

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do látex amoniado por ultracentrifugação

O latex amoniado é um líquido heterogéneo, uma vez que as proteínas do látex se encontram dispersas. Estas podem ser separadas por ultracentrifugação (Yeang *et al.*, 2002), em 3 fracções principais:

- ✓ Fase das partículas de borracha ou fracção cremosa
- ✓ Fase translúcida ou soro C;
- ✓ Fracção sedimentar ou soro B, particularmente lutoides.

De modo a estudar as diferentes fracções do látex amoniado, na primeira parte deste trabalho procedeu-se a uma ultracentrifugação 15500 rpm, durante 45 min, a 10°C. Após a obtenção das três fases, procedeu-se ao estudo do soro C, sendo a fase da borracha estudada posteriormente através de dois métodos diferentes. O soro B não foi estudado, já que após a centrifugação se verificou uma contaminação entre o soro C e o soro B, como já tinha sido descrito na literatura (Yeang *et al.*, 2002).

A fase do soro C contém os alergénios Hev b 5, Hev b 7, Hev b 8, Hev b 9 e aproximadamente 48% de proteína. As proteínas desta fase são geralmente solúveis em água e também são ácidas (Yeang *et al.*, 2002, Yip e Cacioli, 2002).

Com o objectivo de tentar uma primeira separação selectiva das diferentes proteínas do soro C, optou-se por realizar uma precipitação com sulfato de amónio com concentrações crescentes de 25, 50 e 75 %, obtendo-se, respectivamente, três fracções designadas por P1, P2 e P3. Este processo baseou-se no descrito por Wagner e colaboradores (2006), realizado a partir de soro C obtido de látex fresco e não de látex amoniado, como o realizado neste estudo.

As proteínas da primeira fracção (P1) são as que apresentam características mais hidrofóbicas, já que precipitaram com a menor percentagem de sal, Por outro lado, as da última fracção (P3) serão as mais hidrofílicas, pois necessitaram de maior concentração de sal para precipitar.

A electroforese (Fig. 5.1) do soro C e dos precipitados P1 e P2 obtidos a partir do soro C, mostrou um grande arrastamento, não se conseguindo visualizar qualquer

banda definida. Relativamente à amostra P3, observaram-se algumas bandas, a maioria correspondente a proteínas de alto peso molecular, no entanto na zona dos 23-24 kDa visualiza-se uma banda que pode corresponder ao Hev b 3. Apesar disso, é pouco provável que esta banda seja este alergénio, pois a fracção P3, corresponde às proteínas mais hidrofílicas e o Hev b 3 é altamente hidrofóbico. O Hev b 6.01 (20 kDa) e o Hev b 10 (22.9 kDa) têm massas moleculares semelhantes ao Hev b 3 (23 kDa) e sendo proteínas hidrofílicas nativas do soro C, é provável que a banda corresponda a uma destas duas proteínas, no entanto a identificação desta banda não foi possível devido ao facto de não haver kit de ELISA para a identificação do Hev b 6.01 e do Hev b 10.

Além disso, verificou-se posteriormente, através de pesquisa bibliográfica (Yeang *et al.*, 1996) que o Hev b 3, apesar de também poder existir no Soro C, é muito lábil no látex amoniado, pelo que a sua extracção deve-se realizar sempre a partir de látex fresco, o que é totalmente impossível de concretizar fora dos países produtores de borracha. O látex amoniado é a única forma de manter o látex em condições de ser usado nos diferentes processos de fabrico de produtos de borracha, sem haver degradação e contaminação microbiana (Yip e Caciolli, 2002), pelo que é a preparação mais utilizada.

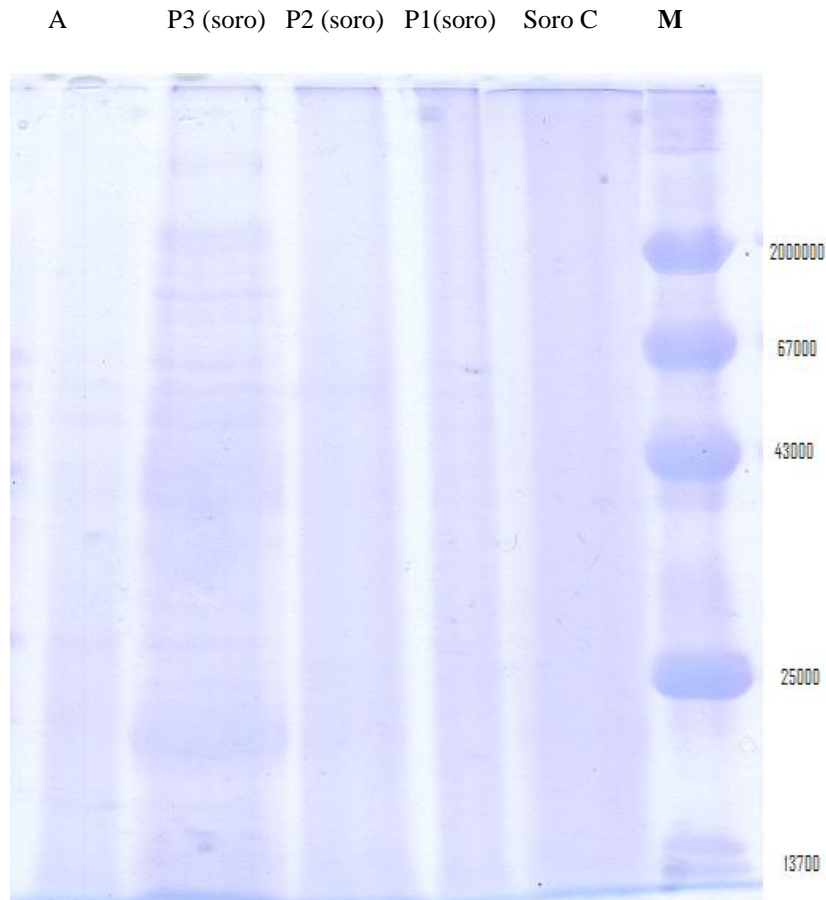


Figura 5.1 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, da amostra extraída pelo método de Durauer e por precipitações do soro C. M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). Fracções correspondentes à precipitação com 25 % (P1), 50 % (P2) e 75 % (P3) de sulfato de amónio. A – Fracções correspondentes à amostra extraída pelo método de Durauer.

É importante referir que o soro C apresenta muitas outras proteínas para além dos alergénios (Yeang *et al.*, 2002, Yip e Cacioli, 2002), o que pode ser verificado pelo grande número de proteínas de massa molecular elevada visualizadas na electroforese realizada (Fig. 5.1)

O soro C foi depois analisado por HIC usando diferentes concentrações de sulfato de amónio no eluente, tendo sido seleccionada a concentração de 1 M de sal, como a que promoveu a melhor separação (Fig. 5.2).

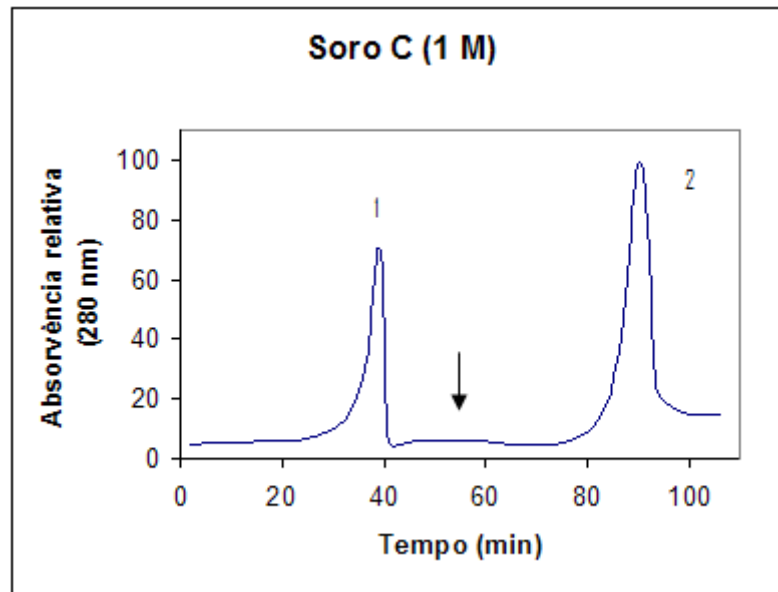


Figura 5.2 – Cromatografia de interacção hidrofóbica em Sepharose CL-6B modificada com 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo, de amostra do soro C. Eluente: PBS 0,01 M, pH 7,4 com concentrações de 1 M de sulfato de amónio. Amostra: 100 μ L, com uma concentração proteica de 0,9 mg/ml. Eluição (\downarrow) obtida com PBS 0,01 M, pH 7,4.

