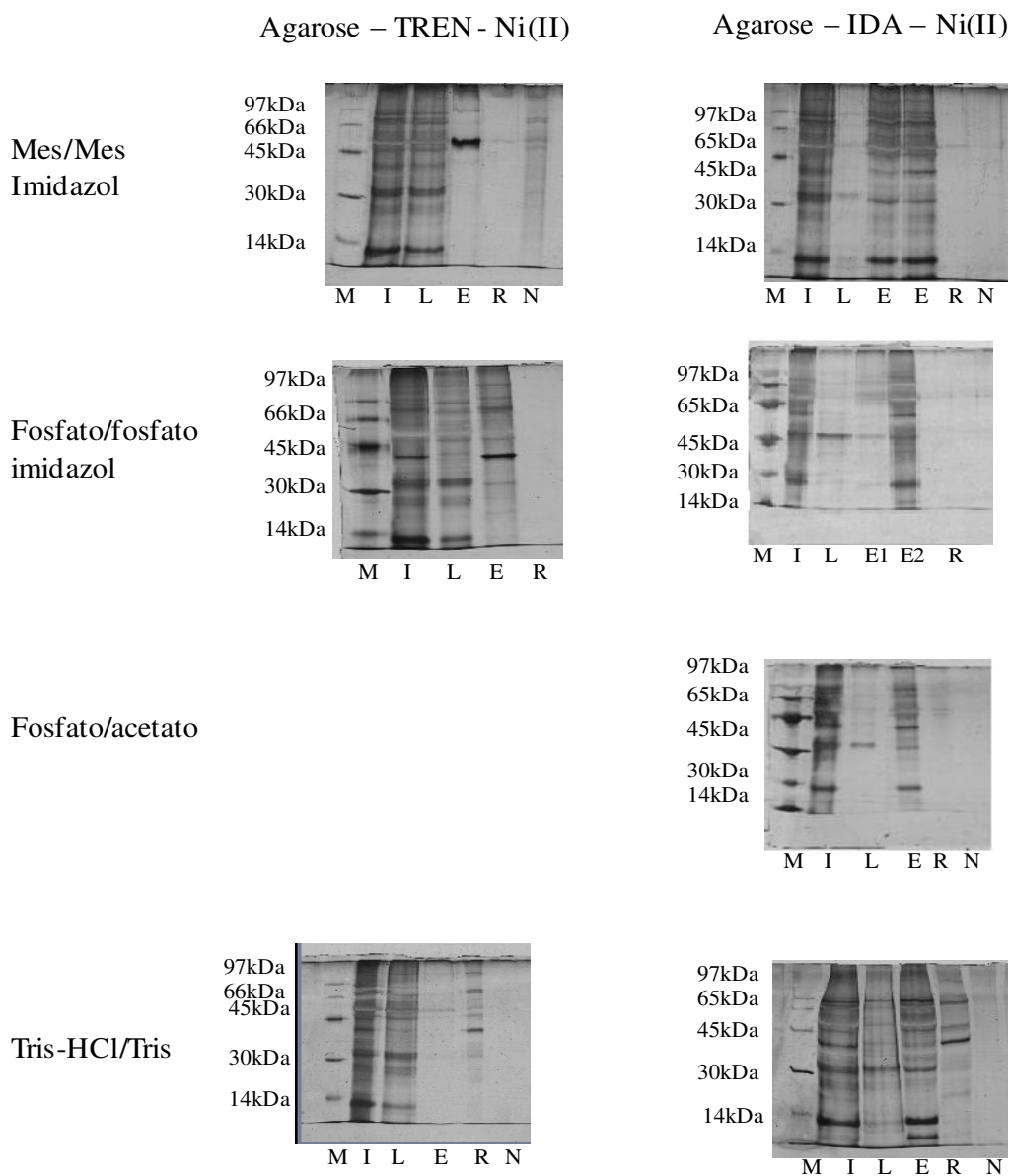


Figura 4.6. Perfis eletroforéticos (SDS-PAGE sob condições não redutoras, gel com concentração de 12%) das frações obtidas das cromatografias em gel de agarose-TREN-Ni(II) e agarose-IDA-Ni(II) para proteínas nativas de soja nos diferentes sistemas tamponantes com adição de sal (NaCl). (M) Marcador de massa molecular; (I) Injeção (proteínas do extrato de soja); (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (E1) *Pool* Eluição frações 13 a 15; (E2) *Pool* Eluição frações 16 a 18; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH.

Na ausência de sal, as interações eletrostáticas são predominantes em relação às ligações de coordenação, promovendo forte retenção das proteínas no quelato imobilizado. Este comportamento poder ser justificado, pois a maioria das proteínas da soja apresenta valores de pI inferiores a 6,1 (ALLAN e SIDNEY, 1972) e nos valores de pH estudados, as proteínas da soja encontram-se carregadas negativamente, enquanto que o ligante TREN (ponto de carga nula em torno de 10,5, de acordo com informações do fabricante) encontra-se carregado positivamente (PEREIRA, 2009).

Na ausência de sal no tampão de adsorção, a retenção das proteínas da soja no quelato TREN-Ni(II) (TREN, tetradentado) foi maior que em IDA-Ni(II) (IDA, tridentado), diferenciando dos resultados obtidos por PORATH e OLIN (1983). Estes autores observaram que a capacidade de adsorção de proteínas em complexos Me(II)-quelante seguiam a seguinte ordem (com o sal NaCl presente no tampão de adsorção):

$\text{Me(II)-IDA}^3 > \text{Me(II)-NTA}^4 > \text{Me(II)-CM-Asp}^4 > \text{Me(II)-TREN}^4 > \text{Me(II)-TED}^5$ (Os sobrescritos referem-se à polidentação dos agentes quelantes: tridentado (3), tetradentado (4) e pentadentado (5)) (SHARMA e AGARWAL, 2002).

As fases móveis que não promoveram a adsorção das proteínas presentes no extrato de soja foram excluídos dos estudos com o *spiking* de fragmentos Fab. Selecionou-se, portanto, as condições em que a maioria das proteínas nativas do extrato de soja foram adsorvidas (maioria das proteínas obtidas nas etapas de eluição ou regeneração do adsorvente). Essas condições foram selecionadas pois visa-se, a seguir explorar a purificação dos fragmentos Fab por cromatografia negativa (para uma purificação ideal, os fragmentos Fab devem ser obtidos na etapa de lavagem).

Baseando no exposto acima, selecionou-se os seguintes adsorventes e as condições tamponantes dos experimentos realizados sem e com acréscimo de sal no sistema tamponante:

a) Adsorvente agarose-TREN-Ni(II) – sistema tamponante Mes/imidazol sem adição de NaCl. Selecionou-se esta condição por apresentar baixa quantidade de proteínas de soja na etapa de eluição, possibilitando explorar esta condição na tentativa de se obter uma separação dos fragmentos Fab através de uma cromatografia negativa (1,3% das proteínas do extrato de soja

foram obtidas na etapa de lavagem, 15,2% na etapa de eluição e 83,2% nas etapas de regeneração);

b) Adsorvente agarose-TREN-Ni(II) – sistema tamponante Tris-HCl sem adição de NaCl. Selecionou-se esta condição por apresentar baixa quantidade de proteínas de soja na etapa de lavagem, possibilitando explorar esta condição na tentativa de se obter uma separação dos fragmentos Fab através de uma cromatografia negativa (0,9% das proteínas do extrato de soja foram obtidas na etapa de lavagem, 23,9% na etapa de eluição e 84,2% nas etapas de regeneração);

c) Adsorvente agarose-IDA-Ni(II) – sistema tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl. Selecionou-se esta condição por se tratar da condição que utilizou agente quelante IDA e apresentou menor quantidade de proteínas de soja na etapa de lavagem, podendo assim ser explorada na separação dos fragmentos Fab através de uma cromatografia negativa (9,2% proteínas de soja foram obtidas na etapa de lavagem, 80% na etapa de eluição, 0,8% nas etapas de regeneração).

Os sistema tamponantes Mes/imidazol sem adição de NaCl e Tris-HCl sem adição de NaCl foram selecionadas por se tratar dos melhores resultados obtidos com o agente quelante TREN-Ni(II), pois observou-se excelente retenção das proteínas da soja. Já o quelato IDA-Ni(II) em sistema tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl, mesmo apresentando cerca de 9% das proteínas da soja na etapa de lavagem foi selecionado por ser o melhor resultado obtido com o agente quelante IDA.

4.4. EXPERIMENTOS CROMATOGRÁFICOS COM FRAGMENTOS Fab

Selecionadas as condições tamponantes, foram realizados experimentos com o intuito de verificar o perfil de adsorção dos fragmentos Fab humano nos adsorventes IMAC estudados. A alimentação das colunas cromatográficas foi realizada com solução de fragmento Fab humano purificado (purificado sequencialmente em colunas contendo os adsorventes agarose-proteína G e agarose-proteína L, item 3.2.5 do capítulo Materiais e Métodos) (Figura 4.7. e Tabela 4.1).

Com base nos resultados apresentados na Figura 4.7 e Tabela 4.1, tem-se, para o adsorvente agarose-TREN-Ni(II), que os fragmentos foram parcialmente retidos nos sistemas tamponantes Mes/imidazol e Tris-HCl/Tris-HCl na ausência de sal (81,3% e 59,5 dos fragmentos foram obtidos nas etapas de lavagem para o sistema tamponante Mes/imidazol e Tris-HCl/Tris-HCl, respectivamente). Este perfil cromatográfico pode ser explorado para se obter uma separação dos fragmentos Fab através de uma cromatografia negativa, quando adicionamos os fragmentos ao extrato proteico dos grãos de soja.

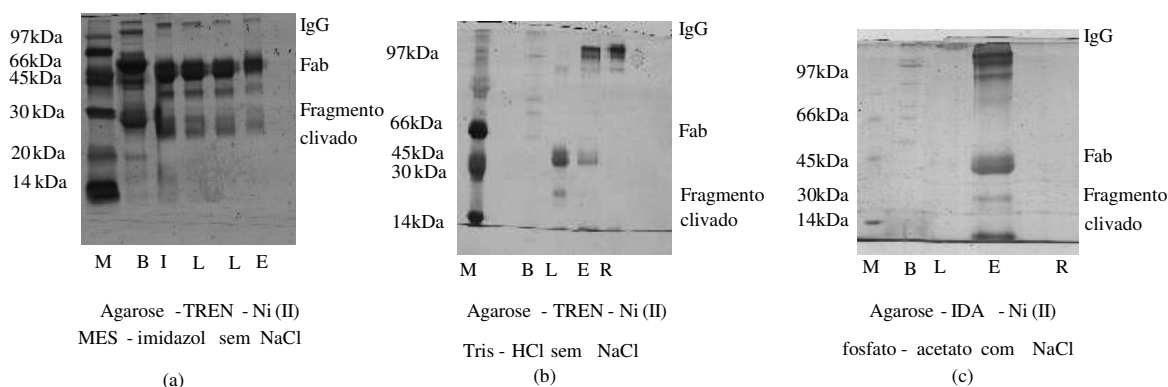


Figura 4.7. SDS-PAGE sob condições não redutoras obtido das frações cromatográficas com alimentação de fragmentos Fab humanos: dos adsorventes e sistemas tamponantes selecionados. SDS-PAGE sob condições não redutoras (a) gel com concentração de 12%, (b) e (c) gel com concentração de 10%. Revelação com nitrato de prata. (M) Marcador de baixa massa molecular; (B) Marcador de IgG com β -mercaptoetanol; (I) Amostra da injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição (R) *Pool* das frações de regeneração.

O adsorvente agarose-IDA-Ni(II) (condição tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio com sal) apresentou elevada retenção de fragmentos (91% dos fragmentos Fab foram retidos pelo gel), contrariamente ao esperado. Por meio de estudos de modelagem molecular e cálculos computacionais, TODOROVA-BALVAY e colaboradores (2004) demonstraram que o quelato IDA-Ni(II), na presença de NaCl no tampão de adsorção, interage com IgG humana intacta devido a presença de resíduos de histidina nas posições 433-x-435 presentes no domínio CH₃ da cadeia pesada.

Tabela 4.1 Balanço de massa das cromatografias realizadas com fragmentos Fab nos adsorventes IMAC estudados.

Frações cromatográficas	TREN-Ni (II) MES-imidazol sem sal		TREN-Ni(II) Tris-HCl sem sal		IDA-Ni(II) Fosfato - acetato com sal	
	PT (mg)	PT (%)	PT (mg)	PT (%)	PT (mg)	PT (%)
Injeção	3,71	100,0	1,21	100,0	1,00	100,0
Lavagem	3,01	81,3	0,72	59,5	0,08	8,0
Eluição	0,58	15,7	0,28	23,4	0,91	91,0
Regeneração	0,06	1,5	0,11	9,3	0,00	0,0
PT adsorvidas	0,64	17,3	0,39	32,2	0,91	91,0
Recuperação	3,65	98,4	1,11	91,7	0,99	99,0

PT: proteínas totais (dosagem pelo método de BRADFORD, 1976).

Estes resíduos permanecem acessíveis nos fragmentos Fc após a clivagem de IgG humana em fragmentos Fc e Fab. No entanto, apesar do fragmento Fab conter resíduos de histidina com menor acessibilidade, neste trabalho verificou-se experimentalmente que este fragmento interagiu com o quelato IDA-Ni(II). A retenção possivelmente se deve ao fato do fragmento Fc não estar presente na solução, não havendo competição entre os dois fragmentos pelo sítio de adsorção do quelato, propiciando, dessa forma, a adsorção do fragmento Fab.

Para uma melhor compreensão do comportamento da adsorção do fragmento Fab humano nos adsorventes estudados, foi realizado por SILVA (2013) a determinação dos pontos isoelétricos dos fragmentos Fab e Fc por eletroforese de focalização isoelétrica.

Segundo SILVA (2013), o fragmento Fab humano estudado apresentou pontos isoelétricos na faixa de 8,65 a 9,3. Na faixa de valores de pH estudados (pH 6,5-7,5), o fragmento Fab e o quelato TREN-Ni(II) encontram-se com carga líquida positiva. Na ausência de sal no tampão de adsorção, as interações eletrostáticas são predominantes, ocorrendo também, em menor proporção, as ligações de coordenação, o que pode explicar a retenção parcial desse fragmento nessa condição. Na presença de sal as ligações de coordenação são predominantes e a adsorção do fragmento Fab no quelato IDA-Ni(II) ocorreu, possivelmente, devido a presença de resíduos de histidina acessíveis na superfície desta proteína.

Conforme discutido, os fragmentos Fab foram retidos em IDA-Ni(II) (Figura 4.7.c), bem como as proteínas da soja (Figura 4.4 e 4.6, tampão fosfato de sódio/acetato de sódio). Como as proteínas nativas do extrato proteico de soja e os fragmentos Fab adsorvem no quelato IDA-Ni(II), a purificação do fragmento somente será possível por cromatografia tradicional, na etapa de eluição.

4.5. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab ADICIONADO ARTIFICIALMENTE A EXTRATO PROTEICO DE SOJA

4.5.1. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab POR CROMATOGRAFIA NEGATIVA EM AGAROSE-TREN-Ni(II)

Tendo-se o conhecimento do perfil cromatográfico das proteínas do extrato proteico de grãos de soja (apresentado nas Figuras 4.4, a 4.6) e dos fragmentos Fab (apresentado na Figura 4.7) no adsorvente agarose-TREN-Ni(II), foram realizados ensaios cromatográficos (nas condições tamponantes previamente selecionadas nos estudos anteriores) para a purificação de fragmentos Fab adicionados artificialmente em extrato proteico de grãos de soja por cromatografia negativa.

Os resultados das cromatografias, eletroforeses e *Western blots* estão apresentados nas Figuras 4.8 a 4.11 e os balanços de massa dessas cromatografias nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Nas condições tamponantes utilizadas (Mes pH 6,5 e Tris-HCl pH 7,0), tanto a matriz como o fragmento Fab (ponto isoelétrico na faixa de 8,65 a 9,30) se encontram carregados positivamente, ocorrendo a repulsão entre os fragmentos Fab e a matriz cromatográfica, favorecendo a obtenção do fragmento Fab na etapa de lavagem (eletroforeses das Figuras 4.8 e 4.10 e *Western blots* das Figuras 4.9 e 4.11). As Tabelas 4.2 e 4.3 também confirmam esta hipótese, pois 79% e 84,1% dos fragmentos Fab foram obtidos na etapa de lavagem para os tampões Mes e Tris-HCl, respectivamente.

Quanto à pureza e o fator de purificação (Tabelas 4.2 e 4.3), obteve-se a pureza de 67,7% e 111,0% e o fator de purificação (valor de pureza obtido/valor de pureza da injeção) de 1,3 e 1,9 na etapa de lavagem para os tampões Mes e Tris-HCl, respectivamente. Quanto ao tampão Mes

pH 6,5, PEREIRA (2009) obteve melhor resultado com o adsorvente agarose-TREN-Ni(II) nesta condição ao purificar IgG humana intacta adicionada artificialmente ao extrato proteico de soja, obtendo IgG com 108% de pureza na etapa de lavagem.

