

Jane Cristina Rodrigues da Cruz

*Minimização da formação de B-30 Destreonina Insulina
durante a conversão enzimática da Proinsulina em
insulina por Tripsinólise*

BELO HORIZONTE

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS/UFMG

2010

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas

Minimização da formação de B-30 Destreonina
Insulina durante a conversão enzimática da
Proinsulina em insulina por Tripsinólise

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção da titulação de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Jane Cristina Rodrigues da Cruz
Orientador: Marcelo Matos Santoro

BELO HORIZONTE

UFMG

2010

043

Cruz, Jane Cristina Rodrigues da.

Minimização da formação de B-30 Destreonina Insulina durante a conversão enzimática da Proinsulina em insulina por Tripsinólise [manuscrito] / Jane Cristina Rodrigues da Cruz. - 2010.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Marcelo Matos Santoro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Bioquímica e imunologia - Teses. 2. Insulina - Teses. 3. Proinsulina. 4. Anidrido maleico - Teses. I. Santoro, Marcelo Matos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1

À Deus.

Aos meus amados pais, Valter e Marília, que sempre lutaram comigo pelos meus sonhos...Pai, se para nascer já foi tão surpreendente não seria diferente tornar a vida um pouco mais divertida! Mãe, nunca irei partir porque estou no seu coração, bem pertinho de você! Contem sempre comigo! Amo vocês.

Aos meus irmãos, Angelo e Renan, a Tia Lourdinha e a Vovó Ana pelo carinho, apoio, acolhimento e boas gargalhadas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao professor Marcelo Matos Santoro, a Dra. Mariza Pereira Xavier, Dra. Heloisa Tunes e ao Dr. Luciano Vilela, pelo apoio, incentivo e crescimento profissional durante a construção dessa dissertação.

Ao Jamil, exemplo de competência, amizade e amor à pesquisa.

As professoras Vera Lúcia dos Santos e Glória Regina Franco, por tantas oportunidades e por me apresentarem ao mundo da pesquisa.

Ao Thiago e a família Barcelos pela amizade, carinho e apoio.

A Samara Rabelo, Thaís Castro, Jorge Martins, Fernando de Souza, Vinício Tadeu, Marina Batista, William Regis, Jacqueline Barbosa, Elaine Cabral, Priscila Lalli, Turma de Bases 2009 UFMG, pelo empenho na realização dos experimentos, deliciosas gargalhadas, bons cafezinhos e pelo multidisciplinar grupo de discussões.

Aos professores Marcos Eberlin, Fábio Gozzo, Luciano Paulino da Silva e Marcelo Bemquerer pelas diversas colaborações, treinamentos em espectrometria de massa, discussões científicas e por me acolherem nos seus laboratórios.

À Embrapa CENARGEM e à UNICAMP pelo intercâmbio e transferência de conhecimentos.

À Família EJC que sempre me proporcionou momentos de carinho, amor e muita alegria.

Aos demais colegas de laboratório, pela convivência.

Aos colegas do LGB por serem não somente um grupo de pesquisa mas uma grande família.

À empresa Biommm S.A. por apostar na excelência e competência que a UFMG têm para com a capacitação dos seus alunos confiando ao LEFQP o trabalho desenvolvido nessa dissertação.

À Capes, pela bolsa concedida.

Muito Obrigada.

“Renda-se como eu me rendi.

Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.

Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.

Temos sempre a tendência de ver coisas que não existem,

e ficar cegos para as grandes lições que estão diante de nossos olhos.

Em toda parte, aquele que ama segue à frente daquele que simplesmente sabe.”

Clarice Lispector

Sumário

Lista de Tabelas.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	XII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
1.Introdução.....	1
1.1 Diabetes doença crônica não transmissível.....	2
1.2 Insulina: Um breve Histórico.....	5
1.3 Insulina: estrutura.....	8
1.4 Insulina Natureza química.....	9
1.5 A expressão Gênica da Insulina Humana.....	11
1.6 Proinsulina à Insulina: obtenção, conversão enzimática e purificação.....	12
1.7 Bloqueio reversível de grupos ϵ -amino.....	19
1.8 Espectrometria de Massas Aplicada a Análise de Proteínas.....	21
1.9 <i>Fingerprinting</i> e Espectrometria de Massa.....	24
1.10 Insulina Humana Recombinante: Produção em larga escala.....	26
2. Objetivos.....	29
3. Parte Experimental.....	30
3.1 Materiais.....	30
3.1.1 Cadeia B Insulina Humana.....	30
3.1.2 Insulina Humana Recombinante.....	31
3.1.3 Preparo de Cadeia A e Cadeia B de Insulina Humana Recombinante.....	32
3.1.4 Proinsulina Humana Recombinante.....	32
3.1.5 Conversão enzimática.....	34
3.1.6 Atividade enzimática durante a conversão.....	34
3.1.7 Espectrometria de Massa.....	36
3.1.8 Planejamento experimental e análise de dados.....	38

4.Resultados e Discussão.....	39
4.1 Digestão enzimática teórica.....	39
4.2 Caracterização da Cadeia B de Insulina Biommm S.A.....	43
4.3 Reação de redução das pontes dissulfeto da Insulina Humana Recombinante: Cadeia A e B.....	47
4.4 Reação de bloqueio de grupos ϵ -amino.....	51
4.5 Caracterização da amostras de Proinsulina Humana Recombinante.....	58
4.6 Atividade enzimática durante a conversão de Proinsulina modificada com 2,3-dimetilmaleico e não modificada.....	61
4.7 Conversões enzimáticas e a formação de B-30 Destreonina Insulina.....	63
4.8 Espectrometria de massa dos intermediários da conversão enzimática.....	69
5. Conclusão.....	80
6. Perspectivas.....	81
7. Referências Bibliográficas.....	82
Anexo I.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1- Lista de países com maior número estimado de casos de Diabetes para os anos de 2000 e 2030.....	4
Tabela 2-Diferenças nas estruturas primárias de Insulina de vaca, porco, ovelha e homem.....	7
Tabela 3-Programa para cromatografia HPLC de purificação da cadeia B de Insulina Humana.....	31
Tabela 4- Programa para cromatografia HPLC de purificação de Insulina Humana.....	32
Tabela 5- Programa para cromatografia HPLC de purificação de Proinsulina Humana.....	33
Tabela 6- Cálculo de rendimento da reação de conversão enzimática da Proinsulina e Proinsulina após modificação com anidrido 2,3-dimetilmaleico à Insulina. A= área do pico cromatográfico, DT= Destreonina Insulina e xi= elemento não caracterizado.....	69

Lista de Figuras

Figura 1-Arranjo estrutural da Insulina Humana. Resíduos encontrados na região de hélice da cadeia A (laranja) e B (azul). As duas cadeias são unidas via modificação pós-traducional que inclui formação de pontes dissulfeto (amarelo) na proteína na sua forma ativa mostrada sobre os ângulos de 180° e 90° no eixo y.....	8
Figura 2- Sequência primária de Insulina Humana por Smith 1985.....	10
Figura 3- Sequência de aminoácidos da Proinsulina Humana cujo gene está inserido no vetor de <i>e.coli</i> patenteado pela empresa Biomm S.A. Em azul está representada a cauda de Histidina, em vermelho a cadeia B, em branco o peptídeo C e em amarelo a cadeia A. O destaque em verde se faz para as Lisinas e preto para as Argininas ambos sítio alvo da Tripsina.....	12
Figura 4–a) Percurso de conversão proteolítica de Proinsulina à Insulina no organismo Humano e b) esquema de conversão de Proinsulina à Insulina no percurso citado Walsh, 2004.....	13
Figura 5- Tríade catalítica da família Serino Protease composta por Histidina 57, Serina 195 e Aspartato 102.....	16
Figura 6- (a) Pontos de clivagem tríptica na Insulina suína, (b) octopeptídeo sintético de Insulina Humana por Wals.1994.....	18
Figura 7- Clivagem Teórica com Tripsina e Carboxipeptidase B da molécula de Proinsulina.....	18
Figura 8- Exposição dos resíduos alvos da Insulina Humana na reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico. Lisina 28 (vermelho) e Fenilalanina 1 (verde) na cadeia B e Glicina 1 (amarela). PDB 2KJJ.Rotação das figuras: 0° de 180° eixo x.....	20
Figura 9- Exposição dos resíduos alvos da reação de bloqueio em Proinsulina Humana. Fenilalanina 1(verde) N-terminal, ε-amino de Lisina 64 e 28 (amarelo) respectivamente. PDB 2KQP.Rotações das figuras: 0°,270° eixo x e 45° eixo y respectivamente.....	20
Figura 10- a) Peptídeo/amostra e matriz (DHB,αciano,etc), b) Fonte de ionização a laser assistida por matriz.....	23
Figura 11– Esquema do processo de ionização por Fonte Eletrospray.....	24
Figura 12- Esquema geral para análise de amostras do tipo <i>fingerprinting</i>	25
Figura 13- Cálculo teórico gerado pelo software Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica de Insulina sem pontes de dissulfeto e com ponte de dissulfeto S-S, antes e após reação de bloqueio ε- amino.....	39
Figura 14- Cálculo teórico gerado pelo software Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica de Insulina após reação de bloqueio ε-amino.....	40
Figura 15- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica Cadeia A de Insulina Humana.....	41

Figura 16- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica da Cadeia B de Insulina Humana após reação de bloqueio do grupo ε-amino.....	41
Figura 17- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica da Proinsulina Humana.....	42
Figura 18- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica da Proinsulina Humana após reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico.....	43
Figura 19- Espectro full scan da amostra de cadeia B de Insulina Humana Recombinante ,obtido por Maldi TOF MS, onde são respectivamente encontrados os íons de m/z 3429.70[M+H] ⁺ , 2487.11[M+H] ⁺ , 1852.85[M+Na] ⁺ , 1829.86[M+H] ⁺ , 881.44[M+Na] ⁺ e 859.36[M+H] ⁺	44
Figura 20- <i>Sequenciamento de novo</i> do íon m/z 3428.78, Delta de sequenciamento equivalente a -0,89, obtido por espectrometria MSMS Maldi TOF. A sequência obtida corresponde à cadeia B de Insulina Humana.....	45
Figura 21- <i>Sequenciamento de novo</i> íon m/z 2487.11, Delta de sequenciamento equivalente a 0,04, obtido por espectrometria MSMS Maldi TOF. A sequência obtida corresponde à cadeia B clivada entre os resíduos B22-23B de Insulina Humana.....	45
Figura 22- Sequenciamento de novo do íon m/z 1829.86. Delta do sequenciamento 0,18. Espectro obtido por Maldi TOF MS.....	47
Figura 23- Perfil Cromatográfico da Insulina Humana Recombinante.....	48
Figura 24- Espectro de massa obtido por Maldi TOF MS de Insulina Humana Recombinante lote MLR 462.....	49
Figura 25- Perfil cromatográfico da reação de redução com DTT da amostra Insulina Humana Recombinante.....	49
Figura 26- Perfil MS da amostra Insulina Humana Recombinante lote MLR462, íons encontrados 2382.09 da cadeia A e 3427.69 da cadeia B obtidos por Maldi TOF MS. Valores teóricos Cadeia A m/z média 2838.73 monoisotópica 2382.00 e Cadeia B 3429.97 m/z média e monoisotópica 3427.68.....	49
- Perfil de isotopólogos de cadeia A e B de Insulina Humana Recombinante obtidos por Maldi TOF MS.....	50
Figura 28- Espectro do sequenciamento em Tandem cadeia A m/z 2383.76 e sequenciamento de novo obtido por Maldi TOF MSMS.....	50
Figura 29- Cromatograma de purificação em HPLC, a) reação de anidrido citracônico e cadeia B de Insulina, b) reação de anidrido 2,3-dimetilmaleico e cadeia B de Insulina.....	51
Figura 30-Espectro após reação de bloqueio da Cadeia B com anidrido 2,3-dimetilmaleico.....	53

Figura 31- Mecanismo de bloqueio do grupo ϵ -amino de Lisina com anidrido 2,3-dimetilmaleico proposto por Dixon em 1968.....	54
Figura 32- Deslocamento de m/z de 3428 para 3539 após a modificação química com anidrido 2,3-dimetilmaleico. Calculo teórico m/z da Cadeia B de Insulina Humana 3427.68 e em reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico m/z 3539,08.....	54
Figura 33- Perfil cromatográfico da amostra de Insulina Humana Recombinante após reação de bloqueio com anidrido 2,3-dimetilmaleico.....	54
- Espectro MS obtido por Maldi TOF da Insulina MLR462 após reação com 2,3-dimetilmaleico. Íons encontrados com m/z 5805.7, 5917.9 e 6035.7. Os cálculos teóricos para a Insulina Humana Recombinante é de m/z 5806.6, adição de um grupo 2,3-dimetilmaleico m/z 5936.81 e adição do segundo grupo 2,3-dimetilmaleico m/z 6047.91.....	55
Figura 35- Espectro <i>full scan</i> dos íons multicarregados 1936.58[M+3H] ⁺ , 1972.95[M+3H] ⁺ , 1479.67[M+4H] ⁺ , 1452.66[M+4H] ⁺ , 1162.69[M+5H] ⁺ e 1183.94[M+5H] ⁺ obtidos por Q-TOF MS da Insulina após reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico.....	59
Figura 36- Espectro MS Maldi TOF da Proinsulina Humana Recombinante HGUT0045, m/z 10616.48[M+H] ⁺ e 5313.32[M+2H] ⁺	59
Figura 37- Espectro Q-TOF MS da Proinsulina Humana Recombinante com íons multicarregados m/z 1788.14[M+6H] ⁺ , 1518.84[M+7H] ⁺ , 1329.14[M+8H] ⁺ , 1181.52[M+9H] ⁺ , 1063.47[M+10H] ⁺	60
- Espectro Maldi TOF MS da Proinsulina Humana Recombinante após a reação de bloqueio de grupos amino livres.Íons encontrados 10742.71[M+H] ⁺ e 5370.96[M+2H] ⁺	62
Figura 39- Curva de atividade enzimática da Tripsina durante a conversão trípica de Proinsulina à Insulina em tampão (pH 8,3). Medidas de absorbância em λ 410nm coletadas por 310s a cada 1 hora	62
Figura 40- Curva de atividade enzimática da Tripsina durante a conversão trípica de Proinsulina modificada com 2,3-dimetilmaleico á Insulina em tampão (pH 8,3). Medidas de absorbância coletadas por 310s. a cada 1 hora.....	63
Figura 41- Gráfico de Hidrofobicidade Kyte-Doolittle para a Insulina sem modificação e após modificação com anidrido 2,3-dimetilmaleico.....	70
Figura 42- Espectro <i>full scan</i> da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B no tempo Zero da curva de conversão a) Proinsulina HGUT0045 em reação com 2,3-dimetilmaleico e b) Proinsulina HGUT0045.....	72
Figura 43- Espectro <i>Full scan</i> da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B após 2 horas das amostras Proinsulina e Proinsulina + 2,3-dimetilmaleico.....	72
Figura 44- Espectro <i>Full scan</i> da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase após 4 horas nas amostras Proinsulina e Proinsulina+ 2,3-dimetilmaleico.....	73

Figura 45- Espectro <i>Full scan</i> da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase após 6 horas nas amostras de Proinsulina e Proinsulina + 2,3-dimetilmaleico.....	74
Figura 46- Espectro <i>Full scan</i> conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B após 8 horas para a amostra de Proinsulina.....	75
Figura 47- Componentes da matriz α -Cyano usada nos experimentos identificados na faixa de m/z 50-500 obtidas com Maldi TOF.....	76
Figura 48- a) <i>Full scan</i> obtidos por Q-TOF MS dos íons multicarregados do fingerprinting da conversão tríptica da Proinsulina Humana sob condições Industriais propostas na patente da empresa Biomm S.A; b) <i>Full scan</i> dos íons multicarregados do fingerprinting da conversão Tríptica da proinsulina bloqueada com anidrido 2,3-dimetilmaleico. As setas em preto apontam os íons triplamente e quadruplamente carregados para B-30 Destreonina Insulina e as setas em vermelho o íon para Cauda de Histidina.....	78
Cromatografia 1- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 2 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase: -- Proinsulina; - - Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 2 horas de conversão.....	65
Cromatografia 2- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 4 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B: -- Proinsulina; -- Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 4 horas de conversão.....	65
Cromatografia 3Cromatografia 3- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 6 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B: -- Proinsulina; -- Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 4 horas de conversão.....	66
Cromatografia 4- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 8 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B: -- Proinsulina; -- Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 4 horas de conversão.....	66
Fluxograma 1- Processo industrial de obtenção da Insulina Humana Recombinante Patente US6,281,329 B1 da empresa Biomm S.A.....	27
Fluxograma 2- Planejamento de ensaios e análises proposto para este trabalho.....	38

Lista de abreviaturas

DCNT= Doenças crônicas não transmissíveis

DM= Diabetes Melito

DM1= Diabetes Melito Tipo 1

DM2= Diabetes Melito Tipo 2

PC1= Proteína convertase 1

PC2= Proteína convertase 2

PC3= Proteína convertase 3

CP_H= Carboxipeptidase-H

U= Unidade de atividade

[S]= Substrato

[E]= Enzima

[ES]= Complexo ativado

[V]= Velocidade

MS= Mass spectrometry

FAB= Fast Atom Bombardment

MALDI= Matrix-assisted laser desorption/ionization

EI= Ionização eletrônica

Da= Dalton

ESI= Electrospray

α -Cyano= α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid

SA= Sinapinic acid

DHB= 2,5-dihydroxybenzoic acid

TOF= Time-of-flight (tempo de voo)

MS/MS= espectrometria de massas *tandem* ou sequencial

CID= dissociação induzida por colisão

TFA= ácido trifluoroacético

ACN= Acetonitrila

BApNA= N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide

m/z= massa carga

DTT= Ditioneitol

U= unidade de atividade

Resumo

O presente estudo visou o bloqueio efetivo de grupos ϵ -amino de resíduos de Lisina em cadeia B de Insulina, Insulina e Proinsulina antes das conversões enzimáticas ocasionadas pelo uso combinado de Tripsina e Carboxipeptidase B, limitando o sítio de restrição dessas enzimas ao resíduo de Arginina e assim diminuindo substancialmente a presença do intermediário B-30 Destreonina Insulina durante a produção industrial de Insulina Humana.

A condições propostas são: 100:1 de reagente em relação à amostra em solução tampão Glicina pH 9,0, à temperatura de 23°C com correção imediata do pH. As conversões enzimáticas foram realizadas sob as condições supracitadas e a cada 2 horas de conversão os produtos foram analisados por cromatografia de fase reversa HPLC e espectrometria de massa MALDI-TOFMS/MSMS e Q-TOFMS.

A perfil *full scan* obtido por Maldi TOF detectou a diminuição dos íons relativos à Proinsulina m/z 10633 e o aparecimento do íon m/z 5808 relativo à Insulina. A presença do íon correspondente a B-30 Destreonina não foi verificada quando da análise por Maldi TOF possivelmente pela supressão causada pelos demais íons da amostra em conversão cuja intensidade relativa era alta. Quando analisados por Q-TOF, o perfil do espectro apresentado para Proinsulina bloqueada e não bloqueada com 2,3-dimetilmaleico evidencia a diminuição da intensidade relativa dos íons multicarregados m/z 1902 e 1427 referentes à m/z 5708 sugerindo a presença de B-30 Destreonina Insulina. Como íon referência foi acompanhado a presença do íon de m/z 1256 relativa ao componente cauda de Histidina e que mantém a intensidade relativa nas análises Q-TOF MS das amostras com e sem bloqueio de ϵ -amino corroborando com o tratamento proposto para a minimização da formação do composto B-30 Destreonina Insulina.

Abstract

The present study was conducted at the effective blockade of ϵ -amino group of lysine residues of chain B of Insulin, Insulin and Proinsulin before enzymatic conversions caused by the combined use of Trypsin and Carboxypeptidase B limiting the restriction site of these enzymes to Arginine residues and thus decreasing substantially the presence of intermediate B-30 Destreonin Insulin during the industrial production of human insulin.

The proposed conditions are: concentration of 100:1 reagent over the sample in Glycine buffer pH 9,0, temperature 23°C with immediate correction of pH. The enzymatic conversions were carried out under the above conditions and every two hours of conversion the products were analyzed by reverse phase HPLC chromatography and mass spectrometry MALDI-TOFMS/MSMS and Q-TOFMS.

The full scan profile obtained by Maldi TOF detected a reduction of the ions of Proinsulin m/z 10633 and the increase of the ion m/z 5808 of Insulin. The presence of the ion corresponding to B-30 Destreonin was not observed when the analysis was made by Maldi TOF, possibly due to suppression caused by other ions in the sample conversion whose relative intensity was high. When analyzed by Q-TOF, the conversion profile of the spectrum presented Proinsulin blocked and not blocked with 2,3-dimethylmaleic shows the decrease in relative intensity of multicharger ions m/z 1902 and 1427 related to m/z 5707, suggesting the presence of B -30 Destreonina Insulin. As reference ion was followed by the presence of m/z 1256 for the component Histidine tail that keeps the relative intensity of the Q-TOF MS analysis of samples with and without blocking ϵ -amino corroborating with the proposed treatment for minimization of the formation of B-30 Destreonina Insulin compound.

1 Introdução

1.1 Diabetes: doença crônica não transmissível

As transições demográfica, nutricional e epidemiológica, identificadas no século passado, determinaram um perfil de risco em que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), por serem altamente prevalentes, de alto custo social e grande impacto na morbimortalidade da população brasileira e do mundo, assumissem assim, um papel importante de ônus crescente e preocupante para os governantes (*Ministério da Saúde,2004*).

O conhecimento sobre a epidemiologia de DCNT, tratamentos e metodologias para estudos de tendência originaram-se nos países desenvolvidos da América do Norte e Europa. Também deles procedem os conhecimentos sobre prevenção e controle. Hoje, por diversas razões, os países em desenvolvimento estão reproduzindo, de modo muito acelerado, a história das DCNT dos países desenvolvidos, com um agravante: a maior parte da população de todos eles convive com a pobreza e com imensas desigualdades sociais. Em relação ao Brasil as dificuldades em lidar com essas doenças têm um desafio a mais: a dimensão continental do país para implementar programas abrangentes para a DCNT (*LESSA,2004; Moakdad,2001*).

A partir dos últimos anos da década de 1990 e neste início do século 21, a prevenção para DCNT, em especial das cardiovasculares seguidas do sobrepeso e obesidade, vem sendo preocupação de várias organizações internacionais, enfatizando os chamados países do Terceiro Mundo (*WHO,2001; WHO,2002;WHO,2003; Moakdad,2001*).

Aproximadamente a quatro décadas os brasileiros convivem com o excessivo aumento da mortalidade pelo diabetes. No contexto epidemiológico e social do Terceiro Mundo, as previsões futuras para o Brasil, em relação às DCNT, até o momento, são

sombrias. Persistem as políticas de saúde do País em optar maciçamente pela medicina curativa, pelo atendimento e tratamento das DCNT em serviços de urgência, emergência ou sob hospitalizações. O custo elevado dessas opções, obviamente reconhecido, não favorece as mudanças desejáveis. Esse é um aspecto já bastante conhecido daqueles que lidam com DCNT, dependente da burocracia, de difícil resolução, impedindo a prática da promoção e proteção da saúde (*Lessa, 2004*).

Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome clínica heterogênea que se caracteriza por anormalidades endócrino-metabólicas que alteram a homeostase metabólica no homem. As anormalidades endócrinas tem como elemento fundamental uma deficiência insulínica absoluta ou relativa, que causa importantes transtornos no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas do organismo humano. Estas anormalidades metabólicas determinam o aparecimento de sintomas e sinais clínicos típicos da síndrome diabética (poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso corporal). A investigação laboratorial de diabetes e sua classificação em tipos clínicos foram padronizados pelo National Diabetes Data Groups (1979) e Organização Mundial de Saúde. O diagnóstico laboratorial de diabetes baseia-se então na determinação de glicemia de jejum e quando indicado na realização de um teste de tolerância a glicose (OGTT-75g), seguindo técnica padronizada e bem definida. A classificação dos pacientes diabéticos envolve critérios clínicos, etiopatogênicos, fisiopatológicos e evolutivos; caracterizando 4 classes clínicas de diabetes: tipo I(DM 1) ou insulino-dependente, tipo II(DM 2) ou não insulino-dependente, III(DM 3) - outros tipos de diabetes e o diabetes gestacional. Define-se ainda um grupo de pacientes não diabéticos mas com diminuição da tolerância a glicose e 2 grupos de indivíduos com tolerância a glicose normal mas com algum risco estatístico para o Diabetes Mellitus (*Foss, 1989*).

O Diabetes Mellitus, configura-se hoje como epidemia mundial, representando grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo (Lessa,2004;MS 2006). A prevalência de DM está aumentando por causa do crescimento e do envelhecimento populacional, maior urbanização, crescente prevalência da obesidade, sedentarismo e maior sobrevida do paciente diabético. Em 1995, o DM atingia 4% da população adulta mundial e que, em 2025, alcançará o montante de 5,4%, visto que nos países em desenvolvimento será observado em todas as faixas etárias, com predominância para grupos etários mais jovens, em comparação aos países desenvolvidos. Nestes últimos, o aumento ocorrerá principalmente na faixa etária de 45 a 64 anos (Ferreira,2009). Perspectivas recentes avançam na estimativa do número de indivíduos diabéticos, projetando incremento de, aproximadamente,334 milhões no mundo sendo no Brasil 11,3 milhões (Tabela 1) de pessoas para o ano de 2030, dos quais 90% apresentarão diabetes tipo 2 (DM2) (Wild,2004).

Ranking	2000		2030	
	Country	People with diabetes (millions)	Country	People with diabetes (millions)
1	India	31.7	India	79.4
2	China	20.8	China	42.3
3	U.S.	17.7	U.S.	30.3
4	Indonesia	8.4	Indonesia	21.3
5	Japan	6.8	Pakistan	13.9
6	Pakistan	5.2	Brazil	11.3
7	Russian Federation	4.6	Bangladesh	11.1
8	Brazil	4.6	Japan	8.9
9	Italy	4.3	Philippines	7.8
10	Bangladesh	3.2	Egypt	6.7

Tabela 1- Lista de países com maior número estimado de casos de Diabetes para os anos de 2000 e 2030. Fonte: Wild, 2004.

Várias são as medidas de prevenção possíveis à DM e por isso constituem prioridades para a saúde pública no mundo. Segundo o Ministério da Saúde e a Sociedade Brasileira de Diabetes (Ferreira,2009; SBD,2006),a prevenção pode ser

realizada mediante a identificação de indivíduos em risco (prevenção primária), cujo objetivo é proteger indivíduos suscetíveis de desenvolver o DM e tem impacto por reduzir ou retardar tanto a necessidade de atenção à saúde quanto tratar as complicações da doença (*Ferreira,2005*), identificação de casos não diagnosticados (prevenção secundária) e pelo tratamento dos indivíduos já afetados pela doença, de forma a prevenir complicações agudas e crônicas (prevenção terciária).

Na rede pública de saúde do Brasil, cerca de 80% dos casos de DM2 podem ser atendidos predominantemente nos serviços de atenção básica, enquanto os casos de DM1 requerem maior participação de especialistas (atenção secundária ou terciária), em virtude da complexidade de seu acompanhamento (*Ferreira,2009*).

Pacientes com DM1 depende de administração exógena de insulina para sua sobrevivência. O melhor tratamento clássico baseia-se em 3-4 injeções subcutâneas de insulina por dia, uma intensiva insulino terapia. Este tratamento é responsável por 35-90% da redução do risco de retinopatia, nefropatia e neuropatia comparada com o tratamento convencional com 1-2 injeções por dia (*Couri,2006*).

1.2 Insulina: Um breve Histórico

Antes dos pesquisadores descobrirem como produzir a insulina, as pessoas que sofriam de Diabetes Mellitus 1(DM1) não tinham nenhuma chance para uma vida saudável. Então, em 1921, cientistas canadenses Frederick G. Banting e Charles H. purificaram insulina do pâncreas de um cão. Ao longo dos anos os cientistas fizeram uma melhoria contínua na produção de insulina. Em 1936, foi descoberta uma forma de liberação mais lenta de insulina no sangue e para isso, foi feito o acoplamento de uma proteína encontrada no esperma de peixes, chamada de protamina, cujo consumo é lento no organismo (*Dinsmoor,2001*).

Em meados de 1950 a estrutura primária (sequência de aminoácidos) contida na molécula de insulina foi completamente elucidada pelo biólogo britânico e ganhador do Prêmio Nobel de Química de 1958, Frederick Sanger. Pela primeira vez, a estrutura de uma proteína fora completamente determinada, mas, ainda faltava a estrutura espacial, que foi compreendida e demonstrada em 1964 por Dorothy Crowfoot Hodgkin, Premio Nobel de 1964, mediante estudos de difração de raios X (*Les Prix Nobel, 1959, Nobel Lectures, 1972*).

Diante de tais fatos e elucidações, pesquisadores produziram pela primeira vez uma insulina sintética nos laboratórios de Panayotis Katsoyannis da Universidade de Pittsburgh e Zahn Helmut na RWTH Aachen University em 1960 (*Fritz 1964, Federwisch 2002*). Na década de 1970, os pesquisadores começaram a tentar produzir um composto sintético que fosse o mais próximo da insulina natural e que sua liberação fosse mais lenta, com picos atenuados durante as refeições (*Dinsmoor, 1964*). Muitos pesquisadores continuaram suas pesquisas por uma melhor insulina, mas o método básico de produção permaneceu sem grandes avanços por décadas.

A insulina foi extraída e purificada do pâncreas de bovinos, suínos e caprinos. A estrutura química da insulina nestes animais é apenas ligeiramente diferente da Insulina Humana como demonstrado na tabela 2, e por isso ela funciona tão bem no corpo humano, embora algumas pessoas tenham respostas imunes negativas ou reações alérgicas (*Ophardt 2003, Dinsmoor, 2001*).

Organismo	Posição na Cadeia A 8-----9-----10	Posição na Cadeia B 30
Humano	-Thr-Ser-Ile-	Thr
Vaca	-Ala-Ser-Val-	Ala
Porco	-Thr-Ser-Ile-	Ala
Ovelha	-Ala-Gly-Val-	Ala

Tabela 2- Diferenças nas estruturas primárias de insulina de vaca, porco, ovelha e homem.