A análise do cromatograma obtido (Fig. 5.2) mostra a separação em dois picos, em que o primeiro corresponde às proteínas mais hidrofílicas que não ficaram retidas na coluna e o segundo pico corresponde às proteínas mais hidrofóbicas que ligaram à coluna.

Estes resultados mostram que as proteínas do soro C, apesar serem solúveis em água e consideradas hidrofílicas, apresentam diferentes hidrofobicidades que permite a sua separação por HIC em dois conjuntos de características distintas (pico 1 e pico 2). A análise electroforética das fracções obtidas na precipitação selectiva com sulfato de amónio (Fig. 5.1), também mostra dois grupos com características hidrofóbicas diferentes, o primeiro constituído por P1 e P2 e o segundo por P3.

Foi realizada uma electroforese SDS-PAGE (Fig.5.3) aos dois picos obtidos na HIC da amostra de soro C, no entanto, os resultados não foram conclusivos, verificando-se um arrastamento das bandas. Deveria ser preciso repetir mais ensaios, para se obter uma quantidade maior de proteína para que fosse detectada na electroforese.

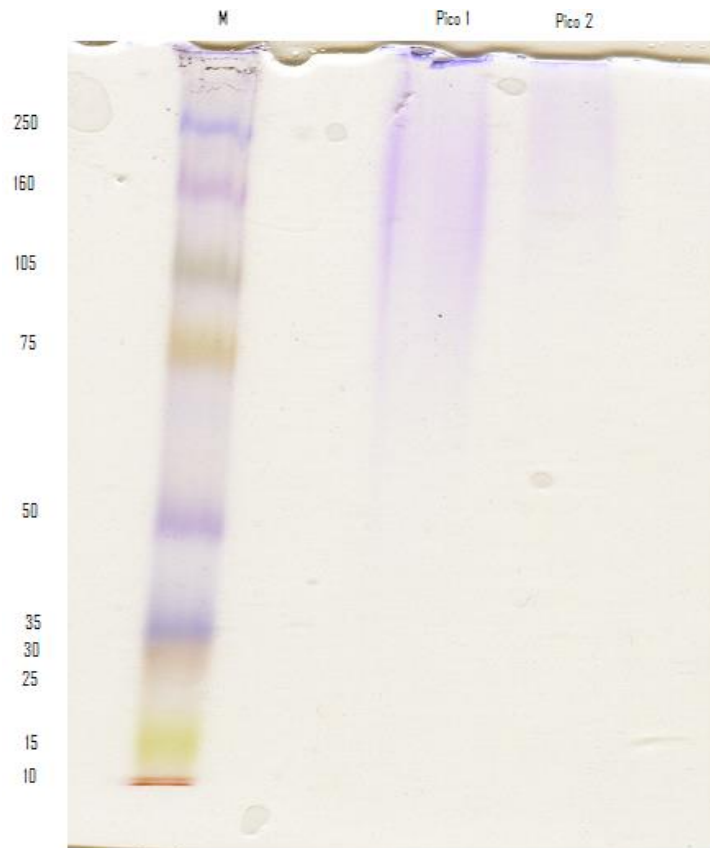


Figura 5.3 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, das fracções obtidas. M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). 1 – Fracções correspondentes ao pico 1 e 2 – Fracções correspondentes ao pico 2 da HIC do soro C usando 1 M de sal no eluente.

5.2 Separação dos alérgenos hidrofóbicos Hev b 1 e Hev b 3 a partir de látex amoniado

5.2.1 Extração pelo método de Durauer

O método de Durauer foi inicialmente aplicado para separar o Hev b 1 (Durauer *et al.*, 2000), no entanto, como o Hev b 3 tem propriedades hidrofóbicas semelhantes, foi feita uma tentativa de adaptar o método para extrair e purificar também Hev b 3. Assim, processou-se a amostra de látex amoniado seguindo o método descrito, alterando-se apenas a aplicação das técnicas cromatográficas nos passos finais de purificação. O objectivo era substituir as etapas de cromatografia de filtração em gel, por um único passo de HIC, separando os alérgenos de modo mais específico pela sua hidrofobicidade.

O Hev b 1 e o Hev b 3 estão presentes na fase cremosa da borracha, por isso o primeiro passo foi centrifugar a amostra do látex amoniado com tampão Tris 50 mM, pH 8, com 0,01% de Triton X-100. Como estes alérgenos são proteínas altamente hidrofóbicas, foi necessário usar também outro detergente (SDS a 2%) para extrair as proteínas da fase cremosa da borracha.

Para confirmar a presença dos alérgenos hidrofóbicos Hev b 1 e Hev b 3 na amostra obtida pelo processo de extração realizado, e antes do processo de filtração em gel para separação do Hev b 1, analisou-se a amostra por electroforese SDS-PAGE, apresentada na figura 5.4. Os resultados mostraram duas bandas intensas a 10 e 14 kDa, como descrito na bibliografia (Durauer *et al.*, 2000), correspondentes ao alérgeno Hev b 1 que tem a massa molecular de 14,6 kDa e, provavelmente a uma proteína contaminante. Não se conseguiu visualizar nenhuma banda relativamente ao Hev b 3 (23-24 kDa), o que levou a considerar o uso de outro processo de extração, mais direccionado para este alérgeno.

No entanto, optou-se por aplicar a HIC ao extracto obtido, no sentido de purificar o Hev b 1 de todos os contaminantes.

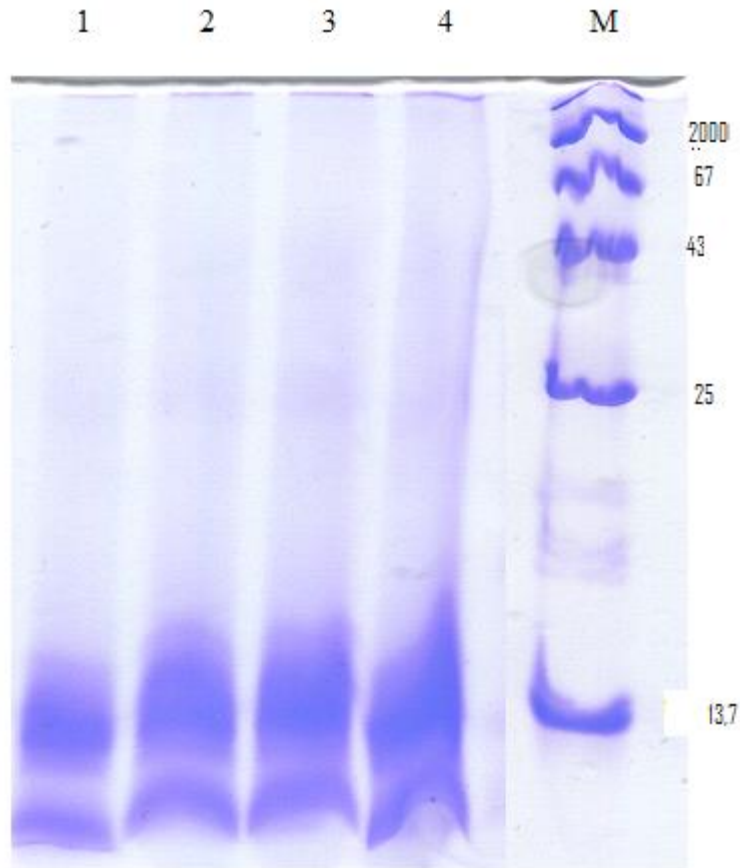


Figura 5.4 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, dos extractos obtidos pelo processo de Durauer (concentração de 0,9 mg/mL) a partir de látex amoniado. M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). As linhas 1 e 2 correspondem à amostra de látex amoniado filtrada. Na linha 1 fez-se uma diluição de 1:2. A linha 3 e 4 corresponde à amostra de látex amoniado não filtrada, na linha 3 fez-se uma diluição de 1:2.

5.2.1.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

O estudo por HIC da amostra obtida no processo de extração de Durauer *et al.*, 2000, foi realizado nas condições experimentais descritas anteriormente para o soro C, por injeção de 100 μ L de amostra com uma concentração proteica de 0,9 mg/ml. Utilizou-se PBS como eluente, com diferentes concentrações de sulfato de amónio, tendo sido obtidos os melhores perfis com 0,25 M e 0,5 M (Fig. 5.5).