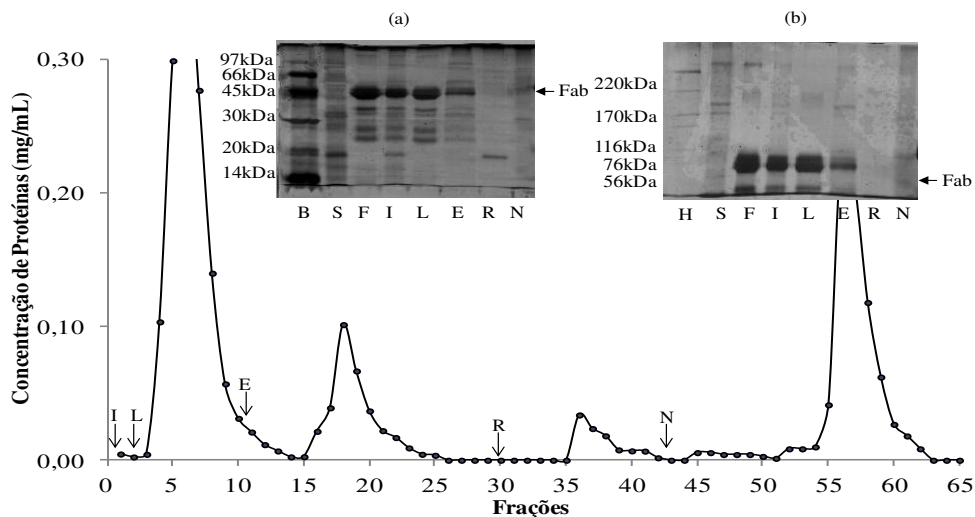


Figura 4.8. Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas da solução de extrato protéico de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II) sem adição de NaCl. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. I - injeção: 2,5 mL contendo 0,82 mg/mL de extrato protéico de soja e 0,86 mg/mL de Fab em Mes 25 mmol/L pH 6,5, L - lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5; E – eluição: Mes 25 mmol/L imidazol 300 mmol/L pH 6,5; R - regeneração: EDTA 50 mmol/L; N - regeneração com NaOH 20 mmol/L. Eletroforese SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%. (S) Proteínas da soja; (F) Fragmento Fab; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH 20 mmol/L; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976); BSA como proteína de referência.



Figura 4.9. *Western blot* com as frações coletadas da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução proteica de soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante Mes/imidazol. S - Proteínas da soja; F - Fragmentos Fab; I - Injeção; L – *Pool* das frações de lavagem; E - *Pool* das frações de eluição; R - *Pool* das frações de regeneração com EDTA; N - *Pool* das frações de regeneração com NaOH; M - marcador de massa molecular.

Tabela 4.2 Balanço de massa de proteínas totais e fragmentos Fab da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução proteica de soja com *spiking* de fragmentos Fab no sistema tamponante Mes/imidazol sem acréscimo de NaCl. Lavagem – *Pool* das amostras 4 a 10; Eluição - fração 19; Regeneração EDTA - fração 36.

Etapas	PT ^a (mg)	PT (%)	Fab ^b (mg)	Fab (%)	Pureza ^c (%)	FP ^d
Amostra inicial	4,20 ± 0,16	100,0	2,15 ± 0,00	100,0	51,2	1,0
Lavagem	2,51 ± 0,06	59,8	1,70 ± 0,10	79,0	67,7	1,3
Eluição	0,43 ± 0,01	10,2	0,00 ± 0,00	-	0,0	0,0
Regeneração EDTA	0,26 ± 0,01	6,2	0,00 ± 0,00	-	0,0	0,0
Regeneração NaOH	-	-	-	-	-	-
Recuperação	3,20 ± 0,04	76,2	1,70 ± 0,10	79,0	-	-

^aProteínas totais: massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (Bradford,1976), proteína de referência IgG

^bFab medido por imunodifusão radial

^cPureza: massa de fragmento dividida pela massa de proteína total da etapa multiplicada por 100.

^dFator de purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Quantidade de Ni (II) quelatado TREN: 47,65 µmol de Ni(II)/g seca de gel.

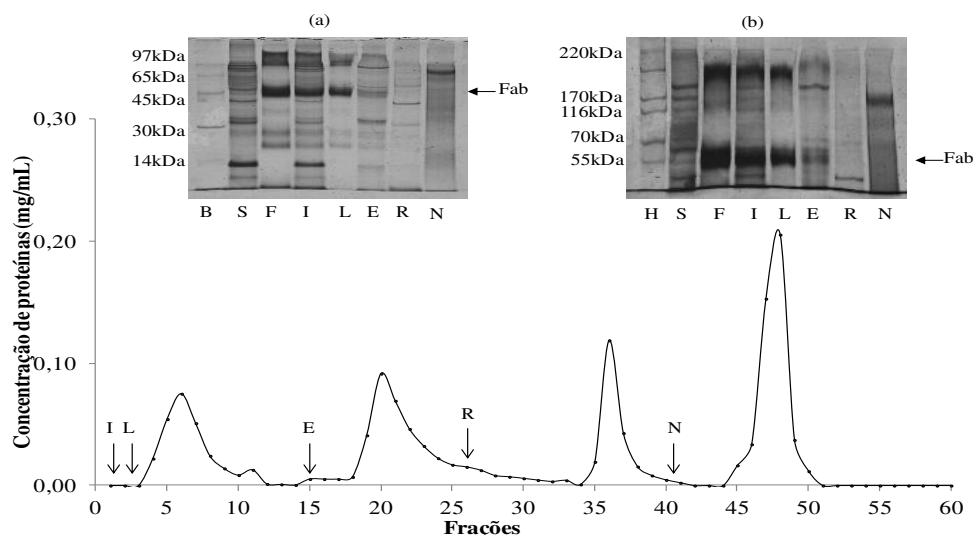


Figura 4.10. Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas da solução de proteína de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II) sem adição de NaCl. Volume do leite: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. I - Injeção: 2,00 mL contendo 0,50 mg/mL de soja e 0,66 mg/mL de fragmento Fab em Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0, L – lavagem Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0; E – eluição Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0; R- regeneração com EDTA 50 mmol/L; N – regeneração com NaOH 20 mmol/L. Eletroforese SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5% (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976); BSA como proteína de referência.

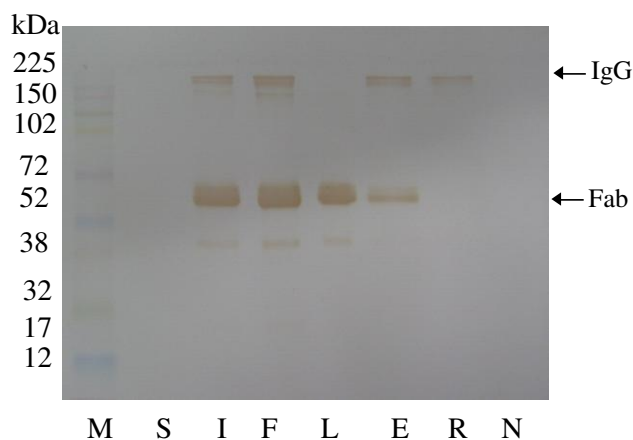


Figura 4.11. Western blot com as frações coletadas da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução de proteína da soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante Tris-HCl sem adição de NaCl. (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (F) fragmentos Fab; (L) Lavagem; (E) Eluição; (R) Regeneração com EDTA; (N) Regeneração com NaOH; (M) marcador de massa molecular.

Tabela 4.3 Balanço de massa de proteínas totais e fragmento Fab da cromatografia em agarose-TREN-Ni(II) realizada com solução de proteína da soja com *spiking* de fragmentos Fab com sistema tamponante Tris-HCl sem adição de NaCl. Lavagem – *Pool* das amostras 4 a 7; Eluição - *Pool* das amostras 18 a 21; Regeneração - fração 38.

Etapas	PT ^a (mg)	PT (%)	Fab ^b (mg)	Fab (%)	Pureza ^c (%)	FP ^d
Amostra inicial	2,32 ± 0,05	100,0	1,32 ± 0,05	100,0	56,9	1,0
Lavagem	1,00 ± 0,01	43,1	1,11 ± 0,10	84,1	111,0	1,9
Eluição	0,65 ± 0,01	28,0	0,22 ± 0,07	16,7	33,8	0,6
Regeneração EDTA	0,46 ± 0,00	19,8	0,00 ± 0,00	-	0,0	0,0
Regeneração NaOH	-	-	-	-	-	-
Recuperação	2,11 ± 0,02	90,9	1,33 ± 0,15	100,8	-	-

^aProteínas totais: massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (Bradford,1976), proteína de referência IgG.

^bFab: massa determinada por imunodifusão radial.

^cPureza: massa de fragmento dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100.

^dFator de purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Quantidade de Ni (II) quelatado ao TREN: 47,65 µmol de Ni(II)/g seca de gel.

Como pode-se observar, foi obtido valores de pureza acima de 100% (108% de pureza na purificação de IgG presente em soja por IMAC). A obtenção de valores acima de 100% é comum quando se utiliza métodos distintos de quantificação. Neste trabalho utilizou-se para a quantificação de fragmentos Fab a técnica de imunodifusão radial e a técnica de Bradford para a quantificação das proteínas totais (IgG como proteína de referência). Como a imunodifusão radial se trata de uma técnica de afinidade entre o fragmento Fab e o anticorpo anti-Fab, a imunodifusão radial é capaz de detectar com maior precisão os fragmentos. Por outro lado, a técnica de Bradford, utiliza a interação entre cadeias proteicas e um corante, apresentando maior interação por cadeias proteicas de maior massa molecular.

Obteve-se maior grau de pureza no experimento realizado com tampão Tris-HCl (110%) que com o tampão Mes (67,7%), possivelmente porque a maioria das proteínas da soja apresenta carga negativa (pI inferiores a 6,1), sendo a adsorção destas favorecida a pH 7,0 (observa-se na eletroforese da Figura 4.10 a presença das proteínas de soja nas etapas de eluição, regeneração com EDTA e regeneração com NaOH). No caso do tampão Mes a pH 6,5, a interação eletrostática é menor, fazendo com que algumas proteínas da soja não sejam adsorvidas na fase

estacionária, obtendo-se proteínas da soja juntamente com os fragmentos Fab na etapa de lavagem.

Diferentemente do observado no *Western blot* (Figura 4.9) e no gel de SDS-PAGE (bandas referentes ao fragmento Fab na etapa de eluição, Figura 4.8), na imunodifusão o alo de fragmentos Fab referente a etapa de eluição do experimento realizado com tampão Mes não foi visualizado. O pH do tampão abaixo de 7,0 (eluição com Mes a pH 6,5 contendo 300 mmol/L de imidazol) e a contaminação da fração eluída com proteínas do extrato proteico de soja provavelmente tenham sido as causas da não complexação do antígeno (fragmento Fab) com o anticorpo (anti-IgG Fab específico) na imunodifusão radial.

4.5.2. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab POR CROMATOGRAFIA TRADICIONAL EM AGAROSE-IDA-Ni (II)

Para o adsorvente agarose-IDA-Ni(II), foi observado a adsorção das proteínas nativas do extrato de soja, bem como de fragmentos Fab. Para separar os fragmentos Fab das proteínas da soja, optou-se pela realização de um gradiente de eluição linear de pH, com a finalidade de se obter um perfil detalhado do comportamento da eluição das proteínas da soja e dos fragmentos Fab. O gradiente linear é largamente empregado em experimentos preliminares em que não se conhece o perfil de eluição de uma dada biomolécula para, posteriormente, se utilizar gradiente degrau, mais reprodutível e geralmente utilizado em processos de purificação em larga escala (WINZERLING *et al.* 1992). A Figura 4.12 e a Tabela 4.4 apresentam, respectivamente, os perfis cromatográfico e eletroforético e o balanço de massa do experimento realizado com gradiente linear de pH na eluição, utilizando-se como alimentação o extrato proteico de soja com adição dos fragmentos Fab (*spiking*) em tampão fosfato de sódio pH 7,5 com 1,0 mol/L de NaCl. Na Figura 4.12 a e b (coluna 5 das eletroforeses), observa-se a separação dos fragmentos Fab das proteínas de soja em tampão acetato de sódio com 1,0 mol/L NaCl na faixa de valores de pH entre 5,5 e 6,0. Para confirmar essa observação, foi realizado um experimento alimentando-se a coluna cromatográfica com uma solução contendo somente fragmentos Fab (Figura 4.13) e a

eluição foi realizada com tampão acetato de sódio pH 5,8 contendo 1,0 mol/L de NaCl (Figura 4.13 e Tabela 4.5).

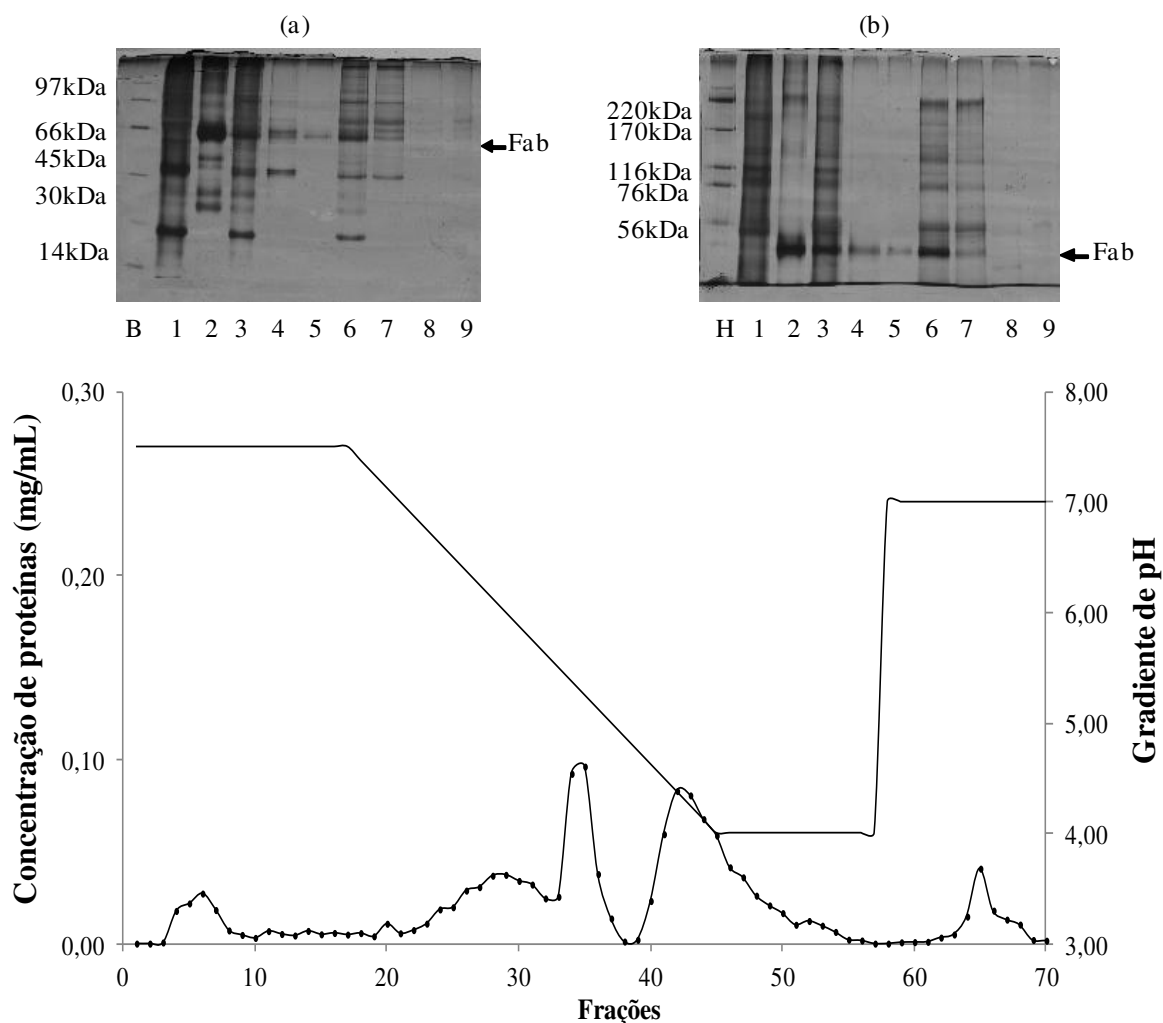


Figura 4.12. Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas da soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leite: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (1,0 mg de soja e 0,44 mg de Fab), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L, pH 7,5; (E) Eluição em gradiente de pH com fosfato de sódio 25 mmol/L de pH 7,5 a 6,0 e acetato de sódio 25 mmol/L, 1,0 mol/L NaCl, de pH 6,0 a 4,0; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0; Eletroforeses SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%. (1) Proteínas da soja; (2) fragmentos Fab; (3) Injeção; (4) Lavagem; (5) Eluição, fração 28; (6) Eluição, fração 34; (7) Eluição, fração 42; (8) Regeneração com EDTA, fração 64; (9) Regeneração com EDTA, fração 65; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976), BSA como proteína de referência.

Tabela 4.4 Balanço de massa em termos de proteínas totais da cromatografia realizada com extrato proteico de soja e *spiking* de fragmentos Fab em coluna agarose-IDA-Ni(II)

Frações cromatográficas	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,58	100,0
Lavagem	0,15	9,2
Eluição (Frações 19 a 57)	1,13	71,1
• 24 – 30	0,22	13,9
• 33 – 36	0,24	15,2
• 41 – 46	0,37	23,3
Regeneração EDTA fração 64	0,11	7,0
Recuperação	2,22	140,5
Proteínas totais adsorvidas (mg)	1,24	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,41	-

^aProteína total: massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976), BSA como proteína de referência.

^bMassa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo. Quantidade de Ni (II) quelatado ao IDA: 65,34 μ mol de Ni(II)/g de massa seca de gel.