Estas diferenças, no entanto, não são significativas na estrutura final e na ação da insulina e, portanto, os seres humanos podem usar todos os três tipos. No entanto, nenhum dos três tipos é tão eficaz como a Insulina Humana (*Ophardt 2003*).

Em meados de 1977, com os avanços da Biologia Molecular e surgimento da era Biotecnológica, foi possível iniciar a síntese de Insulina Humana Recombinante, um processo bioquímico multidisciplinar. A primeira Insulina Humana geneticamente modificada foi produzida em laboratório por Herbert Boyer, 1977, utilizando *Escherichia coli*, uma bactéria não patogênica. Em parceria com a Genentech, fundada por Boyer, Eli Lilly, em 1982, chega ao mercado a primeira Insulina Humana biossintética sob a marca Humulin (*Tof, 1994*). Atualmente, a grande maioria das insulinas disponíveis em todo o mundo são biossintéticas Recombinantes ou análogos de insulina.

No Brasil, na década de 1990, a Empresa Biobrás, única fabricante nacional e quarta maior do mundo naquela época, passou a produzir além da Insulina animal, a Insulina Humana em larga escala em conformidade com as normas e exigências da Organização Mundial de Saúde, a Food and Drug Administration E.U. e outras

autoridades reguladoras, detendo um montante de 73% do mercado nacional de insulinas cujo restante do montante era dividido entre os dois maiores fabricantes de insulina mundiais, Lilly e NovoNordisk, que importavam o produto. Em 1997 a Biobrás faturou R\$ 44,7 milhões, sendo R\$ 38,7 milhões referentes às vendas no mercado interno e R\$ 6 milhões provenientes das exportações. A insulina da empresa era exportada para o Mercosul, Coréia, Índia, Rússia e outros países do Leste Europeu (Marques 1998).

1.3 Insulina: estrutura

Insulina é um hormônio polipeptídico secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e composto por duas cadeias de aminoácidos: cadeia A e B que unidas por pontes de dissulfeto. A insulina é essencial para o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (Kobayash,2008. Kansra.2000. Brobeck,1976).

Na figura 1 são apresentadas estruturas nas quais as cadeias A e B são encontradas na Insulina e isoladamente.

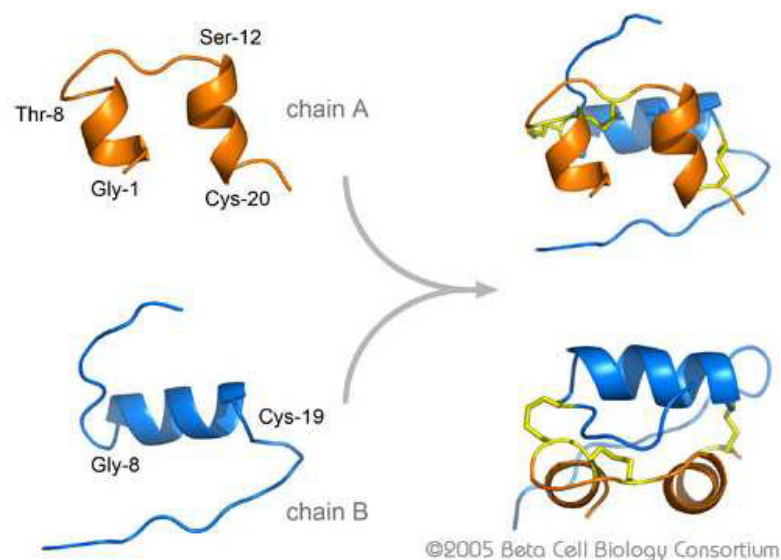


Figura 1- Arranjo estrutural de Insulina – Resíduos encontrados na região de hélice da cadeia A (laranja) e B(azul). As duas cadeias são unidas via modificação pós-traducional que inclui a formação de pontes dissulfeto (amarelo) na proteína na sua forma ativa mostrada sobre os ângulos de 180° e 90° eixo y.

Sem insulina, a glicose se acumula no sangue e as células são acometidas de falta da sua principal fonte de energia. Alguns dos sintomas que podem ocorrer incluem fadiga, infecções constantes, visão desfocada, dormência, formigamento nas mãos ou pernas, aumento da sede e retardo na cicatrização de feridas ou cortes. Diante dessa situação as células tem a rota metabólica de ácidos graxos ativada sendo esta uma fonte de energia armazenada para situações de emergências. Quando isso acontece por um longo período de tempo, o fígado libera grandes quantidades de corpos cetônicos, produto da via metabólica de ácidos graxos, que acidificam o sangue e podem causar alterações da consciência, levando ao coma (*Dinsmoor,2001*).

A descoberta da insulina esteve intimamente ligada ao conhecimento da natureza da Diabetes Mellitus (*Brobeck,1976*), uma vez que para tratar pacientes diabéticos era necessário o desenvolvimento de insulino terapia, quem vem sendo utilizada desde 1922 quando o primeiro paciente foi submetido a tratamento feito por Banting e Best. No entanto, isto não constituiu uma cura e nem previne o aparecimento de complicações crônicas deletérias (*Kobayash,2008*).

1.4 Insulina: Natureza química

A insulina é uma molécula globular de peso molecular 5808 Daltons, composta por duas cadeias de aminoácidos: cadeia A que tem 21 aminoácidos e cadeia B que tem 30 aminoácidos. As duas cadeias são unidas por pontes de dissulfeto entre duas cisteínas CYS A7 e CYS B7 e CYS A20 e CYS B19. Adicionalmente uma ponte dissulfeto intracadeia conecta CYS A6 e CYS A11 forma um anel dissulfídico intracadeia (*Smith 1985*), como mostra a Figura 2.

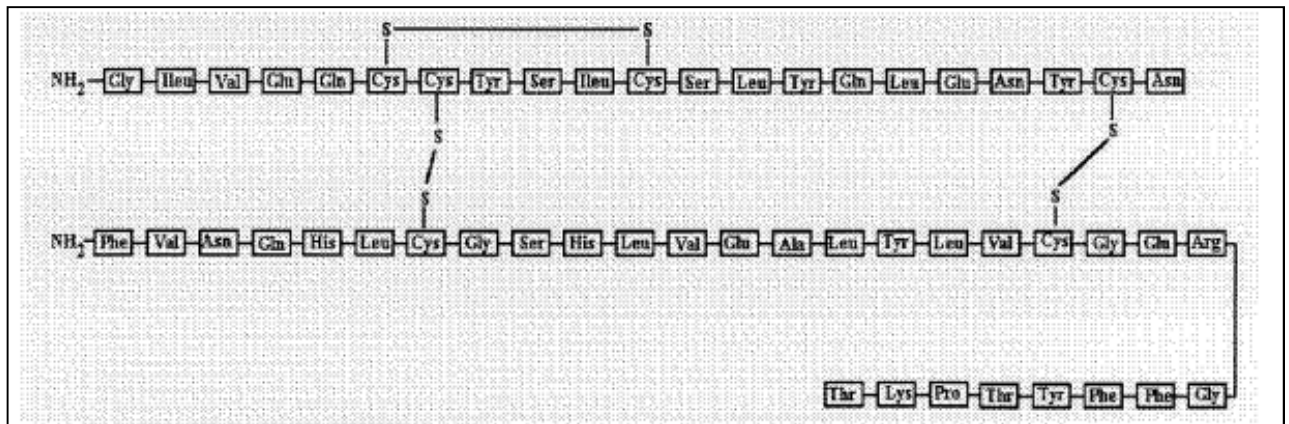


Figura 2- Sequência primária de Insulina Humana por Smith 1985

Este hormônio contém uma alta proporção de resíduos hidrofóbicos e prontamente se associam em solução para formar dímeros, e sob certas condições, polímeros. No organismo, a insulina é produzida e armazenada como um hexâmero (uma unidade de seis moléculas de insulina), enquanto a forma ativa é o monômero (Dunn 2005).

O hexâmero é uma forma inativa, com estabilidade a longo prazo, que serve como uma forma de manter disponível e protegida a insulina altamente reativa. A conversão de hexâmero a monômero é um dos aspectos centrais das formulações de insulina injetável. Por ser o hexâmero muito mais estável que o monômero este é desejável por razões práticas, no entanto o monômero é uma droga muito mais rápida porque a taxa de difusão é inversamente relacionada ao tamanho da partícula. A rápida reação de drogas significa que as injeções de insulina não tem que preceder as refeições por hora, o que dá mais flexibilidade aos diabéticos em sua programação diária (Dunn 2005).

A atividade da insulina parece estar relacionada intimamente com uma forma tridimensional peculiar, determinada por sua estrutura primária de aminoácidos. Esta

forma tridimensional é estabelecida pelas ligações de dissulfeto e a perda biológica ocorre quando essa ligação é quebrada (desnaturação) por calor excessivo ou exposição a bases e álcalis, mesmo que não haja mudança na estrutura primária da proteína. Essas pontes dissulfeto são também biologicamente importantes e a sua ruptura por agentes redutores resultará na perda total da eficiência da insulina (*Brobeck, 1976*).

1.5 A Expressão Gênica da Insulina Humana

O gene da insulina é expresso em altos níveis no interior de células β do pâncreas, constituído por aproximadamente 340pb. Vários elementos glicose responsivos tem sido identificados nesta região e a regulação fisiológica da expressão desses genes depende da cooperatividade e sinergismo das interações entre fatores ligantes de DNA e coativadores. A glicose é o maior regulador da expressão gênica de insulina, ela ativa a transcrição e estabiliza RNA mensageiro (mRNA) de insulina. Adicionalmente, a expressão desse gene pode ser estimulada pelo peptideo1 glucagon-like, hormônio de crescimento e hormônios lactogênicos e inibido por epinefrina, somatostatina, glucagon e leptina (*Poitout, 2003*).

A tradução do mRNA de Proinsulina à proteína preProinsulina ocorre de forma típica em muitos eucariotos. Em geral, os nutrientes que estimulam a secreção de insulina, no qual glicose é o mais fisiologicamente relevante, também estimula a biossíntese de Proinsulina a nível traducional. O controle específico de glicose induzindo a biossíntese de Proinsulina nas células β reside nos elementos cis das regiões 5'e 3'-UTR do mRNA de preProinsulina. Em seguida a Proinsulina é translocada ao lúmen do retículo endoplasmático rugoso onde o enovelamento correto da Proinsulina é feito e a proteína pode então ser enviado através de vesículas de transporte para o complexo de Golgi na porção cis (*Poitout, 2003*).

O principal local para a transformação da Proinsulina biologicamente ativa é o compartimento de grânulos imaturos das células β . A Produção de insulina ocorre através de proteólise limitada da molécula precursora Proinsulina, que é catalisada por duas endopeptidases (proteína convertase 2, PC2, e proteína convertase 3, PC3, também conhecidas como PC-1) e uma exopeptidase C conhecida como carboxipeptidase-H (CP-H) (Poitout,2003).

1.6 Proinsulina à Insulina : obtenção, conversão enzimática e purificação

A Insulina é um hormônio peptídico produzido inicialmente como Proinsulina na membrana do retículo endoplasmático rugoso das β células das ilhotas de Langerhans. A Proinsulina é uma molécula de 10627 Daltons onde se tem Peptídeo C (34 resíduos de aminoácidos) unindo o começo da cadeia A (21 resíduos de aminoácidos) ao final da cadeia B(30 resíduos de aminoácidos) Figura 3. A Proinsulina sofre clivagens proteolíticas nas vesículas secretórias do complexo de Golgi resultando em insulina e peptídeo C, mostrado na Figura 4 (Walsh ,2004;Cruz,1997).

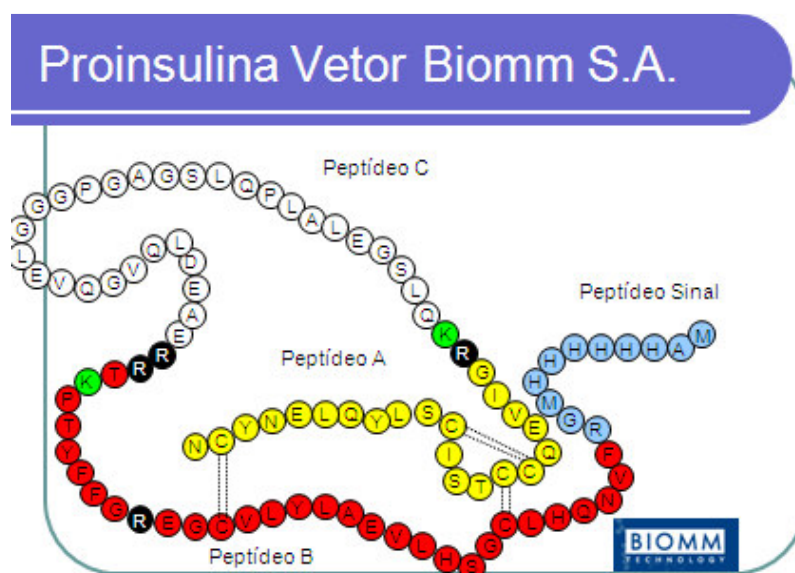


Figura 3- Sequência de aminoácidos da Proinsulina Humana cujo gene está inserido no vetor de e.coli patenteado pela empresa Biommm S.A. Em azul está representada a cauda de Histidina, em vermelho a cadeia B, em branco o peptídeo C e em amarelo a cadeia A. O destaque em verde se faz para as Lisinas e preto para as Argininas ambos sítio alvo da Tripsina.

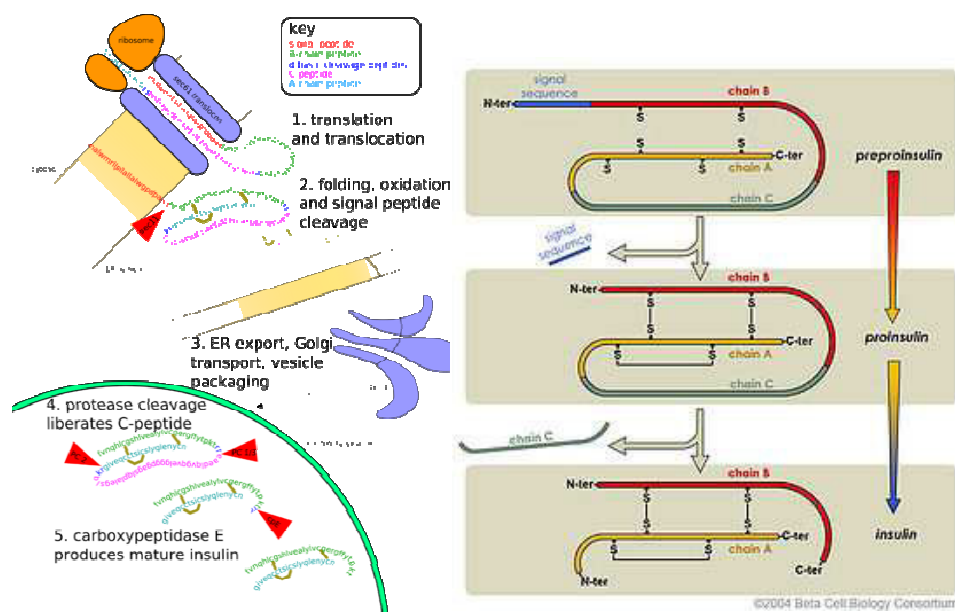


Figura 4 –a) Percurso de conversão proteolítica de Proinsulina à Insulina no organismo Humano e b) esquema de conversão de Proinsulina à Insulina no percurso citado Walsh, 2004.

A insulina administrada em pacientes diabéticos foi, por muito tempo, obtida de pâncreas bovino e suíno saudáveis. A insulina suína é considerada levemente vantajosa em relação à bovina pela sequência de aminoácidos muito semelhante e por isso menos reações imunológicas indesejáveis (Cruz, 1997).

A purificação da insulina bovina e suína, para fins terapêuticos, foi realizado pela primeira vez na década de 1920. Esta purificação consistia na extração da insulina do pâncreas com álcool e ácido e a insulina obtida era muito impura. Em 1926, a Insulina foi cristalizada pela primeira vez mas pouco se entendia sobre o processo de cristalização, o que impossibilitava a cristalização de insulina do extrato bruto do tecido pancreático. Posteriormente, os cristais eram isolados e recristalizados afim de diminuir o elevado teor de contaminantes. A essa insulina recristalizada dava-se o nome de insulina convencional. Embora tal processo de cristalização fosse na verdade uma grande purificação de insulina várias insulinas modificadas permaneciam na insulina

convencional tais como Argenino-insulina, Desamino-insulina, ésteres de insulina e dímeros de insulina, formados no processo de extração com álcool e ácido. Além de insulinas modificadas, o produto final da conversão ainda continham peptídeo C, a Proinsulina e outros peptídeos vasoativos intestinais como o glucagon e a somatostatina. Tal método é considerado relativamente ineficiente para os padrões atuais (Walsh,1994,Cruz,1997).

Os produtos encontrados na insulina convencional afetavam, de lote para lote numa variação de até 25%, a potência da insulina final e frequentemente causavam complicações clínicas quando administradas nos pacientes diabéticos por induzir a produção de anticorpos contra elas, gerando resistência progressiva e aumentando as suas necessidades diárias de hormônio (Walsh,1994, Cruz,1997).

Tal fato se torna extremamente relevante levando em consideração que os pacientes diabéticos necessitam de mais de uma injeção de insulina por dia durante toda a sua vida e a administração repetida de tais compostos imunogênicos podem levar a uma forte resposta imunológica do tipo inflamação e causar abscessos nos locais de aplicação (Walsh,1994).

Desde então, a pesquisa por insulinas mais puras e semelhantes à humana evoluiu muito, esses inconvenientes foram parcialmente sanados através de tecnologia apropriada que passou a produzir insulinas mais puras, diminuindo os efeitos colaterais, principalmente as alergias, a resistência ao hormônio e as lesões de pele nos locais de aplicação (Cruz,1997).

A Insulina Humana é comercialmente fabricada por fermentação microbiana usando *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris*. Em um desses processos após passos sequenciais de purificação, o precursor de Insulina Humana

composto de cadeia B, peptídeo C e cadeia A é convertido à forma autêntica de insulina por modificações enzimáticas *in vitro* com tripsina e carboxipeptidase B. O produto final da reação é insulina e peptídeo C (Young-Jin Son *et al.*,2009).

Entretanto, modificações enzimáticas da Proinsulina usando tripsina e carboxipeptidase, geralmente causam grande acúmulo de derivados de insulina em misturas altamente complexas de peptídeos que dificultam o processo de purificação e ocasiona perdas no rendimento (*Butler, 1969*).

Em alguns casos, derivados inativos de proteínas alvo recombinante são formados por carbamilação, proteólise, desaminação, oxidação da metionina ou ligação covalente não específica. Alguns dos derivados de Insulina Humana após a modificação enzimática são insulina A²¹-desamino, insulina des-treonina (B³⁰), insulina arginil-(A⁰), insulina diarginil-(B³¹-B³²). Estas insulinas são formadas durante todo o processo de purificação onde a Insulina Destreonina é obtida quando a Treonina 30 localizada na cadeia B da Proinsulina é clivada por tripsina. Consequentemente a formação de uma quantidade substancial desses derivados de insulina na conversão enzimática e na purificação poderia aumentar os custos efetivos da produção de Insulina Recombinante (*Butler, 1967*).

A formação destes intermediários ocorre pela ação enzimática da Tripsina, uma enzima proteolítica da Família Serino Protease, restrita aos sítios carboxiterminal dos resíduos de Lisina e Arginina, exceto no caso destes resíduos serem seguidos de um resíduo de Prolina. Ocasionalmente, a presença de outras proteínas dessa mesma família como a Quimiotripsina, cuja ação enzimática é restrita aos sítios de clivagens carboxiterminal dos resíduos hidrofóbicos de Tirosina, Fenilalanina, Triptofano e Metionina, exceto no caso destes resíduos serem seguidos de um resíduo de Prolina,

podem ser notadas quando os processos de obtenção e purificação da Tripsina não conferem alto grau de pureza.

O sítio ativo das enzimas da Família Serino Protease é uma tríade catalítica formada pelos resíduos Asp102, Ser195 e Hys57 mostrados na Figura 5 . Esse conjunto de aminoácidos foi identificado na estrutura da quimiotripsina por David Blow em 1967. A tríade catalítica é parte de uma extensa rede de ligações de hidrogênio e por isso também é chamada de sistema de dispersão de cargas (*BLOW, 1997*).

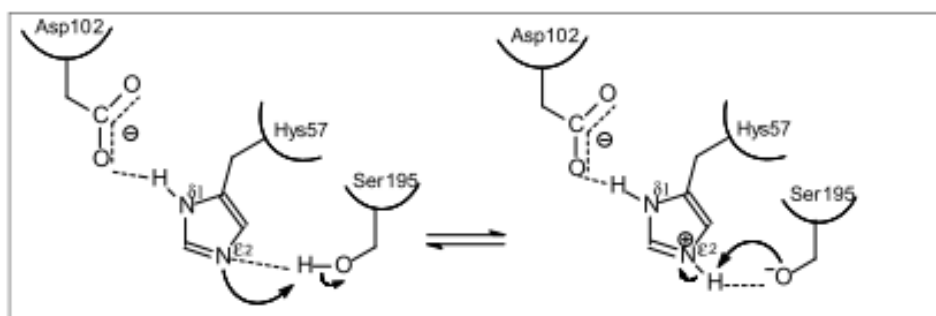


Figura 5- Tríade catalítica da família Serino Protease composta por Histidina 57, Serina 195 e Aspartato 102.

Os resíduos da tríade localizam-se na entrada do bolso de ligação do substrato. O Nε2 do resíduo Hys57 está posicionado de modo favorável a aceitar um próton do OH da Ser195, durante o ataque nucleofílico à carbonila do substrato. O grupo Asp102, carregado negativamente, serve para estabilizar a carga positiva formada sobre o resíduo de Hys57, fazendo uma ligação de hidrogênio com o Nδ1 da Hys57.

Esse sistema de dispersão de cargas torna o átomo de oxigênio da Ser195 um poderoso nucleófilo e permite a hidrólise da ligação peptídica em milissegundos em alguns sistemas biológicos (*PERONA,1995*). As diferentes especificidades entre as enzimas desta família se devem a pequenas modificações estruturais. Na Tripsina, um resíduo de Aspartato (Asp189) está presente no fundo do sítio S1 “pocket” no lugar do

resíduo de Serina na Quimiotripsina. O resíduo de Asp189 atrai e estabiliza a carga positiva do resíduo de Arginina ou Lisina no substrato (*Stryer, 2006*).

Afim de reduzir a quantidade de contaminantes destes intermediários da conversão enzimática no produto final, o processo de recristalização da insulina, atualmente, é acoplado a etapas de purificação por cromatografia. A primeira técnica a ser utilizada foi cromatografia em gel, a qual separava os contaminantes de alto peso molecular, como enzimas e dímeros de insulina.

Entretanto, alguns contaminantes ainda eram perceptíveis tais como insulina^{A²¹-desamino}, Insulina Destreonina (B³⁰), Insulina arginil-(A⁰), Insulina diarginil-(B³¹-B³²), dentro de uma limitada significância clínica. A Insulina obtida por meio desta técnica cromatográfica é chamada Insulina de pico simples. Uma etapa adicional que reduz ainda mais os níveis de contaminantes é a cromatografia de troca-iônica no qual os padrões aceitáveis são de até 10ppm para ProInsulina e 1% para proteínas de alto peso molecular (*Cruz, 1997*).

Desde a década de 1960 várias tecnologias foram desenvolvidas para otimizar o processo de produção em escala industrial , dentre eles o processo de modificação enzimática da Insulina suína e da Insulina produzida por microrganismo recombinantes por meio de técnicas de engenharia genética (*Cruz, 1997*).

O processo de modificação enzimática da Insulina suína à Insulina Humana foi utilizado pela primeira vez no início dos anos 1970 e leva em consideração o fato de que o resíduo 30 da cadeia B de Insulina suína é a alanina e na Insulina Humana este resíduo é uma treonina. A Insulina suína é então tratada com tripsina que cliva a cadeia B entre os resíduos 22 e 23(octopeptídeo) , 29 e 30. A cadeia de Insulina restante (2487.89Da) e esse octopeptídeo são separados e um octopeptídeo sintético (941.97Da) de sequência

semelhante a da porção entre os resíduos 22 e 30 na cadeia B de Insulina Humana é adicionado à molécula de Insulina suína, processo demonstrado na figura 6(a), 6(b) e 7, e purificada posteriormente (Wals.1994,Cruz.1997).

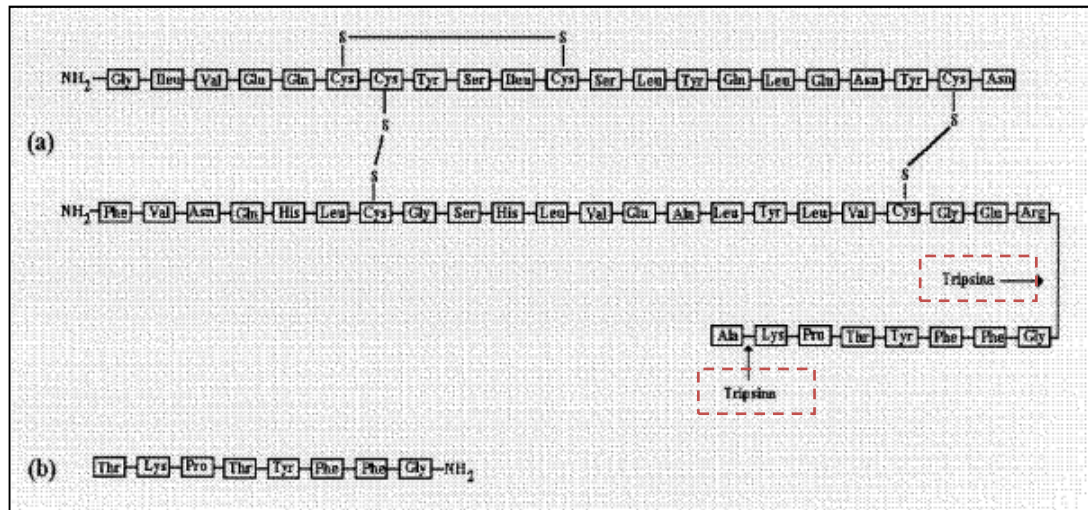


Figura 6- (a) Pontos de clivagem trípica na Insulina suína, (b) octopeptídeo sintético de Insulina Humana por Wals.1994.

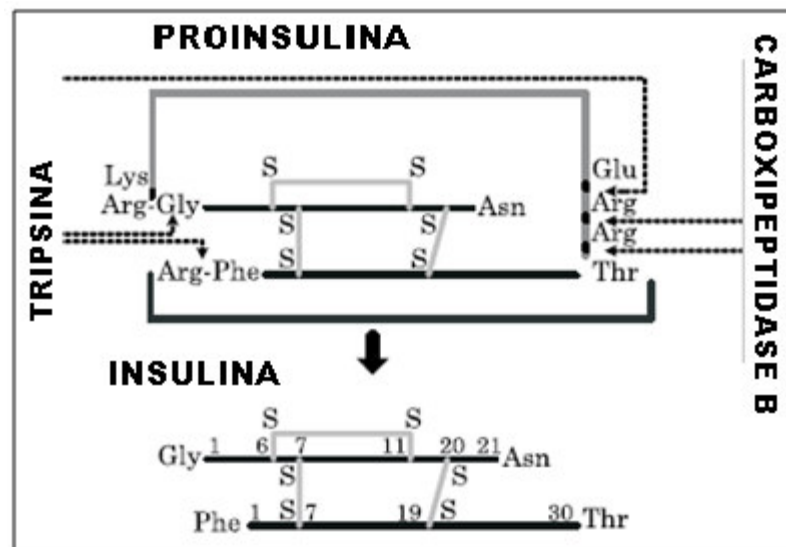


Figura 7- Clivagem Teórica com Tripsina e Carboxipeptidase B da molécula de Proinsulina.

A determinação da atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Segundo a *Enzyme Commission*, “uma unidade (U) de atividade é a quantidade

de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato ou a formação de 1 micromol de produto por minuto”, nas condições estabelecidas do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg).

A atividade enzimática pode ser medida com a enzima pura e em condições de concentração de enzima e substrato, temperatura e pH, tais que permitam que a velocidade de reação seja máxima, o que significa que o substrato [S] deve estar em concentração elevada, de modo a permitir que toda a enzima [E] seja transformada em um complexo ativado [ES]. Neste caso, a velocidade [V] da reação é proporcional a concentração enzimática e também proporcional ao complexo ES (*Kieling, 2002*).

1.7 Bloqueio reversível de grupos ϵ -amino

Muitos esforços têm sido direcionados para diminuir o complexo de peptídeos gerados na conversão enzimática com tripsina pela limitação desta ação em ligações envolvendo resíduos de Arginina e Lisina. Reagentes químicos que causam modificação reversível de grupos amino específicos, ϵ -amino para resíduos de lisina e N-terminal podem ser usados com o objetivo de menor eficiência catalítica nos sítios de clivagens (*Son 2009, Butler 1969*). Exemplos de possíveis bloqueios são apresentados para a cadeia A e B de Insulina, dispostos em posições acessíveis na estrutura tridimensional resolvida de Insulina, Figura 8 , e de ProInsulina, Figura 9.

Depois de purificado com passos de fracionamento mais simples, os peptídeos cujos ϵ -amino encontram-se bloqueados sofrem regeneração dos resíduos de lisina em um pH ácido e retorna a sua forma ativa (Butler, 1969; Dixon, 1968).