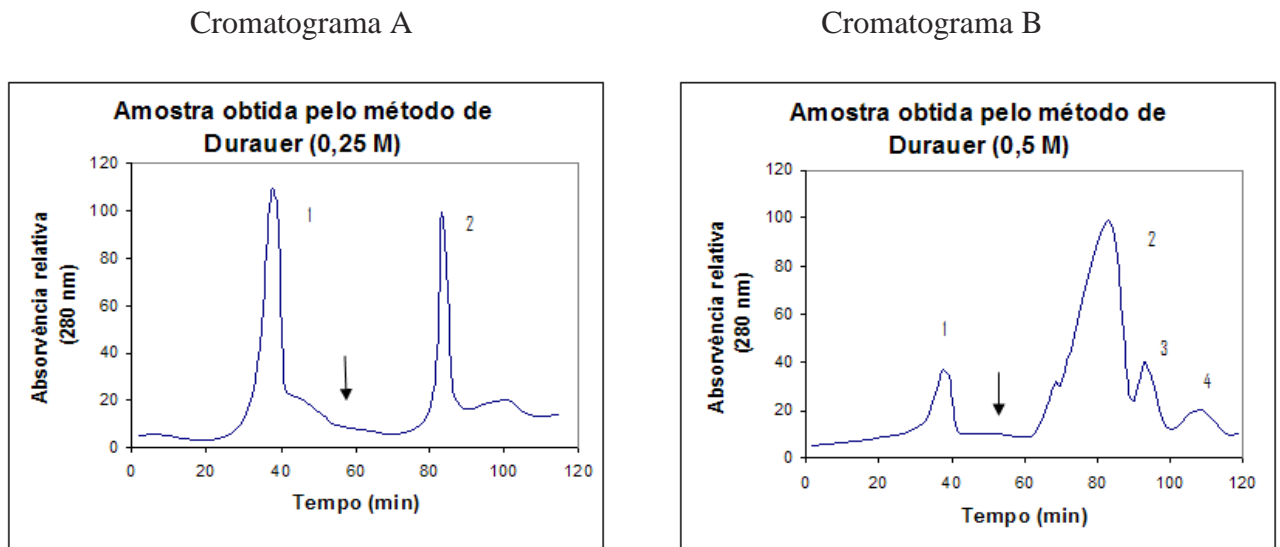


Figura 5.5 – Cromatografia de interacção hidrofóbica em Sepharose CL-6B modificada com 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo, de amostra extraída pelo método de Durauer a partir de latex amoniado. Eluente: PBS 0,01 M, pH 7,4 com concentrações de 0,25 M (A) e 0,5 M (B) de sulfato de amónio. Amostra: 100 μ L, com uma concentração proteica de 0,9 mg/mL. Eluição (∇) obtida com PBS 0,01 M, pH 7,4.

Na análise dos cromatogramas (Fig. 5.5), observou-se que:

- A retenção das proteínas aumentou com o aumento da concentração de sulfato de amónio, verificando-se também um maior fraccionamento em diferentes picos.
- Para a concentração de 0,25 M de sulfato de amónio (Fig. 5.5 (A)) verifica-se a separação da amostra em dois picos principais de hidrofobicidades diferentes.
- Para a concentração de sal de 0,5 M (Fig. 5.5 (B)) observa-se a separação em quatro picos, três deles de área pequena, sendo difícil recolher quantidade suficiente de amostra para fazer novos estudos.

O uso da HIC promove uma diluição da amostra, deste modo, cada ensaio cromatográfico com concentração proteica de 0,9 mg/mL, foi repetido quatro vezes e as fracções foram reunidas e liofilizadas para se realizar uma electroforese SDS-PAGE.

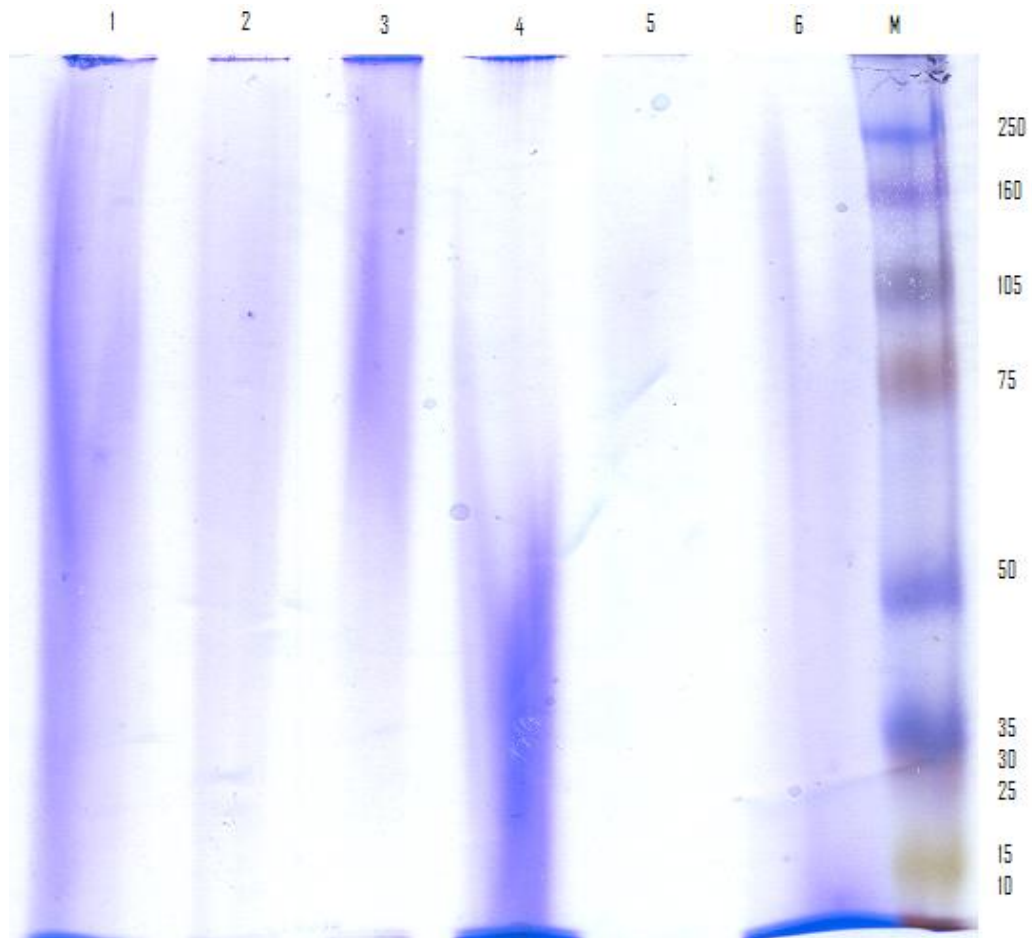


Figura 5.6 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, das fracções obtidas por HIC (0,25 e 0,5 M de sal) da amostra de látex amoniado extraída pelo método de Durauer modificado (concentração de 0,9 mg/mL). M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). Linha 1 – Fracções correspondentes ao pico 1 (0,25 M); Linha 2 – pico 2 (0,25 M); Linha 3 – Fracções correspondentes ao pico 1 (0,5 M); Linha 4 – Fracções correspondentes ao pico 2 (0,5 M); Linha 5 – Fracções correspondentes ao pico 3 (0,5 M); Linha 6 – Fracções correspondentes ao pico 4 (0,5 M).

A electroforese SDS-PAGE (Fig. 5.6) das fracções mostrou haver um grande arrastamento, não sendo possível visualizar qualquer banda definida.

Os dois picos da concentração da HIC com 0,25 M de sal, respectivamente linha 1 e 2 (Fig 5.6), parecem ter perfis proteicos semelhantes, contendo tanto proteínas de alto peso molecular, como proteínas de baixo peso molecular. Este resultado não era esperado, já que a amostra inicial, não apresentava proteínas de alto peso molecular visíveis na electroforese realizada (Fig. 5.4). Este facto deve-se provavelmente a uma

contaminação bacteriológica das amostras que levou ao aumento do teor e da variedade proteica dos extractos, mascarando assim os alergénios existentes.