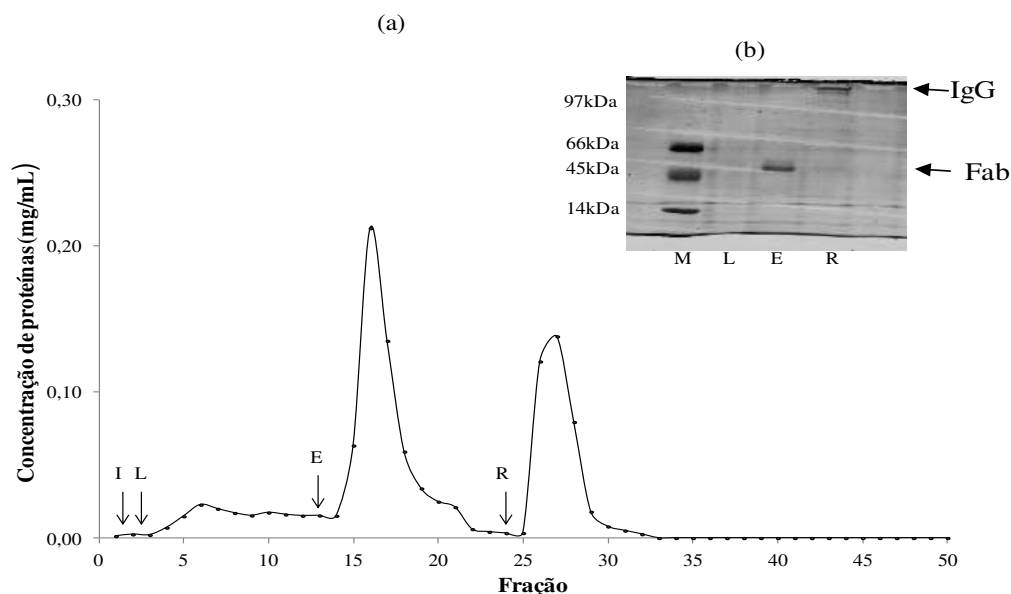


Figura 4.13. (a) Perfil cromatográfico e (b) eletroforético das frações cromatográficas dos fragmentos Fab de alta pureza em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leite: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (0,58 mg de Fab/mL), (L) lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 7,5; (E) Eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1,0 mol/L pH 5,8; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0. (b) Eletroforese SDS-PAGE gel a 10%. (L) Lavagem; (E) Eluição; (R) Regeneração: EDTA; (M) marcador de baixa massa molecular. Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976); BSA como proteína de referência.

Tabela 4.5 Balanço de massa em termos de proteínas totais da cromatografia realizada com fragmentos Fab em coluna agarose-IDA-Ni(II)

Frações cromatográficas	PT ^a (mg)	% ^b
Injeção	1,16	100,0
Lavagem	0,15	13,1
Eluição	0,59	50,9
Regeneração EDTA	0,38	32,7
Recuperação	1,12	96,6
Proteínas totais adsorvidas (mg)	0,97	-
Proteínas totais adsorvidas (mg/mL)	0,32	-

^aProteína total: massa calculada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976), BSA como proteína de referência.

^bMassa de proteína em cada etapa dividida pela massa de proteína inicial no processo. Quantidade de Ni (II) quelatado ao IDA: 68,5 μ mol de Ni(II)/g seca de gel.

O resultado do experimento apresentado na Figura 4.13 confirmou os resultados obtidos nos experimentos realizados com *spiking* de fragmentos Fab em extrato proteico de soja (Figura 4.12), uma vez que o fragmento Fab foi eluído a pH 5,8. Este valor de pH encontra-se no intervalo de pH em que se obteve o fragmento Fab separado das proteínas da soja durante a eluição por gradiente linear de pH (Figura 4.12). Observa-se também na eletroforese da Figura 4.12, que os fragmentos Fab e a IgG intacta foram obtidos em etapas distintas da cromatografia, ou seja, Fab na etapa de eluição e IgG na etapa de regeneração. Este resultado foi confirmado pelo *Western Blot* apresentado na Figura 4.14, sendo detectado também a presença de uma banda tênue de fragmentos Fab na etapa de regeneração, juntamente com IgG (*Western blot* apresenta maior sensibilidade que SDS-PAGE). Conclui-se que o adsorvente agarose-IDA-Ni(II) apresenta potencial para ser utilizado como adsorvente suplementar àqueles utilizados para purificação de fragmentos Fab, pois muitos adsorventes tradicionalmente empregados são pouco eficientes para separação da IgG intacta (muitas vezes presente nesta mistura) do fragmento Fab (COLEMAN e MAHLER, 2003)

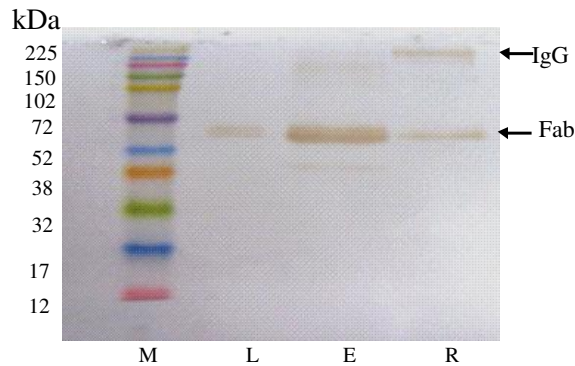


Figura 4.14. *Western blot* das frações coletadas da cromatografia com fragmentos Fab de alta pureza realizada em agarose-IDA-Ni(II) no sistema tamponante fosfato-acetato de sódio (referente a cromatografia apresentada na Figura 4.13). L – *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração com EDTA; (M) marcador de massa molecular.

Uma vez determinado o pH de eluição do fragmento Fab, realizou-se uma cromatografia com 2,0 mL de extrato proteico de soja com *spiking* de fragmento Fab em tampão fosfato de sódio pH 7,5 contendo 1,0 mol/L de NaCl e eluição em gradiente degrau com tampão acetato de sódio pH 5,8 contendo 1,0 mol/L de NaCl (Figuras 4.15 e 4.16 e Tabela 4.6).

Nas Figuras 4.15 e 4.16 observa-se a presença do fragmento Fab na etapa de eluição com pH 5,8, como também observado na Figura 4.12, Contudo, o perfil cromatográfico obtido na Figura 4.14 difere da Figura 4.12 por apresentar picos com maior resolução. Esta característica é comumente observada em processos cromatográficos que utilizam da cromatografia de degrau, visto que as proteínas que antes eram eluidas em diferentes pH no gradiente linear são eluidas na mesma etapa no gradiente degrau.

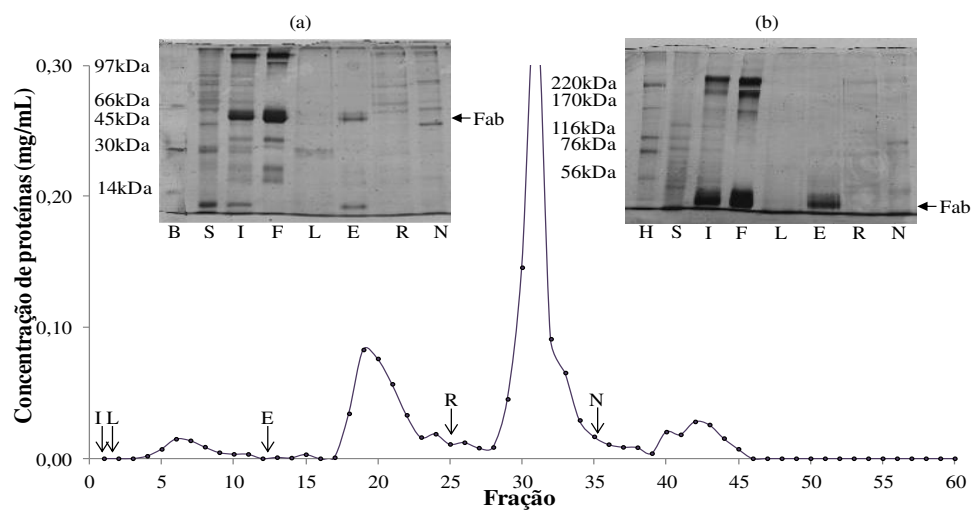


Figura 4.15. Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas solução de proteína de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) realizado em degrau. Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL contendo 0,49 mg de soja e 0,42 mg de fragmento Fab em fosfato de sódio 25 mmol/L, pH 7,5 contendo 1,0 mol/L de NaCl, L - lavagem fosfato de sódio pH 7,5 contendo 1,0 mol/L de NaCl; E – eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, pH 5,8 contendo 1,0 mol/L de NaCl; R – regeneração: EDTA 50 mmol/L; N - regeneração com NaOH 20 mmol/L. Eletroforese SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular; Proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976), BSA como proteína de referência.

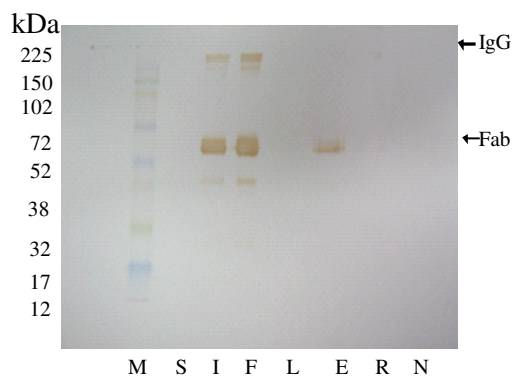


Figura 4.16. *Western blot* das frações coletadas da cromatografia em agarose-IDA-Ni(II) realizada com solução de proteína da soja com *spiking* de fragmentos Fab em sistema tamponante fosfato de sódio/acetato de sódio; (S) Proteínas da soja; (I) Injeção; (F) fragmentos Fab; (L) Lavagem; (E) Eluição; (R) Regeneração com EDTA; (N) Regeneração com NaOH; (M) marcador de alta massa molecular.

Tabela 4.6. Balanço de massa do experimento em agarose-IDA-Ni(II) em tampão fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl. Lavagem – Fração 7; Eluição - *Pool* das amostras 19 a 21; Regeneração - *Pool* das amostras 30 a 32.

Etapas	PT ^a (mg)	PT (%)	Fab ^b (mg)	Fab (%)	Pureza ^c (%)	FP ^d
Amostra inicial	1,80 ± 0,05	100,0	0,83 ± 0,00	100,0	46,1	1,0
Lavagem	0,27 ± 0,00	15,0	0,00 ± 0,00	0,0	0,0	0,0
Eluição	0,74 ± 0,02	41,1	0,73 ± 0,06	87,9	97,3	2,1
Regeneração EDTA	0,74 ± 0,01	41,1	0,17 ± 0,05	20,5	7,2	0,2
Regeneração NaOH	-	-	-	-	-	-
Recuperação	1,75 ± 0,02	97,2	1,73 ± 0,11	108,3	-	-

^aProteínas totais: massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD,1976), IgG como proteína de referência.

^bFab: massa determinada por imunodifusão radial.

^cPureza: massa de fragmento dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100.

^dFator de purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Quantidade de Ni(II) quelatado ao IDA: 68,5 µmol de Ni(II)/g seca de gel.

Diferentemente da purificação dos fragmentos Fab por cromatografia negativa em agarose-TREN-Ni(II) (Figuras 4.8 e 4.10), na purificação realizada por cromatografia tradicional em agarose-IDA-Ni(II) (Figura 4.15), foi acrescido sal (NaCl) nos sistemas tamponantes de adsorção e eluição. Os fragmentos Fab foram adsorvidos na fase estacionária devido a presença de NaCl, que favorece as ligações de coordenação, desfavorecendo as interações eletrostáticas. Por cromatografia tradicional, obteve-se fragmentos Fab com 97,3% de pureza na etapa de eluição a pH 5,8 e um fator de purificação de 2,1 (Tabela 4.6).

4.6. PONTO DE RUPTURA E CAPACIDADE DINÂMICA DOS ADSORVENTES AGAROSE-TREN-Ni(II) E AGAROSE-IDA-Ni(II)

Para determinação do ponto de ruptura e da capacidade dinâmica dos adsorventes agarose-TREN-Ni(II) e agarose-IDA-Ni(II), foram selecionados os sistemas tamponantes Tris-HCl/Tris-HCl sem adição de NaCl (cromatografia negativa) e fosfato de sódio/acetato de sódio acrescido de NaCl (cromatografia tradicional), respectivamente. O intuito desses experimentos foi de analisar a capacidade dinâmica de adsorção em diferentes condições, sendo para IDA-Ni(II), na condição em que predominam as ligações de coordenação (fragmento Fab adsorvido) e para TREN-Ni(II), na condição em que predominam as interações eletrostáticas (fragmento Fab

obtido nas frações não retidas). Para o adsorvente TREN-Ni(II), selecionou-se o tampão Tris-HCl sem NaCl por este ter proporcionado maior grau de pureza do fragmento Fab que o tampão Mes (Tabelas 4.2 e 4.3).

Alimentou-se as colunas com extrato proteico de soja com *spiking* de fragmento Fab, e as frações das etapas de *flowthrough*, lavagem, eluição e regeneração foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE e *Western blot*. Os experimentos realizados em agarose-TREN-Ni(II) são apresentados nas Figuras de 4.17 a 4.20. O balanço de massa da cromatografia está apresentado na Tabela 4.7.

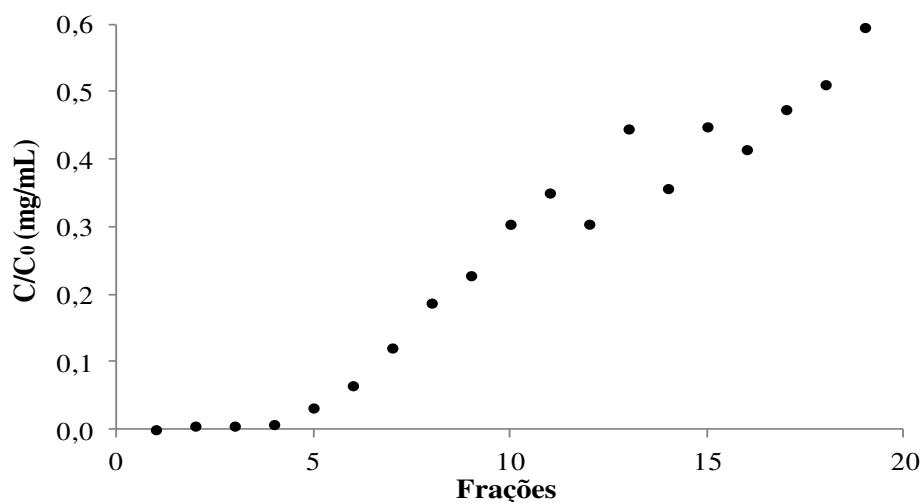


Figura 4.17. Curva de ruptura de proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab. Condição agarose-TREN-Ni(II) tampão Tris-HCl 50 mmol/L, em pH 7,0. Volume do leito: 1,0 mL. Vazão: 0,5 mL/L. (I) Injeção de 20,0 mL contendo de 0,31 mg/mL de proteínas da soja e 0,61 mg/mL de fragmentos Fab. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), com BSA como proteína de referência.

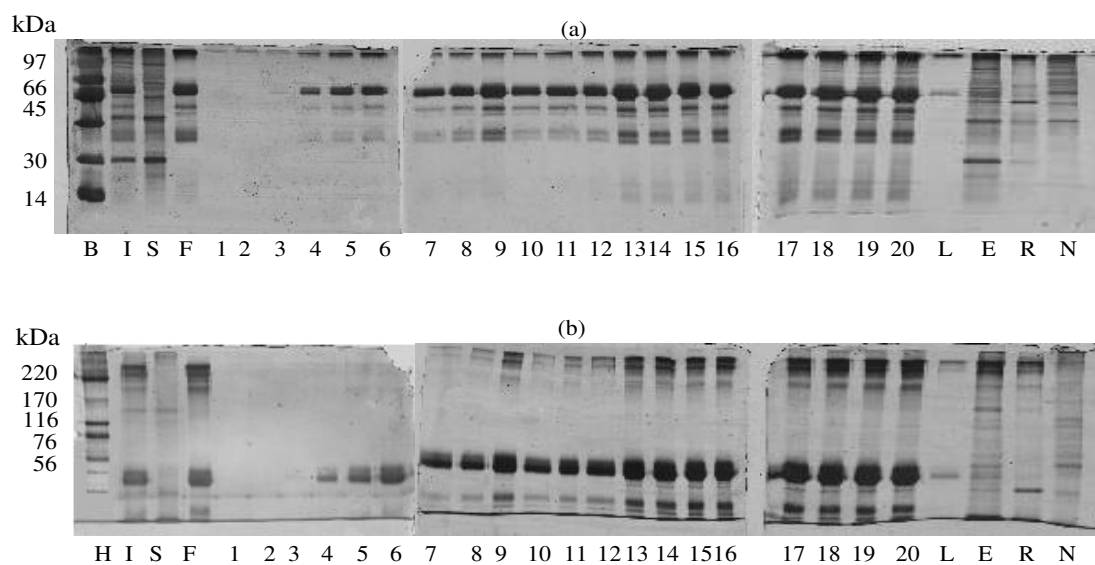


Figura 4.18. Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas da curva de ruptura com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab. Condição agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl. (a) Gel na concentração de 12%, (b) Gel na concentração de 7,5%. (I) Injeção; (S) Proteínas da soja; (F) Fragmentos Fab; (1 a 20) Frações do *flowthrough*; (L) *Pool* da lavagem; (E) *Pool* da eluição; (R) *Pool* da regeneração com EDTA; (N) *Pool* da regeneração com NaOH; (H) Marcador de alta massa molecular; (B) Marcador de baixa massa molecular.

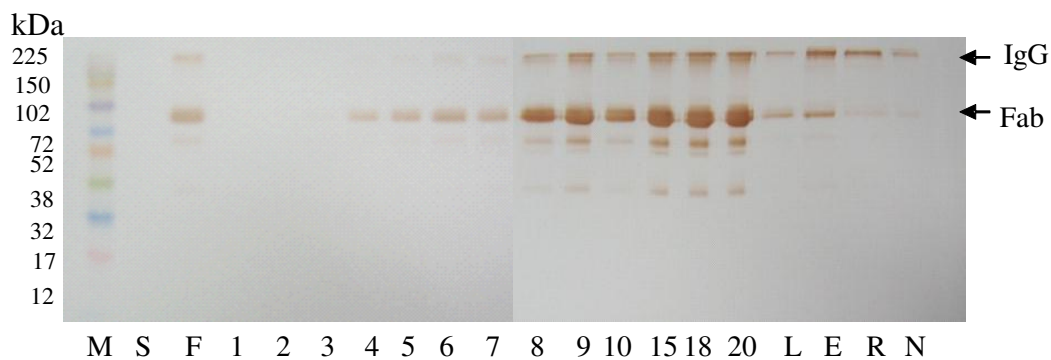


Figura 4.19. *Western Blot* com as frações coletadas da curva de ruptura realizada com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab. Condição agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl; (S) Proteínas da soja; (F) Fragmentos Fab; (1 a 20) Frações do *flowthrough*; (L) *Pool* da lavagem; (E) *Pool* da eluição; (R) *Pool* da regeneração com EDTA; (N) *Pool* da regeneração com NaOH; (M) Marcador de massa molecular.