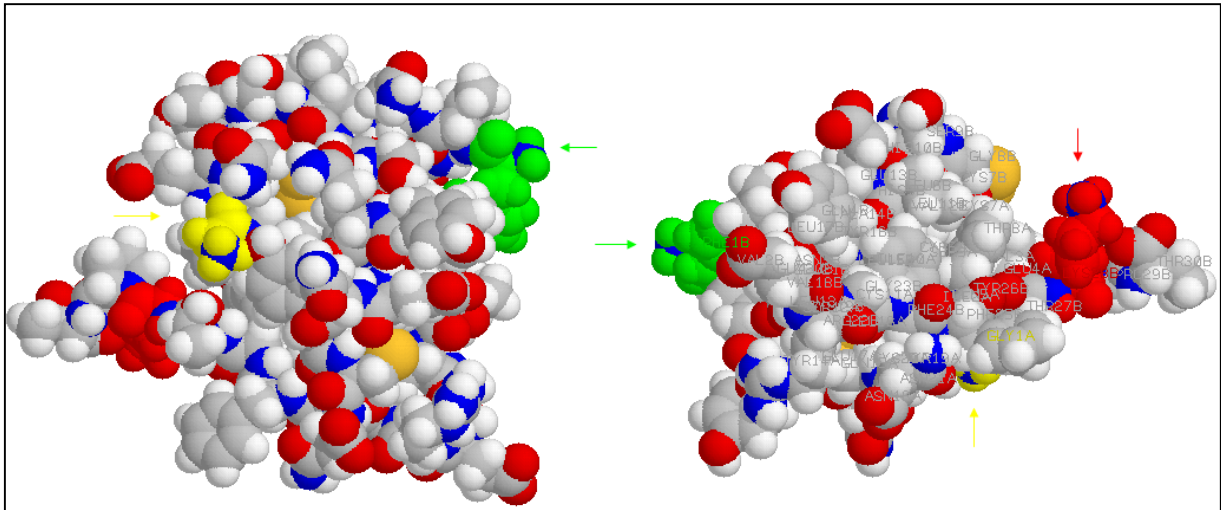


Figura 8- Exposição dos resíduos alvos da Insulina Humana na reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico. Lisina 28 (vermelho) e Fenilalanina 1 (verde) na cadeia B e Glicina 1 (amarela). PDB 2KJJ.Rotação das figuras: 0° de 180° eixo x.

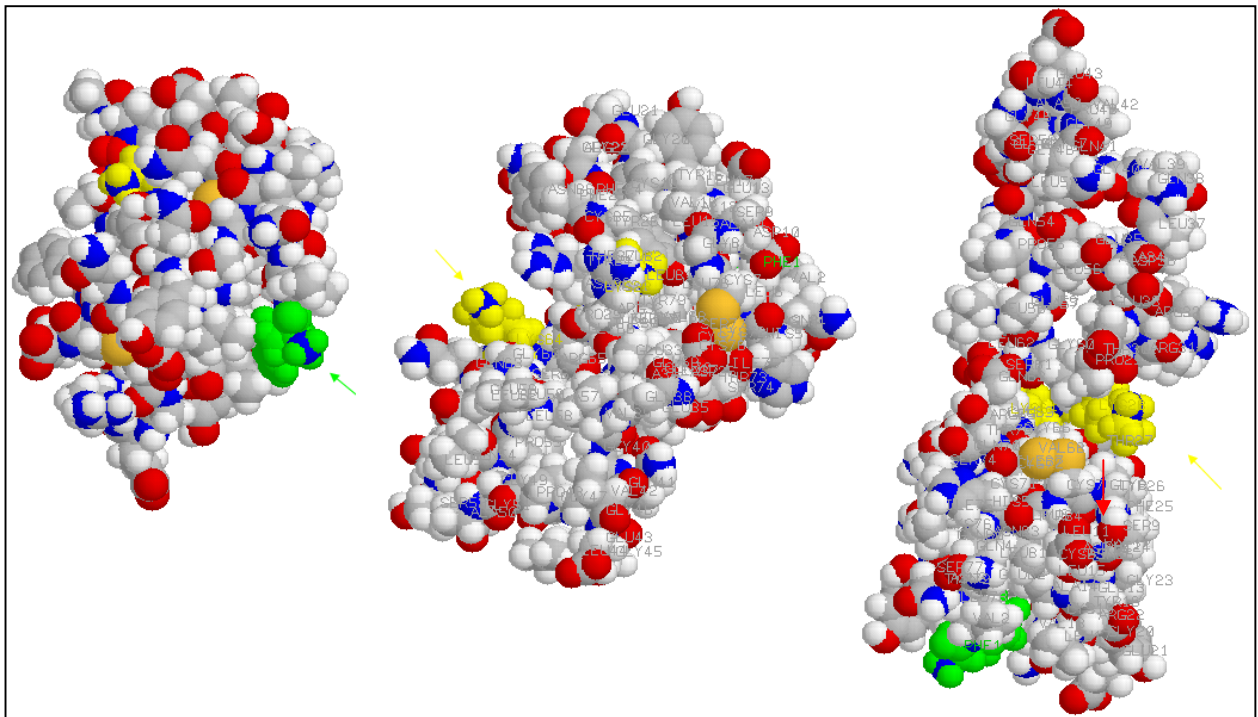


Figura 9- Exposição dos resíduos alvos da reação de bloqueio em Proinsulina Humana. Fenilalanina 1(verde) N-terminal, ϵ -amino de Lisina 64 e 28 (amarelo) respectivamente. PDB 2KQP.Rotações das figuras: 0°,270° eixo x e 45° eixo y respectivamente.

Outros métodos de bloqueio reversível de grupos de aminoácidos já foram desenvolvidos e os produtos derivados variam amplamente com as condições de

estabilidade e propriedades físico-químicas das proteínas, como comportamento na presença de diferentes pH.

Alguns exemplos são trifluoracetilação proposta por Goldberger & Anfinsen em 1962 que remove cargas positivas dos grupos aminoácidos modificados; amidinação, proposta por Hunter & Ludwig em 1962, que mantém as cargas positivas; maleilação (anidrido maleico) proposto por Butler em 1967, tetrafluorosuccinilação por Braunitzer, Beyreuther, Fujiki & Schrank em 1968 e a citraconilação (anidrido citracônico) que reagem com o grupo ϵ -amino da lisina e α -amino no N-terminal de proteínas, na sua forma não protonada, convertendo-os de básicos para grupos ácidos. Assim, o efeito é alterar a carga líquida da proteína em duas unidades de carga por modificação química. Essa reação ocorre entre pH 7,0 e 9,0 e é realizada utilizando um excesso de aproximadamente 50 vezes a concentração de anidrido sobre proteínas nativas ou carboximetiladas (Aitken, 2002; Dixon, 1968).

A grande variedade de faixas de pH e temperaturas sobre os quais os diferentes derivados são estáveis devem permitir que um derivado adequado seja utilizado por qualquer cadeia polipeptídica, apesar da grande diversidade de comportamentos e estabilidade das proteínas individuais (Dixon, 1968).

1.8 Espectrometria de Massas Aplicada a Análise de proteínas

A Espectrometria de Massas (MS) hoje, constitui uma das técnicas instrumentais mais abrangentes da ciência, com amplas aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e tecnológicas. Isto se deve a recentes avanços em instrumentação e ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização que a revitalizaram.

A espectrometria de massas é uma técnica de análise existente há quase um século, porém, inicialmente era restrita a análise de gases, substâncias com altas pressões de vapor e termicamente estáveis. Com a motivação comercial gerada pela utilização desta técnica na indústria do petróleo, onde é utilizada até hoje (*Baldwin, 1995*), muitas inovações além da ionização eletrônica (EI) foram realizadas, como o desenvolvimento dos analisadores quadrupolo (1953), a espectrometria de massas de alta resolução (1956) e o acoplamento com cromatografia gasosa (1957).

Mesmo com estas evoluções, a espectrometria de massas ainda era limitada em relação ao tipo de substâncias analisáveis. Os problemas com a aplicação da espectrometria de massas para análises de sequências envolviam inicialmente a geração de íons peptídicos na fase gasosa e subsequentemente obtenção da informação estrutural que poderiam ser relacionadas com a sequência peptídica. Entre as décadas de 80 e 90 a análise dos íons peptídicos foi viabilizada com o advento da técnica de ionização FAB (*Fast Atom Bombardment*) e a comercialização de eletrospray e MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), porém estas técnicas apresentavam problemas: baixo limite de massa molecular analisável (~1000 Da) , presença de íons indesejáveis provenientes da matriz utilizada por FAB, e a operação bastante complexa de ambas as técnicas.

Atualmente, as análises podem ser feitas por técnicas de ionização brandas, como ESI (*Electrospray*), que operam em pressão atmosférica , e por Maldí, que produz peptídeos protonados, e que dirigem hoje o desenvolvimento de novos instrumentos com grande rapidez, sensibilidade de picomol a femtomol e seletividade (*Dettmer, 2007*). A evolução das técnicas de ionização e dos analisadores tornou possível a análise qualitativa e quantitativa em uma faixa de massas praticamente ilimitada, além de possibilitar o acoplamento com a cromatografia líquida, incompatível com as técnicas

de ionização anteriormente citadas devido à interface entre o espectrômetro de massas, cuja fonte de ionização opera em uma região de alto vácuo, e o cromatógrafo líquido.

As espécies observadas em ESI e MALDI são chamadas protonadas $[M+H]^+$, desprotonadas $[M-1H]^-$ ou de íons adutos quando na presença de Na^+ , K^+ , NH_4^+ e Cl^- , por exemplo, sendo representados por $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+Cl]^-$.

Cristais de proteína/peptídeo são formados quando misturados a matriz como: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -Cyano), sinapinic acid (SA) e 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), utilizados em Maldi como mostra a Figura 10 a) que sob ação do laser, absorve energia das moléculas da matriz e transfere cargas para as moléculas da amostra formando íons com energia interna muito alta, mostrado na Figura 10 b), e consequentemente muitos fragmentos podem ser analisados em seguida pelo analisador TOF.

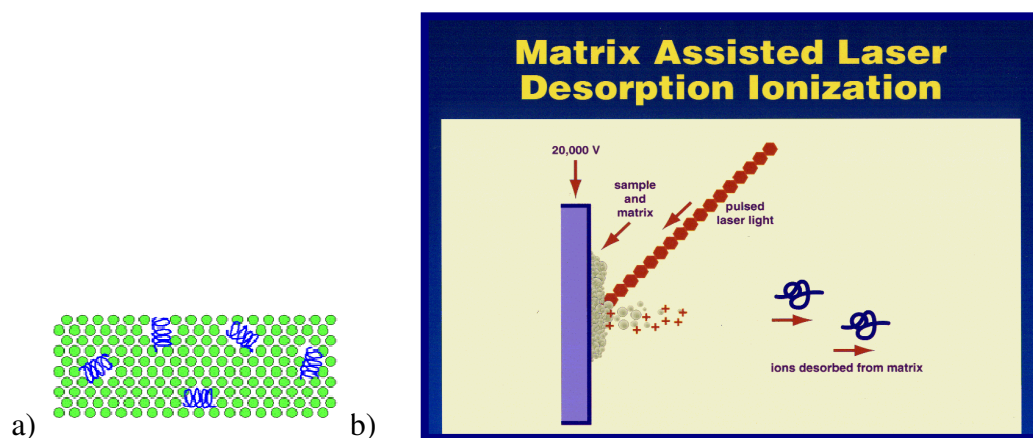


Figura 10- a) Peptídeo/amostra e matriz (DHB, α ciano,etc), b) Fonte de ionização a laser assistida por matriz.

Na técnica de ionização branda, representado aqui por ESI Figura 11, a informação estrutural é muito pouca ou nenhuma, pois os íons gerados têm baixas energias internas, o que resulta em espectros de massas com picos intensos relativos a moléculas protonadas ou desprotonadas e pouca ou nenhuma informação sobre picos relativos a fragmentos. Esta ausência de informação estrutural impulsionou o

desenvolvimento de técnicas de fragmentação induzidas, e com isso surgiu a espectrometria de massas *tandem* ou sequencial (MS/MS), onde geralmente os fragmentos são gerados por dissociação induzida por colisão (CID), ou seja, pela colisão do íon gerado na fonte de ionização com uma molécula de gás (tipicamente argônio) em uma câmara de colisão.

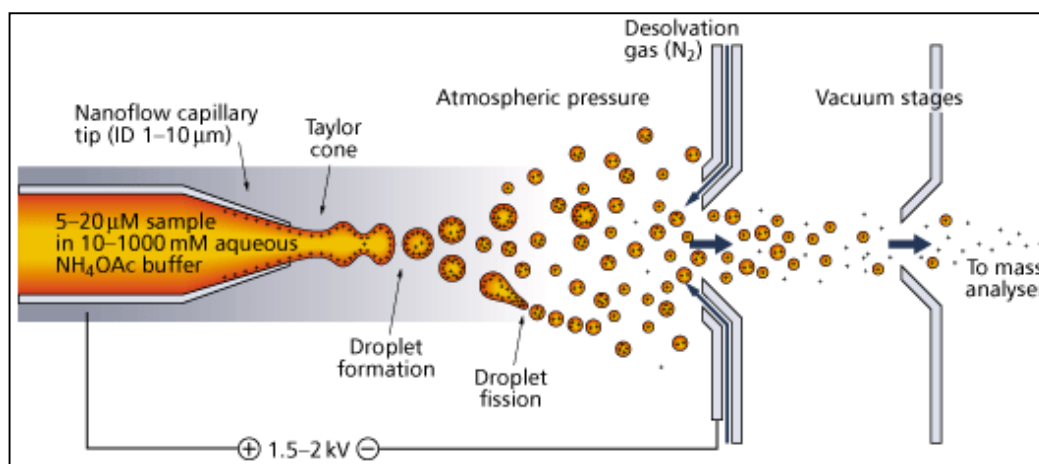


Figura 11– Esquema do processo de ionização por Fonte Eletrospray.

1.9 *Fingerprinting* e Espectrometria de Massa

O *fingerprinting* ou perfil metabólico é a análise de um conjunto de amostras de forma rápida e em que um grande e diferente número de metabólitos é avaliado, sem a intenção de identificar cada metabólito detectado, mas sim comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que podem variar em resposta a uma doença, exposição a uma toxina, a perturbações genéticas ou ambientais (Goodacre, 2002) podendo ainda identificar metabólitos discriminantes ou biomarcadores. Um esquema geral de uma análise de *fingerprinting* é mostrado na Figura 12.

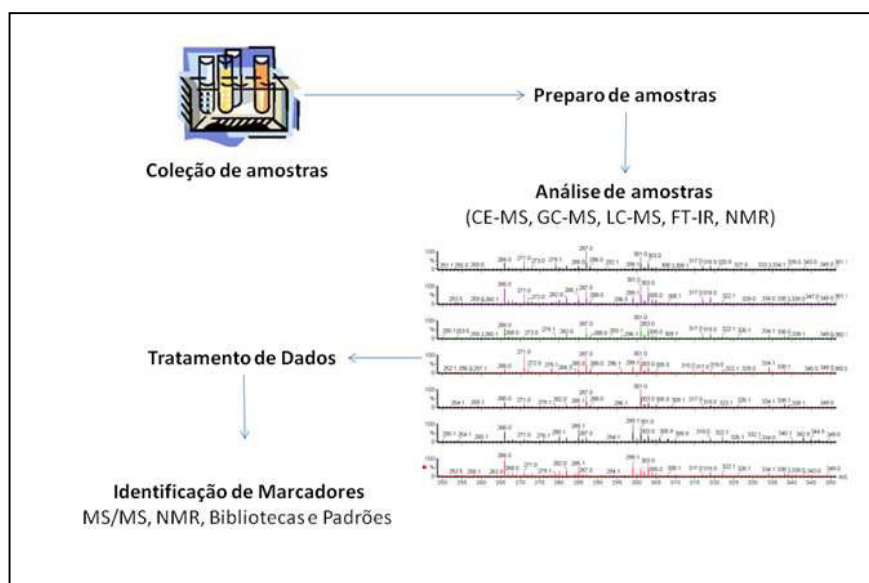


Figura 12- Esquema geral para análise de amostras do tipo *fingerprinting*.

O *fingerprinting* pode ser obtido a partir de vários tipos de matrizes biológicas, seja de natureza humana, animal ou vegetal, assim como urina, plasma, saliva, tecidos, células, folhas, frutos, caule ou raiz. Esta metodologia de análise pode ser utilizada como ferramenta de valia comercial ou científica em estudos de caracterização de amostras como controle de qualidade, certificação de origem e verificação de autenticidade e/ou adulteração (Araújo,2005).

As vantagens mais importantes da espectrometria de massas em relação às demais técnicas são a alta sensibilidade, seletividade, curto tempo de análise e reprodutibilidade combinadas com a possibilidade de confirmar a identidade de um grande número de metabolitos presentes em amostras complexas (Goodacre,2002; Sawaya,2004). Algumas desvantagens como isômeros químicos não podem ser diferenciados por esta técnica de screening rápido, porque eles têm a mesma massa exata e por esta razão a separação cromatográfica é necessária. Além do que, a classificação de produtos de fragmentação, formação de adutos e a supressão iônica são

complicados. Uma vez que todos os componentes da amostra são introduzidos simultaneamente na fonte de ionização, a supressão ou o aumento do sinal pode ocorrer, isto pode afetar expressivamente a análise de dados, especialmente se a matriz for complexa (Goodacre,2002).

1.10 Insulina Humana Recombinante: Produção em larga escala

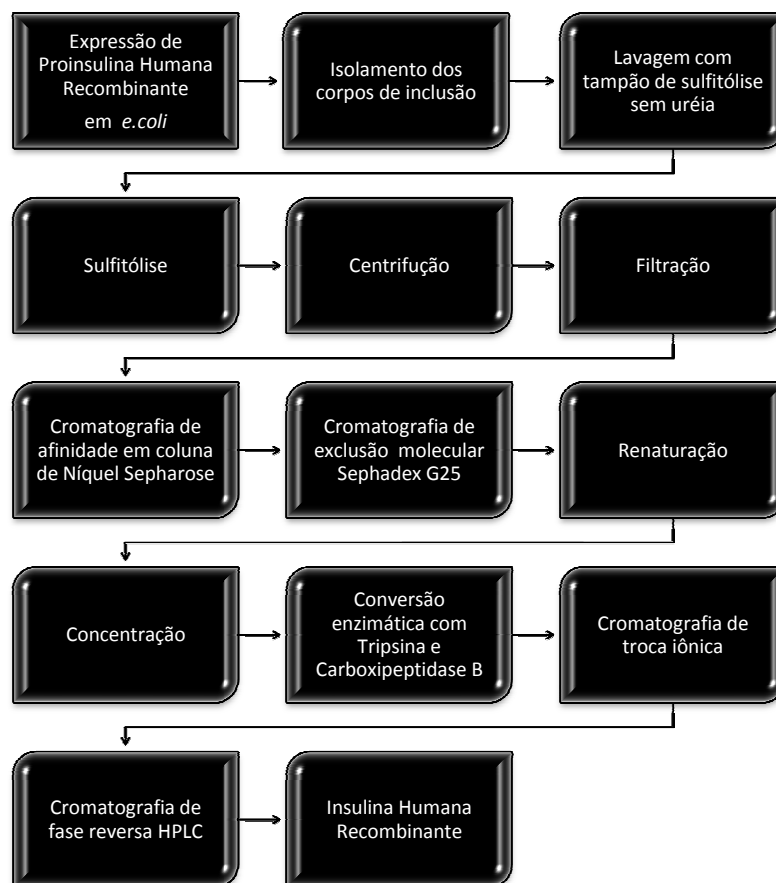
A primeira Insulina produzida pela tecnologia do DNA recombinante aconteceu pela inserção de cDNA de cadeia A e de cadeia B no código genético de células de *Escherichia coli*. As cadeias A e B foram purificadas e acopladas por pontes de dissulfeto. Posteriormente, outros grupos de pesquisa passaram a utilizar cDNA de Proinsulina Humana em *E. coli* ou leveduras, cuja Proinsulina expressa é convertida a Insulina por remoção enzimática do peptídeo C e do peptídeo Sinal. Este é o sistema mais comumente usado em largas escalas, com biorreatores da ordem de 50 mil litros em cada ciclo de produção (Cruz,1997).

Hoje no Brasil, a tecnologia para a produção da Insulina voltará a ser usada, segundo anúncio no site oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes o Brasil (Moraes,2009), FIR Capital (Vieira, 2009) e Agência Fiocruz de Notícias (Monteiro,2010), para uma demanda de 170 milhões de doses por ano através. A transferência de tecnologia será feita entre as empresas Biommm e União Química e do intercâmbio tecnológico entre Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fiocruz e o Instituto Indar (Ucrânia).

A Biommm, empresa brasileira, proprietária da patente para a produção do princípio ativo e sucessora da Biobrás, vai transferir à brasileira União Química a tecnologia de produção dos cristais de Insulina. A nova unidade, será erguida

aproveitando a infraestrutura da recém-inaugurada fábrica do laboratório, no distrito industrial JK, em Brasília (DF) e que a produção não só dos cristais mas também da Insulina formulada irá começar em até três anos, segundo disse ao jornal Valor o Sr. Fernando de Castro Marques, presidente e proprietário da União Química (Vieira, 2009).

O fluxograma de produção da empresa Biommm S.A. sob a Patente de Numero US6,281,329 B1 de Agosto de 2001, foi cedido a este trabalho e está apresentado no fluxograma 1.



Fluxograma 1- Processo industrial de obtenção da Insulina Humana Recombinante Patente US6,281,329 B1 da empresa Biommm S.A.

Embora a Insulina Humana Recombinante seja idêntica ao hormônio na sua forma ativa, algumas impurezas de etapas como a conversão enzimática ainda são encontradas e são submetidas a processos modernos de purificação.

Dentre os compostos intermediários produzidos em maior quantidade está a B-30 Insulina Humana também chamada B-30 Destreonina Insulina Humana, cuja massa molecular é 5707 Dalton que tem características físico-químicas muito semelhantes á Insulina Humana Recombinante o que torna o processo de purificação dispendioso e limitante quanto a separação cromatográfica por HPLC. Conseqüentemente, a formação de quantidades substanciais de derivados de Insulina na conversão enzimática e nos processos de purificação pode aumentar substancialmente os custos efetivos da produção de Insulina Humana Recombinante (Son,2009). Pelas razões supracitadas, o presente trabalho visa à minimização da forma B-30 Destreonina Insulina durante a conversão da Proinsulina em Insulina pelo uso combinado de Tripsina e Carboxipeptidase B.

2 Objetivos

O objetivo geral deste estudo propõe:

*A minimização da formação de B-30 Destreonina Insulina durante a conversão da Proinsulina em Insulina pelo uso combinado de Tripsina e Carboxipeptidase B.

Para tanto os objetivos específicos são:

- *Obtenção da cadeia B de Insulina purificada;
- *Teste de conceito: maleilação e tripsinólise em cadeia B;
- *Estudar os efeitos da introdução de 2,3-dimetilmaleico na estrutura da Insulina Humana Recombinante;
- *Estudar os efeitos da introdução de grupos anidrido 2,3-dimetilmaleico na estrutura da Proinsulina humana;
- *Observar efeitos da atividade enzimática de Tripsina sobre os efeitos de bloqueio de grupos ϵ -amino;
- *Estudar os efeitos de bloqueio sobre resíduos ϵ -aminos da Proinsulina durante o processo industrial de conversão enzimática;
- *Utilizar das técnicas de massas Maldi-TOF(TOF) e ESI-MS(MS) , para caracterizar todas as etapas do processo de conversão enzimática industrial originalmente proposto pela patente da empresa Biomm S.A. e na presença de 2,3-dimetilmaleico;
- *Calcular os rendimentos na conversão de Proinsulina à Insulina;

3 Parte Experimental

Será abordada neste capítulo uma descrição da metodologia e equipamentos utilizados na determinação dos dados de caracterização das amostras de Cadeia B de Insulina, Insulina Humana Recombinante, Proinsulina Humana Recombinante, bloqueio dos grupos ϵ -amino bem como o perfil por espectrometria de massa dos componentes intermediários da conversão enzimática de Proinsulina á Insulina com e sem bloqueio de grupos ϵ -aminos.

3.1 Materiais

3.1.1 Cadeia B Insulina Humana

As amostras de cadeia B de Insulina Humana registradas sobre números Exp.052 BSSO₃⁻ PPT 20/06/1990 e Exp.042 BSSO₃⁻ PPT 01/05/1990 foram gentilmente doadas pela empresa Biommm S.A. para a realização dos experimentos.

Preparo de amostras: As amostras foram preparadas na concentração de 1mg/mL em solução de ácido acético 0,2M, absorvância de 0,663 medida em λ 280nm.

Purificação: A cromatografia de purificação das amostras foi realizada no equipamento de alta performance HPLC da Shimadzu SIL-10A SPV-10AV SCL-10A LC-10AD SCL-10A CTO-10. Os parâmetros de operação foram: vazão de 1mL.min⁻¹ e pressão de 250kgf/cm², λ 280nm, temperatura 35°C. A coluna utilizada foi C18 LiChroCART®250-4 OB543496 LiChrospher 100RP-18(15 μ m) 250x4mm. Os eluentes usados na cromatografia foram solução A: tampão fosfato de sódio 0,1M e ácido perclórico 0,01M pH 2,0; solução B tampão fosfato de sódio 0,1M, ácido perclórico

0,01M, acetonitrila 50%, pH 2,0 O programa usado neste experimento está descrito na Tabela 3.

Tempo (min.)	% B
0	44
3	44
15	60
25	64

Tabela 3- Programa para cromatografia HPLC de purificação da cadeia B de Insulina. Parâmetros usados no equipamento: vazão de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão de $250\text{kgf}/\text{cm}^2$, $\lambda 280\text{nm}$, temperatura 35°C . A coluna utilizada foi C18 LiChroCART®250-4 OB543496 LiChrospher 100RP-18($15\mu\text{m}$) $250\times 4\text{mm}$.

3.1.2 Insulina Humana Recombinante

A amostra de Insulina Humana Recombinante registrada sobre número MLR462 Biobrás foi gentilmente doada pela empresa Biommm S.A. para realização dos experimentos.

Preparo de amostras: As amostras foram preparadas na concentração de $1\text{mg}/\text{mL}$ em tampão glicina 15mM pH 9,0 e/ou tampão ácido bórico cloreto de potássio e hidróxido de sódio $0,1\text{M}$ pH 9,00. A absorbância medida foi de 0,708 medida em $\lambda 280\text{nm}$.

Purificação: A cromatografia de purificação das amostras foi realizada no equipamento de alta performance HPLC da Shimadzu SIL-10A SPV-10AV SCL-10A LC-10AD SCL-10A CTO-10. Os parâmetros de operação foram: vazão de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão de $250\text{kgf}/\text{cm}^2$, $\lambda 280\text{nm}$, temperatura 35°C . A coluna utilizada foi C18 LiChroCART®250-4 OB543496 LiChrospher 100RP-18($15\mu\text{m}$) $250\times 4\text{mm}$. Os eluentes usados na cromatografia foram: solução A ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% ; solução

B ácido trifluoroacético (TFA)0,1% e acetonitrila (ACN) 80%. O programa usado neste experimento está representado na Tabela 4.

Tempo (min).	% B
0.01	0
10	0
40	80
50	80
50.1	Stop

Tabela 4- Programa da cromatografia HPLC de purificação de Insulina. Parâmetros usados no equipamento: vazão de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão de $250\text{kgf}/\text{cm}^2$, $\lambda 280\text{nm}$, temperatura 35°C . A coluna utilizada foi C18 LiChroCART®250-4 OB543496 LiChrospher 100RP-18($15\mu\text{m}$) $250\times 4\text{mm}$.

3.1.3 Preparo de cadeia A e cadeia B de Insulina Humana Recombinante

Para obter cadeias A e B de Insulina Humana foi necessário reduzir e alquilar a amostra MLR462. Para tanto procedeu-se o seguinte experimento:

Redução e alquilação: Para reduzir as pontes de dissulfeto existentes entre as cadeias A e B de Insulina foram usados para a solução de $1\text{mg}/\text{mL}$ de MLR462 em tampão de Bicarbonato de Amônio 50mM e Dithiothreitol (DTT) 25mM . Essa reação foi mantida a 70°C em banho-maria por 1 hora. Para a reação de alquilação, foram acrescentado à amostra já reduzida, 25mM de Iodocetamida, mantida a 37°C por 40 minutos na ausência de luz.

3.1.4 Proinsulina Humana Recombinante

A amostra de Proinsulina Humana Recombinante registrada sobre número HGUT0045 Biobrás foi gentilmente doada pela empresa Biommm S.A. para realização dos experimentos.

Preparo de amostras: As amostras foram preparadas na concentração de 1mg/mL em tampão glicina 15mM pH 9,0 e/ou tampão ácido bórico cloreto de potássio e hidróxido de sódio 0,1M, pH 9,00. A absorbância medida foi de 0,908 medida em λ 280nm.

Purificação: A cromatografia de purificação das amostras foi realizada no equipamento de alta performance HPLC da Shimadzu SIL-10A SPV-10AV SCL-10A LC-10AD SCL-10A CTO-10. Os parâmetros de operação foram: vazão de 1mL.min⁻¹ e pressão de 250kgf/cm², λ 280nm, temperatura 35°C. A coluna utilizada foi C18 LiChroCART®250-4 OB543496 LiChrospher 100RP-18(15 μ m) 250x4mm. Os eluentes usados na cromatografia foram: solução A ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% ; solução B ácido trifluoroacético (TFA)0,1% e acetonitrila (ACN) 80%. O programa usado neste experimento está representado na Tabela 5.

Tempo (min.)	% B
0.01	0
10	0
40	80
50	80
50.1	Stop

Tabela 5- Programa para cromatografia HPLC de purificação de Proinsulina. Parâmetros usados no equipamento: vazão de 1mL.min⁻¹ e pressão de 250kgf/cm², λ 280nm, temperatura 35°C. A coluna utilizada foi C18 LiChroCART®250-4 OB543496 LiChrospher 100RP-18(15 μ m) 250x4mm.

3.1.5 Conversão enzimática

As conversões enzimáticas foram conduzidas utilizando amostras de Proinsulina lote HGUT0045, Tripsina suína lote TR-020/Biobrás e Carboxipeptidase B lote 108H7406/Sigma.

Preparo de amostras: As amostras de Proinsulina foram preparadas na concentração de 1mg/mL, volume final de reação 10mL de tampão glicina 15mM, pH 9,0. Após o preparo das amostras foram acrescentadas Tripsina 1,1 U/mg de proteína e Carboxipeptidase B 0,2 U/mg de proteína. O pH final da reação foi monitorado entre 8,2-8,3. Foram usadas como temperatura de conversão 12°C e 25°C.