Observando as linhas correspondentes aos picos da HIC com concentração de sal 0,5 M (Fig. 5.6), verifica-se que a linha 3, correspondente ao pico 1 (Fig. 5.5 (B)), possui um perfil proteico composto essencialmente por proteínas de alto peso molecular de características mais hidrofílicas, já que este pico não ficou retido na coluna. A linha 4 corresponde ao pico com maior área do cromatograma (Fig 5.5 (B)), e é composta por proteínas de baixo peso molecular, entre os 10 e os 50 kDa. É de realçar que a massa molecular da maioria dos alergénios do látex, se situa neste intervalo, pelo que estes podem encontrar-se principalmente nestas fracções.

O pico correspondente à linha 5 não é visível, devido à sua reduzida área.

O último pico representado na linha 6 apresenta um perfil proteico com proteínas de alto e baixo peso molecular, mas com características mais hidrofóbicas que as dos picos anteriores.

5.2.1.2 Quantificação do alergénio Hev b 3 por ELISA

O método ELISA Fitkit® foi utilizado, para quantificar o alergénio Hev b 3 na amostra inicial e nas fracções recolhidas na HIC, já que não foi visualizado na electroforese da amostra obtida no processo de extracção. Como è um método com sensibilidade muito superior à electroforese, permite detectar concentrações de alergénios na ordem dos ug/L.

Tabela 5.1: Quantificação do Hev b 3 existente nas amostras pelo método ELISA

	Amostra Inicial (método de Durauer)	Pico 1 (0,25 M)	Pico 2 (0,25 M)	Pico 2 (0,5 M)	Pico 3 (0,5 M)	Pico 4 (0,5 M)
Concentração (ug/L)	1,199	0,130	0,102	0,121	0,308	0,111

A análise dos resultados obtidos por ELISA para o Hev b 3 (Tabela 5.1) mostra que os valores em todas as amostras são relativamente baixos, havendo no entanto, uma maior concentração na amostra inicial. Estes resultados confirmam o facto de não se ter

visualizado este alergénio por electroforese da amostra resultante da extracção dos alergénios hidrofóbicos pelo método de Durauer.

Para a HIC com a concentração de 0,25 M (Fig. 5.5) de sal, os valores são aproximadamente iguais, o que indica que não houve separação selectiva deste alergénio no processo.

As fracções obtidas na HIC com 0,5 M de sal (Fig. 5.5) mostram pequenas quantidades de Hev b 3, no entanto, o maior valor aparece no pico 3, que possui uma área reduzida, o que sugere a existência de uma separação mais selectiva para este alergénio. Este facto sugere um estudo posterior mais aprofundado a realizar no futuro.

A quantificação do Hev b 1 não foi realizada por impossibilidade na aquisição do Fitkit® de determinação deste alergénio, no entanto foi comprovada a sua extracção na electroforese do extracto inicial como se pode comprovar na figura 5.4.

5.2.2 Extracção pelo método de Wititsuwannakul

O método de Wititsuwannakul (Wititsuwannakul *et al.*, 2008) é um método descrito para a extracção do Hev b 3 a partir de látex fresco, no entanto na impossibilidade de o obter, utilizou-se látex amoniado (0,7%).

Este método usa um detergente (Triton X-100) para extrair as proteínas presentes na fase da borracha e nas membranas, sendo de seguida realizado um conjunto de 2 precipitações.

Na primeira precipitação foi usada acetona para fazer uma agregação das partículas de borracha. Isto acontece porque as diferenças de polaridade vão modificar a concentração do solvente na superfície das partículas da borracha, promovendo assim a sua agregação.

O passo seguinte da separação foi feito, tendo em conta a maior estabilidade térmica das proteínas hidrofóbicas (Hev b 1 e Hev b 3) em relação às hidrofílicas. Estas ficam desnaturadas a 70° C formando um precipitado que posteriormente é removido, ficando assim, a solução apenas com as proteínas mais hidrofóbicas.

Na figura 5.7, encontra-se a electroforese das amostras relativas aos diferentes passos do processo de extracção, para controlo da presença de proteínas em cada uma das etapas.

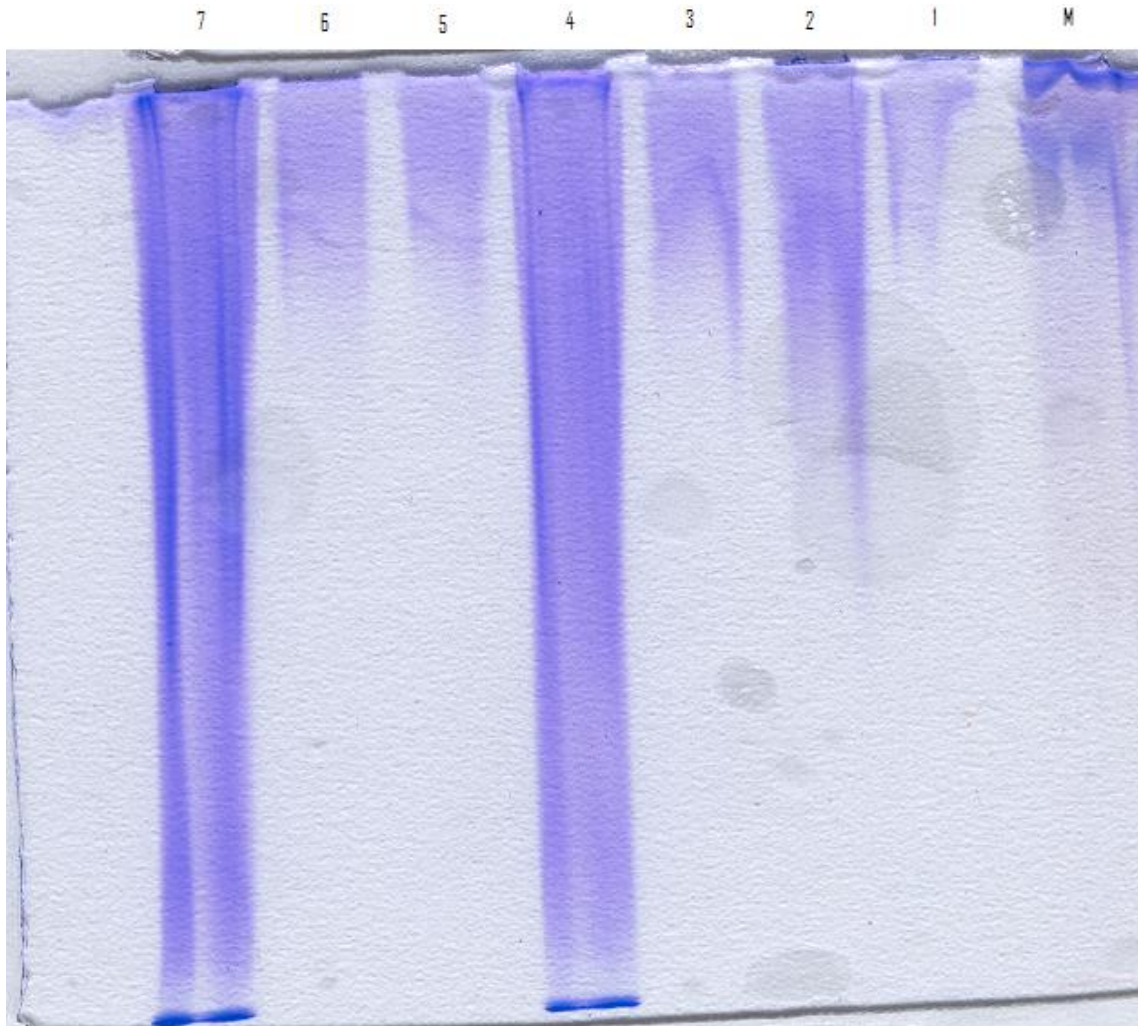


Figura 5.7– Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, das fracções durante o processo de extracção pelo método de Wititsuwannakul; M_{ap} – Marcador de pesos moleculares elevados (kDa). 1 – Fracções correspondentes ao passo 1 do processo de extracção (Fig. 4.2); 2 – Fracções correspondentes ao passo 2 do processo de extracção (Fig. 4.2); 3 – Fracções correspondentes ao passo 3 do processo de extracção (Fig. 4.2); 4 – Fracções correspondentes ao passo 4 do processo de extracção (Fig. 4.2); 5 – Fracções correspondentes à amostra descartada no passo 4 do processo de extracção (Fig. 4.2); 6 – Fracções correspondentes à amostra descartada no passo 5 do processo de extracção (Fig. 4.2); 7– Fracções correspondentes ao passo 5 do processo de extracção (Fig. 4.2).