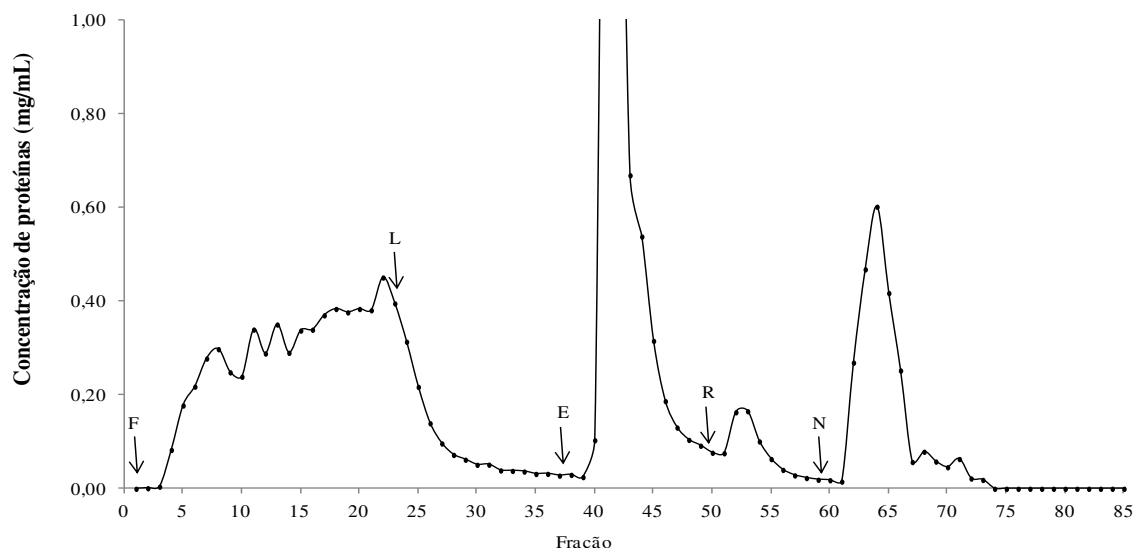


Figura 4.20. Perfil cromatográfico da curva de ruptura e eluição das proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl; (F) *Flowthrough* (L) Lavagem com tampão Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0; (E) Eluição com tampão Tris-HCl 700 mmol/L, pH 7,0; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), com BSA como proteína de referência.

Tabela 4.7 Balanço de massa por imunodifusão radial da curva de ruptura em agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl sem adição de sal. *Pool* do *flowthrough*; *Pool* das amostras de lavagem; *Pool* das amostras de eluição; *Pool* das amostras de regeneração.

Etapas	PT ^a (mg)	PT (%)	Fab ^b (mg)	Fab (%)	Pureza ^c (%)	FP ^d
Amostra inicial	18,49 ± 0,25	100,0	12,24 ± 0,18	100,0	66,2	1,0
<i>Flowthrough</i>	6,78 ± 0,10	36,7	6,12 ± 0,10	50,0	90,3	1,4
Lavagem	2,09 ± 0,04	11,3	1,97 ± 0,20	16,1	94,3	1,4
Eluição	6,81 ± 0,13	36,8	1,27 ± 0,30	10,4	18,7	0,3
Regeneração EDTA	0,68 ± 0,04	3,7	0,00 ± 0,00	0,0	0,0	0,0
Regeneração NaOH	-	-	-	-	-	-
Recuperação	16,36 ± 0,11	88,5	9,36 ± 0,50	76,5	-	-

^aProteínas totais: massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD,1976), IgG como proteína de referência.

^bFab: massa determinada por imunodifusão radial.

^cPureza: massa de fragmento dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100.

^dFator de purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Quantidade de Ni(II) quelatado ao TREN: 47,65 µmol de Ni(II)/g seca de gel.

Para o adsorvente agarose-TREN-Ni(II), utilizou-se uma concentração de proteína total na injeção de 0,92 mg/mL em tampão Tris-HCl sem adição de NaCl, sendo um terço deste valor composto por proteínas de soja e dois terços de fragmento Fab. A vazão de 0,5 mL/min foi utilizada em todos os experimentos cromatográficos com base no trabalho de Pereira (2009), que observou que esta vazão proporciona a maior adsorção das proteínas do extrato proteico de soja em agarose-TREN.

Nas Figuras 4.17, 4.18 e 4.19, observa-se nas três primeiras frações do *flowthrough* (equivalentes a três volumes de coluna), não é possível detectar presença de proteínas. A partir da fração quatro é possível detectar a presença de fragmentos Fab (confirmado por *Western blot*, Figura 4.19), sem indícios de proteínas de soja. As proteínas de soja foram detectadas a partir de fração 13 (equivalente a 13 volumes de coluna, Figura 4.18). O fragmento Fab pôde ser obtido livre de impurezas por 12 frações, o que equivale a uma injeção de aproximadamente 11 mg de proteínas totais.

O adsorvente agarose-TREN-Ni(II) apresentou capacidade de adsorção de cerca de 7,5 mg de proteínas totais/mL de gel (somando as proteínas obtidas nas etapas de eluição e de regeneração do adsorvente com EDTA). Observa-se que não houve saturação do adsorvente, pois a alimentação foi interrompida no valor de C/Co cerca de 0,5. Obteve-se neste experimento, o mesmo perfil cromatográfico observado nos experimentos anteriores: o fragmento Fab foi recuperado com alta pureza nas etapas de *flowthrough* (nas primeiras 12 frações) e de lavagem, enquanto que a maioria das proteínas de soja foram recuperadas nas etapas de eluição e de regeneração. A saturação do adsorvente não foi atingida, visto que a técnica de cromatografia negativa utiliza-se de fração de *flowthrough* para a obtenção da proteína de interesse. Na cromatografia negativa o ponto em que ocorrem os primeiros sinais das proteínas de soja não retida (ponto de ruptura) é o mais importante, pois a alimentação pode ser interrompida neste ponto.

No experimento de curva de ruptura realizado com agarose-IDA-Ni(II) e tampão fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl, alimentou-se a coluna com 0,92 mg de proteínas totais/mL, sendo 40% desta solução composta por proteínas da soja e 60% de fragmentos Fab. Os experimentos realizados com agarose-IDA-Ni(II) estão apresentados nas Figuras 4.21 a 4.24 e o balanço de massa apresentado na Tabela 4.8.

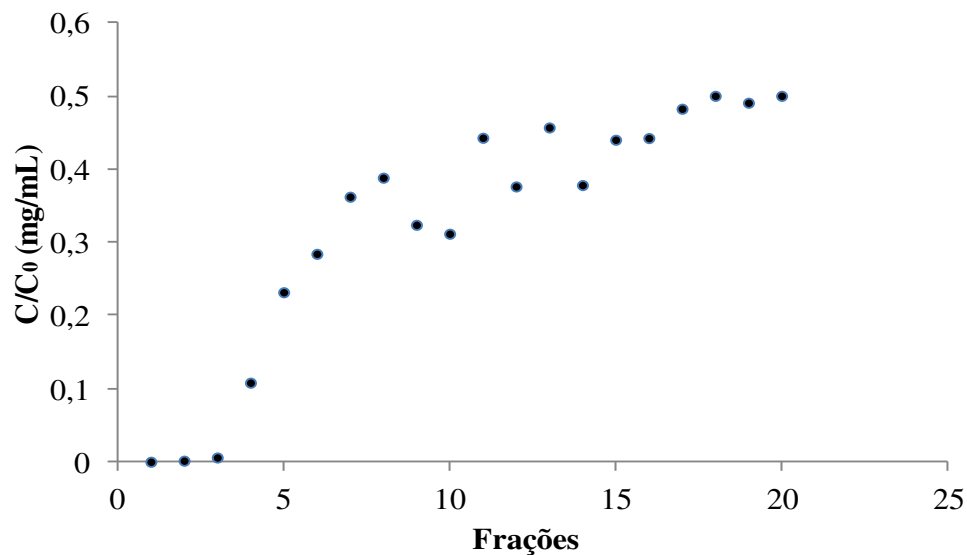


Figura 4.21. Curva de ruptura das proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio 25 mmol/L, 1,0 mol/L de NaCl pH 7,5. Volume do leito: 0,7 mL. Vazão: 0,5 mL/L. (I) Injeção de 18,0 mL de solução contendo 0,35 mg/mL de proteínas da soja e 0,57 mg/mL de fragmento Fab. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), com BSA como proteína de referência.

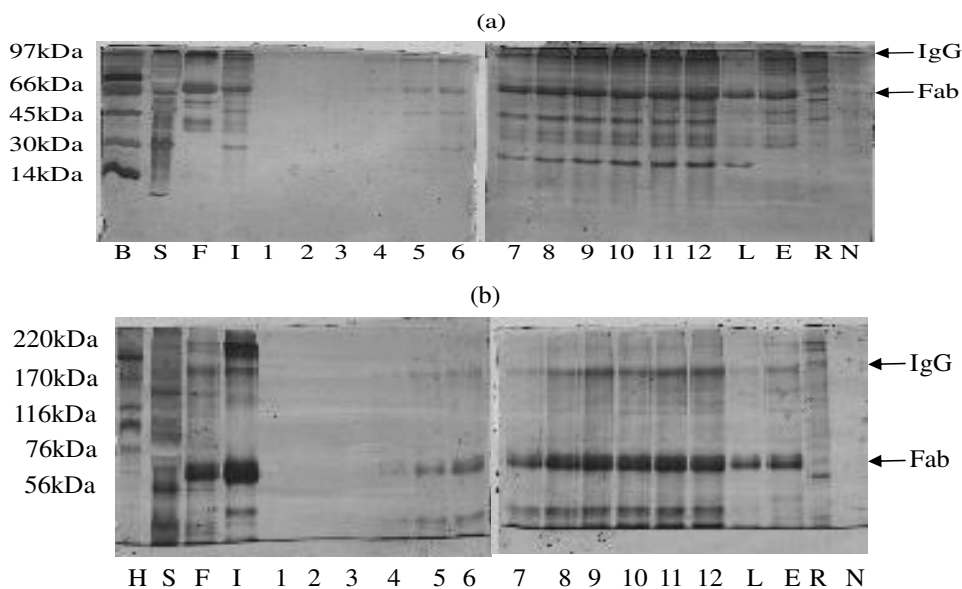


Figura 4.22. Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas na curva de ruptura com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio (a): Gel na concentração de 12%, (b) Gel na concentração de 7,5%. (S) Proteínas da soja; (F) Fragmentos Fab; (I) Extrato proteico de soja com fragmentos Fab; (1 a 12) frações do *flowthrough*; (L) *Pool* da lavagem; (E) *Pool* da eluição; (R) *Pool* da regeneração com EDTA; (N) *Pool* da regeneração com NaOH; (H) marcador de alta massa molecular; (B) marcador de baixa massa molecular.

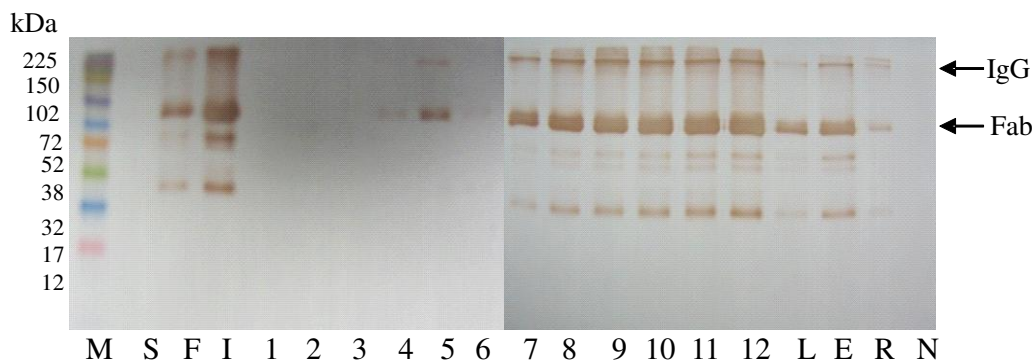


Figura 4.23. Western Blot com as frações coletadas da curva de ruptura realizada com proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio (1 a 12) frações *flowthrough*; (L) *pool* da lavagem; (E) *pool* da eluição; (R) *pool* da regeneração com EDTA; (N) *pool* da regeneração com NaOH; (M) Marcador de massa molecular.

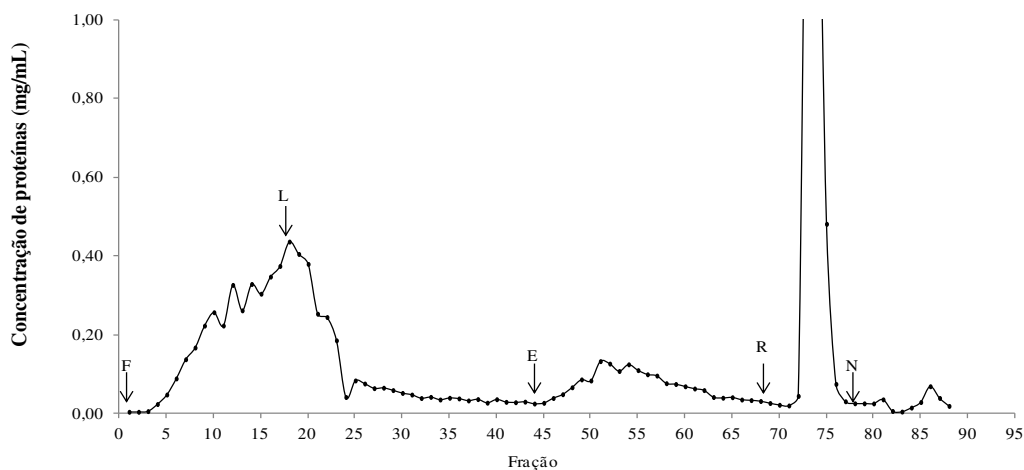


Figura 4.24. Cromatograma da curva de ruptura e da eluição das proteínas de soja com *spiking* de fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl; (F) *Flowthrough*; (L) Lavagem com tampão fosfato de sódio 25 mmol/L contendo 1,0 mol/L de NaCl, pH 7,5; (E) Eluição com tampão acetato de sódio 25 mmol/L, pH 4,0; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L. Massa de proteína total determinada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), com BSA como proteína de referência.

Tabela 4.8. Balanço de massa da curva de ruptura em agarose-IDA-Ni(II) em fosfato de sódio/acetato de sódio com adição de NaCl. *Flowthrough* – *Pool* das amostras 10 a 18; Lavagem – *Pool* das amostras 22 a 27; Eluição - *Pool* das amostras 51 a 53; Regeneração - *Pool* 73 a 75.

Etapas	PT ^a (mg)	PT (%)	Fab ^b (mg)	Fab (%)	Pureza ^c (%)	FP ^d
Amostra inicial	16,54 ± 0,23	100,0	10,22 ± 0,00	100,0	61,8	1,0
<i>Flowthrough</i>	4,69 ± 0,04	28,4	2,95 ± 0,20	28,9	62,9	1,0
Lavagem	1,82 ± 0,02	11,0	1,70 ± 0,16	16,6	93,4	1,5
Eluição	2,00 ± 0,02	12,3	3,10 ± 0,10	30,3	155,0	2,5
Regeneração EDTA	4,17 ± 0,03	25,1	1,02 ± 0,02	9,9	24,5	0,4
Regeneração NaOH	-	-	-	-	-	-
Recuperação	12,68 ± 0,05	76,8	6,45 ± 0,30	85,7	-	-

^aProteínas totais: massa determinada por meio da dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976), IgG como proteína de referência.

^bFab: massa determinada por imunodifusão radial.

^cPureza: massa de fragmento dividida pela massa de proteína total de cada etapa multiplicada por 100.

^dFator de purificação: razão entre a pureza da fração e a pureza do material alimentado.

Quantidade de Ni quelatado ao agente quelante IDA igual 68,5 µmol de Ni(II)/g de gel.

Volume de leite: 0,7 mL.

Neste experimento observou-se uma capacidade de adsorção de mais de 6,0 mg de proteínas totais/mL de adsorvente (Tabela 4.8), valor este, abaixo dos 7 mg observados na condição anterior. A menor capacidade de adsorção do adsorvente agarose-IDA-Ni(II) está relacionada a presença de NaCl no tampão de adsorção, que inibe as interações eletrostáticas. Ressalta-se, como no experimento anterior, a saturação completa do adsorvente agarose-IDA-Ni(II) também não foi alcançada.

Das Figuras 4.21 a 4.23 pode-se observar que os primeiros traços de proteínas são detectados apenas na fração 4 (aproximadamente 4 volumes de coluna). Tal resultado difere do apresentado nas Figuras 4.17 e 4.18, nas quais se detectou o fragmento Fab na fração quatro e as proteínas de soja foram detectadas a partir da 13^o fração. Na Figura 4.22 fica evidente o aparecimento das proteínas de soja juntamente com os fragmentos nas primeiras frações coletadas (capacidade de adsorção de fragmento Fab é baixo).

Na Tabela 4.8 observa-se que os maiores fatores de purificação e pureza encontram-se nas etapas de lavagem e eluição. Na etapa de eluição tem-se 30,3% do total da proteína injetada, com pureza calculada de 155% e fator de purificação de 2,5. Este valor de pureza acima de 100% na etapa de eluição justifica-se pela maior sensibilidade do método de imunodifusão radial na detecção do fragmento Fab em comparação com o método de Bradford.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que os quelatos IDA-Ni(II) e TREN-Ni(II) apresentaram variações significativas na capacidade de adsorção de proteínas e seletividade na purificação de fragmentos Fab humanos adicionados artificialmente no extrato proteico de grãos de soja.