3.1.6 Atividade enzimática durante o tempo de conversão

Os experimentos de atividade enzimática foram realizados no equipamento Spectrophotometer UV-160^a Shimadzu com Cell positioner Shimadzu e CPS controller-240A.

Preparo de amostras para as condições de trabalho no laboratório LEFQP/UFMG : A amostra de Proinsulina lote HGUT0045 foi preparada a 1mg/mL em tampão Glicina 15mM pH 9,0, num volume total de 10mL por reação. Para o experimento de bloqueio de grupos ε-amino foram adicionados ao volume de 10 mL de reação, 11,86mg de anidrido 2,3-dimetilmaleico. A correção do pH foi feita constantemente até o término da reação de bloqueio com adição de NaOH 0,1N. A atividade enzimática foi conduzida a temperatura de 22°C durante 24 horas. A cada 1 hora de conversão, retirava-se 200μL da reação e acrescentava-se, em uma cubeta de poliestireno, 10μL de substrato BApNA (Solução 900μM) e 790μL de tampão Glicina 15mM. A Atividade foi acompanhada pela leitura de absorção em λ410nm por 300

segundos a cada 1 hora de reação durante às 8 primeiras horas e no tempo final de 24 horas da atividade enzimática de conversão.

Preparo de amostras para a conversão industrial realizada nas dependências do laboratório da empresa Biomm S.A.: A amostra de Proinsulina lote HGUT0045 foi preparada a 1mg/mL em tampão Glicina 15mM pH 9,0, num volume total de 10mL por reação. Foram usadas 1,1U/mg de proteína de Tripsina e 0,2U/mg de proteína de Carboxipeptidase B. No experimento de bloqueio de grupos ϵ -amino foram adicionados ao volume de 10 mL de reação, 11,86mg de anidrido 2,3-dimetilmaleico. A correção do pH (~8,29) foi feita constantemente até o termino da reação de bloqueio com adição de NaOH 3N. A atividade enzimática foi conduzida a temperatura de 23°C durante 24 horas. A cada 1 hora de conversão, retirava-se 500 μ L da reação e acrescentava-se 1,5mL de solução de ácido acético 1M. O volume de 50 μ L das amostras preparadas foram analisadas por cromatografia de fase reversa HPLC, coluna Kromasil 100-3.5C4 (3.5 μ m, C4, 4.6x150mm) para quantificação de Insulina e determinação de B-30 Destreonina Insulina. As soluções usadas foram: Fosfato de Sódio Monobásico 0.05M e Perclorato de Sódio 0,1M (solução SSP 0.1) acrescida de 30% ACN (Eluente PPA30); solução SSP 0.1 acrescida de 50% ACN (Eluente PPA 50). Os dados da cromatografia da conversão industrial foram realizados na empresa Biomm S.A. sob a supervisão da Dra. Mariza Pereira Xavier e Dra. Heloisa Ribeiro Tunes de Souza em Março de 2010.

3.1.6 Reação de bloqueio grupos ϵ -amino: Quando submetido ao tratamento com anidrido 2,3-dimetilmaleico foram usados 100x a concentração molar deste reagente, ou seja, para 10 mL de Proinsulina a 1mg/mL, foram necessários 118,6mg de reagente adicionado em pequenas porções à amostra. A correção do pH foi efetuada

durante a adição do reagente de bloqueio com NaOH 1N, de modo que este permanecesse, ao final da reação, em 8,3.

Os reagentes usados para as reações de bloqueio são: Anhydride maleic ,99%, ref. 63200, Fluka; Anhydride citraconic,99%, ref.27429, Fluka; 2,3-dimthylmaleic anhydride,98%, ref.D167800 Sigma-Aldrich.

3.1.7 Espectrometria de massa

Maldi TOF/TOF Autoflex III Bruker Daltonics análise MS e MSMS

A matriz usada nos experimentos foi α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid na proporção 1:3 das amostras obtidas após cromatografia HPLC ou ZIP-TIP e secagem parcial ou total em speed vacue. As configurações usadas no equipamento foram: Linear detector gain 6.8x, Eletronic Gain 100mV, shots 200/200, added 400, Freq. 50.8, laser power 68% , lens 0,05kV, Method linear(LP_ProteMix.par) espectros *full scan* íons adquiridos m/z 5-20kDa; Method reflexive (RP_ProteMix.par) espectros *full scan* íons adquiridos m/z 100-5000Da; Method LIFT Calibrate MSMS (lift.par) íons adquiridos m/z 50-2000. Os espectros foram tratados com o software *FlexAnalysis* e *PepSeq*. Para todas as análises o equipamento foi calibrado com uma mistura de padrões de calibração de peptídeos e proteínas com uma faixa de 100 a 5kDa para o método RP_ProteMix e MSMS_Calibrate e 5 a 10kDa para LP_ProteMix.

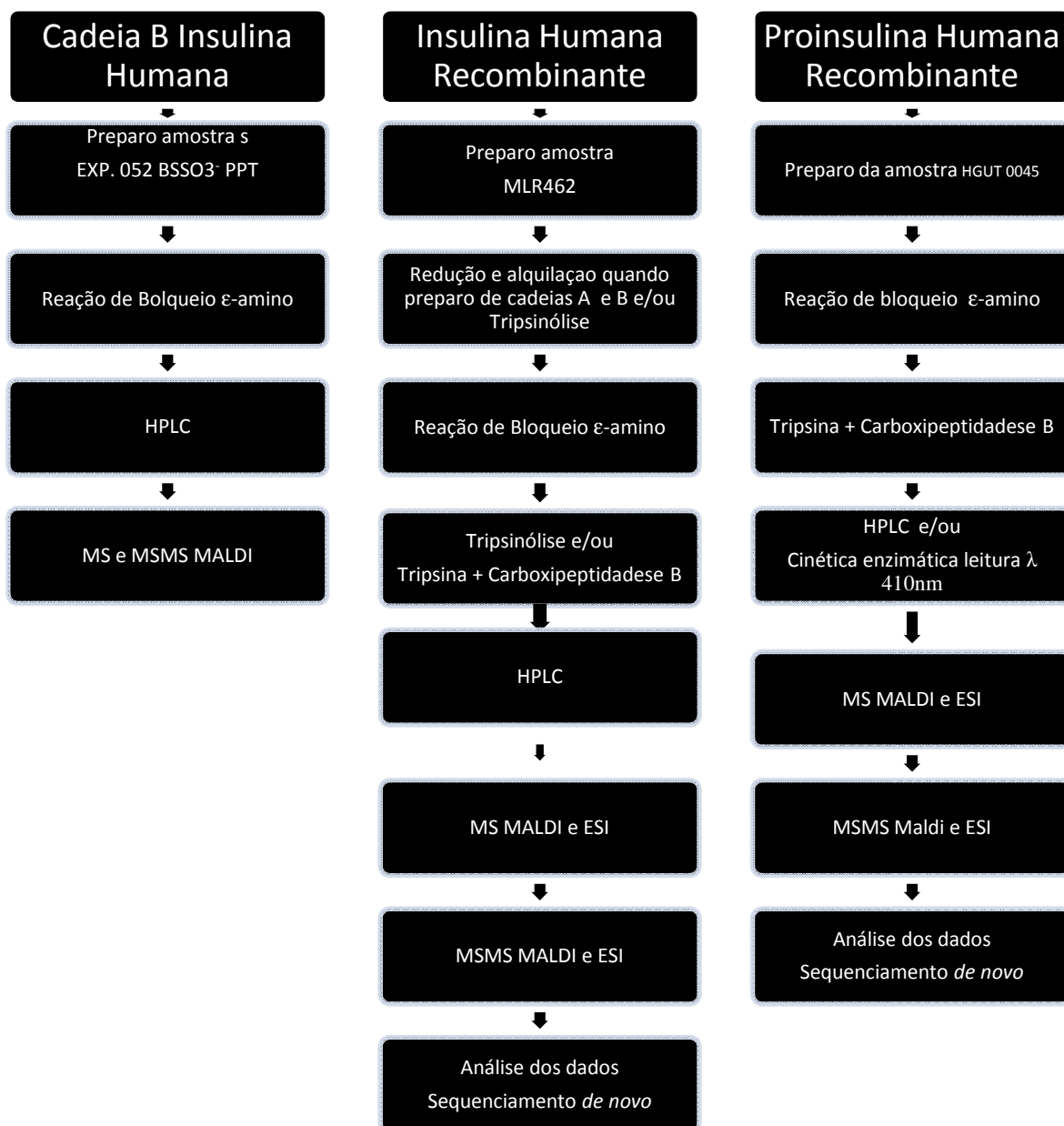
Q-TOF Micromass Análise ESI-MS e ESI MS/MS

As amostras foram preparadas de acordo com o seguinte procedimento: 10mL da amostra do item 4.1.2 foram diluídos em 1mL de solução MeOH/H₂O (1:1) e 0,1% ácido fórmico. A solução foi injetada por inserção direta no espectrômetro de massas. O

tempo total para aquisição de cada espectro foi fixada em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os ESI-MS/MS foram extraídos no modo positivo através do equipamento QToF Micromass (Manchester-Reino Unido) de configuração QqToF. As condições de operação do equipamento para otimização das análises foram 3-4kV voltagem do capilar, 100°C temperatura da fonte, 100°C temperatura de dessolvatação, voltagem do cone 60-80 V e calibração feita com ácido fórmico cujos 11 matches testados foram confirmados e a média residual de $-7.636283e^{-9} \pm 0.000795$.

As amostras diluídas foram injetadas por uma bomba de injeção automática (Harvard Apparatus) com um fluxo contínuo de 500nL min^{-1} . Os espectros *full scan* foram adquiridos na faixa de m/z 1000-3000 para ESI-MS, m/z 50-3500 para ESI-MS/MS e a energia de colisão aplicada de 30-50 eV . Os dados adquiridos foram tratados com o softwar MassLynx™ 4.1 da empresa Waters.

3.1.8 Planejamento experimental e análise de dados



Fluxograma 2- Planejamento de ensaios e análises proposto para este trabalho.

4 Resultados e Discussão

No presente capítulo são apresentados os resultados experimentais realizados bem como a análise e discussão dos dados obtidos.

4.1 Digestão enzimática teórica

Os perfis das sequências de aminoácidos geradas pela clivagem teórica com o programa MassLynx™ 4.1 Waters de Insulina e Proinsulina por Quimiotripsina e Tripsina antes e após tratamento de bloqueio do grupo ε-amino com 2,3-dimetilmaleico (indicado pela letra B nas sequências geradas), os dados de massas teóricas (Theor) e as respectivas m/z para íons monocarregados [M+H], duplo carregados [M+2H], triplo carregados [M+3H] e tetra carregados [M+4H] são apresentados nas figuras abaixo.

Trypsin:K-P/R-P Y-P/F-P W-P			Insulina Humana Recombinante			
Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-14	(-)GIVEQCCTSICSLY(Q)	1532.67	1533.68	767.34	511.90
T2	15-19	(Y)QLENY(C)	665.30	666.31	333.66	222.78
T3	20-22	(Y)CNF(V)	382.13	383.14	192.07	128.38
T4	23-37	(F)VNQHLCGSHLVEALY(L)	1681.82	1682.83	841.92	561.62
T5	38-43	(Y)LVCGER(G)	675.34	676.35	338.68	226.12
T6	44-45	(R)GF(F)	222.10	223.11	112.06	75.04
T7	46-46	(F)F(Y)	165.08	166.09	83.55	56.03
T8	47-47	(F)Y(T)	181.07	182.08	91.54	61.37
T9	48-50	(Y)TPK(T)	344.21	345.21	173.11	115.74
T10	51-51	(K)T(-)	119.06	120.07	60.54	40.69
T1-2	1-19	(-)GIVEQCCTSICSLYQLENY(C)	2179.96	2180.97	1090.99	727.66
T2-3	15-22	(Y)QLENYCNF(V)	1029.42	1030.43	515.72	344.15
T3-4	20-37	(Y)CNFVNQHLCGSHLVEALY(L)	2045.95	2046.95	1023.98	682.99
T4-5	23-43	(F)VNQHLCGSHLVEALYLVCGER(G)	2339.15	2340.16	1170.58	780.72
T5-6	38-45	(Y)LVCGERGF(F)	879.43	880.44	440.72	294.15
T6-7	44-46	(R)GFF(Y)	369.17	370.18	185.59	124.06
T7-8	46-47	(F)FY(T)	328.14	329.15	165.08	110.39
T8-9	47-50	(F)YTPK(T)	507.27	508.28	254.64	170.10
T9-10	48-51	(Y)TPKT(-)	445.25	446.26	223.63	149.43

Average Mass = 5810.7029, Monoisotopic Mass = 5806.6849
 N-Terminus = NH₂, C-Terminus = OH

1 GIVEQ CCSI CSLYQ LENYC NFVNQ HLCGS HLVEA LYLVC GERGF FYTPK T

Trypsin:K-P/R-P /Y-P/F-P/W-P			Insulina Humana Recombinante S-S			
Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-14	(-)GIVEQCCTSICSLY(Q)	1910.77	1911.77	956.39	637.93
T3	20-22	(Y)CNF(V)				
T2	15-19	(Y)QLENY(C)	665.30	666.31	333.66	222.78
T4	23-37	(F)VNQHLCGSHLVEALY(L)	2355.15	2356.15	1178.58	786.06
T5	38-43	(Y)LVCGER(G)				
T6	44-45	(R)GF(F)	222.10	223.11	112.06	75.04
T7	46-46	(F)F(Y)	165.08	166.09	83.55	56.03
T8	47-47	(F)Y(T)	181.07	182.08	91.54	61.37
T9	48-50	(Y)TPK(T)	344.21	345.21	173.11	115.74
T10	51-51	(K)T(-)	119.06	120.07	60.54	40.69

Figura 13- Cálculo teórico gerado pelo software Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica de Insulina sem pontes de dissulfeto e com ponte de dissulfeto S-S, antes e após reação de bloqueio ε- amino

Trypsin:K-P/R-P /Y-P/F-P/W-P			ε-amino Insulina Humana			
Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-14	(-)GIVEQCCTSICSLY(Q)	1517.66	1518.66	759.84	506.89
T2	15-19	(Y)QLENY(C)	665.30	666.31	333.66	222.78
T3	20-22	(Y)CNF(V)	382.13	383.14	192.07	128.38
T4	23-37	(F)VNQHLCGSHLVEALY(L)	1681.82	1682.83	841.92	561.62
T5	38-43	(Y)LVCGER(G)	675.34	676.35	338.68	226.12
T6	44-45	(R)GF(F)	222.10	223.11	112.06	75.04
T7	46-46	(F)F(Y)	165.08	166.09	83.55	56.03
T8	47-47	(F)Y(T)	181.07	182.08	91.54	61.37
T9	48-50	(Y)TPK(B)	344.21	345.21	173.11	115.74
T10	51-52	(K)BT(-)	245.09	246.10	123.55	82.70
T1-2	1-19	(-)GIVEQCCTSICSLYQLENY(C)	2164.95	2165.96	1083.48	722.66
T2-3	15-22	(Y)QLENYCNF(V)	1029.42	1030.43	515.72	344.15
T3-4	20-37	(Y)CNFVNQHLCGSHLVEALY(L)	2045.95	2046.95	1023.98	682.99
T4-5	23-43	(F)VNQHLCGSHLVEALYLVCGER(G)	2339.15	2340.16	1170.58	780.72
T5-6	38-45	(Y)LVCGERGE(F)	879.43	880.44	440.72	294.15
T6-7	44-46	(R)GFF(Y)	369.17	370.18	185.59	124.06
T7-8	46-47	(F)FY(T)	328.14	329.15	165.08	110.39
T8-9	47-50	(F)YTPK(B)	507.27	508.28	254.64	170.10
T9-10	48-52	(Y)TPKBT(-)	571.29	572.29	286.65	191.44

Average Mass = 5921.8000, Monoisotopic Mass = 5917.7057
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Modified amino acids: 23DM(B) =

1 GIVEQ CCTSI CSLYQ LENYC NFVNQ HLCGS HLVEA LYLVC GERGF FYTPK BT

Figura 14- Cálculo teórico gerado pelo software Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica de Insulina após reação de bloqueio ε-amino.

Average Mass = 2383.7311, Monoisotopic Mass = 2382.0000
N-Terminus = H, C-Terminus = OH

1 **NCYNE** LQYLS CISTC CQEVIG

Trypsin:K-P/R-P /Y-P/F-P/W-P

Cadeia A Insulina Humana

Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-3	(-)NCY(N)	398.13	399.13	200.07	133.72
T2	4-8	(Y)NELQY(L)	665.30	666.31	333.66	222.78
T3	9-21	(Y)LSCISTCCQEVIG(-)	1354.59	1355.60	678.30	452.54
T1-2	1-8	(-)NCYNEQY(L)	1045.42	1046.43	523.72	349.48
T2-3	4-21	(Y)NELQYLS CISTCCQEVIG(-)	2001.88	2002.89	1001.95	668.30

Figura 15- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica Cadeia A de Insulina Humana.

Trypsin_Biomm_Chymo:-R-K /Y

Cadeia B Insulina Humana

Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-1	(-)T(K)	119.06	120.07	60.54	40.69
T2	2-5	(T)KPTY(F)	507.27	508.28	254.64	170.10
T3	6-8	(Y)FFG(R)	369.17	370.18	185.59	124.06
T4	9-15	(G)REGCVLY(L)	838.40	839.41	420.21	280.47
T5	16-30	(Y)LAEVLHSGCLHQNVF(-)	1665.83	1666.84	833.92	556.28
T1-2	1-5	(-)TKPTY(F)	608.32	609.32	305.17	203.78
T2-3	2-8	(T)KPTYFFG(R)	858.43	859.44	430.22	287.15
T3-4	6-15	(Y)FFGREGCVLY(L)	1189.56	1190.57	595.79	397.53
T4-5	9-30	(G)REGCVLYLAEVLHSGCLHQNVF(-)	2486.22	2487.23	1244.12	829.75

Average Mass = 3429.9723, Monoisotopic Mass = 3427.6845
N-Terminus = H, C-Terminus = OH

1 **TKPTY** FFGRE GCVLY LAEVL HSGCL HQNVF

Trypsin_Biomm_Chymo:-R-K /Y

I ε-amino Cadeia B Insulina

Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-1	(-)T(K)	119.06	120.07	60.54	40.69
T2	2-6	(T)KBPTY(F)	633.30	634.31	317.66	212.11
T3	7-9	(Y)FFG(R)	369.17	370.18	185.59	124.06
T4	10-16	(G)REGCVLY(L)	838.40	839.41	420.21	280.47
T5	17-31	(Y)LAEVLHSGCLHQNVF(-)	1665.83	1666.84	833.92	556.28
T1-2	1-6	(-)TKBPTY(F)	734.35	735.36	368.18	245.79
T2-3	2-9	(T)KBPTYFFG(R)	984.46	985.47	493.24	329.16
T3-4	7-16	(Y)FFGREGCVLY(L)	1189.56	1190.57	595.79	397.53
T4-5	10-31	(G)REGCVLYLAEVLHSGCLHQNVF(-)	2486.22	2487.23	1244.12	829.75

Average Mass = 3556.0841, Monoisotopic Mass = 3553.7162
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Modified amino acids: 23DM(B) =

1 **TKBPT** YFFGR EGCVL YLAEV LHSGC LHQNV F

Figura 16- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica Cadeia B de Insulina Humana após reação de bloqueio ε-amino.

Trypsin_Biomun_Clymo:R.K. Y/W F M			Proinsulina Humana Recombinante			
Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]
T1	1-3	(-)NCY(N)	398.13	399.13	200.07	133.72
T2	4-8	(Y)NELQY(L)	665.30	666.31	333.66	222.78
T3	9-22	(Y)LSICSTCCQEVIGR(K)	1510.69	1511.70	756.35	504.57
T4	23-23	(R)K(Q)	146.11	147.11	74.06	49.71
T5	24-55	(K)QLSGELALPQLSGAGPG GGLEVQGVQLDEAER(R)	3174.62	3175.62	1588.32	1059.21
T6	56-56	(R)R(T)	174.11	175.12	88.06	59.05
T7	57-58	(R)TK(P)	247.15	248.16	124.58	83.39
T8	59-61	(K)PTY(F)	379.17	380.18	190.59	127.40
T9	62-62	(Y)F(F)	165.08	166.09	83.55	56.03
T10	63-63	(F)F(G)	165.08	166.09	83.55	56.03
T11	64-65	(F)GR(E)	231.13	232.14	116.57	78.05
T12	66-71	(R)EGCVLY(L)	682.30	683.31	342.16	228.44
T13	72-86	(Y)LAEVLMSGCLHQVRF(R)	1665.83	1666.84	833.92	556.28
T14	87-87	(F)R(G)	174.11	175.12	88.06	59.05
T15	88-89	(R)RH(H)	206.07	207.08	104.04	69.70
T16	90-96	(R)G00000G(-)	911.40	912.41	456.71	304.81
T1-2	1-8	(-)NCYNELQY(L)	1045.42	1046.43	523.72	349.48
T2-3	4-22	(Y)NELQYLSICSTCCQEVIGR(K)	2157.99	2158.99	1080.00	720.34
T3-4	9-23	(Y)LSICSTCCQEVIGRK(Q)	1638.79	1639.80	820.40	547.27
T4-5	23-55	(R)KQLSGELALPQLSGAGPG GGLEVQGVQLDEAER(R)	3302.71	3303.72	1652.36	1101.91
T5-6	24-56	(K)QLSGELALPQLSGAGPG GGLEVQGVQLDEAERR(T)	3330.72	3331.72	1666.37	1111.25
T6-7	56-58	(R)RTK(P)	403.25	404.26	202.63	135.43
T7-8	57-61	(R)TKPTY(F)	608.32	609.32	305.17	203.78
T8-9	59-62	(K)PTYF(F)	526.24	527.25	264.13	176.42
T9-10	62-63	(Y)FF(G)	312.15	313.16	157.08	105.06
T10-11	63-65	(F)FGR(E)	378.20	379.21	190.11	127.08
T11-12	64-71	(F)GREGCVLY(L)	895.42	896.43	448.72	299.48
T12-13	66-86	(R)EGCVLYLAEVLMSGCLHQVRF(R)	2330.12	2331.13	1166.07	777.71
T13-14	72-87	(Y)LAEVLMSGCLHQVRF(G)	1821.93	1822.94	911.97	608.32
T14-15	87-89	(F)RHH(H)	362.17	363.18	182.09	121.73
T15-16	88-96	(R)G00000G(-)	1099.46	1100.47	550.74	367.50

Average Mass = 10633.0757, Monoisotopic Mass = 10626.1299
N-Terminus = H, C-Terminus = OH

1. **NCDE** LQYLS CISTC CQEVIGRQL SGEALPQLSGAGPG GGLEVQGVQLDEAERRTKPT YFFGR EGCVL YLAEVLMSGCLHQVRFRRGH I000H A

Figura 17- Cálculo teórico gerado pelo softwar Mass Lynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica de Proinsulina Humana.

Trypsin: K-P -R-P		Y-P F-P W-P		I ε-amino Proinsulina Humana				
Frag#	Res#	Sequence	Theor (Bo)	[M+H]	[M+2H]	[M+3H]	[M+4H]	
T1	1-3	(-)HCY (H)	398.13	399.13	200.07	133.72	100.54	
T2	4-8	(Y)NELQY (L)	665.30	666.31	333.66	222.78	167.33	
T3	9-21	(Y)LSCISTCCQEVIG (R)	1354.59	1355.60	678.30	452.54	339.66	
T4	22-22	(G)R (K)	174.11	175.12	88.06	59.05	44.54	
T5	23-54	(R)KQLSGELALPOLSGAGP GGGLEVQGVLDERE (R)	3146.61	3147.62	1574.31	1049.88	787.66	
T6	55-55	(E)R (R)	174.11	175.12	88.06	59.05	44.54	
T7	56-57	(R)RT (K)	275.16	276.17	138.59	92.73	69.80	
T8	58-62	(T)KBPTY (F)	633.30	634.31	317.66	212.11	159.33	
T9	63-63	(Y)F (F)	165.08	166.09	83.55	56.03	42.28	
T10	64-64	(F)F (G)	165.08	166.09	83.55	56.03	42.28	
T11	65-65	(F)G (R)	75.03	76.04	38.52	26.02	19.77	
T12	66-72	(G)REGCVLY (L)	838.40	839.41	420.21	280.47	210.61	
T13	73-87	(Y)LAEVLHSGCLHQNIVF (R)	1665.83	1666.84	833.92	556.28	417.47	
T14	88-97	(F)RGRHHHHHGA (-)	1255.56	1256.57	628.79	419.53	314.90	
T1-2	1-8	(-)HCDELQY (L)	1045.42	1046.43	523.72	349.48	262.36	
T2-3	4-21	(Y)NELQYLSICSTCCQEVIG (R)	2001.88	2002.89	1001.95	668.30	501.48	
T3-4	9-22	(Y)LSCISTCCQEVIGR (K)	1510.69	1511.70	756.35	504.57	378.68	
T4-5	22-54	(G)RKQLSGELALPOLSGAG PGGGLEVQGVLDERE (R)	3302.71	3303.72	1652.36	1101.91	826.69	
T5-6	23-55	(R)KQLSGELALPOLSGAGP GGGLEVQGVLDERER (R)	3302.71	3303.72	1652.36	1101.91	826.69	
T6-7	55-57	(E)RRT (K)	431.26	432.27	216.64	144.76	108.82	
T7-8	56-62	(R)RTKBPTY (F)	890.45	891.46	446.23	297.82	223.62	
T8-9	58-63	(T)KBPTYF (F)	780.37	781.38	391.19	261.13	196.10	
T9-10	63-64	(Y)FF (G)	312.15	313.16	157.08	105.06	79.04	
T10-11	64-65	(F)FG (R)	222.10	223.11	112.06	75.04	56.53	
T11-12	65-72	(F)GREGCVLY (L)	895.42	896.43	448.72	299.48	224.86	
T12-13	66-87	(G)REGCVLYLAEVLHSGCL HQNIVF (R)	2486.22	2487.23	1244.12	829.75	622.56	
T13-14	73-97	(Y)LAEVLHSGCLHQNIVFRG RHHHHHGA (-)	2903.38	2904.39	1452.70	968.80	726.85	

Average Mass = 10759.1875, Monoisotopic Mass = 10752.1616
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Modified amino acids: 23DHB(B) =

1 HCDNE LQYLS CISTC CQEVIG GRHQ LSGEL ALPOL SGAGP GGGLE VQGVQ LDERE RRTKP TYFFG REGCV LYLAE VLHSG CLHQN VFRGH RHHHH HGA

Figura 18- Cálculo teórico gerado pelo softwar MassLynx para clivagem com Tripsina e Quimiotripsina da sequência peptídica de Proinsulina e Proinsulina após reação com anidrido 2,3-Dimetilmaleico.

4.2 Caracterização da cadeia B de Insulina Biomm S.A.

A amostra de cadeia B em solução de ácido acético 0,2M, apresentou parcial solubilização ou seja, quando adicionada uma dada massa de cadeia B em um dado volume o que se obtinha era uma solução opaca (leitosa) que após 1 hora em repouso, sob condições de pH ideal (~8,3), tornava-se translúcida e pronta para uso no experimento. Na cromatografia reversa HPLC a amostra apresentou picos nos tempos

de retenção de 29,53, 30,05 e 30,61 minutos. Esses picos cromatográficos foram analisados por espectrometria de massa Maldi TOF e os resultados demonstram a frequente presença de íons de m/z 3428.78, 2487.11, 1829.86 e 859.39.

Para cada íon encontrado a interpretação de massa e sequência peptídica são propostas a seguir: íon 3428.78[M+H] isotópico de cadeia B uma vez que a m/z referente ao C12 para essa cadeia é de 3427.68; íon 2487.11[M+H] isotópico C12 da cadeia B clivada tríptica entre os resíduos B22-B23 caracterizados como cadeia B de Insulina Humana em acordo com os trabalhos de Wals em 1994 e Cruz em 1997; o íon 1830.90[M+H]⁺ clivagem Quimiotríptica entre os resíduos B16-B17 da cadeia B cuja massa média teórica calculada é de 1830.09[M+H]⁺; o íon 1852.85[M+Na]⁺ aduto de Sódio (Na) na cadeia B clivada por Quimotripsina entre os resíduos B16-B17; o íon 859.38[M+H]⁺ isotópico da clivagem tríptica da cadeia B entre os resíduos B22- B23 e B30-B31 ; 881.39[M+Na]⁺ é aduto de Sódio(Na) na cadeia B clivada por Tripsina entre os resíduos B22- B23 e B30-B31. Na Figura 19 é apresentado o espectro *full scan* dos dados acima apresentados.



Figura 19- Espectro full scan da amostra de cadeia B de Insulina Humana Recombinante ,obtido por Maldi TOF MS, onde são respectivamente encontrados os íons de m/z 3429.70[M+H]⁺, 2487.11[M+H]⁺, 1852.85[M+Na]⁺, 1829.86[M+H]⁺, 881.44[M+Na]⁺ e 859.36[M+H]⁺.

Confirmando as seqüências peptídicas dos íons citados na Figura18, foram feitas análises de espectrometria de massas MSMS e *sequenciamento de Novo* (sequenciamento em *tandem*), Figuras 20,21 e 22. Os valores de Delta para o sequenciamento em *tandem* realizado foi -0.89 (íon 3428.78),0.04 (íon,2487.11) e 0.18 (íon 1829.86). O íons 881.44[M+Na]⁺ e 859.36[M+H]⁺ não apresentaram sinal para MSMS no equipamento Maldi TOF.