Na análise da electroforese observou-se um arrastamento em vez de bandas definidas, no entanto, é visível que as partes da amostra que foram descartadas durante as precipitações tinham uma menor quantidade de proteína do que as fracções da amostra que são recolhidas.

As linhas 4 e 7 apresentam um perfil proteico semelhante, contendo proteínas de alto e baixo peso molecular, nas restantes linhas são visíveis sobretudo, proteínas de alto peso molecular.

A linha 6 que representa as proteínas desnaturadas durante o aquecimento a 70° C, tem um tamanho reduzido, o que pode significar que nesta fase não se encontrem muitas proteínas de carácter hidrofílico.

No sentido de se verificar a composição proteica das amostras obtidas nas últimas etapas do processo de extracção, realizou-se a electroforese SDS-PAGE apresentada na figura 5.8. Assim, analisou-se a amostra antes e após o aquecimento a 70° C e o respectivo precipitado.

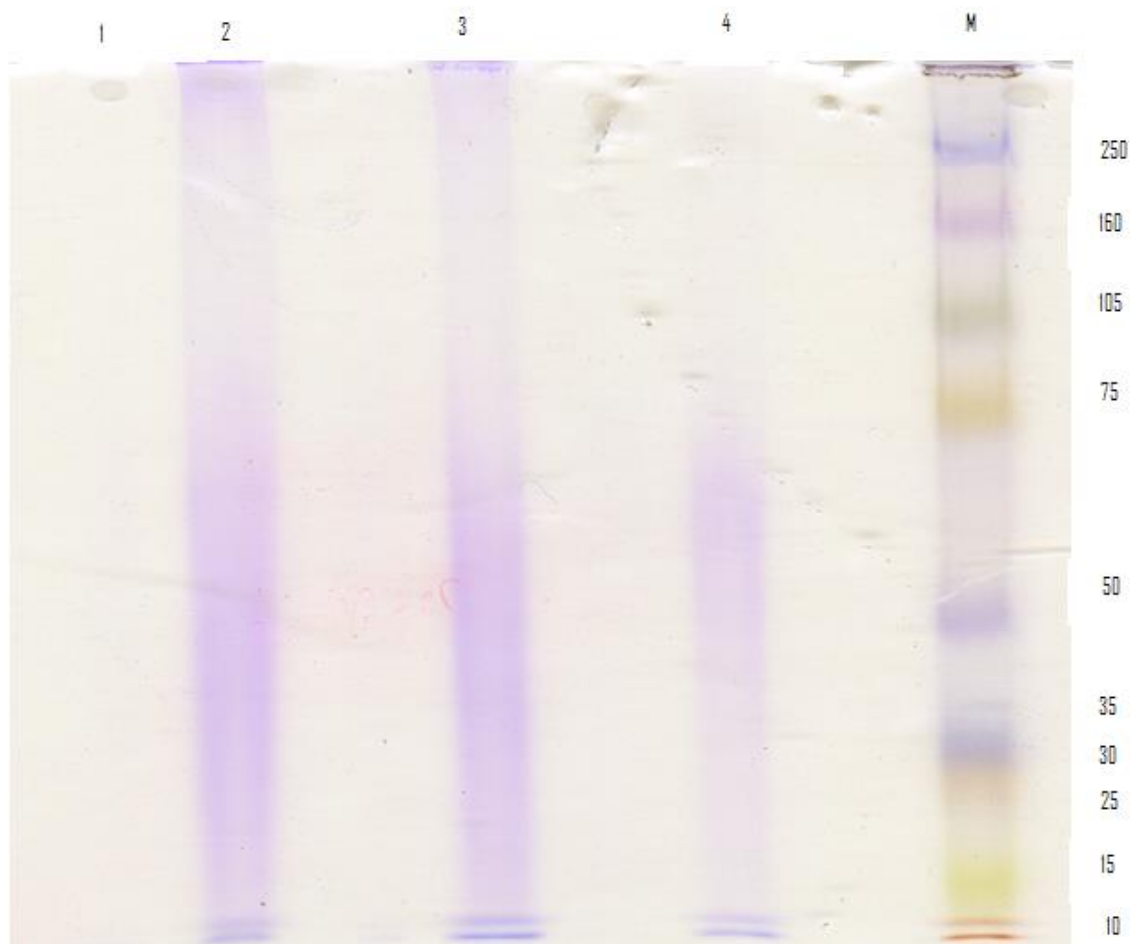


Figura 5.8 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, das fracções durante o processo de extracção pelo método de Wititsuwannakul e a amostra injectada na HIC. M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). 1 – Fracções correspondentes à amostra descartada no passo 5 do processo de extracção (Fig. 4.2); 2 – Fracções correspondentes ao passo 5 do processo de extracção (Fig. 4.2); 3 – Fracções correspondentes ao passo 4 do processo de extracção (Fig. 4.2); 4 – Fracções correspondentes à amostra injectada no FPLC.

A linha 1 (Fig. 5.8) representa a amostra descartada no passo 5 (Fig. 4.2), não se conseguindo observar quaisquer proteínas hidrofílicas que tenham sido desnaturadas. Isto pode dever-se ao facto das proteínas hidrofílicas estarem maioritariamente no soro C (Yeang *et al.*, 2002).

Na linha 2 (Fig. 5.8), está representado o passo 4 (Fig. 4.2) do processo de extracção onde se pode observar proteínas com vários pesos moleculares, desde 15 até 75 kDa; a linha 3 representa o passo 5, em que a única diferença em relação ao passo anterior é que a amostra foi aquecida a 70° C tirando partido do facto de as proteínas hidrofóbicas serem mais estáveis a esta temperatura do que as proteínas hidrofílicas, que com este aquecimento desnaturam e formam um precipitado.

Na linha 4 (Fig. 5.8) está representada a amostra que foi injectada na coluna de HIC. Esta, não é mais do que a amostra presente na linha 3 (Fig. 5.8), que ao ser sujeita a uma filtração num filtro de 0,45 µm, passa de uma cor branca para uma cor límpida apresentando, por isso, uma menor quantidade de proteínas. A solução é branca devido à presença de agregados de grandes dimensões resultantes da interacção entre as proteínas hidrofóbicas e também entre as microparticulas de borracha.

5.2.2.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A HIC da amostra obtida por extracção pelo método de Wititsuwannakul foi realizada nas mesmas condições experimentais já referidas anteriormente. Injectaram-se 100 μ L de amostra com uma concentração proteica de 0,7 mg/ml e utilizou-se PBS 0,01M, pH 7,4 como eluente com concentrações de sulfato de amónio que variaram entre 0,25 M e 2 M.