Para o adsorvente agarose-TREN-Ni(II) em sistema tamponante Mes/Mes imidazol e Tris-HCl/Tris-HCl sem NaCl, os fragmentos Fab adicionados artificialmente no extrato proteico de soja foram purificados por cromatografia negativa, obtendo-se 79% e 84,1% dos fragmentos Fab na etapa de lavagem com um grau de pureza de 68% e 111% e fator de purificação de 1,3 e 1,9, respectivamente.

Demonstrou-se que agarose-IDA-Ni(II) adsorve as proteínas nativas do extrato proteico de soja (9,2% das proteínas alimentadas não foram retidas em tampão fosfato de sódio em presença de NaCl). Para este o adsorvente os fragmentos Fab foram purificados por cromatografia tradicional, obtendo-se 87,9% de fragmento Fab na etapa de eluição a pH 5,8, com um grau de pureza de 97,3% e fator de purificação de 2,1.

Dos resultados dos experimentos realizados para determinação da capacidade de adsorção dinâmica do adsorvente, pode-se concluir que a capacidade de adsorção da agarose-TREN-Ni(II) em Tris-HCl foi cerca de 7,5 mg de proteínas totais/mL de gel. Destaca-se que não houve saturação do adsorvente, pois a alimentação foi interrompida no valor de C/C_0 de 0,5. As proteínas da soja começaram a ser visualizadas por eletroforese SDS-PAGE na fração 12 do *flowthrough*. Na cromatografia negativa, o ponto em que ocorrem os primeiros sinais das proteínas de soja não retida (ponto de ruptura) é o mais importante, pois a alimentação pode ser interrompida neste ponto. Obteve-se 66% do total da proteína injetada nas frações do *flowthrough* e lavagem, com pureza de 91% e fator de purificação de 1,4. A capacidade de adsorção de fragmentos da agarose-IDA-Ni(II) em tampão fosfato de sódio com acréscimo de NaCl foi baixa, tendo-se obtido alta pureza e fator de purificação de 2,5.

Este estudo contribuiu para obter conhecimento de base para posterior aplicação da técnica de IMAC na purificação de proteínas recombinantes produzidas em sementes de plantas transgênicas.

CAPÍTULO 6: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos da purificação de fragmentos Fab humanos a partir de soluções com *spiking* de fragmentos Fab em extrato proteico de soja, vê-se a relevância da continuação da pesquisa nesta área. Sugere-se, portanto, os seguintes estudos:

- 1) Extração das proteínas da soja com *spiking* dos fragmentos Fab;
- 2) Realizar experimentos com baixa concentração (μg) de fragmentos Fab.

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONY, J.; NEAR, R.; WONG, S. L.; IIDA, E.; ERNST, E.; WITTEKIND, M.; HABER, E.; NG, S.-C. Production of stable antidigoxin Fv in *Escherichia coli*. *Molecular Immunology*.v.29, p.1237–1247, 1992.

ANDERSON, L.; PORATH, J.; Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe^{+3}) affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*. v.154, p.250–254, 1986.

AGATON, C.; FALK, R.; GUTHENBERG, I. H.; GÖSTRING, L.; UHLÉN, M.; HOBER, S. Selective enrichment of monospecific polyclonal antibodies for antibody-based proteomics efforts. *Journal of Chromatography A*, v.1043, p. 33-40, 2004.

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

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

ANDREW, S. M.; TITUS, J. A.; Fragmentation of immunoglobulin G. *Current Protocols in Cell Biology*, v.16, p. 1614, 2003.

ANDREWS, B. A.; NIELSEN, S.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems. *Journal of Bioseparation*, v. 6, p. 303-313, 1996.

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

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

BAKKER, H.; BARDOR, M.; MOLTHOFF, J. W.; GOMORD, V.; ELBERS, I.; STEVENS, L. H. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 2899–2904, 2001

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

BASARAN, P.; RODRIGUEZ-CEREZO, E. Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.28, p.72-153, 2008.

BEITLE, R. R.; ATAAI, M. M. Immobilized metal affinity chromatography and related techniques, *American Institute of Chemical*, v.88 p.34, 1992.

BELEW, M.; PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography: Effect of solute structure, ligand density and salt concentration on the retention of peptides. *The Journal of Chromatography*, v.516, p. 333-354, 1990.

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

BOOTHE, J.; NYKIFORUK, C.; SHEN, Y.; ZAPLACHINSKI, S.; SZARKA, S.; KUHLMAN, P. Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology*, v.8, p.588–606, 2010.

BOSSI, A.; RIGHETTI, P. G. Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients: Recent Analytical and Preparative Developments. *Electrophoresis*, v.18, p. 2012, 1997.

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

BRESOLIN, I.T.L.; MIRANDA, E.A.; BUENO, S.M.A. Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas, *Química Nova*, v.32, p.1288-1296, 2009.

BRESOLIN, I. Purificação de anticorpos utilizando-se de IMAC em membranas de fibra oca de peva: Comparação dos agentes quelantes IDA, TREN e CM-ASP. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. p.124, Dissertação (Mestrado).

BUCHNER, J.; RENNER, M.; LILIE, H.; HINZ, H. J.; JAENICKE, R. Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry*, v.30, p. 6922-6929, 1991.

CHAGA, G. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.49, p.313-334, 2001.

CHARGELEGUE D.; VINE N.; DOLLEWEERD C. V.; DRAKE, P. M; Ma, J. A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Research*, v.9, p. 187–194, 2000.

CHEADLE, C.; HOOK, E. L.; GIVOL, D.; RICCA, A. G.; Cloning and expression of the variable regions of mouse myeloma protein MOPC315 in *E. coli*: Recovery of active F_v fragments. *Molecular Immunology*, v.29, p.21-30, 1992.

CHEN, Q. Expression and purification of pharmaceutical proteins in plants. *Biological Engineering*, v.2, p.291–321, 2008.

COHEN, S. A.; TRIKHA, M.; MASCELLI, M. A. Potential future clinical applications for the GPIIb/IIIa antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indications. *Pathology & Oncology Research*, v.6, p. 163–174, 2000.

COLEMAN, L.; MAHLER, M. S. Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody papain digest by Gradiflow electrophoresis. *Protein Expression and Purification*, v.32, p.246–251, 2003.

CONLEY, A. J.; ZHU, H.; LE, L. C.; JEVNIKAR, A. M.; LEE, B. H.; BRANDLE, J. E. Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnology*, v.9, p.419–33, 2011.

CORNELL, B. A.; BRAACH-MAKSVYTIS, V.L.B.; KING, L.G.; OSMAN,P.D.J.; RAGUSE, L.; WIECZOREK, L.; PACE, R. J. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, v.387, p.580–582, 1997.

CUNHA, N. B; ARAUJO, A. C.; LEITE, A.; MURAD, A. M. Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. *Genetics and Molecular Research*, v.9, p.1163-1170, 2010.

CUNHA, N. B. MURAD, A.M.; CIPRIANO, T.M.; ARAUJO, A. C. Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Research*, v. 20, p.811-826, 2011a.

CUNHA N. B; MURAD, A. M.; RAMOS G.L.; MARANHÃO, A. Q. Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. *Transgenic Research*, v.20, p. 841-855, 2011b.

DANIELL, H., LEE, S. B., PANCHAL, T.; WIEBE, P. O. Expression of the native cholera B toxin subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, v.311, p.1001–1009, 2001.

DERRICK, J. P.; WIGL, D. B. The third IgG-binding domain from streptococcal protein G. An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. *Journal of Molecular Biology*, v. 243, p. 906-918, 1994.

DÜRING, K., HIPPE, S., KREUZALER, F.; SCHELL, J. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, v.15, p.281–293, 1990.

EVANGELISTA, R.L.; KUSNADI, A.R.; HOWARD, J.A.; NIKOLOV, Z.L. Process and Economic Evaluation of the Extraction and Purification of Recombinant β -Glucuronidase from Transgenic Corn. *Biotechnology Progress*, v. 14, p. 607-614, 1998.

FERNANDEZ-SAN M. A.; MINGO-CASTEL, A., MILLER, M.; DANIELL, H. A; chloroplast transgenic approach to hyperexpress and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology*. v.1,p.77–79, 2003.

FIEDLER, M.; SKERRA, A.; Use of thiophilic adsorption chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody F(ab) fragment without the need for an affinity tag. *Protein Expression and Purification*, v.17, p.421-427, 1999.

FISCHER, R.; STOGER, E; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P. TWYMAN, R. M. Plant-based Production of biopharmaceutical. *Current Opinion in Plant*, v.7, p. 152-158, 2004.

FISCHER, U.; KUHLMANN, M.; PECINKA, A.; SCHMIDT, R.; METTE, M. F. Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation. *Plant Journal*, v.53, p.1-10, 2008.

FRANCISCO, J. A.; GAWLAK, S. L.; MILLER, M.; BATHE, J.; RUSSELL, D.; CHACE, D.; MIXAN, B.; ZHAO, L.; FELL, H. P.; SIEGALL, C. B. Expression and characterization of bryodin 1 and a bryodin 1-based single-chain immunotoxin from tobacco cell culture. *Bioconjugate Chemistry*, v.8, p.708–713, 1997.

GAGNON, P. Monoclonal antibody purification with hydroxyapatite. *New Biotechnology*, v.25, p.287-293, 2009.

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

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

HARRISON, R.G.; TODD, P.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. Bioprocess design. *Bioseparations Science and Engineering*, v.1 p. 72-319, 2003.

- HEMDAN, E.S.; PORATH, J. Development of immobilized metal affinity chromatography. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. *Journal of Chromatography*, v. 323, p. 255-264, 1985.
- HIATT, A.; CAFFERKEY, R.; BOWDISH, K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, v. 342, p.76–78, 1989.
- HOLLIGER, P., HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise fo single domains. *Nature Biotechnology*, v.23, p.1126-1136, 2005.
- HOLT, L.J.; HERRING, C.; JESPER, L.S.; WOOLVEN, B.P.; TOMLINSON, I.A. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 484, 2003.
- HUMPHREYS, D. P.; CARRINGTON, B.; BOWERING, L. C.; GANESH, R.; SEHDEV, M.; SMITH, B. J.; KING, L. M.; REEKS, D. G.; LAWSON, A.; POPPLEWELL, A.G. A plasmid system for optimization of Fab production in *Escherichia coli*: importance of balance of heavy chain and light chain synthesis. *Protein Expression and Purification*, v. 26, p.309-320, 2002.
- HUSE, K.;BOHME, H. J. E SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Method*, v.51, p.217-223, 2002.
- HUSSACK, G.; GROHS, B. M.; ALMQUIST, K. M.; MCLEAN, M. D.; GHOSH, R.; HALL, C. J. Purification of Plant-Derived Antibodies through Direct. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 3451-3459, 2010.
- KNÄBLEIN, J. Plant-based expression of biopharmaceuticals. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, p. 386–407, 2005.
- LABROU, N.; CLONIS, Y . D. The affinity technology in down- stream processing. *Journal Biotechnology*, v.36, p. 95-119, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAU, O.S.; SUN, S.S.M. Plant seeds as bioreactors for recombinant protein production, *Biotechnology Advances*, *Biotechnology Advances*, v.27, p.1015-1022, 2009.
- LEE, J. W.; FORCINITI, D. Purification of human antibodies from transgenic corn using aqueous two-phase systems. *Biotechnology Progress*, v.26, p. 159–67, 2010.
- LESNEY, M.S. Farming for Pharmaceutical a Genetically modified crops promise a corn-o-pharmacopoeia, *Today`s Chemist at work*, p.24-27, 2004.

- LIM, S.; MANUSU, H. P.; GOOLEY, A. A.; WILLIAMS, K. L.; RYLATT, D. B. PURIFICATION OF monoclonal antibodies from ascetic fluid using preparative electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, v. 827, p. 329-335, 1998.
- LOWE, J. A; JONES, P. Biopharmaceuticals and the future of the pharmaceutical industry. *Current opinion in drug discovery & development*, v.10, p.513-4, 2007.
- LU X.; MULLER C. J. Concentration of IgG in the sera of normal rhesus macaques as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay. *Journal of Immunological Methods*, v.197, p 193-196, 1996.
- MA, J. K-C.; Pascal M. W.; CHRISTOU, D.; CHRISTOU, P. Genetic modification: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature*, v.4, p. 794-805, 2003.
- MA, S. W.; ZHAO, D. H.; YIN, Z. Q.; MUKHERJEE, R.; SINGH, B.; QIN, H. Y.; STILLER, C. R.; JEVNIKAR, A. M. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nature Medicine*. v.3, p.793-796, 1997.
- MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, E. S.; LERNER, A. R. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.100, p.438-442, 2003.
- MCGARVEY, P. B; HAMMOND, J.; DIENELT, M, M.; HOOPER, D. C.; FU, Z. F.; DIETZSCHOLD, B.; KOPROWISHI, H.; MICHAELS, F. H. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, v.13, p.1484-1487, 1995.
- MAGE, M.; LAMOYI, E. Preparation of Fab and F(ab')₂ fragments from monoclonal antibodies. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.24, p. 79-97, 1987.
- MAGE, M. Preparation of Fabs from IgGs of different animal species. *Methods in Enzymology*, v. 70, p. 142-150, 1980.
- MASON, H. S., LAM, D. M. K.; ARNTZEN, C. J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 89, p.11745-11749, 1992.
- MENKHAUS, T. J.; BAI, Y.; ZHANG C.; NILKOLOV, Z. L.; GLATZ, C. E; Considerations for the Recovery of recombinant proteins from plants, *Biotechnology Progress*, v.20, p. 1001-1014, 2004.
- MENKHAUS, T. J.; GLATZ, C. E. Antibody capture from corn endosperm extracts by packed bed and expanded bed adsorption. *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 473-85, 2005.

MISON, D.; CURLING, J. The industrial production cost of recombinant therapeutic proteins expressed in transgenic corn. *Biopharmaceutical*, v.13, p.48-54, 2000.

MOFFATT, F. L. JR.; GULAC, S. A.; SARAFINI, A. N.; SFAKANCKIS, G.N.; DOP, R.; ROBINSON, D. S.; FRANSCESCHI, D.; BOGGS, J.; LIVINGSTONE, A. S. A thousand points of light or just a dim light bulb? Radiolabeled antibodies and colorectal cancer imaging, *Cancer Investigation*, v.17, p.322–334, 1999.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, v. 117, p. 307-310, 1981.

MULLER, K. M.; ARNDT, K. M.; BAUER, K.; PLUCKTHUN, A. Tandem immobilized metal-ion affinity chromatography/immunoaffinity purification of His-tagged proteins-evaluation of two anti-His-tag monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry*, v.259, p.54-61, 1998

MUNRO, S.; PELHAM, B.R.P. An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell Press*, v. 46, p.291-300, 1986.

MUNRO, S; PELHAM, H. R. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, v. 48, p. 899–907, 1987.

NEVES, M.; De LOOSE, M.; JACOBS, A.; Van HOUD, H.; KALUZA, B.; WEIDLE, U.; VAN MONTAGU, M.; DEPIKER, A. Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana and Arabidopsis*. *Transgenic Research*, v. 2, p. 227-237, 1993.

NEWCOMBE, C.; NEWCOMBE, A.R. Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of Chromatography B*, v. 848, p. 2-7, 2007.

NIKOLOV, Z. L.; HAMMES, D. Production of recombinant proteins from transgenic crops. Plant as factories for protein production. *The Netherlands: Kluwer Academic Publishers*, v. 3 , p. 159-74, 2002.

PADILLA, S.; VALDÉS, R.; GÓMEZ, L.; GEADA, D.; FERRO, W.; MENDOZA, O. Assessment of a plantibody HB-01 purification strategy at different scales. *Chromatographia*, v.70, p. 1673-1678, 2009.

PEETERS, K.; DE WILDE, C.; DEPICKER, A. Highly efficient targeting and accumulation of a Fab fragment within the secretory pathway and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*. v.268, p. 4251–4260, 2001.

PEREIRA, R. A. I. Cromatografia negativa em sepharose-TREN como técnica de purificação de proteínas adicionadas artificialmente a extrato de soja Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009, p.130, Dissertação (Mestrado).

PERSSON, H. Envenoming by European vipers antivenom treatment-influence on morbidity, *Prezeglada Lekarski*, v.58, p. 223-225, 2001.

PLATIS, D.; LABRAU, E.N. Affinity chromatography for the purification of therapeutic proteins from transgenic maize using immobilized histamine, *Journal of Separation Science*, v.31, p.636-645, 2008.

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

POLJAK, R. J.; AMZEL, L. M.; AVEV, H.P.; CHEN, B. L.; PHIZACKERLEY, R.P.; SAUL, F. Three-Dimensional Structure of the Fab' Fragment of a Human Immunoglobulin at 2.8-Å Resolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.70, p.3305-3310, 1973.

PORATH, J.; BELEW, M. 'Thiophilic' interaction and the selective adsorption of Proteins, *Trends in Biotechnology*, v.5, p.225-229, 1987.

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

PORATH, J. Amino Acid Side Chain Interaction with Chelate-liganded Crosslinked Dextran, Agarose and TSK Gel. *The Journal of Molecular Recognition*, v.3, p.123-127, 1990.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal in affinity chromatography of biomaterial. Serum protein affinity for gel-immobilization iron and nickel ions. *Biochemistry*, v. 22, p. 1621-1630. 1983.

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

POWERS, D. B.; AMERSDORFER, P.; POUL, M. A.; NIELSEN, U. B.; SHALABY, M. R.; ADAMS, G. P.; WEINER, L. M.; MARKS, J.D. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods*, v.251, p.123-135, 2001.

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

PUJOL, M.; RAMIREZ, I. N.; AYALA, M.; GAVILONDO, V. J.; VALDES, R.; RODRIGUEZ, M.; BRITO, J.; PADILA, S.; GOMEZ, L.; REYES, B.; PERAL, R.; PEREZ, M.; MILA, L.;

SANCHEZ, F.R.; PAEZ, R.; CREMATA, J.; ENRIQUEZ, G.; MENDOZA, O.; ORTEGA, M.; BARROTO, C.; An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine*, v.23, p.1833-1837, 2005.