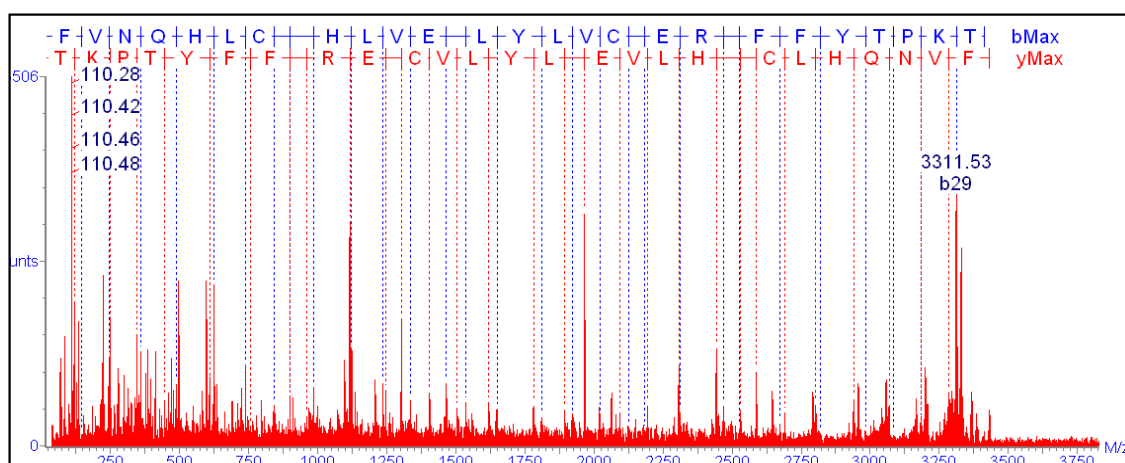


Figura 20- *Sequenciamento de novo* do íon m/z 3428.78, Delta de sequenciamento equivalente a -0,89, obtido por espectrometria MSMS Maldi TOF. A seqüência obtida corresponde à cadeia B de Insulina Humana.

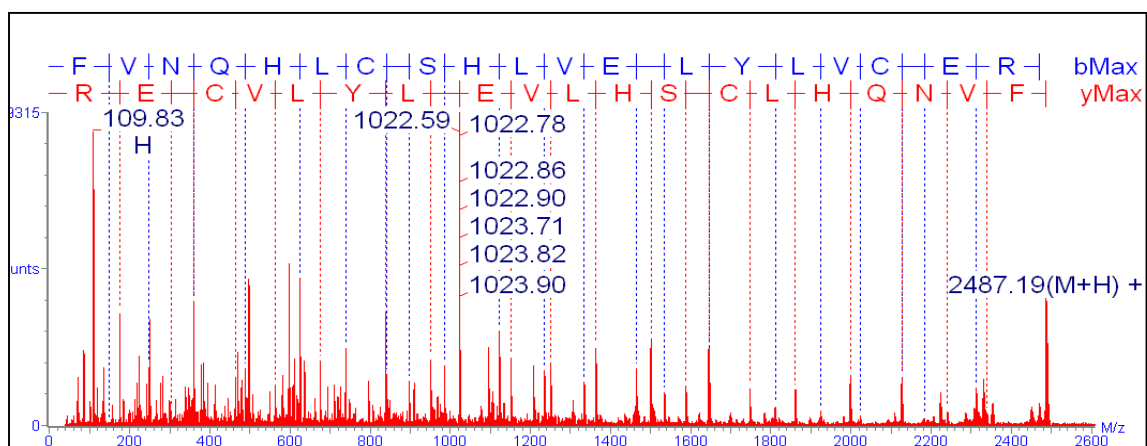


Figura 21- *Sequenciamento de novo* íon m/z 2487.11, Delta de sequenciamento equivalente a 0,04, obtido por espectrometria MSMS Maldi TOF. A seqüência obtida corresponde à cadeia B clivada entre os resíduos B22-23B de Insulina Humana.

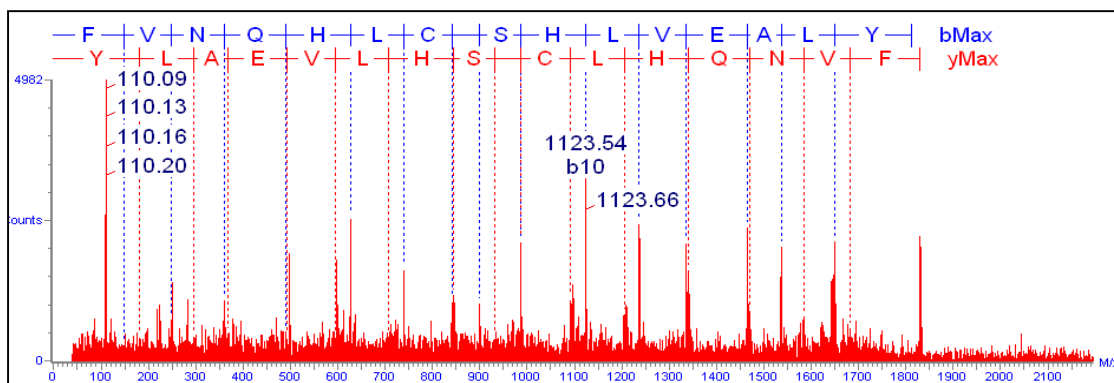


Figura 22- Sequenciamento de novo íon m/z 1829.86, Delta de sequenciamento equivalente a 0,18, obtido por espectrometria MSMS Maldi TOF. A seqüência obtida corresponde à cadeia B clivada entre os resíduos B16-17 de Insulina Humana.

De acordo com as seqüências supracitadas e apresentadas pelas clivagens teóricas e confirmadas por *sequenciamento em tandem* é possível afirmar que a Tripsina usada na produção da cadeia B possui contaminação com Quimiotripsina, responsável pelo aparecimento do produto peptídico intermediário com clivagem C-terminal na Tirosina. De posse dessas informações e com o objetivo de reproduzir ao máximo as condições da produção industrial da empresa Biomm S.A., todos os experimentos subsequentes foram realizados com a mesma Tripsina, do citado processo de obtenção da cadeia B, e portanto os demais resultados apresentados nesta dissertação levam em consideração as possíveis clivagens Quimiotríptica.

Corroborando com os resultados de caracterização da cadeia B, foram realizados estudos referentes ao teste de conceito de bloqueio do grupo ϵ -amino do qual não puderam ser observadas mudanças de m/z como esperado. O teste foi repetido em vários dias e em concentrações de 10,50,100 e 200 vezes a razão molar de anidrido citracônico e/ou anidrido maleico em relação à cadeia B. Nenhum espectro com qualquer modificação de m/z pôde ser detectado.

4.3 Reação de Redução das pontes dissulfeto da Insulina Humana Recombinante:

Cadeia A e B

A liberação de Insulina e suas cadeias A e B nas ilhotas de Langerhans isoladas de rato demonstram que tanto a Insulina quanto os peptídeos A e B aparecem no meio de incubação, com a predominância de peptídeos em uma proporção molar de cerca de 5:1. Ou seja, no meio onde a Insulina é expressa é possível encontrar seus peptídeos nas frações solúveis (Zahradnik, 1969).

A obtenção dos peptídeos de cadeia A e B de Insulina, separadamente, é possível pela reação de redução das pontes dissulfeto usando um agente redutor, neste caso o Ditioneitol (DTT) e posterior purificação por cromatografia de fase reversa HPLC. Para tanto, foi necessária uma prévia caracterização da Insulina Humana Recombinante, lote MLR 462, feito por meio de cromatografia de fase reversa HPLC e pelo perfil de espectrometria de massa MALDI MS apresentados nas Figuras 23 e 24 .

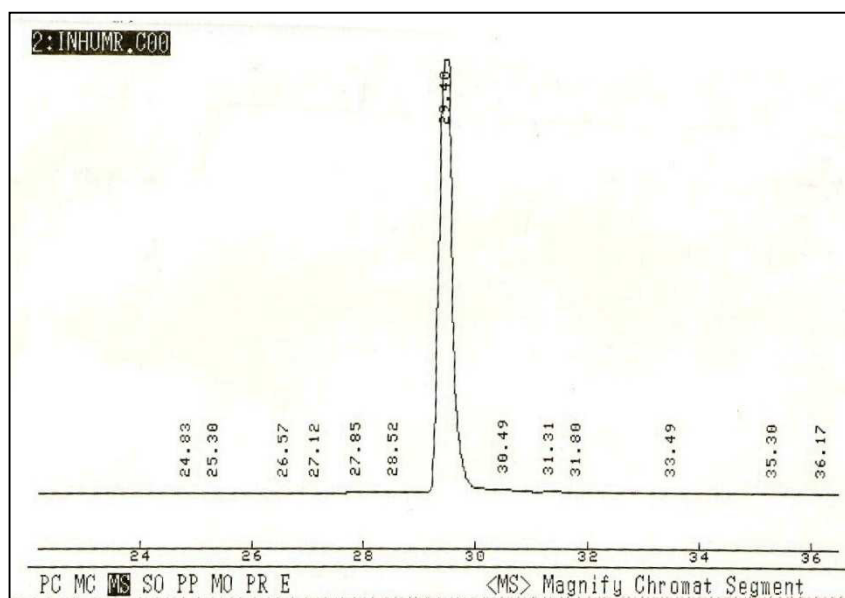


Figura 23- Perfil cromatográfico da Insulina Humana Recombinante MLR462

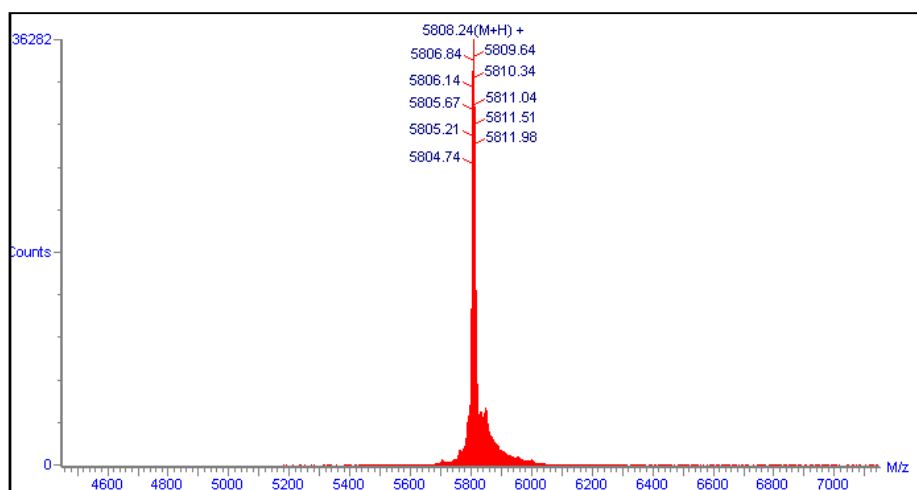


Figura 24- Espectro de massa obtido por Maldi TOF de Insulina Humana Recombinante lote MLR462. Valor teórico calculado monoisotópico m/z 5806.68 e média m/z 5810.7.

Confirmada a presença de único íon m/z 5806.6 e perfil cromatográfico com tempo de retenção 29,4 minutos foi possível iniciar a reação de redução e alquilação da Insulina Humana Recombinante por meio de DTT .

O perfil cromatográfico da reação de redução é mostrado na Figura 25 .Os picos eluídos foram analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF MS nas Figuras 26 e MALDI-TOF MSMS na Figura 27. Ao final da reação de redução as amostras foram purificadas via cromatográfica HPLC e analisadas por espectrometria de massa.

Os espectros de MS apresentando o perfil do isotopólogos para cada cadeia obtida e o espectro MSMS da cadeia A com o seu respectivo *sequenciamento de novo*, Figura 28, confirmam o perfil inequívoco para a cadeia A m/z 2383.73 e cadeia B 3428.78 já citados neste trabalho.

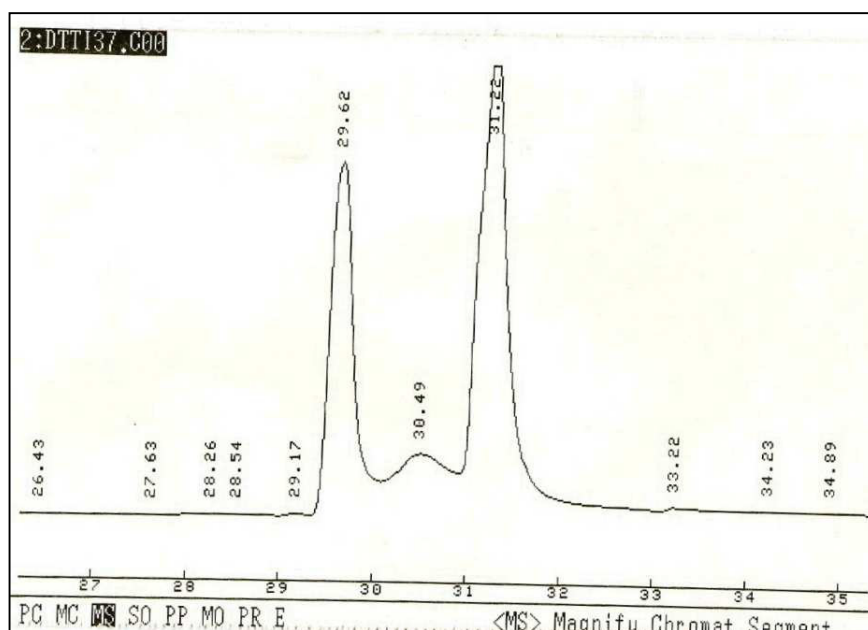


Figura 25- Perfil cromatográfico da reação de redução com DTT da amostra Insulina Humana Recombinante.

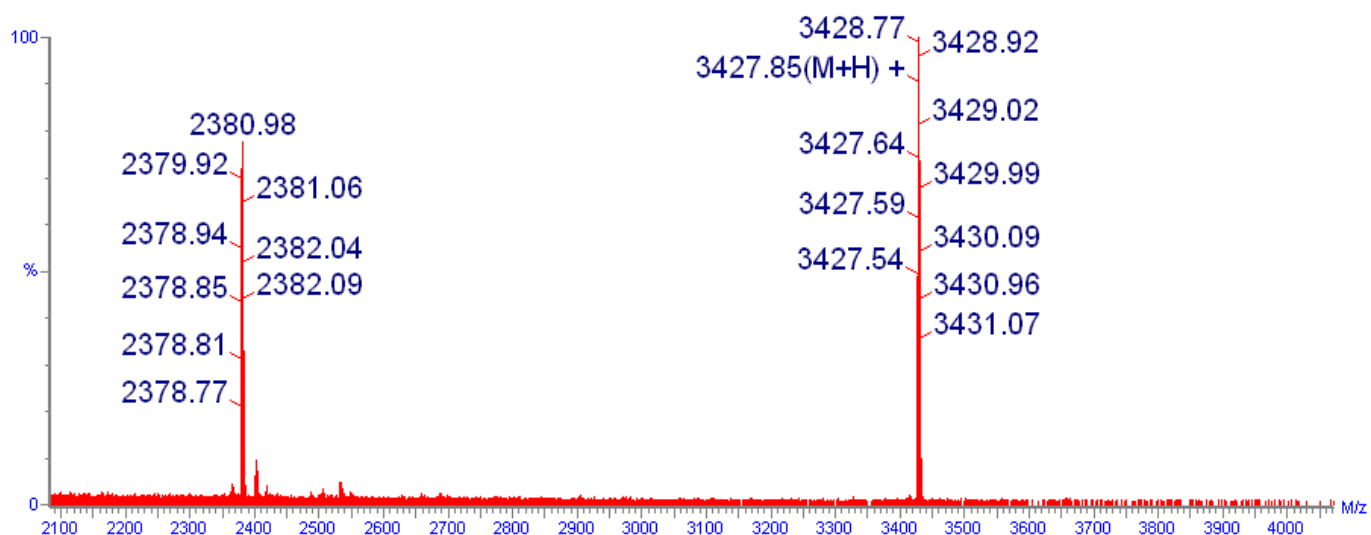


Figura 26- Perfil MS da amostra Insulina Humana Recombinante lote MLR462, íons encontrados 2382.09 da cadeia A e 3427.69 da cadeia B obtidos por Maldi TOF MS. Valores teóricos Cadeia A m/z média 2838.73 monoisotópica 2382.00 e Cadeia B 3429.97 m/z média e monoisotópica 3427.68

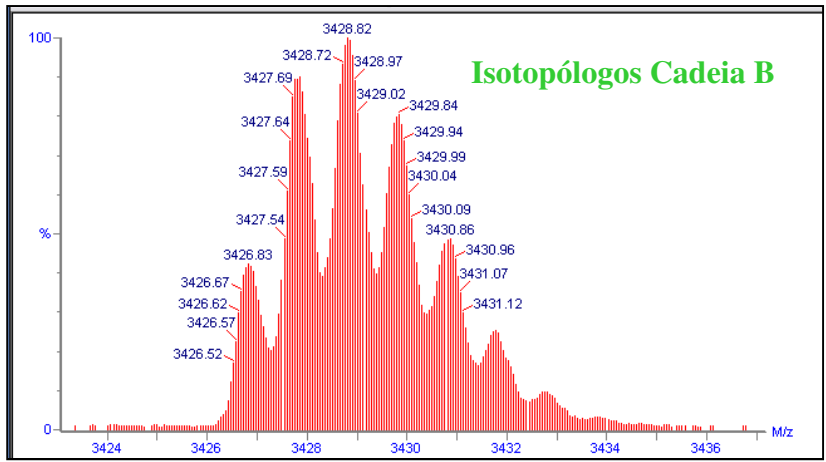
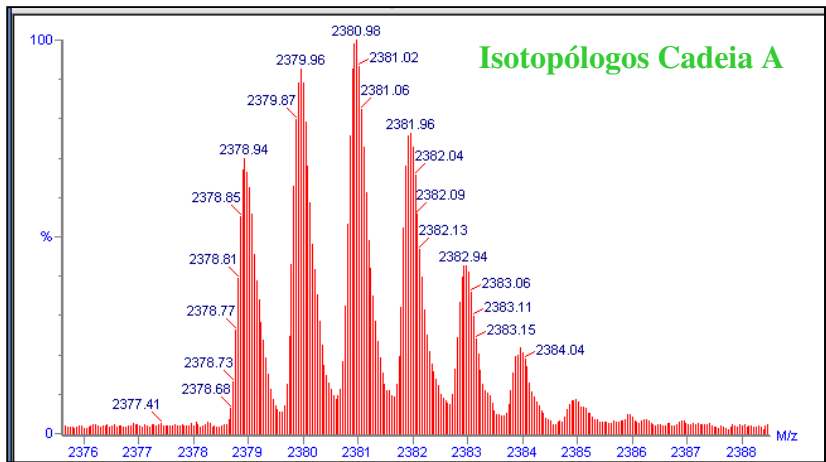


Figura 27- Perfil de isotopólogos de cadeia A e B de Insulina Humana Recombinante obtidos por Maldi TOF MS.

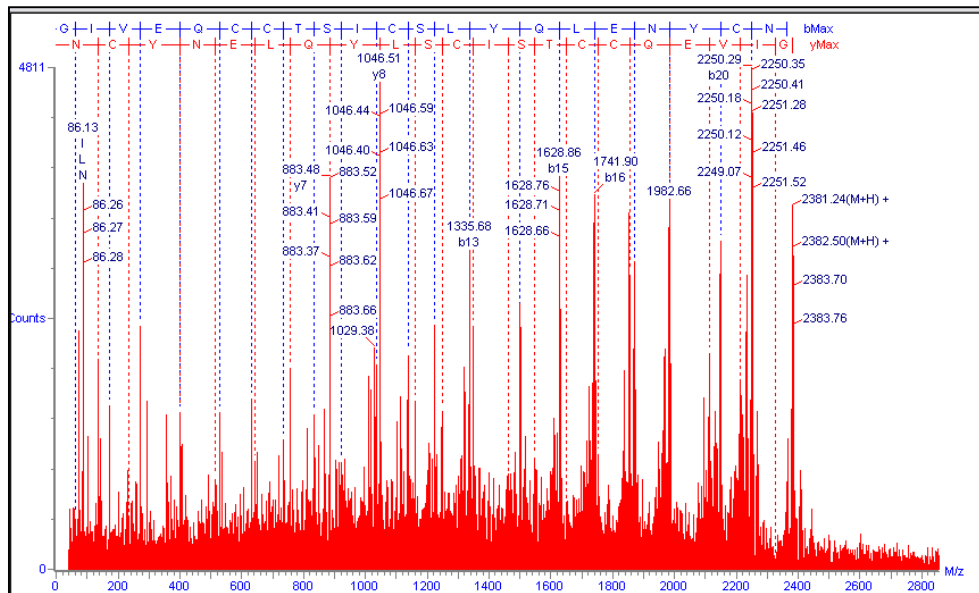


Figura 28- Espectro do sequenciamento em Tandem cadeia A m/z 2383.76 e sequenciamento de novo obtido por Maldi TOF MSMS.

4.4 Reação de bloqueio de grupos ϵ -aminos

Com a obtenção da cadeia B isolada foi possível determinar o quão efetiva foi a reação de bloqueio de grupos ϵ -amino, objetivo proposto como teste de conceito.

O perfil cromatográfico do tratamento da cadeia B com anidrido citracônico e anidrido 2,3-dimetilmaleico apresentado na Figura 29 demonstra uma mudança no perfil do tempo de retenção da cromatografia entre os tratamentos propostos. A fórmula molecular, massa média e massa monoisotópica molecular desses reagentes são respectivamente $C_5H_4O_3$, 112.0850 Da e 112.0160 Da; $C_6H_6O_3$, 126.1118 Da e 126.0317 Da. Esta mesma reação de bloqueio de grupos ϵ -amino de lisinas usando anidrido citracônico para Proinsulina foi proposta Son em 2009. A massa teórica calculada para a modificação da cadeia B de Insulina com anidrido citracônico é 3525.05Da quando há perda neutra de uma molécula H_2O .

As perdas neutras, ou seja, moléculas de H_2O m/z 17 $[M+H]^+$, NH_3 m/z 16 $[M+H]^+$ e CO m/z 27 $[M+H]^+$ são, segundo Cantú em 2008, frequentemente geradas durante o processo de dissociação induzida por colisão.

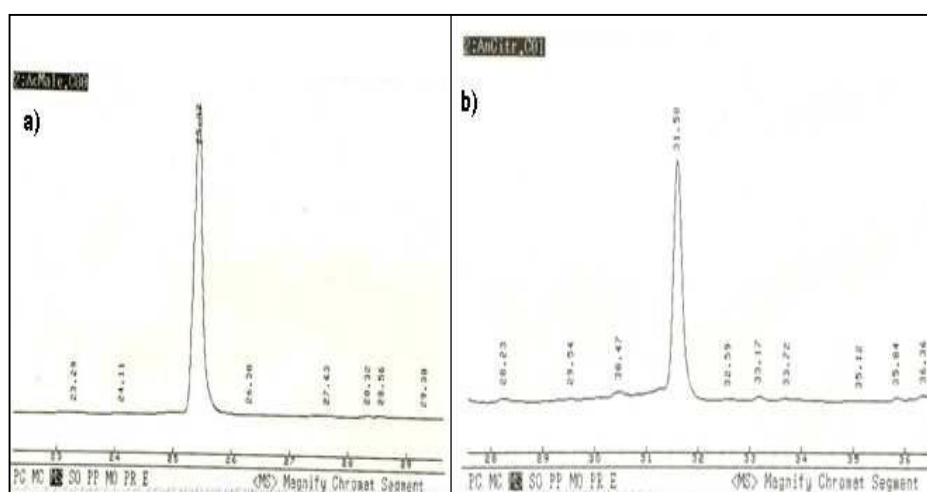


Figura 29- Cromatograma de purificação em HPLC, a) reação de anidrido citracônico e cadeia B de Insulina, b) reação de anidrido 2,3-dimetilmaleico e cadeia B de Insulina.

O espectro encontrado na reação bloqueio, Figura 30, sugere que a reação não foi efetiva quando usado o anidrido citracônico e a presença do íon de m/z 2487.31 cujo espectro MSMS, Figura 20, confirma a presença do produto de Tripsinólise da cadeia B entre resíduos B-22 e B-23 sugeridos por (Wals.1994,Cruz.1997).



Figura 30- Espectro da reação de bloqueio da cadeia B com anidrido citracônico obtido por Maldi TOF MS. Cálculo teórico m/z 2487.23.

A reação de bloqueio dos grupos ϵ -amino de Lisinas com anidrido 2,3-dimetilmaleico foi sugerida por Dixon em 1968 e é demonstrado no mecanismo abaixo, Figura 31. A massa calculada para o produto da reação de bloqueio na cadeia B com anidrido 2,3-dimetilmaleico é de 3539.07Da e há liberação de uma molécula de H_2O como perda neutra.

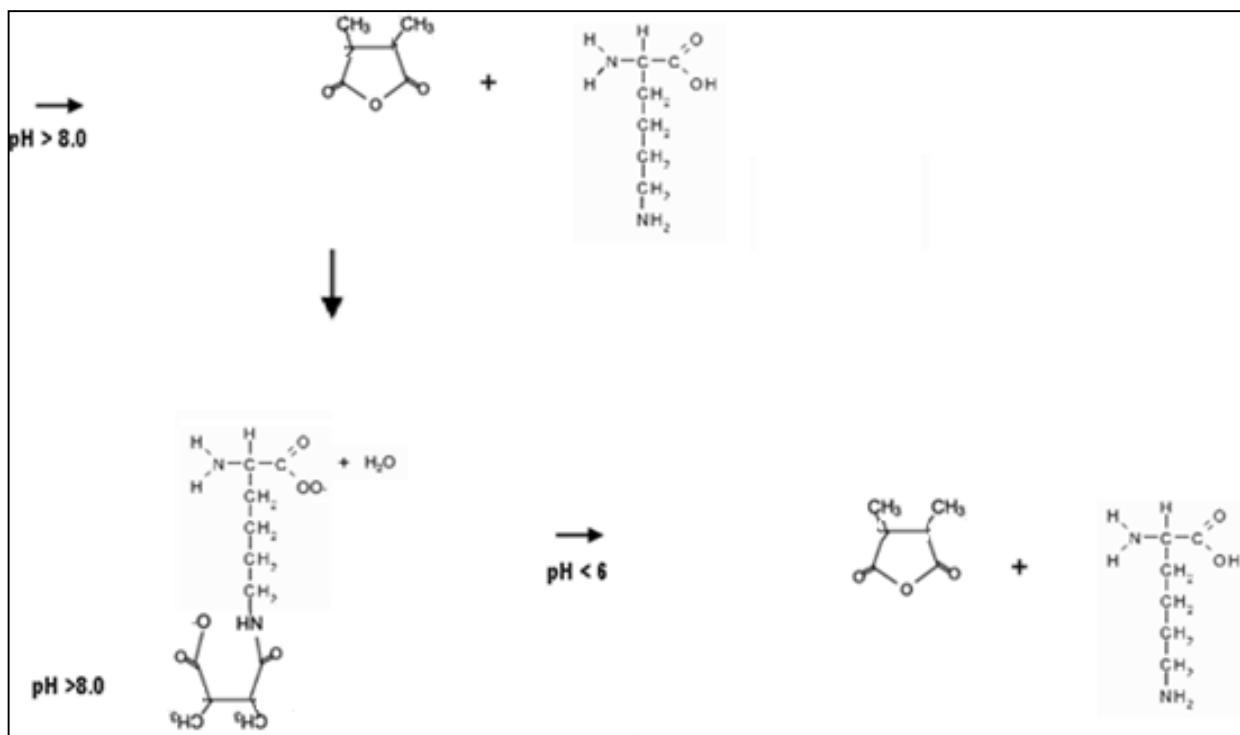


Figura 31- Mecanismo de bloqueio do grupoε-amino de lisina em reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico proposto por Dixon em 1968.

O resultado da reação de bloqueio do grupo amino com anidrido 2,3-dimetilmaleico é observado no espectro da Figura 32. A reação de bloqueio aconteceu para parte da amostra uma vez que pôde ser detectada, na faixa de m/z 3426, a presença do íon de cadeia B sem o bloqueio com o anidrido 2,3-dimetilmaleico. Esta reação de bloqueio cuja a concentração molar de 2,3-dimetilmaleico em relação à massa molar da cadeia B é de 50 vezes sugere que, para o efetivo bloqueio de todos os grupos amino livres (α e ϵ) da amostra ocorram, são necessárias medidas de otimização da reação de bloqueio.

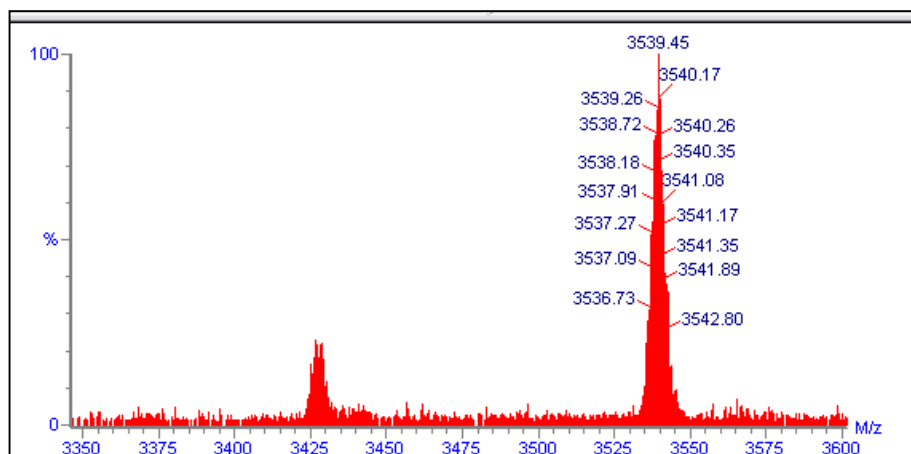


Figura 32- Deslocamento de m/z de 3428 para 3539 após a modificação química com anidrido 2,3-dimetilmaleico. Cálculo teórico m/z da Cadeia B de Insulina Humana 3427.68 e em reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico m/z 3539,08.

Frente aos resultados obtidos, o reagente de escolha para o teste de bloqueio dos grupos amino livres em Insulina Humana Recombinante foi o anidrido 2,3 dimetilmaleico usado em concentrações de 50,100 e 200 vezes a razão molar de Insulina MLR462.