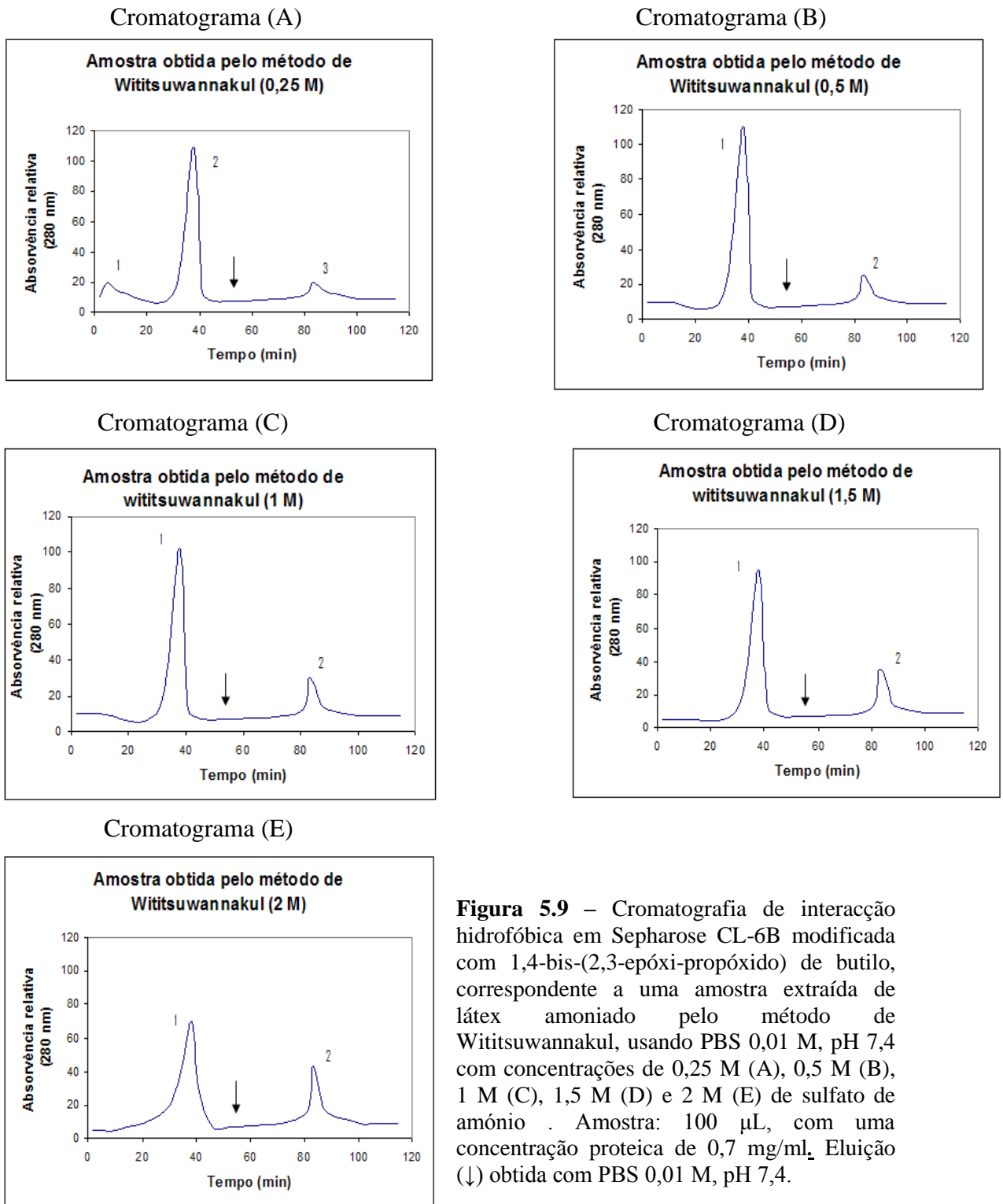


Figura 5.9 – Cromatografia de interação hidrofóbica em Sepharose CL-6B modificada com 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo, correspondente a uma amostra extraída de látex amoniado pelo método de Wititsuwannakul, usando PBS 0,01 M, pH 7,4 com concentrações de 0,25 M (A), 0,5 M (B), 1 M (C), 1,5 M (D) e 2 M (E) de sulfato de amónio . Amostra: 100 μ L, com uma concentração proteica de 0,7 mg/ml. Eluição (\downarrow) obtida com PBS 0,01 M, pH 7,4.

A análise dos cromatogramas (Fig. 5.9), mostra que:

- Para a concentração de 0,25 M (Fig. 5.9 (A)) obteve-se o fraccionamento da amostra em três picos, dois dos quais com área muito reduzida. Com o aumento da concentração, o primeiro pico correspondente às proteínas de carácter hidrofílico (antes da eluição com tampão sem sal) desapareceu, comportando-se da maneira descrita na literatura (Queiroz *et al.*, 2001);
- Para as restantes concentrações de sal, apenas se observaram dois picos, à medida que a concentração de sal aumentou. O primeiro pico, onde se encontram as proteínas mais hidrofílicas diminuiu, enquanto o segundo, correspondente às proteínas mais hidrofóbicas, aumentou ligeiramente com o incremento da força iónica. É de realçar, no entanto que mesmo com concentrações elevadas de sal (2 M) no eluente, nunca se verificou a retenção total das proteínas da amostra em análise. Isto pode indicar uma baixa concentração de proteínas hidrofóbicas, o que se veio a confirmar posteriormente por ELISA relativamente ao alérgénio Hev b 3. Este facto provavelmente resultou também da precipitação observada na amostra, com o aumento da concentração de sal. Esta promoveu uma diminuição das proteínas mais hidrofóbicas, já que ao estarem precipitadas ficaram retidas no processo de filtração que se processava antes da injeção da amostra na HIC.

Com o intuito de escolher a concentração ideal de sal no eluente, para a recolha dos picos para posterior análise por electroforese SDS-PAGE, seleccionaram-se os cromatogramas que apresentavam picos com maior resolução e com o segundo pico de área maior. Por isso, de acordo com este critério, foi escolhida a concentração de sal de 2 M no eluente. No entanto, como as proteínas que se pretendem purificar são muito hidrofóbicas, seria de esperar que com uma pequena concentração de sal ficassem retidas na coluna, por isso usou-se também a concentração de 0,25 M.

A diluição das amostras obtidas não permitiu a visualização por SDS-PAGE, das proteínas existentes em cada um dos picos obtidos por HIC. Deste modo cada ensaio cromatográfico com concentração proteica de 0,7 mg/mL foi repetido 4 vezes e as fracções foram reunidas e liofilizadas.

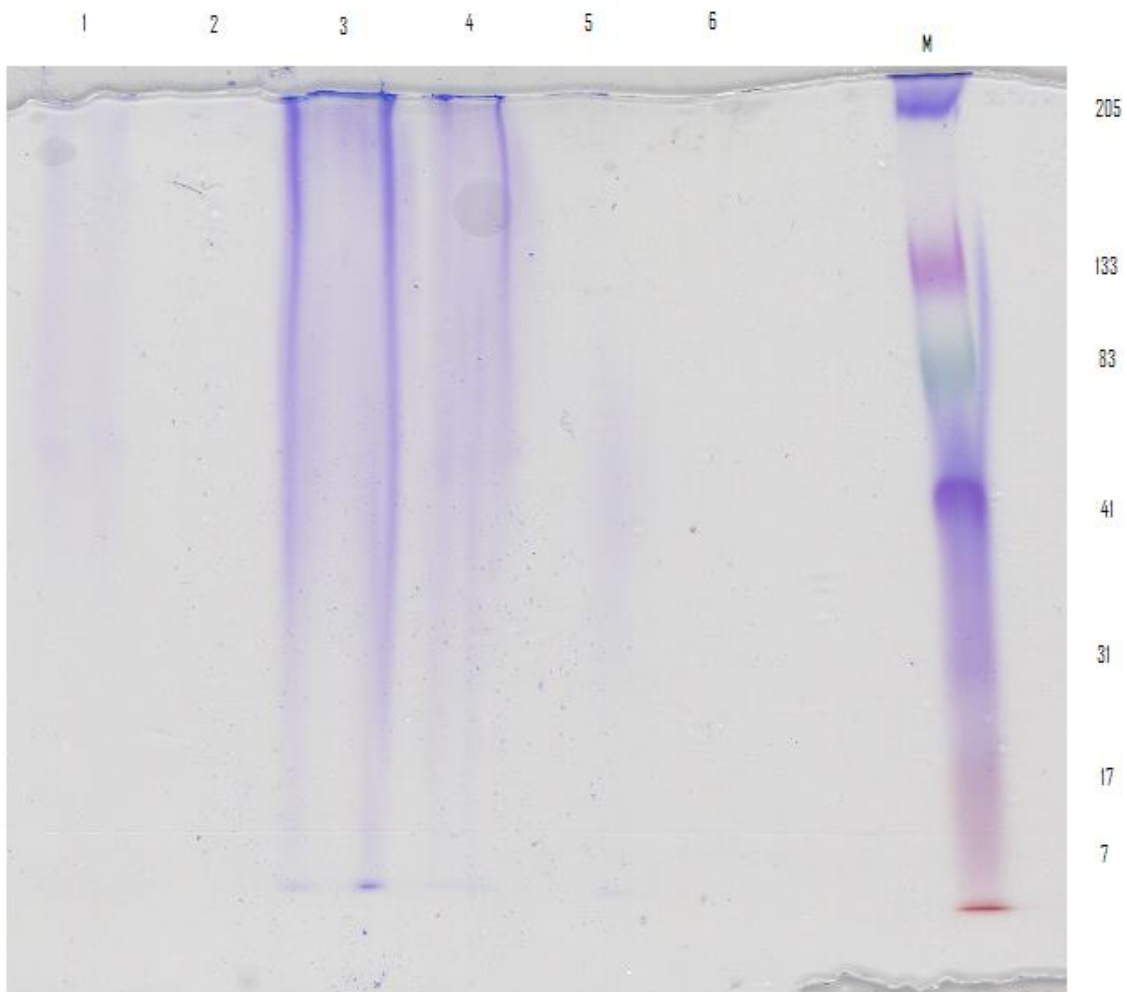


Figura 5.10 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, da amostra obtida durante o processo de extracção pelo método de Wititsuwannakul e fracções dos picos recolhidos na HIC com concentrações de sal de 0,25 e 2 M; M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). 1 – Fracções correspondentes ao pico 2 de 2 M obtido na HIC; 2 – Fracções correspondentes ao pico 1 de 2 M obtido na HIC; 3 – Fracções correspondentes ao pico 2 de 0,25 M obtido na HIC; 4 – Fracções correspondentes ao pico 1 de 0,25 M obtido na HIC; 5 – Amostra (não filtrada) obtida pelo processo de Wititsuwannakul; 6 – Amostra (filtrada) obtida pelo processo Wititsuwannakul.