OSBORNE, T. B. The vegetable proteins. *Longman Green and Co.*, London, 1924.

RAMIREZ, N.; ORAMAS, P.; AYALA, M.; RODRIGUEZ, M.; PEREZ, M.; GAVILONDO, J.; Expression and long-term stability of a recombinant single-chain Fv antibody fragment in transgenic *Nicotiana tabacum* seeds, *Biotechnology Letters*, v.23, p.47-49, 2000.

RECH, E. Biotecnologia: aliada da ciência no combate à fome e na prevenção e erradicação de doenças. *Revista USP*, São Paulo, n.64, p.122-131, 2005.

ROBIC, G. Soja como biorreator: estudo de extração e purificação de proteína recombinante utilizando β -glucuronidase. Campinas: Faculdade de engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, p.82, Dissertação (Mestrado), 2005.

ROQUE, A. C. A.; TAIPA, A. T.; CHRISTOPHER, R.; LOWE, C. R. An artificial protein L for the purification of immunoglobulins and Fab fragments by affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1064, p 157- 167, 2004.

RÖTHLISBERGER, D.; HONEGGER, A.; PLUCKTHUN, A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *Journal of Molecular Biology*, v.347, p.773-789, 2005.

SAGAR S. L.; BEITLÉ, R. R.; ATAÍ, M. M.; DOMACH, M. M. Metal-based affinity separation of alpha- and gamma-chymotrypsin and thermal stability analysis of isolates. *Bioseparation*, v.3, p.291-6, 1992.

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

SILVA, A. C. L. purificação de fragmentos fab de igg humana policlonal por imac utilizando os adsorventes ida-me²⁺ e tren-me²⁺ e por cromatografia de afinidade utilizando fenil boronato. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2013, p. 201, Qualificação de Doutorado.

SHARMA, A. K.; SHARMA, M. K. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*, v.27 p. 811-832, 2009.

SKERRA, A.; PLUCKTHUN, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, v.240, p.1038-1041, 1988.

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

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

SPOK, A.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R.; MA, J. K.; SPARROW, P. A. Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends in Biotechnology*, v. 26 p. 506-517, 2008.

STAUB, J. M.; GRACIE, B.; GRAVES, J.; HAJDUKIEWICZ, P. T.; HUNTER, P.; NEHRA, N.; PARADKAR, V.; SCHLITTLER, M.; CARROLL, J. A.; SPATULA, L.; WARD, D.; YE, G.; RUSSEL, D. A. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology*, v.18, p.333-338, 2000.

SCHATZ, M. S; KERSCHBAUMER, J. R; GERSTENBAUER, G; KRAL, M; DORNER, F; SCHEIFLINGE, F; Higher expression of fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, v.84, p.433-438, 2003.

SULKOWSKI, E. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, v.3, p.3-7, 1985.

SULKOWSKI, E. The saga of IMAC and MIT. *Bioassays*, v.10, p.170-175, 1989.

TACKET, C. O.; MASON, H. S.; LOSONSKY, G.; CLEMENTS, J. D; LEVINE, M. M.; ARNTZEN, C. J. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial-antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Medicine*, v.4, p.607-609, 1998.

TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. Techniques Immuno-enzymatiques. Techniques en Immunologie. Ed. Les Editions Inserm, Société Française d'Immunologie, 1987.

THOMAS, T. M.; SHAVE, E. E.; BATE, I. M.; GEE, S. C.;FRANKLIN, S.; RYLATT, D. B. Preparative electrophoresis: a general method for the purification of polyclonal antibodies, *Journal of Chromatography A*, v. 944, p.161-168, 2002.

TODOROVA-BALVAY, D.; PITIOL, O.; BOURHIM, M.; SRIKRISHNAN, T.; VIJAYALAKSMI, M.; Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *Jornal of Chromatography B*, v. 808, p. 57-62, 2004.

TOWBIN, H; STAEHLIN, T; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceeding of National Academy of Sciences*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TWYMAN RM, SCHILLBERG S, FISCHER R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, v. 10, p.185-218, 2005.

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

VÉZINA, L. P.; FAYE, L.; LEROUGE, P.; D'AOUST, M. A.; MARQUET-BLOUIN, E.; BUREL, C. Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology*, v.7, p.442-455, 2009.

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

VIANNA, G. R.; CUNHA, N. B.; MURAD, A. M.; RECH, E. L. Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins, *Genetics and Molecular Research*, v.10, p. 1733-1752, 2011.

XU, J.; GE, X.; DOLAN, M. C. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 278-99. 2011.

WILKEN, L. R.; NIKOLOV, Z. L.; Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 419-433, 2012.

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

WOLF, W.; COWA, J. *Soybeans as a Food Source*. *CRC Press*, p 18, 1975.

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

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

ZIJLSTRA, G. M.; MICHELSEN, M. J. F.; DE GOOIJER, C. D.; VANDER POL, L. A.; TRAMPER, J. IgG and hybridoma partitioning in aqueous two-phase systems containing a dye-ligand. *Journal of Bioseparation*, v. 7, p.117-126, 1998.

ZHANG, D.; NANDI, S.; BRYAN, P.; PETTIT, S.; NGUYEN, D.; SANTOS, M. A. Expression, purification, and characterization of recombinant human transferrin from rice. *Protein Express and Purification*, v.74, p.69-79, 2010.

ZHAO, Y.; GUTSHALL, L.;JIANG, H.; BAKER, A.; BEIL, E.; OBMOLOVA, G.; CARTON, J.; TAUDTE, S.; AMEGADZIE, A.; Two routes for production and purification of Fab fragments in biopharmaceutical discovery research: papain digestion of mab and transient expression in mammalian cells. *Protein Expression and Purification*, v.67, p. 182–189, 2009.

ZHU, Z.; HUGHES, W. K.;HUANG, L.; SUN, B.; LIU, C.; LI, Y. Expression of human α -interferon in plants. *Virology*, v.172, p. 213–222, 1994.

APÊNDICE A

Neste apêndice está apresentando os perfis cromatográficos referentes aos ensaios cromatográficos realizados com soja para screening das condições estudadas apresentando na Figura 4.3. a Figura 4.6.

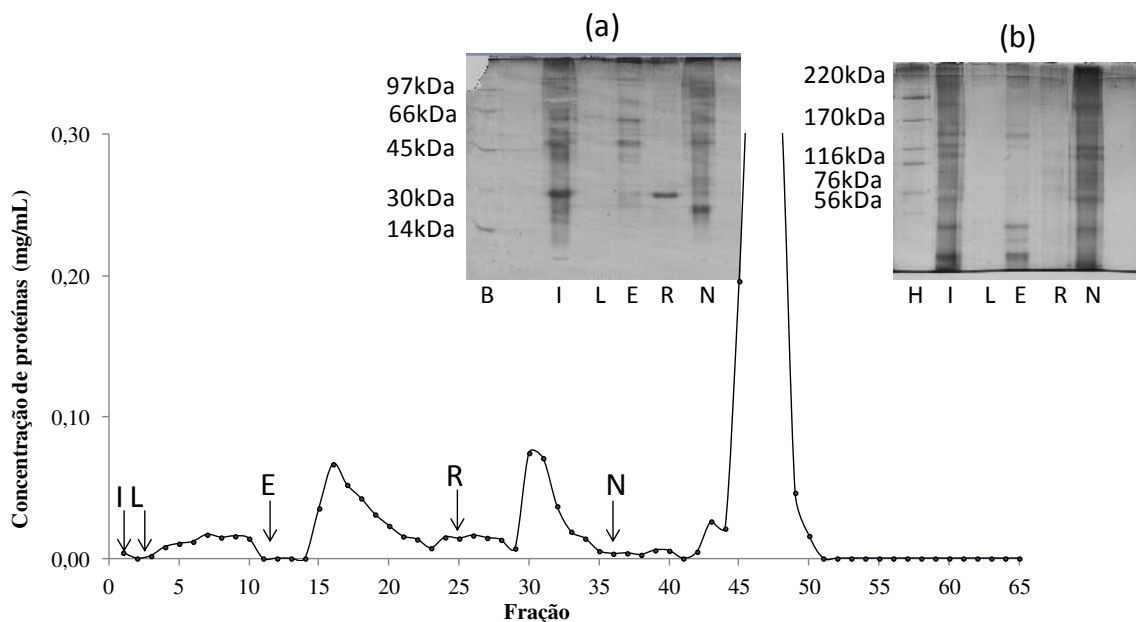


Figura A1- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja utilizando TREN-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (2,04 mg), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, pH 7,5; (E) Eluição: fosfato de sódio 25 mmol/L, imidazol 300 mmol/L pH 7,5; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0; (N) Regeneração: NaOH 20 mmol/L; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) Pool das frações de lavagem; (E) Pool das frações de eluição; (R) Pool das frações de regeneração; (N) Pool das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

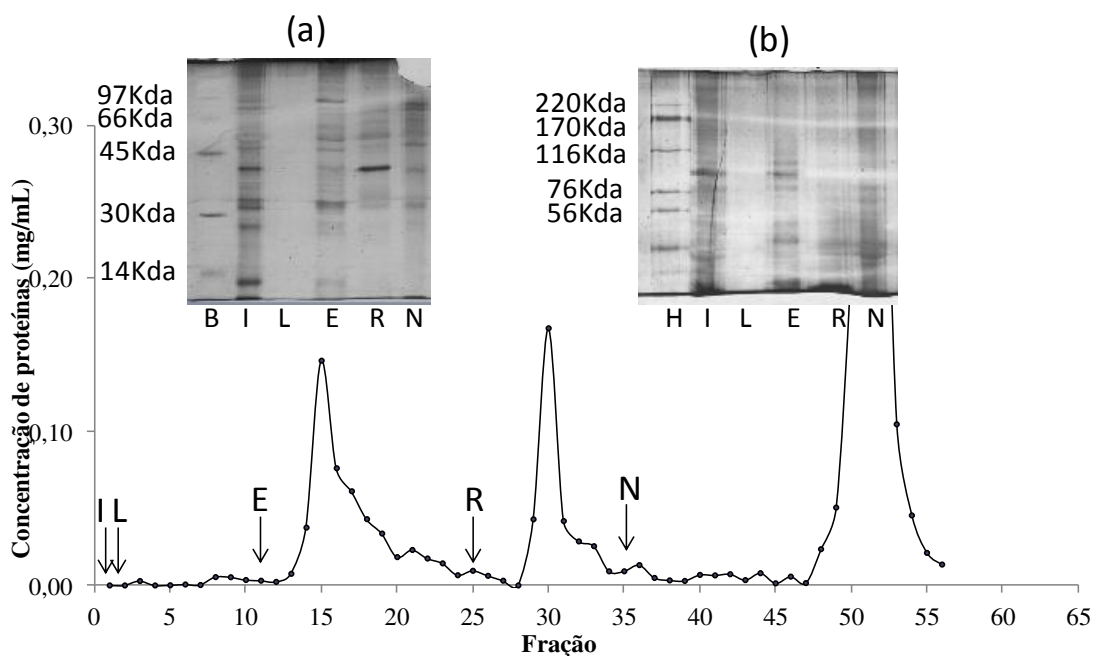


Figura A2- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-TREN-Ni(II). Volume do leite: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (2,03 mg), (L) Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L, 7,0; (E) Eluição: Tris-HCl 700 mmol/L pH 7,0; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0;(N) Regeneração: NaOH 20mmol/L; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixa massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

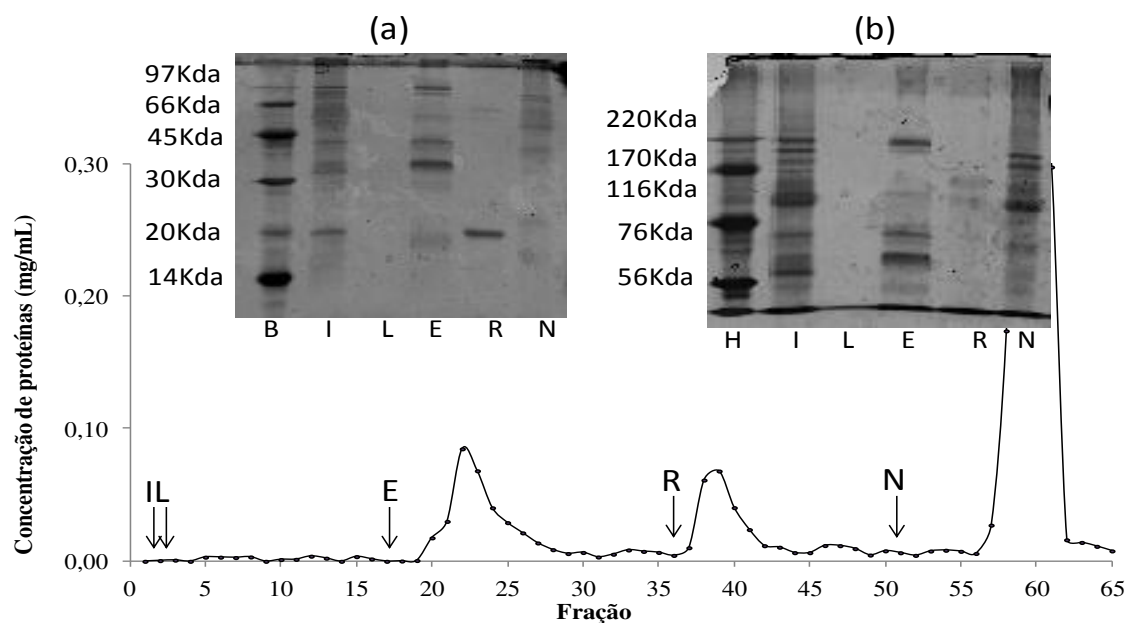


Figura A3 - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-TREN-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (2,22 mg), (L) Lavagem: MES 25 mmol/L, pH 6,5; (E) Eluição Mes 25 mmol/L, imidazol 300 mmol/L, pH 6,5; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L, (N) NaOH 20 mmol/L.; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

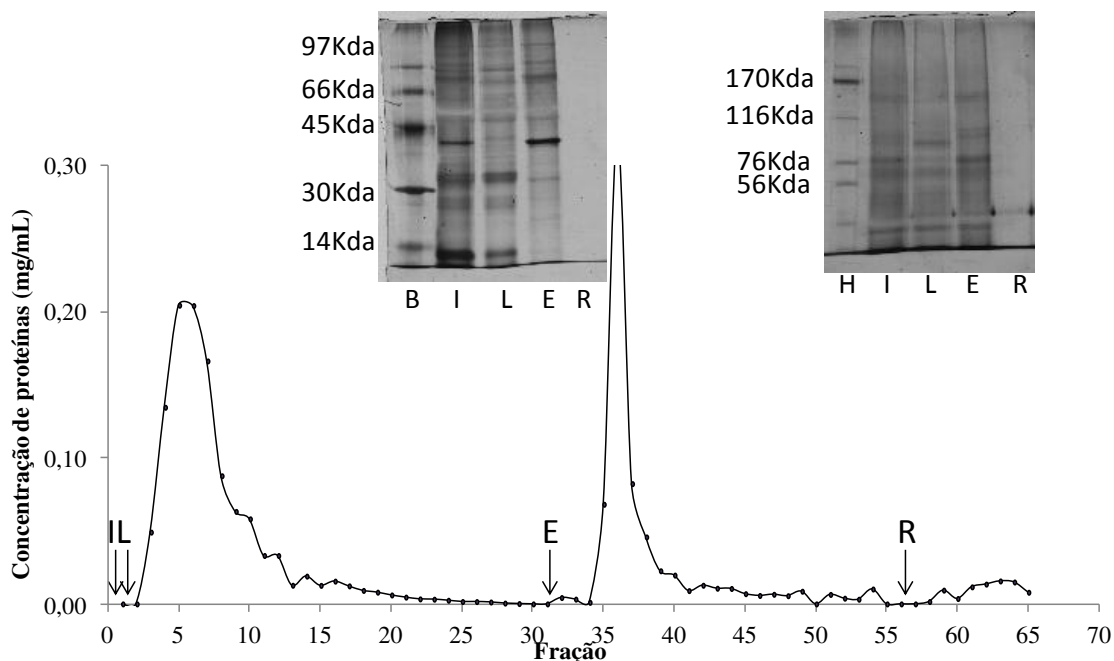


Figura A4- Perfil cromatográfico e eletroforetico das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-TREN-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (2,13 mg), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,5; (E) Eluição: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L, imidazol 300 mmol/L pH 7,5; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

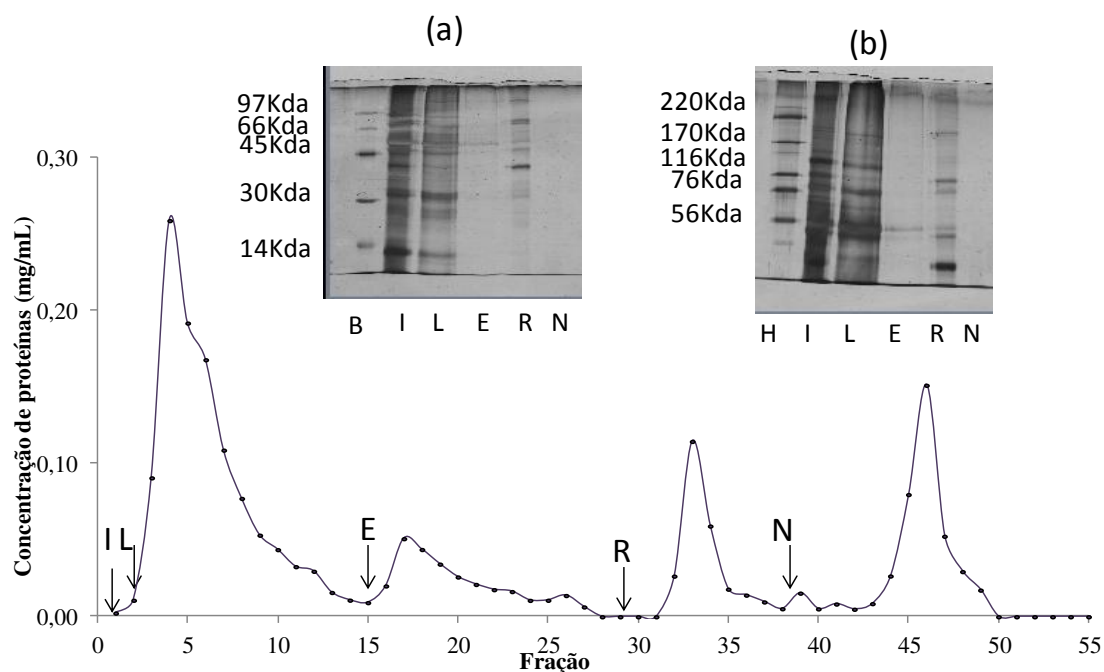


Figura A5- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-TREN-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (1,77 mg), (L) Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,0; (E) Eluição: Tris-HCl 700 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,0; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7, (N) Regeneração: NaOH 20 mmol/; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) Pool das frações de lavagem; (E) Pool das frações de eluição; (R) Pool das frações de regeneração; (N) Pool das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