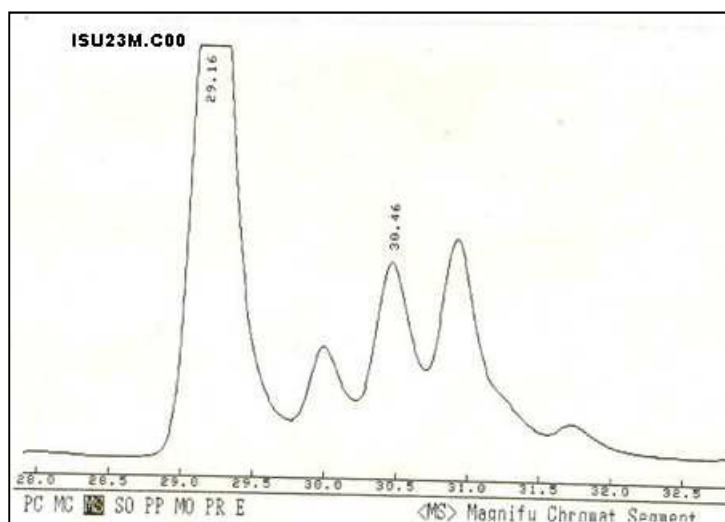


Figura 33- Perfil cromatográfico da amostra de Insulina Humana Recombinante após reação de bloqueio com anidrido 2,3-dimetilmaleico.

O perfil cromatográfico mostrado na Figura 33 apresenta diversos picos em diferentes tempos de retenção dentre os tratamentos realizados sugerindo que, os produtos formados na presença das diferentes concentrações apresentam perfis de hidrofobicidade distintos para a cromatografia de fase reversa HPLC usando coluna C18. Na concentração de 50 vezes a razão molar, vários picos de diferentes tempos de retenção são encontrados possivelmente devido ao bloqueio parcial dos grupos amino livres (α e ϵ) já sugeridos no tratamento anteriormente demonstrado para cadeia B. As concentrações de 100 e 200 vezes tem com semelhanças alguns tempos de retenção sendo os picos melhores resolvidos ora para 100 vezes ou 200 vezes. Diante dessas evidências cromatográficas, os experimentos a seguir foram conduzidos com reação de bloqueio da qual a concentração de 2,3-dimetilmaleico em relação á Insulina é de 100:1, à temperatura ambiente de 22°C com constante correção de pH (feita com NaOH 0,1N) até o término da reação de bloqueio. O espectro da reação de bloqueio pode ser analisado na Figura 34.

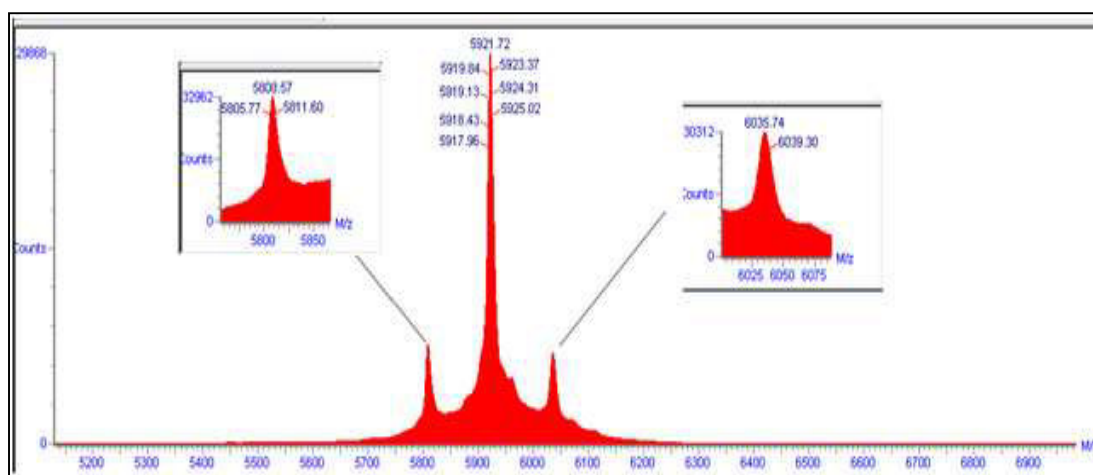


Figura 34- Espectro MS obtido por Maldi TOF da Insulina MLR462 após reação com 2,3-dimetilmaleico. Íons encontrados com m/z 5805.7, 5917.9 e 6035.7. Os cálculos teóricos para a Insulina Humana Recombinante é de m/z 5806.6, adição de um grupo 2,3-dimetilmaleico m/z 5936.81 e adição do segundo grupo 2,3-dimetilmaleico m/z 6047.91.

O fato do bloqueio ocasionado por este reagente ser de extremo interesse, se faz em torno da presença de cargas negativas dos resíduos em bloqueio que passam a não estarem mais disponíveis ao reconhecimento da Tripsina, portanto, as ligações peptídicas adjacentes permanecem resistentes á hidrólise (Son, 2009.)

Para que ocorra a reação do anidrido 2,3-dimetilmaleico tanto no N-terminal (grupo α -amino) ou na cadeia lateral da Lisina (ϵ -amino) esses grupos devem estar desprotonado. O resíduo que possui o grupo α -amino N-terminal da cadeia A de Insulina é uma Glicina cujo pKa (medida da tendência do grupo para ceder o próton) é de 9,6 e na cadeia B uma Fenilalanina cujo pKa é 9,24 . O resíduo de Lisina na cadeia B de Insulina não sofre impedimento espacial, como já demonstrado na Figura 8, portanto o seu grupo ϵ -amino pKa 10,53 podem reagir de acordo com a sua desprotonação.

Nos experimentos realizados o tampão do preparo de amostras tem o pH 9,0 fator este limitante para que os grupos aminos permanecessem na forma desprotonada. No citado valor de pH, cerca de 33,53% dos grupos α -amino de Fenilalanina e Glicina estão na sua forma desprotonada e potencialmente capazes de ter átomos de oxigênio eletronegativos no grupo carboxila que tendem a atrair elétrons, aumentando a tendência do um grupo amino liberar prótons e se tornar reativo para com o anidrido 2,3-dimetilmaleico. Uma parcela menor de grupos ϵ -aminos, cerca 3,065% permanecem desprotonados e portanto, menos reativos para a reação de bloqueio, o que não torna o resíduo menos reativo frente aos demais já citados como observado por Nikhil em 2006. No entanto, resíduos de Lisina podem ser encontrados em valores menores de pKa como resultado dos efeitos de microambientes. Os valores de pKa relatados por Schimidt & Westheimer em 1996, demonstram que as lisinas são consideradas mais reativas e podem todavia serem seletivamente modificadas. Valores de pKa 5,9 foram

encontrados por esses pesquisadores para resíduos de Lisina reativos em oxaloacetato descaboxilase.

Os cálculos teóricos de massa para Insulina Humana bloqueada coincidem com os valores de m/z encontrada nos experimentos de aproximadamente 5921 e 6035 respectivamente e apresentados no espectro da Figura 34, sugerindo dois sítios de bloqueio. A m/z referente ao segundo bloqueio apresenta-se muito lábil ao processo de preparo da amostra para análise em Maldi TOF uma vez que o pH 3,5 da matriz utilizada, em minutos, impossibilita a detecção do bloqueio. A esse fenômeno, já observado por Butler em 1969, foi necessário o preparo da matriz na faixa de pH 5,0 o que dificultou o processo de cristalização junto a matriz na placa e posterior ionização. Alguns espectros ainda assim foram obtidos e neles podem ser detectados a presença de massa adicional referente ao segundo bloqueio.

A reversibilidade do bloqueio de grupos amino de proteínas e peptídeos tem algumas vantagens. A reação do bloqueio ocorre por volta do pH 8,5-9,5 e é completamente específico para amino grupos. As proteínas e peptídeos bloqueados são muito solúveis em pH neutro ou alcalino desde que haja o predomínio de cargas negativas que maximizam a repulsão eletrostática e minimizar a agregação. O grupo maleil amino formado pode ter meia vida muito estável, acima de pH 8,0 e facilmente hidrolisado, abaixo de pH 5,0, por catálise intramolecular .

Afim de confirmar a presença do bloqueio do grupo ϵ -amino na reação com 2,3-dimetilmaleico foi analisada a amostra de Insulina, possivelmente bloqueada, no equipamento Q-TOF onde foram encontrados os íons multicarregados $1162.69[M+5H]^+$, $1184.07[M+5H]^+$, $1452.66[M+H]^+$, $1479.67[M+H]^+$, $1936.58[M+3H]^+$ e $1972.95[M+3H]^+$ atribuindo inequivocamente a presença do bloqueio na Insulina sem

definir o amino grupo e resíduo bloqueado devido a dificuldade de obtenção de espectros Q-TOF MSMS, Figura 35.

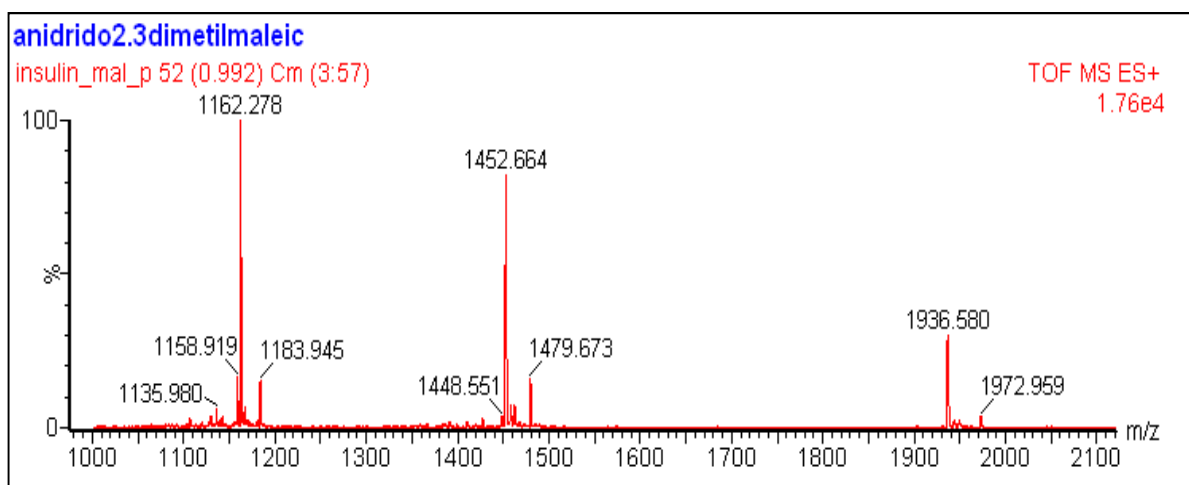


Figura 35- Espectro *full scan* dos íons multicarregados 1936.58[M+3H]⁺, 1972.95[M+3H]⁺, 1479.67[M+4H]⁺, 1452.66[M+4H]⁺, 1162.69[M+5H]⁺ e 1183.94[M+5H]⁺ obtidos por Q-TOF MS da Insulina após reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico.

4.5 Caracterização da amostra de Proinsulina Humana Recombinante

O estudo a seguir foi desenvolvido diante das caracterizações e teste de bloqueio de grupos α e/ou ϵ -amino de cadeia B e de Insulina Humana verificados nos itens acima.

A amostra HGUT0045 doada pela empresa Biommm S.A. na forma liofilizada, foi preparada a partir do processo de fermentação da cepa *e.coli* que possui o inserto de expressão da Proinsulina Humana. Após o processo de expressão, as células passam por um processo de lise onde são liberados os chamados corpos de inclusão de Proinsulina Humana que são tratados para que ocorra o desenovelamento das proteínas e posteriormente o enovelamento correto é favorecido.

A construção do vetor de expressão da Proinsulina tem como elementos cadeia A, cadeia B, cadeia C (peptídeo C) e cauda de Histidina. A proteína expressa possui 97 resíduos de aminoácidos cuja massa molecular é de 10758,12 Da. Após a expressão essa proteína (chamada proteína de fusão) sofre a hidrólise de uma Metionina, permanecendo com 96 resíduos e massa molecular de 10633,07Da. A partir de clivagens com Tripsina e Carboxipeptidase B essa proteína tem uma segunda estrutura hidrolisada, a Cauda de Histidina, e então sua cadeia passa a ter 86 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 9406,56Da.

Na cromatografia de fase reversa HPLC da Proinsulina o pico de retenção encontrado foi de 29 minutos dos quais todo o volume eluído e coletado foi secado, colocado em mistura com a matriz α -ciano, aplicado diretamente sobre a placa de Maldi e analisado por MS Maldi TOF, representado na Figura 36. O espectro da amostra possui intenso íons de m/z 10616.48 $[M+H]^+$ e 5313.32 $[M+2H]^+$, sendo eles respectivamente, os valores de m/z teóricos para Proinsulina com perda neutra de água e o íon correspondente com dupla carga.

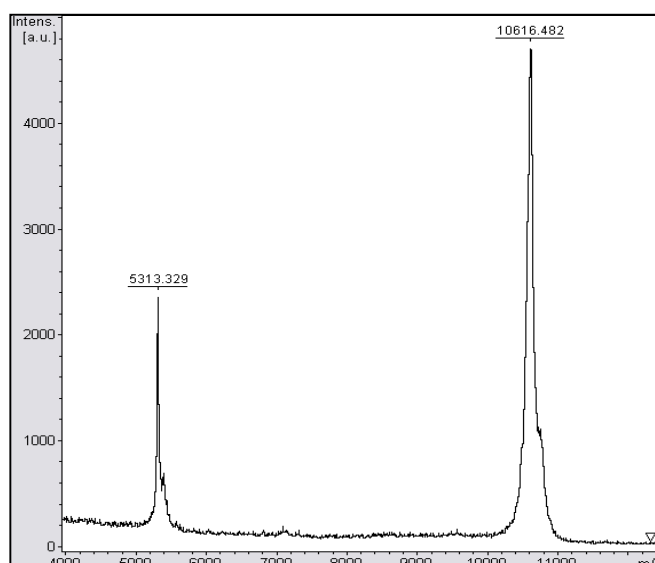


Figura 36- Espectro MS Maldi TOF da Proinsulina Humana Recombinante HGUT0045, m/z 10616.48 $[M+H]^+$ e 5313.32 $[M+2H]^+$

O perfil dessa amostra foi avaliado no espectrômetro de massa Q-TOF e apresentado a seguir, Figura 36. Os íons encontrados são multicarregado com m/z $1788.14[M+6H]^+$, $1518.84[M+7H]^+$, $1329.14[M+8H]^+$, $1181.52[M+9H]^+$ e $1063.47[M+10H]^+$.

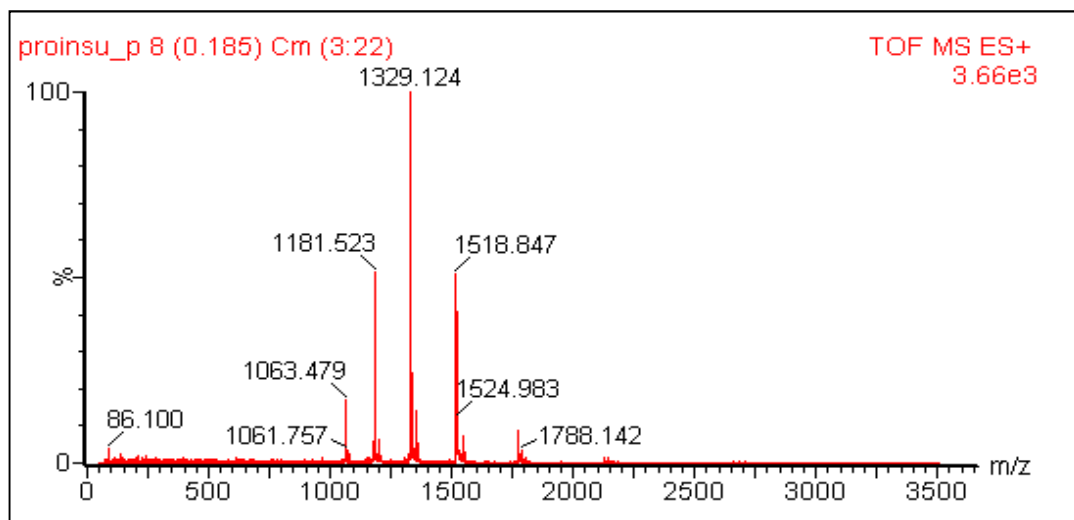


Figura 37- Espectro Q-TOF MS da Proinsulina Humana Recombinante com íons multicarregados m/z $1788.14[M+6H]^+$, $1518.84[M+7H]^+$, $1329.14[M+8H]^+$, $1181.52[M+9H]^+$, $1063.47[M+10H]^+$

A reação de bloqueio do grupo ϵ -amino da Proinsulina Humana Recombinante pôde ser detectada através de espectrometria de massa Maldi TOF MS cuja massa média calculada para o produto desta reação é de $10742.18[M+H]^+$ na presença de perda neutra de H_2O e sua respectiva dupla carga m/z $5371.09 [M+2H]^+$, Figura 38. A presença do íon m/z $9389.20 [M+H]^+$ de baixa intensidade, indica a perda da cauda de histidina cuja m/z teórica é de $9388.57 [M+H]^+$.

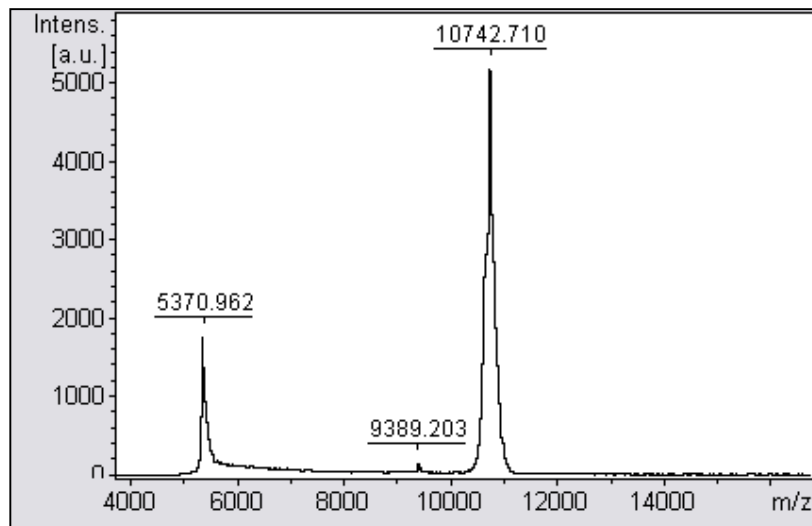


Figura 38- Espectro Maldi TOF MS da Proinsulina Humana Recombinante após a reação de bloqueio de grupos amino livres. Íons encontrados $10742.71[M+H]^+$ e $5370.96[M+2H]^+$.

4.6 Atividade enzimática durante a conversão de Proinsulina modificada com 2,3-dimetilmaleico e não modificada

Existe uma correlação entre a estrutura das proteínas ou peptídeos que fazem parte da molécula enzimática e suas propriedades biológicas, e esta propriedade leva a uma especificidade extraordinariamente alta e reproduzível. A especificidade das enzimas usadas nesse experimento (Tripsina e Carboxipeptidase B) é classificada como absoluta, ou seja, exclusiva para a hidrólise de ligações peptídicas específicas formadas por grupos carboxílicos dos aminoácidos básicos.

O principal objetivo dos experimentos onde a velocidade de conversão enzimática foi determinada se fez com o interesse de verificar se a reação de bloqueio dos grupos ϵ -amino proposta neste trabalho poderia interferir na catálise enzimática durante a conversão de Proinsulina á Insulina. A Atividade de conversão foi avaliada paralelamente na presença de Proinsulina modificada com anidrido 2,3-dimetilmaleico

(concentração molar de 100:1) e sem a modificação. Para determinar a atividade enzimática da Tripsina, a cada 1 hora de conversão, foi determinada a absorbância do produto da hidrólise do substrato cromogênico sintético N_α-benzoyl-DL-arginine-p-nitroaniline (BAPNA) medido à λ 410nm por espectrofotometria e sob condições de pH 8,3, temperatura de 25°C e concentração de substrato de 90μM.

Os resultados encontrados, Figuras 39 e 40, demonstram que os valores de absorbância entre os tempos e tratamentos permanecem inalterados durante as 8 horas de conversão e após 24 horas. Este resultado corrobora para a interpretação de velocidade que também se faz inalterada na presença do tratamento, Figura 41, sugerindo que o sítio ativo da Tripsina não sofreu qualquer modificação.

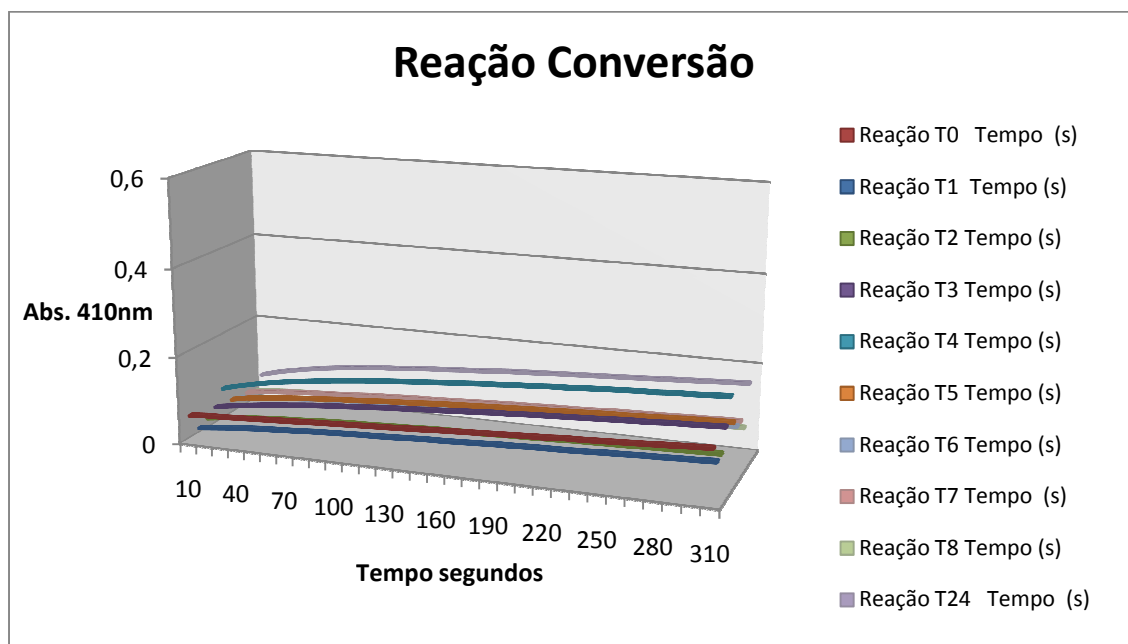


Figura 39- Curva de atividade enzimática da Tripsina durante a conversão trípica de Proinsulina à Insulina em tampão (pH 8,3). Medidas de absorbância em λ 410nm coletadas por 310s a cada 1 hora .

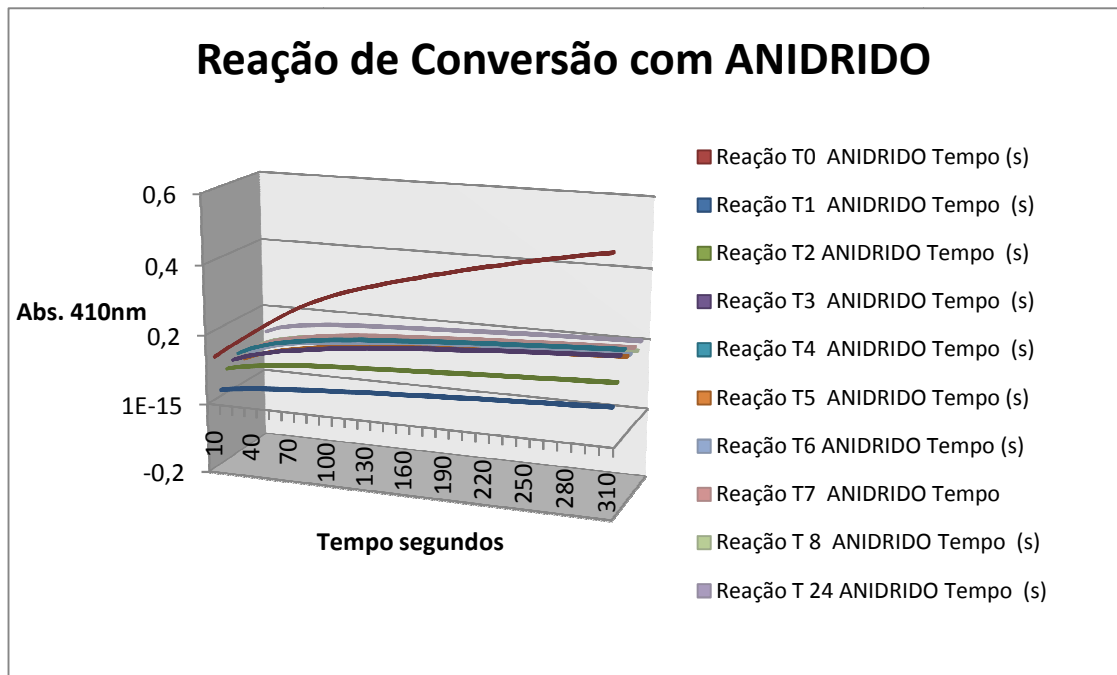


Figura 40- Curva de atividade enzimática da Tripsina durante a conversão trípica de Proinsulina modificada com 2,3-dimetilmaleico á Insulina em tampão (pH 8,3). Medidas de absorbância coletadas por 310s. a cada 1 hora.

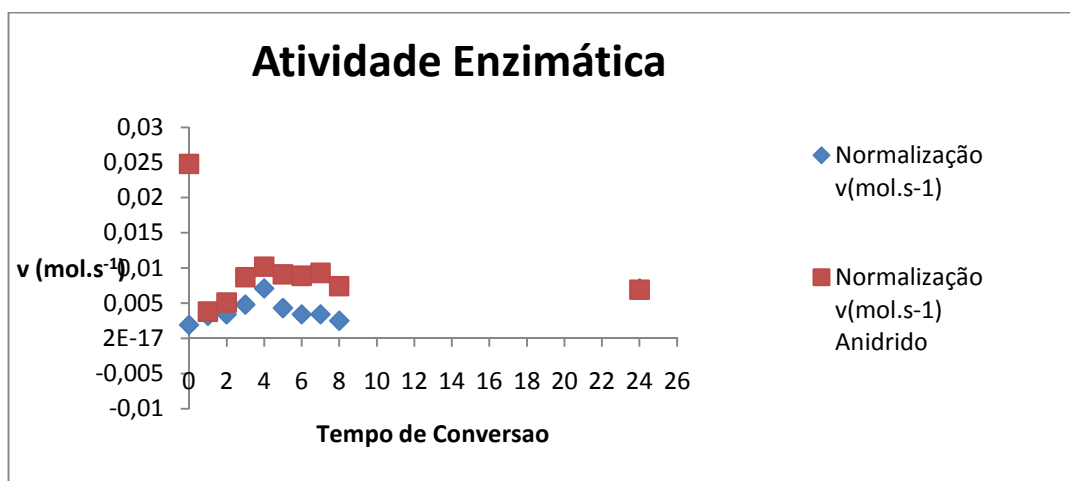


Figura 40- Atividade enzimática de Tripsina durante 24 horas expressa em velocidade versus tempo de conversão de Proinsulina em Insulina.

4.7 Conversões enzimáticas e a formação de B-30 Destreonina Insulina

Diante do objetivo de minimização da formação de B-30 Destreonina Insulina durante a conversão enzimática de Proinsulina á Insulina, experimentos de conversão enzimática fazendo uso ou não do reagente anidrido 2,3-dimetilmaleico foram

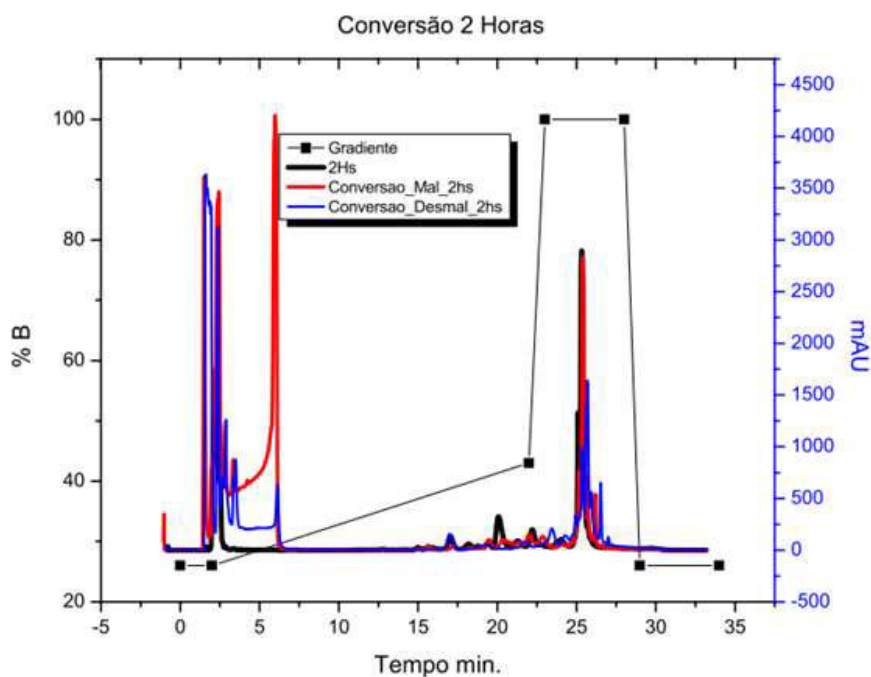
realizados e os compostos intermediários desta reação foram analisados por cromatografia de fase reversa HPLC com coluna C4 e espectrometria de massa.

Um dos derivados de Insulina presente no complexo peptídico formado durante a conversão enzimática é a B-30 Destreonina Insulina, cuja m/z teórica é $5705.6372[M+H]^+$, $2852.8186[M+2H]^+$, $1901.87[M+3H]^+$, $1426.40[M+4H]^+$, $1141.12[M+5H]^+$ e sua formação se deve á clivagem tríptica no C-terminal do resíduo 30 da cadeia B de Insulina Humana. Este composto é de difícil separação na cromatografia de fase reversa HPLC uma vez que a sua relação com a cadeia peptídica da Insulina Humana se faz pela clivagem tríptica de um resíduo de Treonina, logo, seu perfil cromatográfico muito próximo ao da Insulina Humana Recombinante.