A electroforese SDS-PAGE (Fig. 5.10) mostra as diferenças proteicas existentes nos picos recolhidos da HIC. Observou-se a presença de proteínas mais hidrofóbicas de alto e baixo peso molecular no pico 2 de 0,25 M (linha 3), enquanto que no pico 1 de 0,25 M (linha 4), apenas são visíveis uma pequena quantidade de proteínas de alto peso molecular.

No que diz respeito à HIC usando eluente com concentração de sal de 2 M, não se consegue observar qualquer tipo de proteínas no pico 1 (linha 2), enquanto que no pico 2 (linha 1) se observam proteínas de alto peso molecular.

De entre as amostras extraídas pelo método de Wititsuwannakul, apenas na amostra não filtrada (linha 5), são obtidas algumas proteínas com massa molecular de cerca de do 50 kDa. Esta diferença na composição proteica, pode dever-se ao facto das proteínas hidrofóbicas formarem agregados ou estarem associadas a pequenas partículas de borracha (Yeang *et al.*, 2002), que ficaram retidas após a filtração.

5.2.2.2 Quantificação do alergénio Hev b 3 por ELISA

O método ELISA Fitkit® foi utilizado, para quantificar o alergénio hev b 3 na amostra inicial e na amostra obtida pela HIC.

Tabela 5.2: Quantificação do hev b 3 existente nas amostras pelo método ELISA

	Amostra obtido pelo método de Wititsuwannakul	Pico 2 (0,25M)
Concentração ug/L	0,0	0,0

Os resultados da ELISA, não revelaram a presença de Hev b 3 na amostra obtida pelo método de Wititsuwannakul, o que pode ser explicado pelo facto de que este alergénio ser muito lábil no látex amoniado. Foi demonstrado que esta proteína, mesmo a temperaturas de -20° C, tem tendência para se fragmentar em polipéptidos de menor massa molecular, de 24 kDa a cerca de 5 kDa (Yeang *et al.*, 1996). Por outro lado, também está descrita a sua agregação em presença de proteínas de massa molecular superior a 24 kDa. No latex amoniado (usado para a manufactura de produtos de látex) os lutoides sofrem ruptura e libertam o soro B que reage com o Hev b 3 existente nas partículas de borracha, originando uma série de polipéptidos de baixa massa molecular que são muito alergénicos para os doentes com espinha bífida (Yeang *et al.*, 1996, 2002).

5.3 Separação dos alergénios hidrofóbicos de uma amostra obtida a partir de látex não amoniado

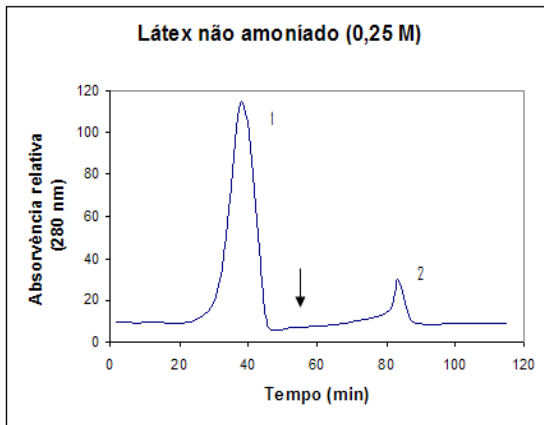
Após a confirmação pelos ensaios anteriores de que os dois métodos testados não permitiram a obtenção de amostras com os alergénios hidrofóbicos Hev b1 e Hev b 3, a partir do látex amoniado, utilizou-se uma amostra obtida a partir de látex não amoniado (NAL), cedida gentilmente pelo Dr. Jonas Lidholm dos laboratório Phadia (Uppsala, Suécia).

5.3.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

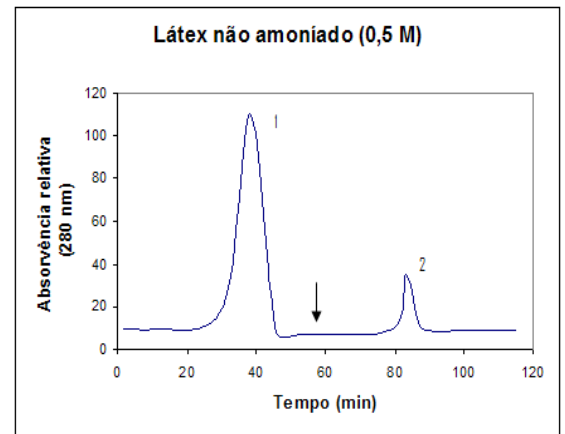
O estudo dos perfis de HIC da amostra de látex não amoniado (Fig. 5.11), foi realizado nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente, por injeção de 100 μL de amostra com uma concentração proteica de 0,4 mg/ml. Utilizou-se PBS como eluente, com concentrações de sal que variaram entre 0,25 M e 1,5 M.

A influência da concentração de sulfato de amónio, na retenção das proteínas presentes no extracto de latex não amoniado foi estudada e os resultados mostraram que a retenção das proteínas aumenta à medida que a concentração do sal no eluente também aumenta (Queiroz *et al.*, 2001).

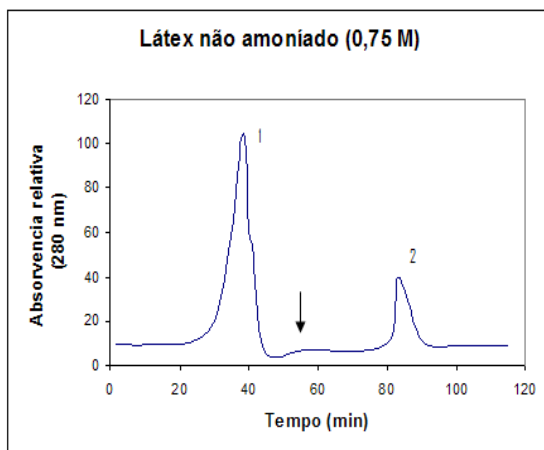
Cromatograma (A)



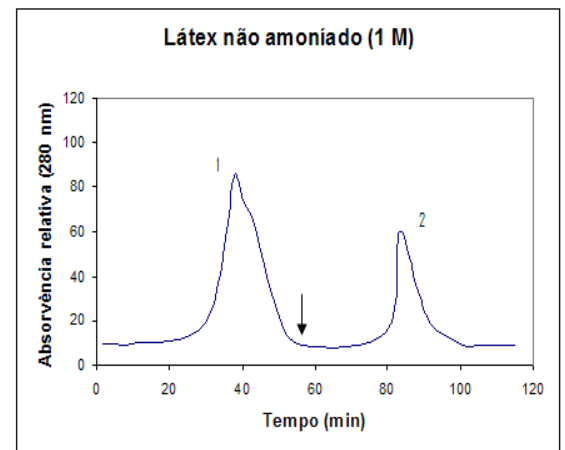
Cromatograma (B)



Cromatograma (C)



Cromatograma (D)



Cromatograma (E)

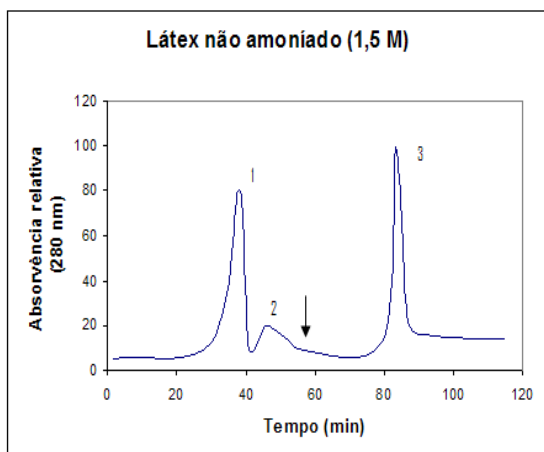


Figura 5.11 – Cromatografia de interação hidrofóbica em Sepharose CL-6B modificada com 1,4-bis-(2,3-epóxi-propóxido) de butilo, correspondente ao extracto de latex não amoniado, usando PBS 0,01 M, pH 7,4 com concentrações de 0,25 M (A), 0,5 M (B), 0,75M (C), 1 M (D), 1,5 M (E) de sulfato de amónio . Amostra: 100 μ L, com uma concentração proteica de 0,4 mg/ml. Eluição (\downarrow) obtida com PBS 0,01 M, pH 7,4.