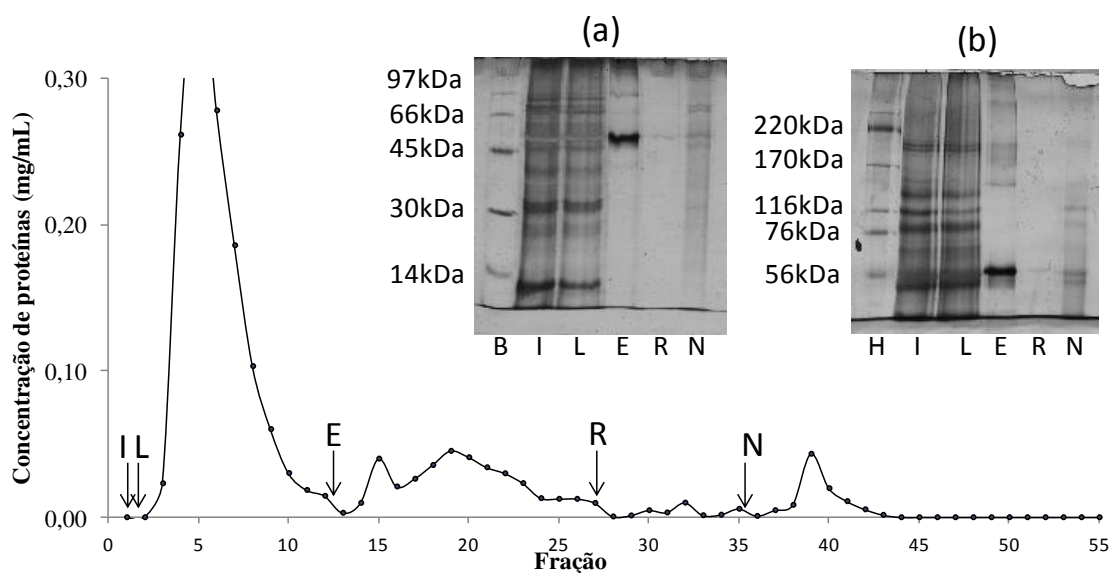


Figura A6- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-TREN-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (1,83 mg), (L) lavagem: MES 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 6,5; (E) Eluição: Mes 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L, Imidazol 300 mmol/L pH 6,5; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7; (N) Regeneração: NaOH 20 mmol/L. SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

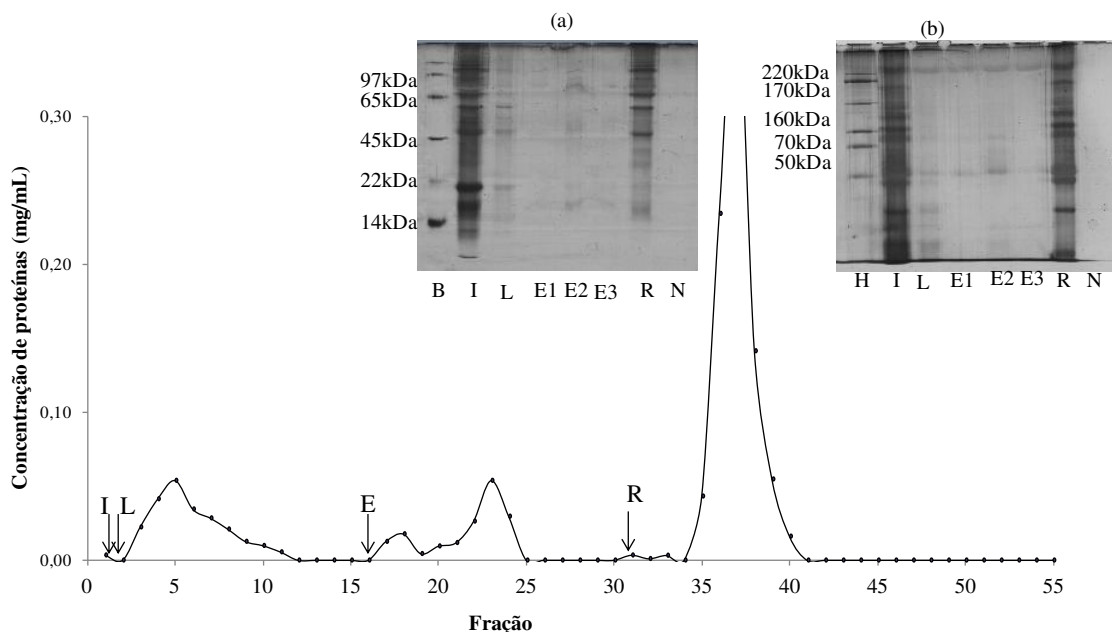


Figura A7- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (1,44mg), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; (E) Eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, pH 4,0 ; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E1, E2, E3) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

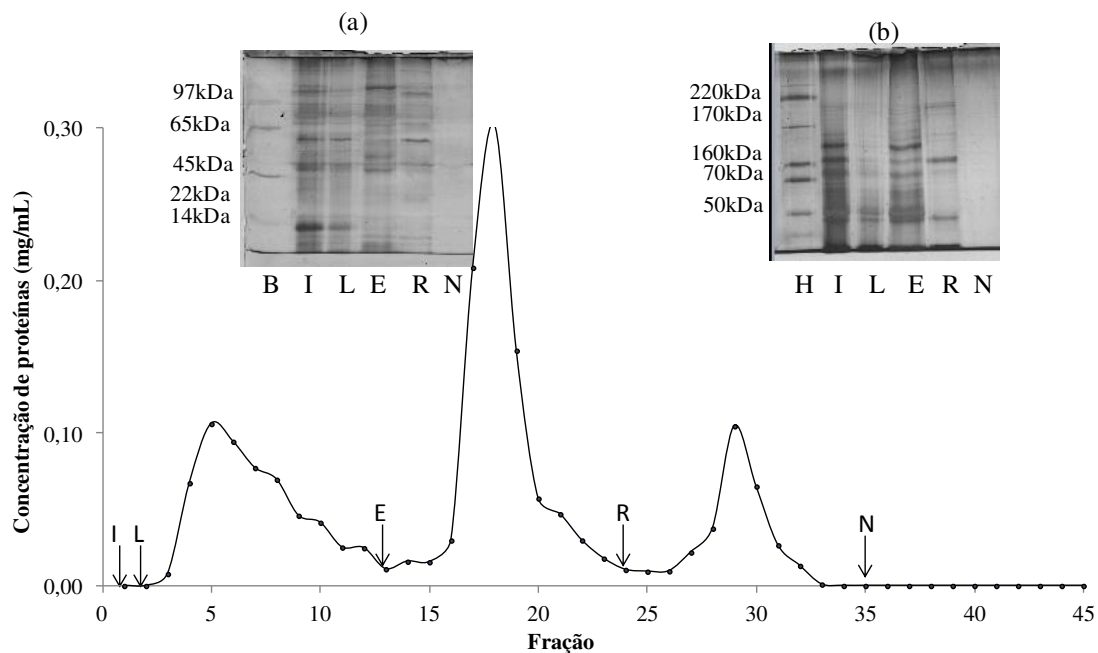


Figura A8- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (2,01mg), (L) Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0; (E) Eluição: Tris-HCl 700 mmol/L, pH 7,0 ; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L, pH 7,0; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixa massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

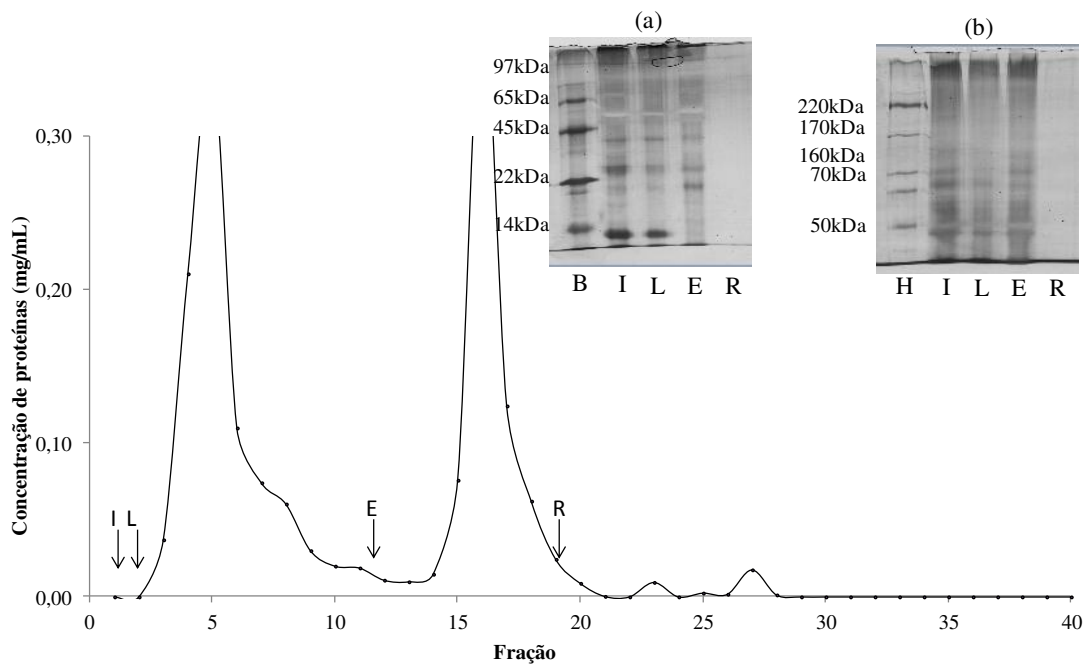


Figura A9- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Volume de frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (1,87 mg de soja), (L) Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5; (E) Eluição: Mes 25 mmol/L contendo imidazol 300 mmol/L pH 6,5; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0. SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixa massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

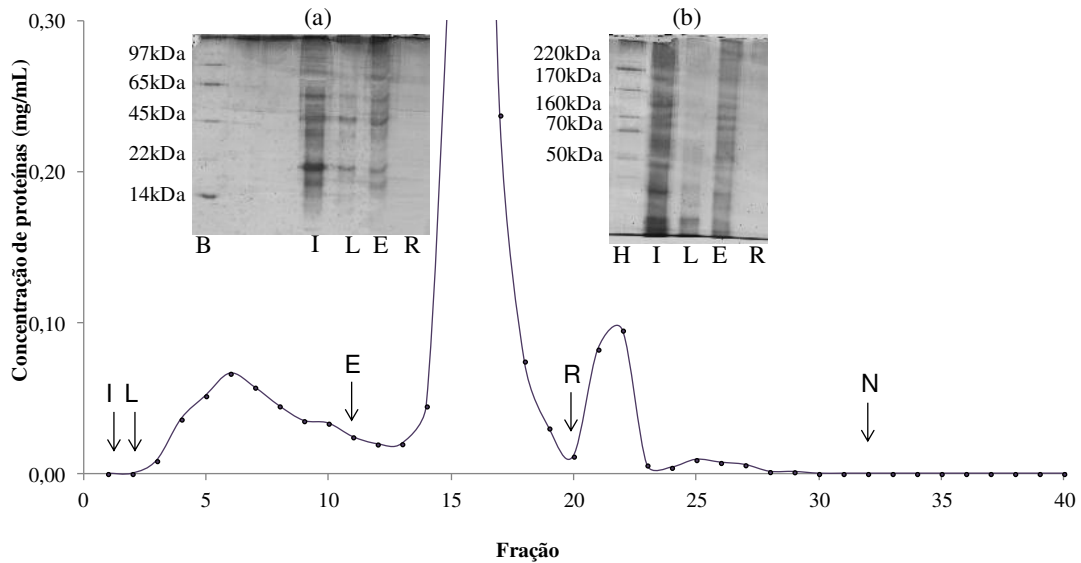


Figura A10 - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leite: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (2,04 mg), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,5; (E) Eluição: fosfato de sódio 25 mmol/L , imidazol 300 mmol/L pH 7,5; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L. SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração.

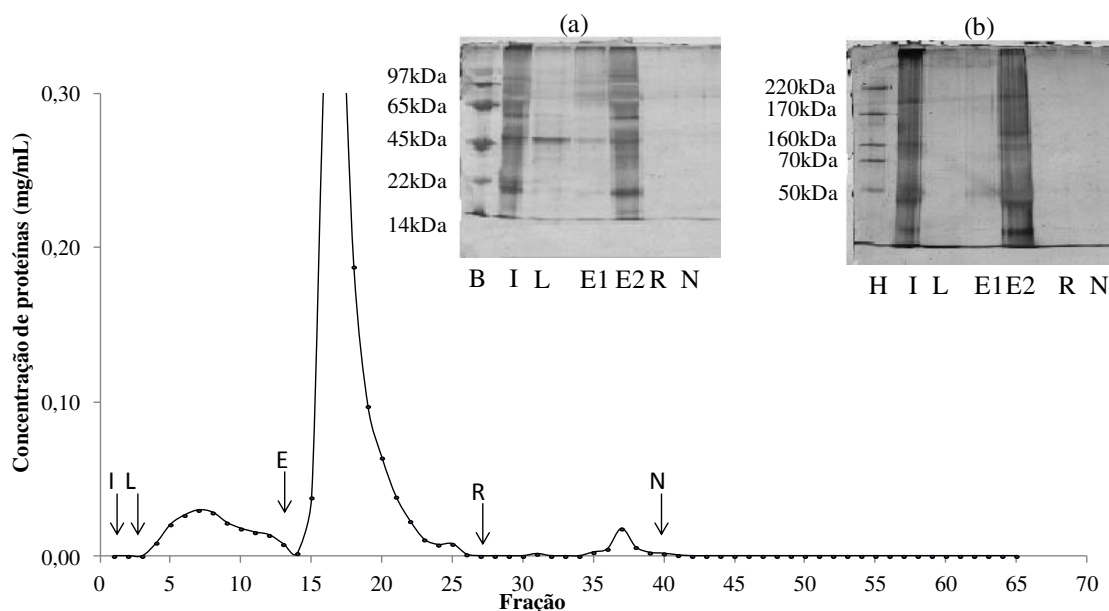


Figura A11- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (1,92mg), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,5; (E) Eluição fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L, imidazol 300 mmol/L pH 7,5; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L; (N) Regeneração com NaOH 20 mmol/L; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E1) *Pool* Eluição frações 13 a 15; (E2) *Pool* Eluição frações 16 a 18; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH.