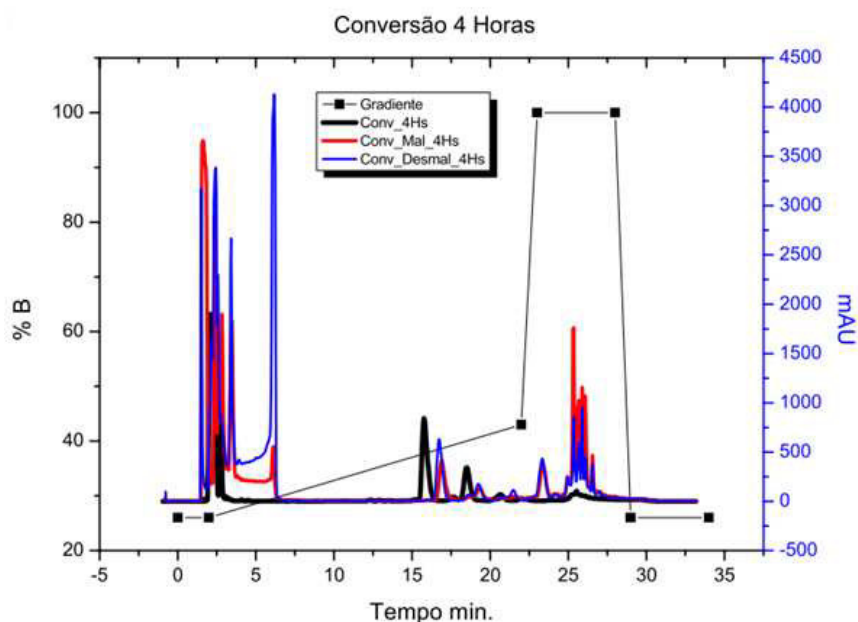
O presente trabalho, sugere que através do bloqueio de grupos ϵ -amino a formação deste derivado possa ser minimizado. Diante desta sugestão, estudos da conversão enzimática foram necessários. Os dados teóricos desta conversão usando as enzimas Tripsina e Carboxipeptidase B foram feitos e apresentados nesse trabalho e a seguir dados experimentais foram conduzidos de forma a confirmar a sugestão da proposta.

Durante os experimentos de conversão enzimática da Proinsulina foram realizadas cromatografias de fase reversa HPLC e os dados gerados são apresentados para os tempos 2,4,6 e 8 horas. As amostras em estudos foram Proinsulina, Proinsulina em reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico e esta mesma amostra após 2 horas na presença de meio ácido (ácido acético, pH 3,5 e temperatura de 23°C). Ao processo de reversão da reação de anidrido em bloqueio dos grupos ϵ -amino dá-se o nome de reação de desmaleilação, segundo Son em 2009 que utilizou o reagente anidrido citracônico.

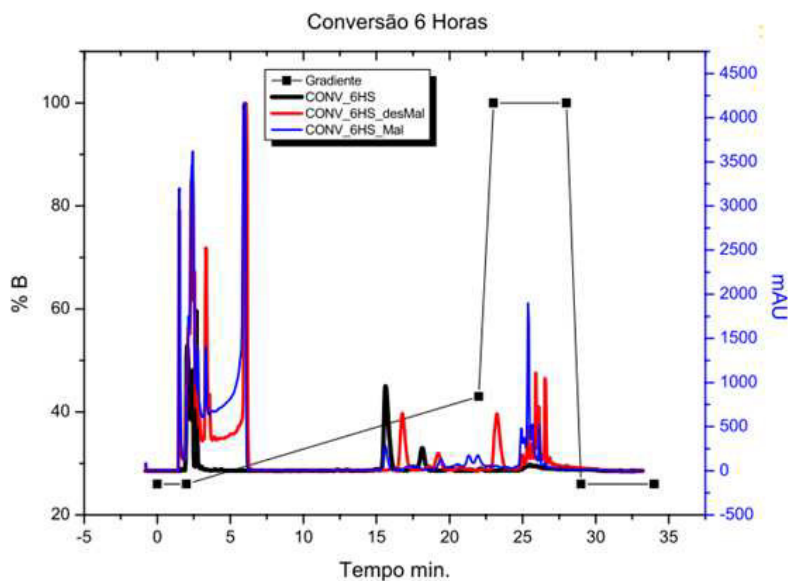
O perfil e análises das cromatografias de conversão enzimática para as amostras e condições propostas na metodologia deste trabalho são apresentados a seguir.



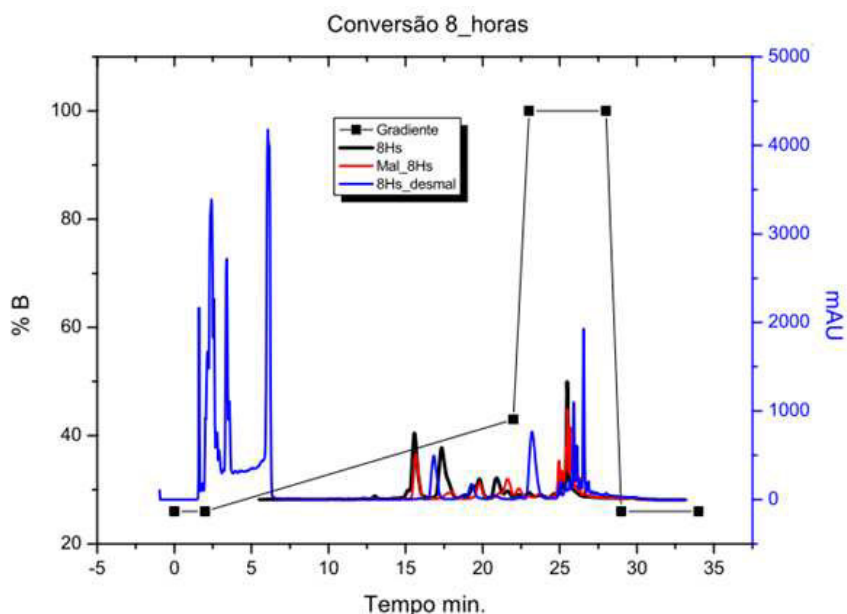
Cromatografia 1- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 2 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase: -- Proinsulina; - - Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 2 horas de conversão.



Cromatografia 2- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 4 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B: -- Proinsulina; - - Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 4 horas de conversão.



Cromatografia 3- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 6 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B: -- Proinsulina; -- Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 4 horas de conversão.



Cromatografia 4- HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5 μ m,C4,4.6x150mm), após 8 horas de conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B: -- Proinsulina; -- Proinsulina em reação com 2,3-dimetilmaleico; -- desmaleição após 4 horas de conversão.

De acordo com o processo industrial de conversão, purificação e quantificação de B-30 Destreonina Insulina já estabelecidos pela empresa Biommm S.A., o pico

cromatográfico referente à Insulina possui o tempo de retenção de 15 minutos, referente à B-30 Destreonina Insulina o tempo de retenção é de 17 minutos e para a Proinsulina o tempo de retenção é de 25 minutos, já no final do gradiente e início da lavagem da coluna. Além desses picos, foram detectados alguns outros cuja área não representa elementos significativos ao processo de purificação, como componente Xi ainda não caracterizado. Tais elementos foram reportados juntos aos dados obtidos para a formação de Insulina e B-30 Destreonina Insulina cujo cálculo de rendimento da reação de conversão é apresentado na Tabela 6.

Nos dados apresentados na Tabela 6, as área dos picos cromatográficos relativos ao tratamento da Proinsulina com 2,3-dimetilmaleico após 4 horas de conversão são: Insulina 315,23 e B-30 Destreonina Insulina 23,98. Esses mesmos elementos são analisados nas amostras sem tratamento com anidrido 2,3-dimetilmaleico e as áreas encontradas são 347,15 Insulina, 20,91 B30-Destreonina Insulina. Após 6 horas de reação de conversão os dados apresentados demonstram o aumento da área do pico de Insulina e decréscimo da área para o pico da B-30 Destreonina Insulina o que, no entanto, foi inversamente observado para o tratamento com 2,3-dimetilmaleico cuja área do pico de Insulina diminui consideravelmente e a área do pico de B-30 Destreonina Insulina demonstra uma pequena redução.

Exp. 028/10 Conversao de Proinsulina HGUT0045 a temperatura ambiente 23°C													
Tempo (h)	volume (ml)	A	A/mL	A total	Recuperação A %	Crom. Insulin %	Crom DT %	A DT	A total DT	Crom. Xi %	A xi	A Total xi	
HGUT0045	5,0000		104524,5600	522622,8000	100.								
0	5,0000												
2	5,1000	188,9754	11338,5240	57826,4700	11.1	21.58							
4	5,1000	347,1591	20829,5460	106230,6800	20.3	58.2	3.71	20,9198		25.65	153,0115		
6	5,1000	355,6480	21338,8800	108828,2800	20.8	70.73	2.73	13,7399		19.22	96,6427		
Biommm S.A.													
Exp. 028/10 Conversao de Proinsulina HGUT0045+ Anidrido 2,3-dimetilmaleico 1:100, à temperatura ambiente de 23°C													
Tempo (h)	volume (ml)	A	A/mL	A total	Recuperação A %	Crom. Insulin%	Crom DT%	A DT	A total DT	Crom. Xi %	A xi	A Total xi	P 23
HGUT0045	5,0000		104524,5600	522622,8000	100.								
0	5,0000												
2	5,1000	154,2997	9257,9820	47215,7080	9.0	34.75	6.91	30,6736		4.19	18,6185		58,8175
4	5,1000	315,2382	18914,2920	96462,8900	18.4	41.72	3.17	23,9868		5.19	39,2135		297,7353
7	5,1000	227,2439	13634,6340	69536,6300	13.3	25.93	2.24	19,6044		4.98	43,6626		524,7492

Tabela 6- Cálculo de rendimento da reação de conversão enzimática da Proinsulina e Proinsulina após modificação com anidrido 2,3-dimetilmaleico à Insulina. A= área do pico cromatográfico, DT= Destreonina Insulina , Xi= elemento não caracterizado e P23= pico 23 minutos de retenção.

Os picos demonstrados na cromatografia de conversão 6 horas da amostra HGUT 0045 foram coletados, analisados por espectrometria de massa Maldi TOF MS e a tabela com os resultados estão no Anexo 1.

A presença do pico cromatográfico 23 na Tabela 6, para a amostra após tratamento com anidrido 2,3-dimetilmaleico foi quantificado e a área relativa ao pico é de 524,74 no final de 7 horas de conversão enzimática. A hipótese levantada para a presença deste pico se fez em torno da alteração do perfil de hidrofobicidade de alguns resíduos de aminoácidos que possuem grupos amino-livres capazes de reagirem com anidrido 2,3 dimetilmaleico. Como a exemplo desta hipótese, os perfis da Insulina Humana e a Insulina Humana modificada com anidrido 2,3-dimetilmaleico podem ser observados pelo gráfico de hidrofobicidade Kyte-Doolittle (Kyte, 1982) na Figura 41.

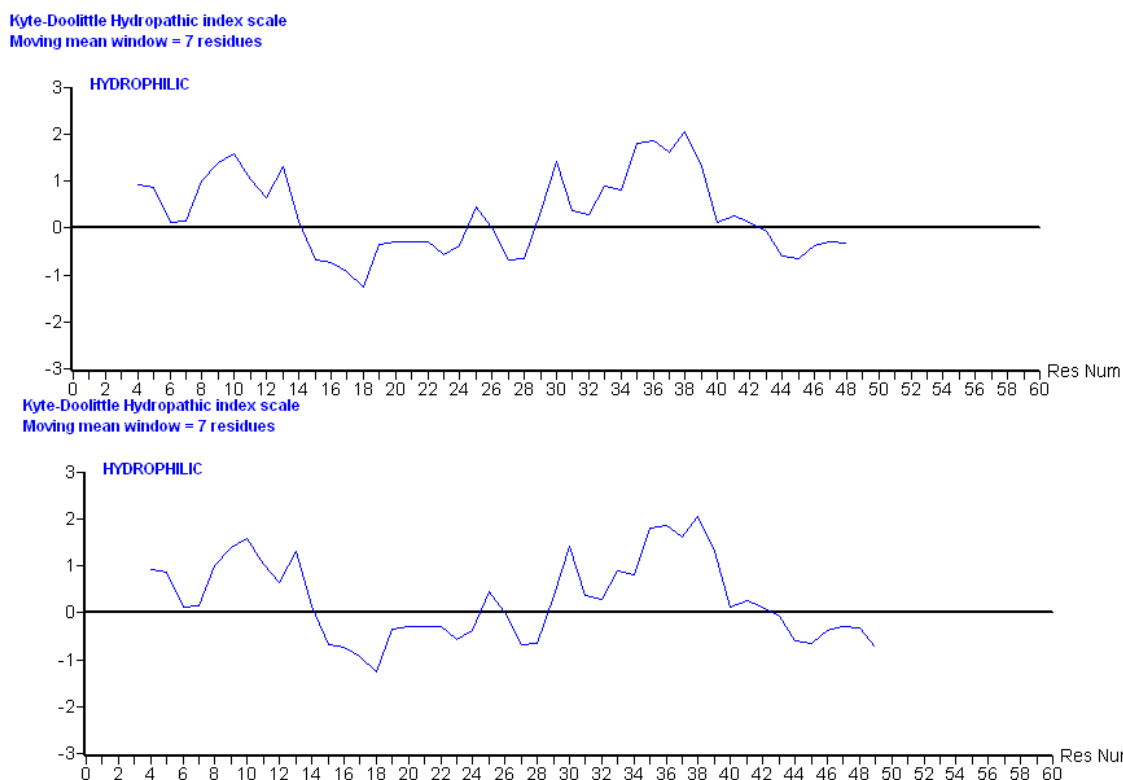


Figura 41- Gráfico de hidrofobicidade Kyte-Doolittle para a Insulina sem modificação e após modificação com 2,3-dimetilmaleico representado pela letra B.

Considerar este fato requer, todavia, a identificação, caracterização e quantificação de cada componente nos picos eluídos após tratamento com anidrido 2,3-dimetilmaleico e conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase .

4.8 Espectrometria de massa dos intermediários da conversão enzimática

Diante dos resultados discutidos anteriormente a etapa subsequente foi proposta afim de responder as perguntas sobre características dos produtos formados e eluídos em cada pico validado no protocolo de quantificação de B-30 Destreonina Insulina e em especial o pico 23, por meio de estudos e análises via Maldi TOF MS e MSMS. O experimento de conversão foi repetido e os picos então coletados e analisados por espectrometria de massa.

Para todos os tempos de conversão propostos as amostras foram preparadas através de ZIPTIP C18 e analisadas por Maldi TOF MS e MSMS. Os valores de m/z média encontrados estão na sua maioria nas formas monocarregadas $[M+H]^+$ e duplo carregados $[M+2H]^+$. As espécies de íons característicos de Proinsulina e Proinsulina ϵ -amino bloqueada podem ser observados na Figura 38 até o seu quase desaparecimento no tempo 8 horas da Figura 42. Os cuidados com as condições de pH e temperatura propostas na metodologia deste trabalho foram tomados para que os valores pré-determinados permanecessem constantes durante a conversão.

As amostras coletadas a cada hora de reação foram adicionadas à solução de ácido acético na concentração de 1:3, onde a correção do pH da solução foi necessária á inativação das enzimas de conversão e a ao não favorecimento da formação de precipitado que é elucidado pelo ponto isoelétrico dos constituintes da mistura complexa como a Insulina, PI 5,62, o reagente inicial Proinsulina, PI 6,86 na presença do pH ácido.

A patente US6,281,329 B1 da empresa Biommm S.A. propõe que para a finalização do processo de conversão enzimático, o pH da solução seja corrigido para 3,5. No trabalho feito por Son em 2009, usando anidrido citracônico para o bloqueio de grupos ϵ -amino de Proinsulina, o uso desta faixa de pH(3,5) favorece a reversão da reação de maleilação com anidrido citracônico. Portanto, cada amostra coletada foi analisada imediatamente após adição da solução de ácido acético e correção de pH 3,5 e as amostras de reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico foram submetidas a uma segunda cromatografia em HPLC após 2 horas em meio ácido, à temperatura de 23°C e analisadas por Maldi TOF MS.

Os espectros Maldi TOF MS *full scan* de cada amostra são apresentados e analisados a seguir:

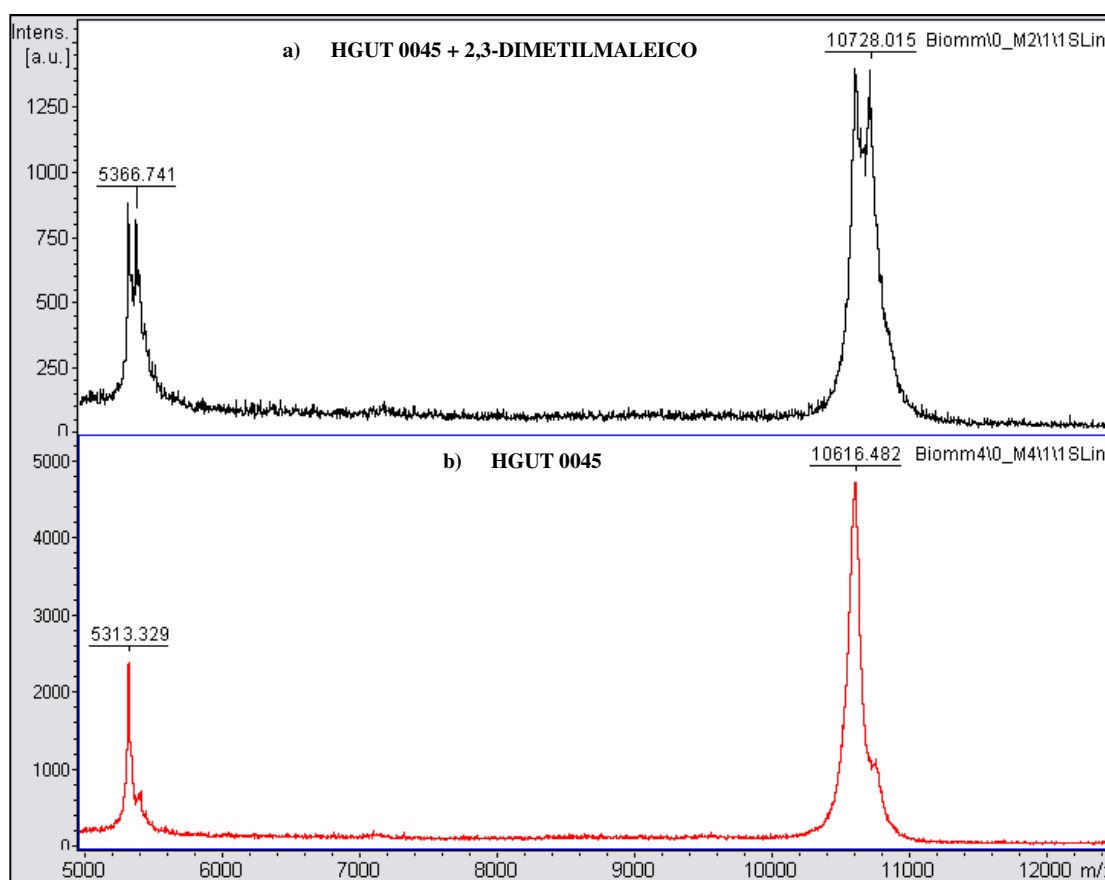


Figura 42- Espectro full scan da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B no Tempo zero da curva de conversão, a) Proinsulina HGUT0045 em reação com 2,3-dimetilmaleico; b) Proinsulina HGUT0045. Íons encontrados $10728[M+H]^+$ e $5366[M+2H]^+$, $10616[M+H]^+$ e $5313[M+2H]^+$.

No tempo zero de conversão são observados os valores de m/z $10728.42[M+H]^+$ correspondente a m/z média calculada para Proinsulina em reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico cujo mecanismo de reação já citado neste trabalho demonstra a liberação de H_2O m/z $17[M+H]^+$ e a perda neutra de CO m/z $28[M+H]^+$; $10616.48[M+H]^+$ corresponde a massa da Proinsulina com perda neutra de uma molécula de H_2O ; $5366.74[M+2H]^+$ e $5313.32[M+2H]^+$ dupla cargas das respectivas moléculas de

Proinsulina com modificação do anidrido 2,3-dimetilmaleico e Proinsulina. O erro calculado para a exatidão de massa nessa análise foi de 39,56 ppm.

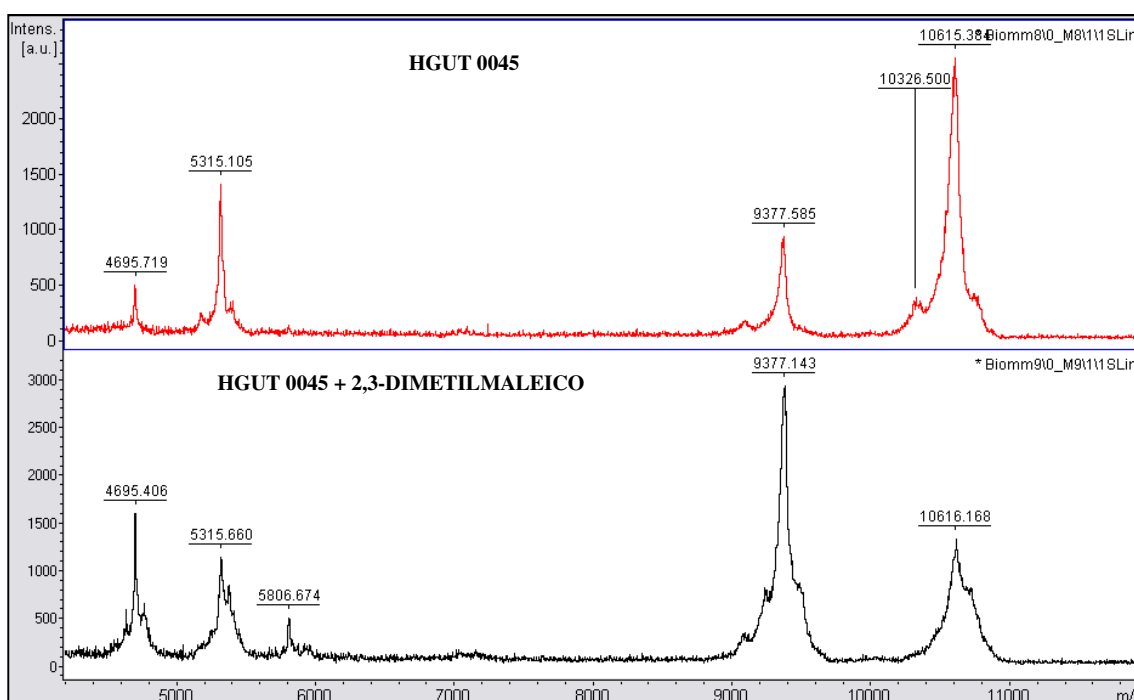


Figura 43- Espectro *Full scan* da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B após 2 horas das amostras Proinsulina e Proinsulina + 2,3-dimetilmaleico.

No tempo 2 horas de conversão além do íons já citados para o tempo zero surgem íons m/z 9377.58[M+H]⁺ teoricamente característico para a perda da cauda de Histidina; 4685.4[M+H]⁺ teoricamente calculado como sendo uma clivagem trípica do resíduo da Arginina que mantém a cadeia B ainda conectada à cauda de Histidina; 5806.67 [M+H]⁺ teoricamente calculado e já demonstrado na caracterização da Insulina tem sua intensidade ainda pequena mas já começa a ser notado claramente no tratamento da Proinsulina com anidrido 2,3-dimetilmaleico.

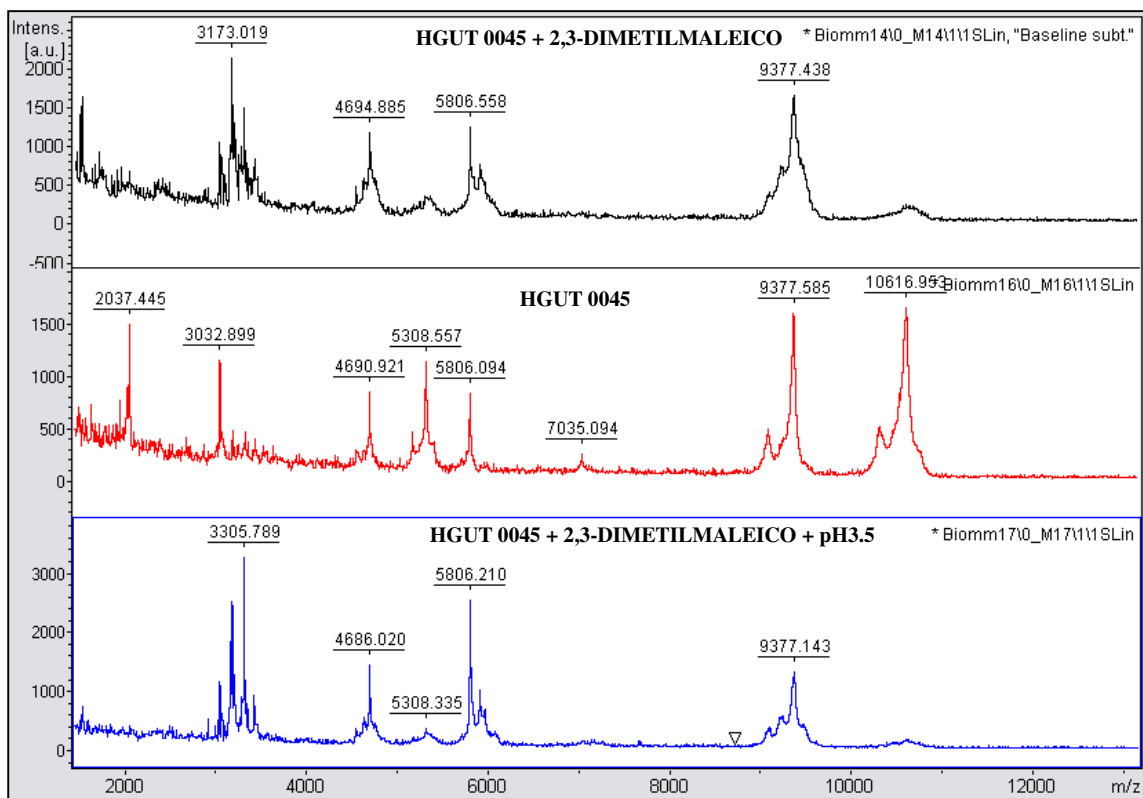


Figura 44- Espectro *Full scan* da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase após 4 horas nas amostras Proinsulina e Proinsulina+ 2,3-dimetilmaleico.

No tempo 4 horas de conversão os íons de intensidade relevantes além dos já analisados para o tempo 2 horas conversão são: 3305.78[M+H]⁺ teoricamente calculado como uma clivagem tríptica no resíduo de Lisina 23 e Argina55 (observar sequência da Proinsulina proposta na Figura 12); 7035.09[M+H]⁺ teoricamente calculado com uma clivagem tríptica do resíduo Arginina 22 e Arginina 86; 5308.55[M+2H]⁺ teoricamente calculado como dupla carga da molécula de com perda neutra de uma molécula de H₂O; 5806.09[M+H]⁺ teoricamente calculado e já demonstrado na caracterização da insulina da qual as intensidades relativas são crescentes na ordem de HGUT0045, HGUT0045+anidrido 2,3-dimetilmaleico e HGUT0045 +2,3-dimetilmaleico+pH3,5.

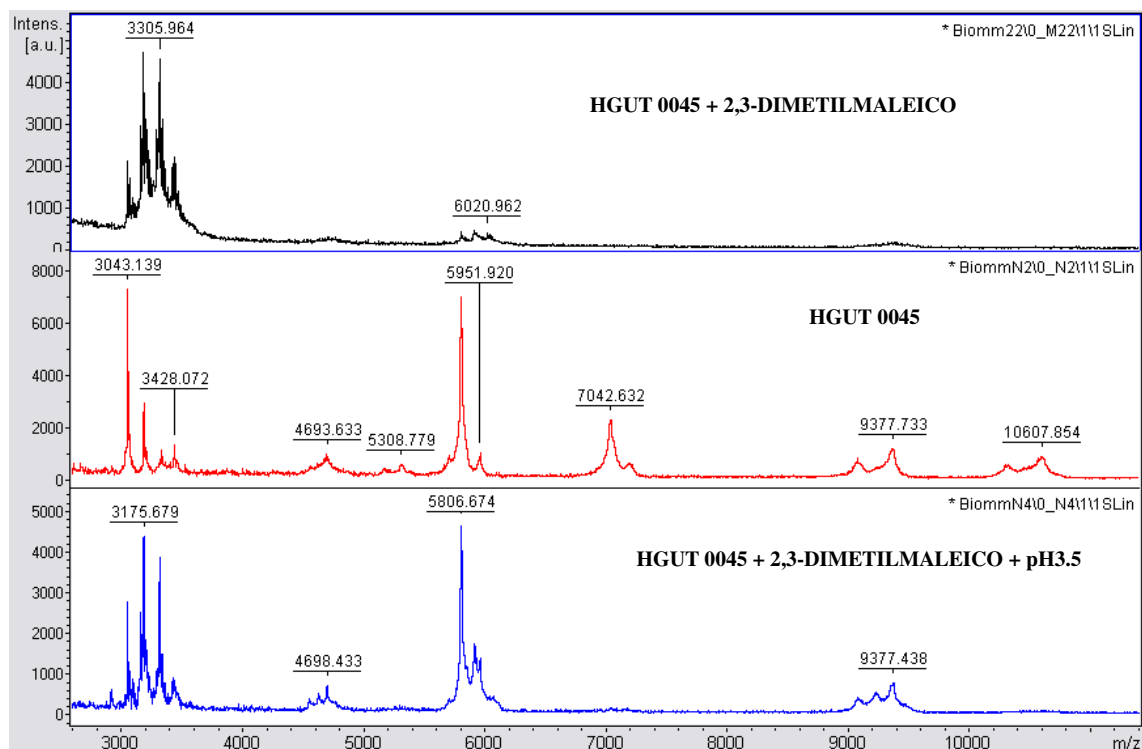


Figura 45- Espectro *Full scan* da conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase após 6 horas nas amostras de Proinsulina e Proinsulina + 2,3-dimetilmaleico.