Após a análise dos cromatogramas (Fig. 5.11), observou-se que:

- Antes da eluição do tampão com sal, os cromatogramas apresentam apenas um pico, correspondente às proteínas mais hidrofílicas.
- A partir da concentração 0,75 M (Fig. 5.11 (C)), verificou-se o aparecimento de um ombro no primeiro pico.
- Para a concentração de sal 1,5 M no eluente (E), observou-se a separação do ombro com o aparecimento de um novo pico. Foi com esta concentração de sal que se conseguiu um maior fraccionamento da amostra.

Com o intuito de escolher a concentração ideal de sal no tampão, para a recolha dos picos para posterior análise por electroforese SDS-PAGE, seleccionaram-se os cromatogramas que apresentavam o maior número de picos, com maior resolução. Por isso, de acordo com este critério, foi escolhida a concentração de sal de 1,5 M no eluente.

A diluição das amostras obtidas, não permitiu a visualização por SDS-PAGE, das proteínas existentes em cada um dos picos obtidos por HIC com 1,5 M de sulfato de amónio. Deste modo, cada ensaio cromatográfico com concentração proteica de 0,4 mg/mL foi repetido 2 vezes e as fracções foram reunidas e liofilizadas.

A análise por SDS-PAGE das fracções dos picos obtidos na HIC da amostra proveniente de NAL está representada na figura 5.12

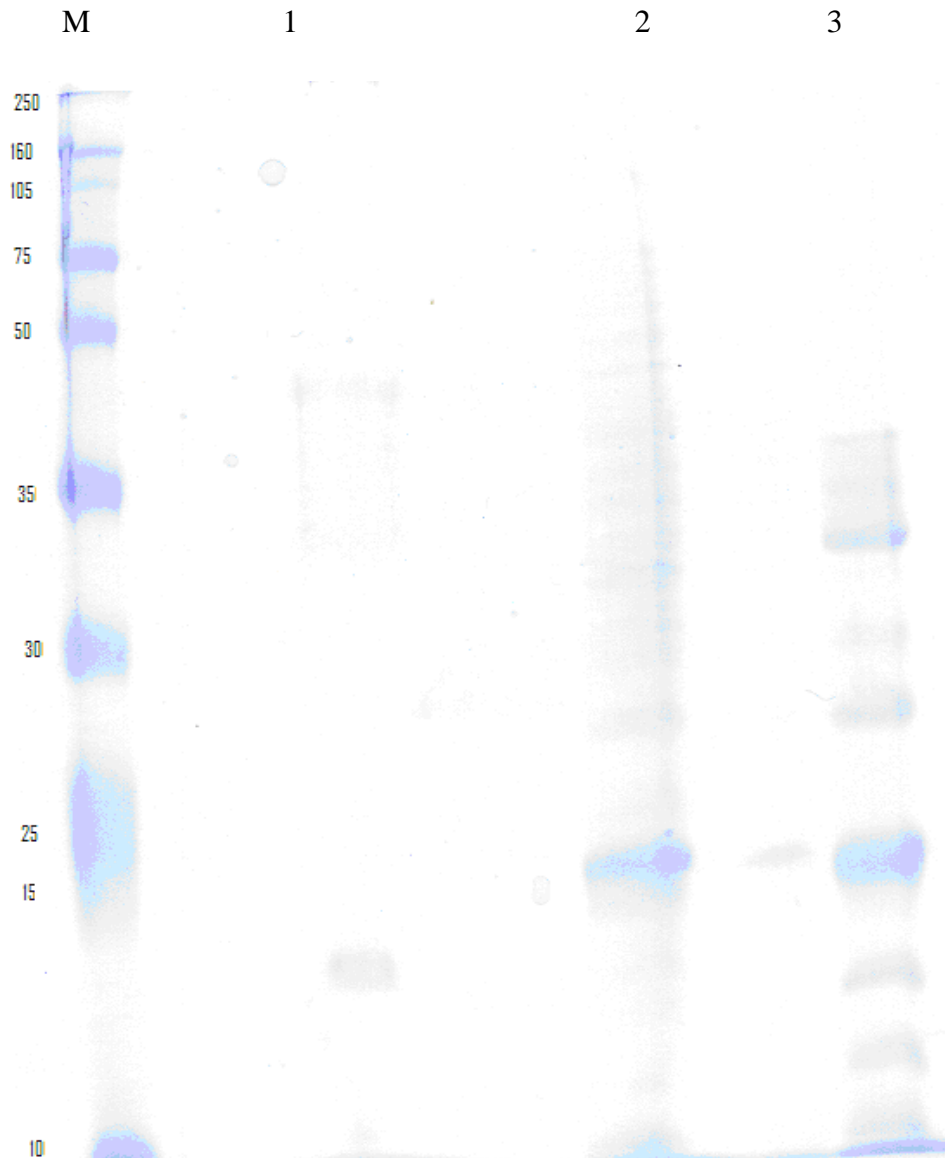


Figura 5.12 – Análise por electroforese SDS-PAGE, gel a 12,5%, das fracções obtidas por HIC (1,5 M de sal) do NAL (concentração de 0,4 mg/mL). M_{ap} – marcador de pesos moleculares elevados (kDa). 1 – Fracções correspondentes ao pico 1; 2 – Fracções correspondentes ao pico 2; 3 – Fracções correspondentes à amostra injectada.

A HIC do NAL, usando 1,5 M de sal no eluente, apresentou três picos distintos (Fig. 5.11 (E)). A electroforese SDS-PAGE (Fig. 5.12) destas fracções, mostrou que no primeiro pico (linha 1) se observou apenas uma única banda na zona dos 13-14 kDa, que está presente no NAL original, mas não está no segundo pico. Tendo em conta as massas moleculares, esta banda pode ser o Hev b 1 (14.7 kDa) ou o Hev b 8 (13.9 kDa), no entanto como o pico 1 seria onde se encontrariam os alergénios

mais hidrofílicos, onde se inclui o Hev b 8, será assim mais provável, que a banda isolada seja de facto o Hev b 8. O Hev b 1 deveria encontrar-se no segundo pico juntamente com as proteínas mais hidrofóbicas.

5.2 Quantificação de alergénios por ELISA:

O método ELISA Fitkit® foi utilizado, para quantificar o alergénio Hev b 3 na amostra inicial e nas amostras obtidas pela HIC.

Tabela 5.3: Quantificação do hev b 3 existente nas amostras pelo método ELISA

	Amostra de látex não amoniado	Pico 1 (1,5 M)	Pico 2 (1,5 M)
Concentração ug/L	2,212	0,962	1,087

Os resultados da ELISA revelaram, tal como é descrito na literatura (Yeang *et al.*, 1996) que é no latex não amoniado que se encontram os valores mais elevados de Hev b 3, em comparação com as amostras obtidos pelos processos de Jungbauer e Wititsuwannakul. Na análise dos resultados dos testes de ELISA aos picos do cromatograma, observa-se que o segundo pico possui, tal como se esperava, uma maior concentração de Hev b 3, no entanto, as diferenças entre os dois valores são pequenas, não permitindo tirar-se qualquer conclusão definitiva.

Devido às semelhanças nas massas moleculares entre o Hev b 1 e Hev b 8, a quantificação por ELISA do primeiro alergénio no pico 1 poderia ser importante para clarificar a identidade da proteína existente na banda visualizada na SDS-PAGE, resultante da separação selectiva por HIC. No entanto, tal como já foi referido, por dificuldades na aquisição do Fitkit® para o Hev b 1, esses ensaios terão de ser realizados posteriormente.

Apesar disso, os resultados obtidos com o NAL são bastante promissores, já que num só passo cromatográfico se conseguiu a separação de uma proteína, a partir de uma mistura relativamente complexa.

É de realçar que não se puderam realizar mais ensaios com a amostra obtida a partir do NAL, por esta já não ser suficiente.