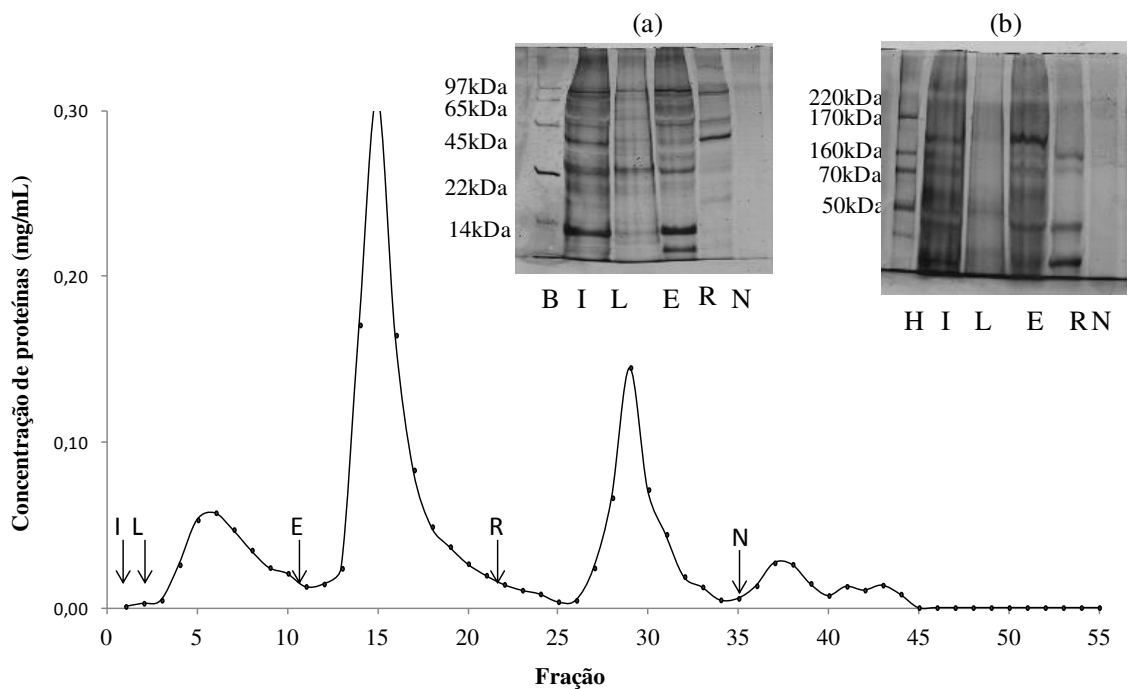


Figura A12- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (1,77 mg), (L) Lavagem: Tris 50 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,0; (E) Eluição: Tris 700 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,0; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0; SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixa massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

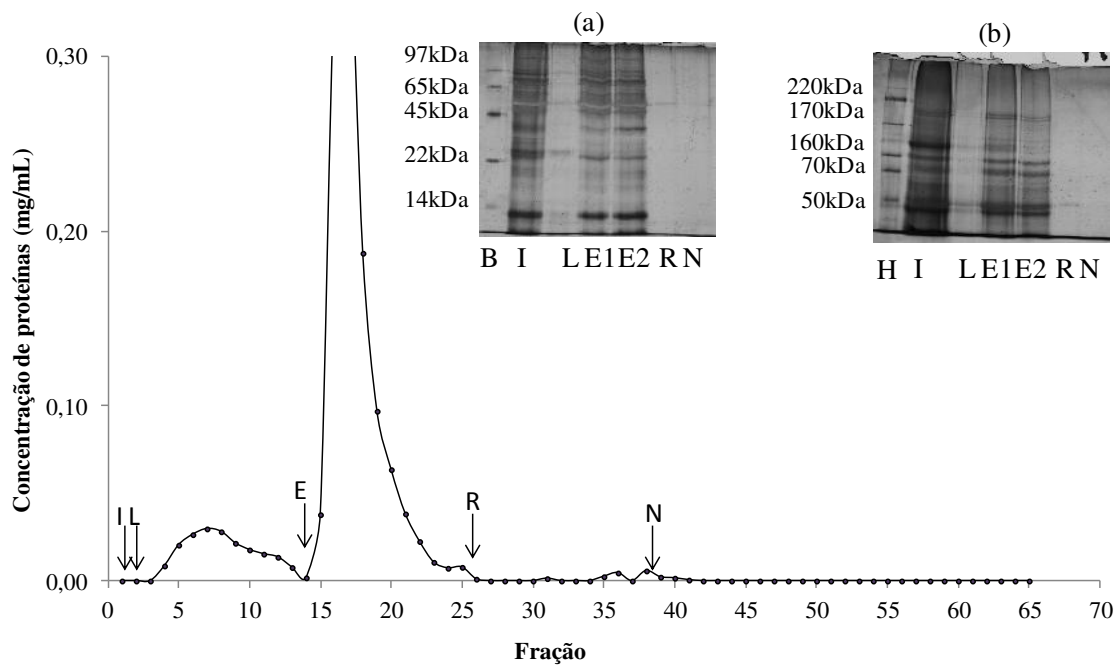


Figura A13 - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leite: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (1,58 mg), (L) Lavagem: Mes 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 6,5; (E) Eluição: Mes 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L, Imidazol 300 mmol/L pH 6,5; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L pH 7,0; (N) Regeneração: NaOH 25 mmol/L .SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem (E1) Eluição Fração 16; (E2) Eluição Fração 17; (R) *Pool* das frações de regeneração; (N) *Pool* das frações de regeneração com NaOH; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

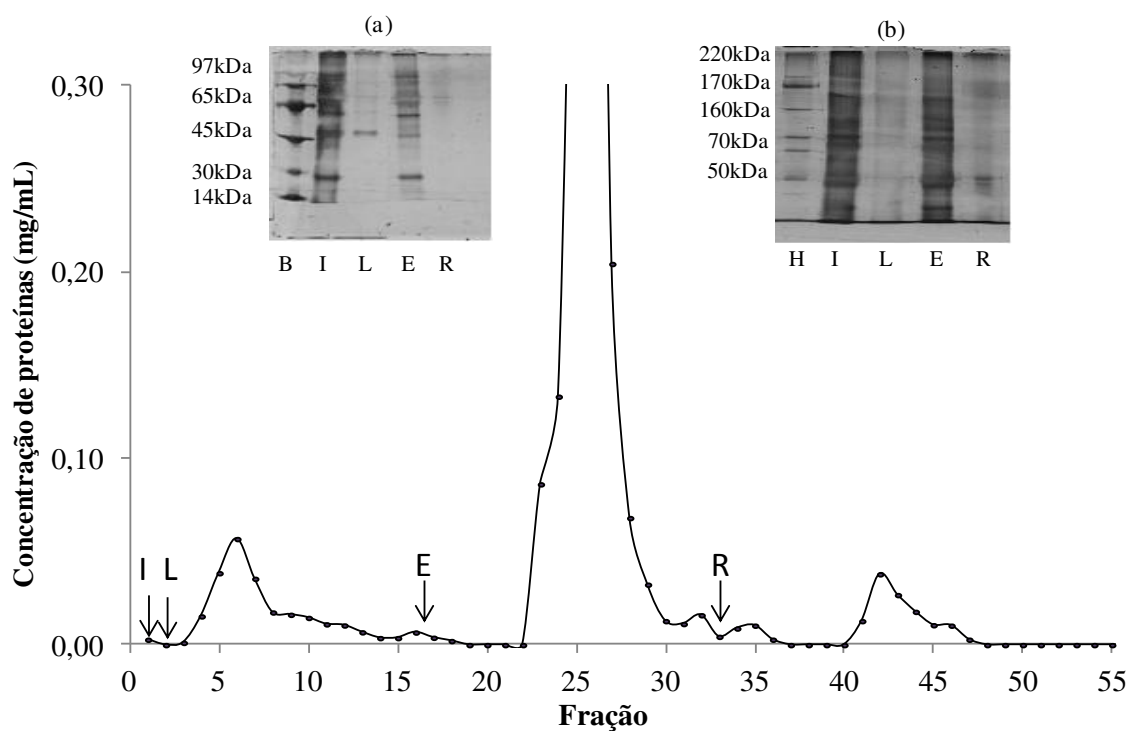


Figura A14- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas das proteínas de soja em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2 mL (2,30 mg), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, 1 mmol/L NaCl, pH 7,5; (E) Eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, 1 mmol/L NaCl, pH 4,0 ; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7,0; (B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular. SDS-PAGE (a) gel a 12,5%; (b) gel a 7,5%; (I) Injeção; (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração;(B) Marcador de baixo massa moléculas; (H) Marcador de alta massa molecular.

APÊNDICE B

Neste apêndice é apresentado os perfis cromatográficos referentes aos ensaios cromatográficos realizados com fragmentos Fab sem adição das proteínas da soja apresentados da Figura 4.7. e na Tabela 4.1.

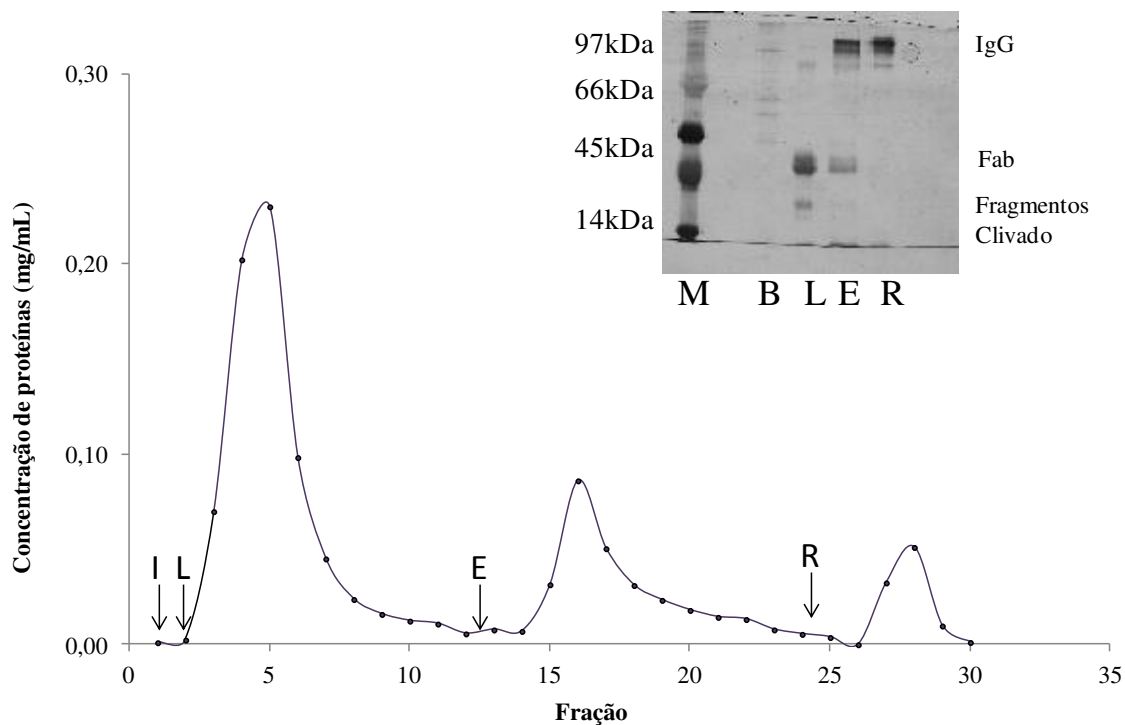


Figura B1- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas dos fragmentos Fab em agarose-TREN-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 5 mL (1,21 mg de Fab), (L) Lavagem: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,0; (E) Eluição: Tris-HCl 700 mmol/L, pH 7,0 ; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L, pH 7,0; SDS-PAGE gel a 12,5% (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (M) Marcador de baixa massa moléculas; (B) Marcador de alta massa molecular.

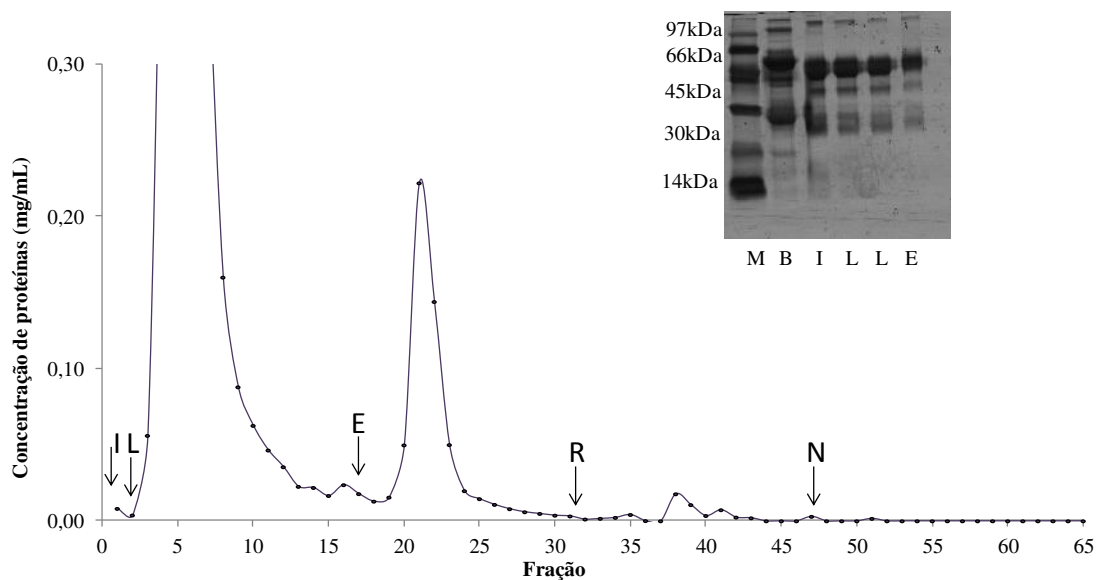


Figura B2- Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas dos fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 2,0 mL (3,71 mg), (L) Lavagem: Mes 25 mmol/L pH 6,5; (E) Eluição: Mes 25 mmol/L, imidazol 300 mmol/L pH 6,5; (R) Regeneração: EDTA 50 mmol/L. (N) NaOH 25 mmol/L; SDS-PAGE gel a 12,5% (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (M) Marcador de baixa massa moléculas; (B) Marcador de alta massa molecular.

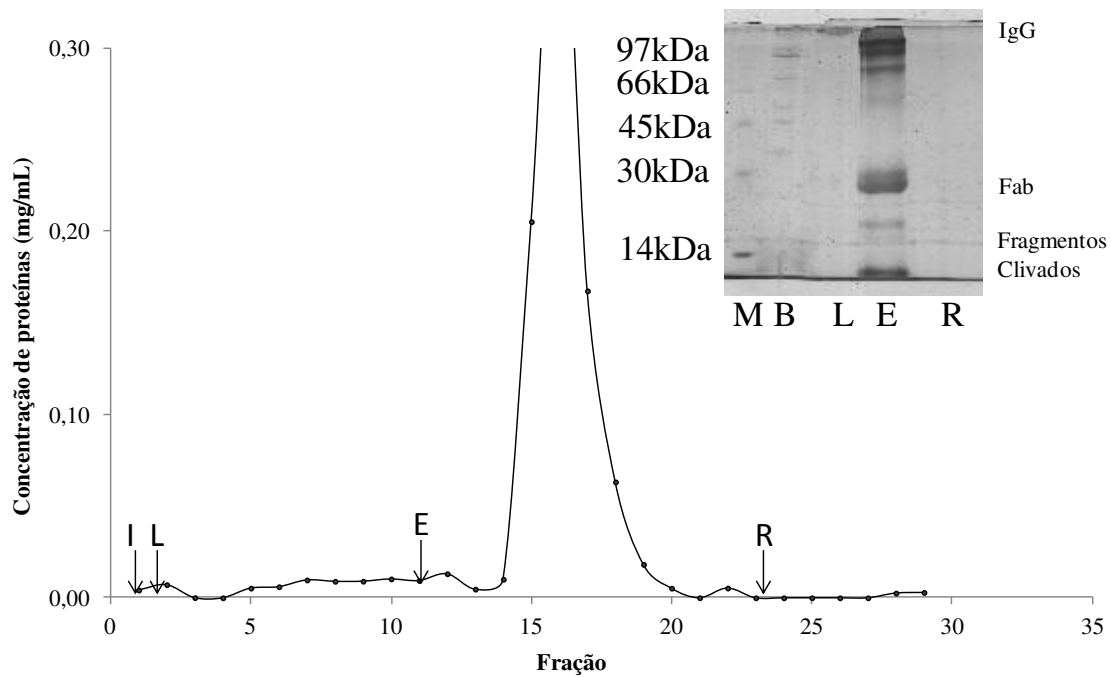


Figura B3 - Perfil cromatográfico e eletroforético das frações cromatográficas dos fragmentos Fab em agarose-IDA-Ni(II). Volume do leito: 3,0 mL. Vazão: 0,5 mL/min. Frações coletadas: 1,0 mL. (I) Injeção: 3 mL (0,33 mg de Fab/mL), (L) Lavagem: fosfato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 7,5; (E) Eluição: acetato de sódio 25 mmol/L, NaCl 1 mol/L pH 4,0; (R) Regeneração com EDTA 50 mmol/L pH 7; SDS-PAGE gel a 12,5% (L) *Pool* das frações de lavagem; (E) *Pool* das frações de eluição; (R) *Pool* das frações de regeneração; (M) Marcador de baixo massa moléculas; (B) Marcador de alta massa molecular

APÊNDICE C

Neste apêndice está apresentando a curva de calibração utilizada para todos os experimentos de imunodifusão radial realizado neste trabalho.

Tabela C1- Valores típicos utilizados para a cura de calibração de Fab humano e diâmetros de alo obtidos no experimentos de imunodifusão radial

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro (mm)
40,9	9,5
81,7	14,5
163,4	16,0
245,0	19,3
489,9	20,0
653,2	21,5

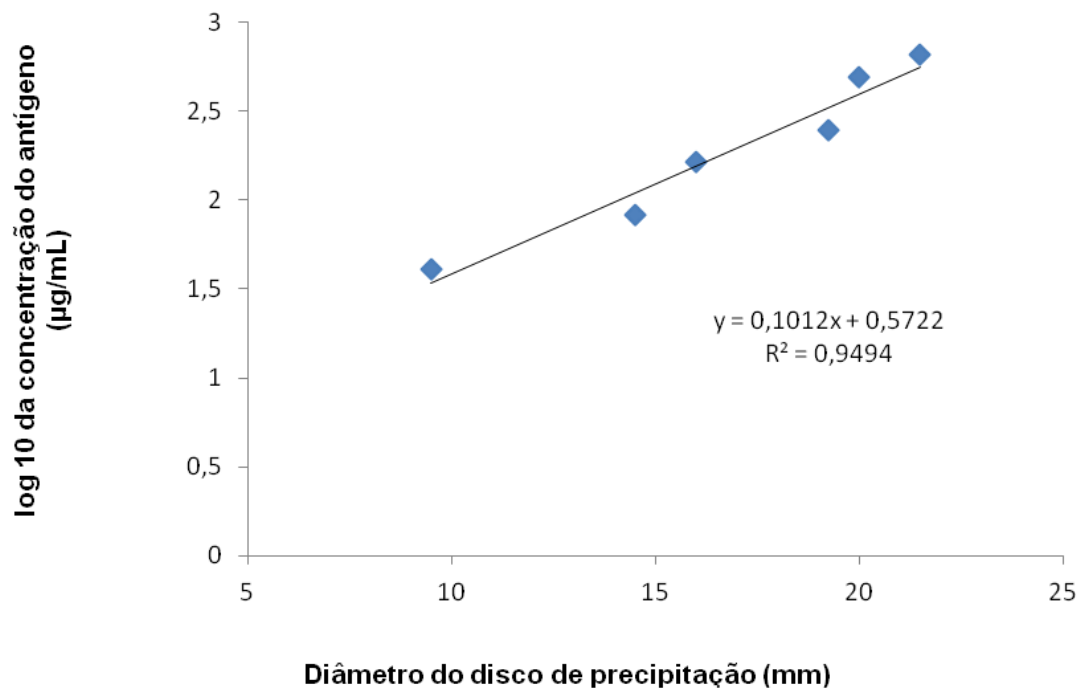


Figura C1- Curva de calibração típica para os experimentos de imunodifusão radial