No tempo 6 horas de conversão os íons de intensidade relevantes além dos já analisados para o tempo 2 e 4 horas são: 5951.92 $[M+H]^+$ teoricamente calculado como molécula de Insulina cuja Arginina 56 permanece sem a quebra da ligação peptídica ocasiona pela ação da Carboxipeptidase B; 7042.58 $[M+H]^+$ teoricamente calculado como clivagem trípica na Arginina 23 e Fenilalanina 86 acrescido de um ganho neutro de 17u correspondente a uma molécula de H_2O ; 3428.07 $[M+H]^+$ teoricamente calculado e já demonstrado nesse trabalho como cadeia B de Insulina Humana

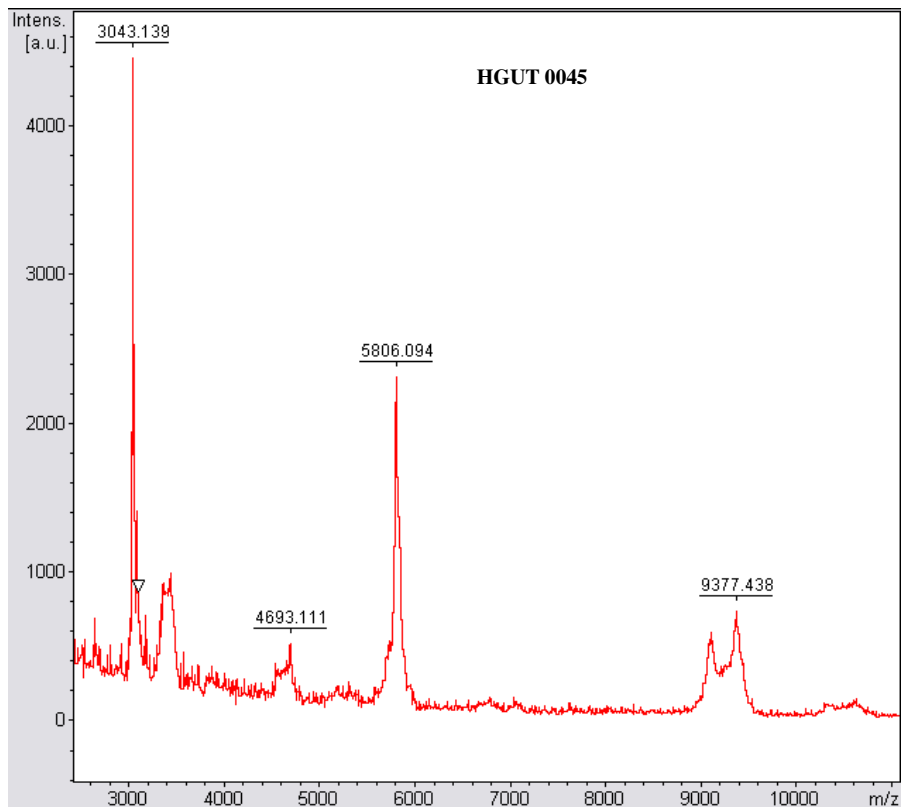


Figura 46- Espectro *Full scan* conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B após 8 horas para a amostra de Proinsulina.

O tempo 8 horas de conversão enzimática é apresentado somente para HGUT0045 uma vez que a ionização das amostras HGUT0045+ anidrido 2,3-dimetilmaleico e HGUT0045+ anidrido 2,3-dimetilmaleico+pH3,5 não foram possíveis. Nos “spots” da placa de Maldi para essas amostras foram observados a presença de grandes cristais formados, sendo esse, um dos motivos da impossibilidade de ionização.

Como controle do experimento foram analisados os espectros dos íons da matriz α -Ciano, identificados na faixa de m/z 50-500 com maior intensidade de íons entre m/z 170-370 e mostrados no espectro da Figura46. Estes íons podem ser usados na recalibração do equipamento como íons de referência durante as análises pelo programa *flexAnalysis-Bruker*, corrigindo os erros de exatidão de massa (ppm) mesmo após a obtenção dos dados.

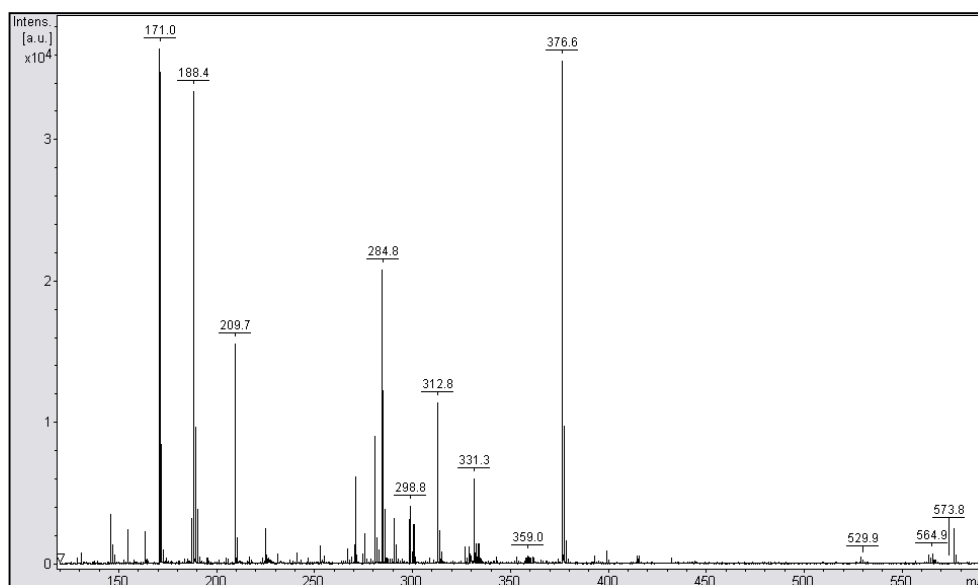


Figura 47- Componentes da matriz α -Ciano usada nos experimentos identificados na faixa de m/z 50-500 obtidas com Maldi TOF

A espectrometria de massa de perfis de conversão baseado nas informações geradas por banco de dados de sequências peptídicas é uma ferramenta promissora para identificar biomarcadores da qualidade dos produtos formados mas é limitado por fatores pré-analíticos (preparo de amostras, por exemplo) e a complexidade do processamento de dados (Fiedler,2009). Outros critérios abordados em espectrometria de massa são resolução e exatidão de massa que no presente trabalho foram avaliados para os dados de espectros Maldi TOF MS e os valores encontrados ficam em torno de 100-400 de resolução e 30-60 ppm de exatidão de massa como aceitos devido às dispersões do processo.

Segundo o trabalho de Fiedler em 2009, o acúmulo de picos durante a obtenção dos dados espectrométricos no equipamento MALDI TOF pode aumentar a sensibilidade mas como consequência ocorre o decréscimo da resolução. Isso acontece devido as dispersões do tipo espacial, temporal e cinética que ocorrem em TOF mas que

podem ser corrigidas aplicando extração pulsada com gradiente, extração atrasada e o uso de refletores.

Embora muitos dados tenham sido obtidos por Maldi TOF, uma segunda técnica de espectrometria de massa foi utilizada em busca de adicionais informações sobre o processo de conversão. A seguir, os dados de Q-TOF MS das amostras de conversão enzimática nos padrões industriais da empresa Biomm S.A. e sob modificações dos grupos ϵ -aminos livres são demonstrados nas Figuras 48 a) e b). Os íons obtidos estão na sua forma multicarregada.

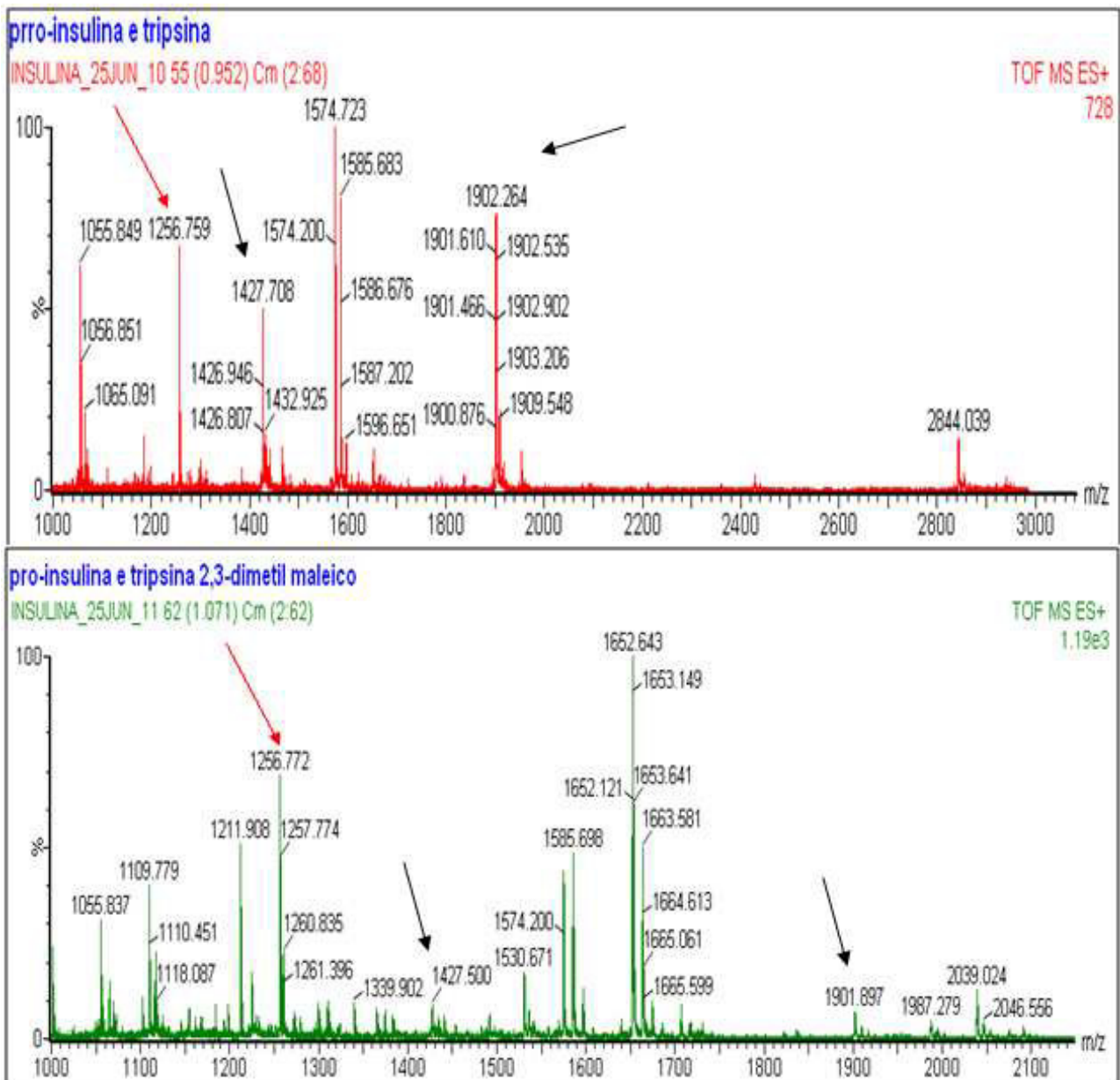


Figura 48- a) *Full scan* obtidos por Q-TOF MS dos íons multicarregados do fingerprinting da conversão trípica da Proinsulina Humana sob condições Industriais propostas na patente da empresa Biommm S.A; b) *Full scan* dos íons multicarregados do fingerprinting da conversão Trípica da proinsulina bloqueada com anidrido 2,3-dimetilmaleico. As setas em preto apontam os íons triplamente e quadruplicamente carregados para B-30 Destreonina Insulina e as setas em vermelho o íon para Cauda de Histidina.

De acordo com os dados observados, os íons cujas m/z podem ser relacionados com a lista de possíveis produtos da conversão enzimáticas são: $1256.7[M+H]^+$, $1427.7[M+4H]^+$, $1574.7 [M+2H]^+$, $1585.6[M+2H+Na]^+$ e $1902.2[M+3H]^+$. Curiosamente, os íons $1427.7[M+4H]^+$ e $1902.2[M+3H]^+$ possuem m/z monocarregada

de 5709.59 cuja identidade pode ser condizente com a forma B-30 Destreonina Insulina. Este fato ainda é cautelosamente tratado uma vez que relacionando a intensidade relativa destes íons na presença e ausência do tratamento de bloqueio do grupo amino, pode ser claramente detectado a minimização de ambos nas amostras em tratamento com o bloqueio, em acordo com o trabalho de Nikhil em 2006 e com a hipótese do bloqueio efetivo demonstrado na Figura 33 e já discutido no item 4.4 deste trabalho.

Observando e considerando a presença do íon de m/z 1256.77 relativo à cauda de Histidina presente em ambas as amostras (com e sem tratamento) e cujas intensidades relativas permanecem com valores próximos durante as análises por espectrometria Q-TOF MS, podemos usá-los como referência ao observar os íons supracitados como B-30 Destreonina. Esse fato demonstra que a manutenção da intensidade dos sinais relativos em relação a cauda de Histidina demonstram um decréscimo notável dos íons correspondentes a B-30 Destreonina Insulina.

Tais fatos, corroboram com o objetivo proposto no trabalho de minimizar formação de B-30 Destreonina Insulina durante a conversão da Proinsulina em Insulina pelo uso combinado de Tripsina e Carboxipeptidase B.

5 Conclusão

Concluimos através dos dados supracitados que o bloqueio efetivo de grupos ϵ -amino ocorreu na presença do reagente de bloqueio anidrido 2,3-dimetilmaleico, na concentração molar de 100 vezes em relação à massa da amostra de Proinsulina.

A reação de bloqueio ocorreu em pH 9,0 e foram observados a presença de pelo menos um bloqueio efetivo sendo o segundo bloqueio instável, ou seja, a reversibilidade da reação foi rápida na presença de pH 3,5 à temperatura de 23°C.

Durante os tempos 2,4,6,8 e 24 horas de conversão enzimática usando Tripsina foram observados os valores de velocidade e absorbância à 410nm em relação ao tempo de quebra do substrato BApNa que se permaneceram sem alterações na presença do tratamento com anidrido 2,3-dimetilmaleico e na ausência de tratamento mantendo portanto, a atividade enzimática da Tripsina estável durante todo o processo de tripsinólise .

Os resultados de Maldi TOF não demonstraram a presença do íon corresponde a B-30 Destreonina Insulina possivelmente devido a supressão causada pela presença de outros íons que melhores ionizaram e portanto, foram detectados. Entretanto, o uso do equipamento Q-TOF possibilitou a detecção não somente da presença deste íon durante a conversão enzimática com Tripsina e Carboxipeptidase B assim como a possibilidade de demonstrar a relação da sua intensidade relativa na presença do íon correspondente a clivagem da cauda de Histidina que demonstrava sua intensidade relativa sendo mantida entre as amostras de Proinsulina tratada e não tratada corroborando com o resultado da minimização da intensidade do íon de B-30 Destreonina Insulina observados qualitativamente por espectrometria de Massa.

6 Perspectivas

O presente trabalho obteve muitas informações sobre a conversão enzimática e os efeitos que o reagente anidrido 2,3-dimetilmaleico pode ter sobre a produção de intermediários como a B-30 Destreonina Insulina. No entanto, estudos de otimização das concentrações usadas para bloqueio, temperatura e pH ótimos para a reversibilidade desta reação, quantificação dos produtos formados em cada pico cromatográfico durante a conversão enzimática e a caracterização dos constituintes presentes na complexa mistura gerada durante a conversão enzimática ainda são necessários.

O bloqueio dos grupos ϵ -amino que permanecem protonados em pH 9,0 é um contexto interessante a se tratar para que sejam alcançadas melhores condições de reação. Um favorecimento da desprotonação de todos os grupos ϵ -amino em pH 10 aproximadamente é sugerido para em seguida submeter a amostra à reação com anidrido 2,3-dimetilmaleico e posteriormente à conversão com Tripsina e Carboxipeptidase. Os dados obtidos poderiam esclarecer os valores máximos de minimização de B-30 Destreonina Insulina.

Como observado, há instabilidade do segundo bloqueio na amostra de Insulina, possivelmente na porção N-terminal. O favorecimento dessa reação poderia ser observado no pH 6,5 sem o favorecimento da desprotonação de grupos ϵ -amino. A informação sobre o pKa da desprotonação dos grupos α -amino e ϵ -amino na Insulina Humana Recombinante e Proinsulina Humana Recombinante se determinados poderiam complementar os estudos de otimização da reação.

7 Referências Bibliográficas

AITKEN, A., Learmonth, M. (2002) *The Protein Protocols Handbook*, second ed., New Jersey.

ARAÚJO, A. S., da Rocha, L. L., Tomazela, D. M., Sawaya, A. C. H. F., Almeida, R. R., Catharino, R. R., Eberlin, M. N. (2005) Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer, *Analyst* 130, 884.

BALDWIN, M. A. (1995) *Modern Mass Spectrometry in Bioorganic Analysis Nat. Prod. Rep* 12, 33.

BLOW, D. M. (1997) The tortuous story of Asp...His...Ser: Structural analysis of α -chymotrypsin, *Trends in Biochemical Sciences* 22, 405-408.

BROBECK, J. R. (1976) *As Bases Fisiológicas da Prática Médica* in: Best & Taylor, 9ª edição ed.

BUTLER, P. J. G., Harris, J. L., Hartley, B. S., Leberman, R. (1967) Reversible Blocking of Peptide Amino Groups by Maleic Anhydride, *Biochem.J.* 103, 78.

BUTLER, P. J. G., Harris, J. L., Hartley, B.S., Leberman, R. (1969) The Use of Maleic Anhydride for the Reversible Blocking of Amino Groups in Polypeptide Chains, *Biochem.J.* 112, 679.

BUTT, J. B. (1980) Reaction Kinetics and Reactor Design, *J. Chem. Educ.* 57 (10), A297.

CANTÚ, M. D., Carrilho, E., Wulff, N.A., Palma, M.S. (2008) Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático, *Quim. Nova* Vol. 31(3) 669-675.

CARTAILLER, J.-P. (2004) *Insulin- from secretion to action*, (©, B. C. B. C., Ed.).

CHARCE, R. E., Frank, B.H. (1993) *Research, Production and Safety of Biosynthetic Human Insulin*, Little Tree Publishing.

COURI, C. E. B., Foss, M.C., Voltarelli, J.C. (2006) Secondary prevention of type 1 diabetes mellitus: stopping immune destruction and promoting β -cell regeneration, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39, 1271-1280.

COWIE, C. C., Rust, K.F., Ford, E.S., Eberhardt, M.S., Byrd-Holt, D.D., Li, C., Williams, D.E., Gregg, E.W., Bainbridge, K.E., Saydah, S.H., Geiss, L.S. (2009) Full accounting of diabetes and pre-diabetes in the U.S. population in 1988-1994 and 2005-2006, *Diabetes Care* 32(2), 287-294.

CRUZ, J. M. (1997) Adsorção de Insulina em resina trocadora de íon utilizando leitos de fixos e fluidizados, in *Faculdade de Engenharia Química*, p 141, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DEGANI, A. L. G. C., Q.B.; VIEIRA, P.C. (1998) *Cromatografia: um breve ensaio*, *Química Nova na Escola* 7, 21-25.

DETTMER, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. *Mass Spectrometry Review*. 2007, 26, 51.

DINSMOOR, R. S. (2001) *Insulin: A Never-ending evolution*, Countdown, Spring

DIXON, H. B. F., Perham, R. N. (1968) Reversible Blocking of Amino Groups with Citraconic Anhydride, *Biochem. J.* 109, 312.

DUCKWORTH, W. C., Heinemann, M., Kitabchi, A.E. (1972) Purification of Insulin-Specific Protease by Affinity Chromatography, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69(12), 3698-3702.

DUNN, M. F. (2005) Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review, *Biometals* 18 (4) 295–303.

ETTRE, L. S. (2003) M.S. Tswett and the invention of chromatography, *LCGC Europe* 21, 458-467.

FAROOQ, S. a. R., D. M. (1990) Heat effects in adsorption column dynamics: 2. experimental validation of the one-dimensional model, *Industrial & Engineering Chemistry* 29, 1084.

FEDERWISCH, M. D., M. L.; De, Meyts P. (2002) *Insulin & Related Proteins – Structure to Function and Pharmacology.*, Kluwer Academic Publishers.

FERREIRA, C. L. R. A., Ferreira, M.G. . (2009) Epidemiological characteristics of diabetic patients within the public health system an analysis of the HiperDia system, *Arq Bras Endocrinol Metab* 53/1.

FERREIRA, S. R. G., Almeida, B., Siqueira, A.F.A., Khawali, C. . (2005) Intervenções na prevenção do diabetes mellitus tipo 2: é viável um programa populacional em nosso meio, *Arq Bras Endocrinol Metab* 49(4), 479-484.

FIEDLER, G. M., Leichtle, A.B., Kase, J., Baumann, S., Ceglarek, U., Felix, K., Conrad, T., Witzigmann, H., Weimann, A., Schütte, C., Hauss, J., Büchler, M., Thiery, J. Serum, . (2009) Peptidome Profiling Revealed Platelet Factor 4 as a Potential Discriminating Peptide Associated with Pancreatic Cancer, *Clinical Cancer Res* 15(11).

FOSS, M. C. (1989) Diabetes mellitus: concept, diagnosis and classification. , *Medicina Ribeirão Preto* 22(1/2), 54-61.

FRITZ, G. (1964) *First Man-made Protein in History*, Life New York, NY: Time, Inc 56 (1): 47.

GARCIA, F. A. P. a. P., E. M. V. (1993) *Chromatography*”, *Recovery Processes for Biological Materials*, Edited by J.F. Kennedy and J. M. S. Cabral ed.

GARRET, J. S. (2000) *Introduction to Chromatographic Separations*, Michigan State University

GLAZER, A. N., DeLange, J.R and Sigma, D.S. (1975) *Chemical Modifications of Proteins.*, American Elsevier Publishing CO.

GOODACRE, R., Vaidyanathan, S., Bianchi, G., Kell, D. . (2002) Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. , *B. Analyst* 127(11), 1457-1452.

GROUP, D. P. P. R. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, *The New England Journal of Medicine* 346, 6.

HODGKIN, D. C. (1964) Nobel Lectures Chemistry 1963-1970, Elsevier Publishing Company.

KANSRA, U. C., Sircar, S. (2000) Insulin Therapy : Practical Points., *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine* Vol. 1, No. 3

KIELING, D. D., Junior, A.F. (2002) Enzimas Aspectos Gerais, in Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

KOBAYASH, N. (2008). The Current Status of Islet Transplantation and its perspectives. *The Review of Diabetic Studies.* , 5:136-143.

KYTE, J., Doolittle, R.F.(1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. , *J Mol Biol* 157, 105-132.

LESSA, I. (2004) Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: um desafio para a complexa tarefa da vigilância., *Ciênc. saúde coletiva* 9 (4).

LESSA, I. A., M. J.; Magalhães, L.; Filho, N. A.; Aquino, E; Costa, M. C. R. . (2004) Simultaneidade de fatores de risco cardiovascular modificáveis na população adulta de Salvador-Brasil, *Revista Panamericana de Salud Pública* 16, 131-137.

MARQUES, M. (1998) BIOBRÁS: Fabricante local de insulina vai enfrentar Hoechst, *InvestNews da Gazeta Mercantil*.

MOAKDAD, A. H., Bowman, B.A., Ford, E.S. & Vinicor, F. (2001) The continuing epidemics of obesity and diabetes in the U.S. *Journal American Medical Association* 286, 1195-1200.

MONTEIRO, D. (2010) Acordo para produção de insulina apresenta os primeiros resultados, in *Agencia Fiocruz de Noticias*.

MORAES, P. (2009) Brasil Volta a Produzir Cristais de Insulina, in *Redação online da Sociedade Brasileira de Diabetes*.

NIESSEN, W. M. A. (2006) *Liquid chromatography – mass spectrometry*, CRC Press ed., Boca Raton -Flórida – USA,.

NIKHIL, J., Kavimandan, E. L., Jeffrey, J., Wilson, J. S., Brodbelt, and Peppas, N. A. (2006) Synthesis and Characterization of Insulin-Transferrin Conjugates *Bioconjug Chem* 17(6), 1376–1384.

OPHARDT, C. E. (2003) *Virtual Chembook*.

ORGANIZATION, W. H. (2001) *Surveillance of risk factors for non communicable disease.*, (approach, T. W. S.-w., Ed.), Geneva.

ORGANIZATION, W. H. (2002) II Global Forum on Non-communicable Diseases Prevention and Control, Shanghai, China.

ORGANIZATION, W. H. (2002) II Global Forum on Non-communicable Diseases Prevention and Control, Shanghai, China.

ORGANIZATION, W. H. (2003) III Global Forum on Non-communicable Diseases Prevention and Control, Brazil.

ORGANIZATION, W. H. (2003) III Global Forum on Non-communicable Diseases Prevention and Control., Brazil.

PERONA, J. J. C., C.S. . (1995) Structural basis of substrate specificity in the serino proteases, *Protein Science* 4, 337-360.

POITOUT , V., Stein, R., Rhodes, C.J.(2003) *Insulin Gene Expression and Biosynthesis*. International Textbook of Diabetes Mellitus, Copyright © John Wiley & Sons, Ltd.

GENENTECH. First Successful Laboratory Production of Human Insulin Announced, Genentec, Inc. and City of Hope National Medical Center.

SANGER, F. (1959) Les Prix Nobel en 1958, © The Nobel Foundation.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2004) Fórum Global das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2004) Inquérito Domiciliar sobre Comportamento de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis, (Básica., S. d. V. d. S. S. d. A., Ed.).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2006) Diabetes mellitus. Cadernos de Atenção Básica, (Secretaria de Atenção Básica à Saúde, D. d. A. B., Ed.).

SAWAYA, A. C. H. F., Tomazela, D. M. , Cunha, I. B. S., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custodio, A. R., Eberlin, M. N. (2004) Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis, *Analyst* 129, 739-744.

SCOTT, R. P. W. (2003) *Principles and Practice of Chromatography*, Chrom-Ed Book Series.

SILVA, J. G. (2004) *Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático*, Editora Interciência Ltda ed., Rio de Janeiro -RJ.

SCHMIDT, D. E., WESTHEIMER, F. H.(1996) Mechanism of the reaction catalyzed by acetoacetate decarboxylase. Importance of lysine 116 in determining the pKa of active-site lysine 115, *Biochemistry* 10, 1249-1253.

SMITH, E. L. H., R.L.; LEHMAN, I.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P. WHITE, A. (1985) *Principles of Biochemistry-Mammalian Biochemistry*.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2006) Tratamento e acompanhamento do diabetes mellitus. , (Diabetes, D. S. B. d., Ed.).

SON, Y. J., Kim, C.K., Kim, Y.B., Kweon, D.H., Park, Y.C., Seo, J.H. (2009) Effects of citraconylation on enzymatic modification of human proinsulin using trypsin and carboxypeptidase B, *Biotechnol Prog* 25(4), 1064-1070.

TYMOCZKO, J. L., Berg, Jeremy M., Stryer, Lubert. (2006) *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company

VIEIRA, A. (2009) União Química e Biomim vão produzir cristais de insulina, in *FIR CAPITAL* ©.

WALSH, G. H., D. R. (1994) *Protein Biotechnology*.

WILD, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. . (2004) Global prevalences of diabetes. Estimates for the year 2000 and Projections for 2030, *Diabetes Care* 27(5), 1047-1053.

YACH, D., Hawkes, C., Gould, C.L., Hofman, K.J. (2004) The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control, *JAMA : the journal of the American Medical Association* 291(21), 2616-2622.

ZAHRADNIK, J. M., Meek, J.C. and Bolinger, R. E. (1969) Production of insulin A and B chains by isolated rat islets, *Metabolism* 18, 172-174.

Anexo I

Perfil *full scan* obtido por Maldi TOF MS do tempo 6 de conversão enzimática por Tripsina e Carboxipeptidase B da amostra Proinsulina HGUT0045 em tampão Glicina 15mM, pH 8,23, temperatura 23°C analisadas por HPLC de fase reversa, coluna 100-3.5 C4 (3.5µm,C4,4.6x150mm). Foram coletados todos os picos nos diferentes tempos de retenção como descrito na tabela a seguir e em vermelho estão os tempos de retenção de cada pico coletado e no corpo da tabela está cor detecta a presença do íon característico à B-30 Destreonina Insulina.

N19	N20	N23	N24	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O10	O11	O12	O13	O14	O15	O16
HGUT0045	HGUT0045	HGUT0045	HGUT0045	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs	HGUT 6Hs
_Conv_T6	_Conv_T6	_Conv_T6	_Conv_T6	RT P18'	RT P18'	RT P20'	RT P20'	RT P238'	RT P238'	RT P26'	RT P26'	RT P265'	RT P265'	RT P27'	RT P27'	RT P271'	RT P271'	RT P275'	RT P275'
_RT_P15	_RT_P15	_RT_P18	_RT_P18	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20	03_03_20
m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
2415,026	2904,776	2905,785	2905,374	2903,92	2905,374	1718,837	1719,866	1290,36	1883,149	5958,854	5956,62	3424,507	3428,072	1883,546	1880,441	2910,137	2908,905	3011,469	3011,592
2904,822	3430,926	3431,639	3431,372	3544,593	3430,836	1881,923	1882,554	1883,678	1996,481					2907,837	2908,741	5810,504	3325,167	3537,435	3538,069
3428,072	5704,091	5704,436	5704,206	5312,552	3542,961	1897,464	5803,773	1995,868	2109,345					3329,031	3329,031	5956,503	5811,781	6018,717	6020,844
5700,296	5802,933	5806,094	5806,906	5400,26	5312,108	5803,077		2108,856	5804,817					5810,504	4812,999		5956,503	12025,88	12011,36
5807,602	5951,45	11607,77	11607,77	5703,631	5394,89			5802,845							5812,013				
11602,85	11614,99			5803,541	5701,101														
				10602,84	5804,353														
				10608,48															