



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0708733-0 A2**

(22) Data de Depósito: 06/03/2007
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 13/24 2006.01
A01N 63/02 2006.01
C12P 21/06 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE POLIPEPTÍDEOS RICOS EM 4-HIDROXIPROLINA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COMPOSIÇÃO NO CAMPO AGRONÔMICO, COMPOSTO, E, USO DE POLIPEPTÍDEOS CONTENDO 4-HIDROXIPROLINA**

(30) Prioridade Unionista: 10/03/2006 IT MI2006A000434

(73) Titular(es): Arterra Bioscience S.R.L.

(72) Inventor(es): Fabio Apone, Maarten J. Chrispeels, Maria Gabriella Colucci

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007002075 de 06/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/104489 de 20/09/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE POLIPEPTÍDEOS RICOS EM 4-HIDROXIPROLINA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COMPOSIÇÃO NO CAMPO AGRONÔMICO, COMPOSTO, E, USO DE POLIPEPTÍDEOS CONTENDO 4-HIDROXIPROLINA. A presente invenção refere-se a um método para a preparação de 4-hidroxi-L-prolina ou de composições com alto teor deste aminoácido e ao uso do mesmo como agroquímico no campo agrícola e/ou como um intermediário de síntese de compostos químicos.

“MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE POLIPEPTÍDEOS RICOS EM 4-HIDROXIPROLINA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COMPOSIÇÃO NO CAMPO AGRONÔMICO, COMPOSTO, E, USO DE POLIPEPTÍDEOS CONTENDO 4-HIDROXIPROLINA”

5 A presente invenção refere-se a um método para a preparação de uma composição com base em 4-hidroxirolina e aos usos da mesma no campo agrícola.

Especialmente, a presente invenção refere-se a um método para a preparação de 4-hidroxi-L-prolina e a composições com um alto teor deste aminoácido e ao uso da mesma como agroquímico no campo agrícola e como um intermediário de síntese para compostos químicos.

4-hidroxirolina, um derivado hidroxilato (4-HO-Pro) de prolina, é um aminoácido de importância biológica considerável, que é tipicamente encontrado em um colágeno.

15 A hidroxiprolina atualmente é obtida a partir de fontes de proteína de um animal, como os de origem suína ou bovina.

Os métodos para a obtenção de oligopeptídeos ricos em hidroxiprolina prevê que a fonte de proteína de origem animal seja inicialmente moída e conservada em ambiente de baixa temperatura até o momento do tratamento, que é composto das seguintes fases:

20 - Hidrólise ácida (a acidez é mantida elevada durante toda a operação, para acelerar o processo e evitar qualquer tipo de racemização). A temperatura varia de 70-100 °C;

- Filtração dos produtos insolúveis/decantação ou extração com solventes dos componentes lipídicos ou lipofílicos;

25 - Purificação através de cromatografia de troca de íons. O teor de hidroxiprolina nas matrizes mais ricas pode alcançar, no máximo, 12 - 14% da massa de aminoácido, com a presença de quantidades semelhantes de aminoácidos, por exemplo, prolina (10 - 15%), que constituem os parâmetros

de operação para a separação crítica;

- Purificação/perda de cor com carvão ativo;
- Ultrafiltração;
- Cristalização repetida;
- 5 - Secagem.

No entanto, os processos atualmente utilizados têm várias desvantagens, tais como a obtenção de uma concentração total de hidroxiprolina livre ou de peptídeo menor do que 12 - 14% com relação à massa de aminoácido presente, além do risco de contaminação por intermédio de peptídeos bioativos perigosos. Isto pode ser associado com riscos de contaminação por uma proteína modificada (com relação à forma "não patológica") chamada de "prion" responsável pelo desenvolvimento de algumas patologias sérias, entre as quais a encefalopatia espongiforme bovina (BSE).

15 Estes riscos recentemente levaram a união europeia a proibir o uso de proteínas hidrolisadas de origem animal ou derivação para uso em agricultura biológica.

Três grupos de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (glicoproteína-rica em hidroxila, HRGP), identificadas e caracterizadas em plantas, são descritas na literatura (Showalter AM and Varner JE (1988); Biochemistry of Plants, Vol.15, editado por Stumpf PK & Conn, EE Academic Publisher, New York). Estes incluem:

- 25 i) "Proteínas arabinogalactan", principalmente localizadas na matriz extracelular e algumas vezes associadas com a membrana plasmática;
- ii) lecitinas que pertencem à família Solanaceous; e
- iii) extensinas, os principais componentes das paredes celulares principais onde elas ligam covalentemente a matriz de semi-celulose e as pectinas. Elas são especialmente abundantes nas paredes das células que crescem em meios líquidos (Lamport, 1974; Cooper and Varner, 1983; Qi et

al., 1995).

5 Algumas destas extensinas provenientes de culturas de células de cenoura foram amplamente caracterizadas em relação à sua função importante no controle da extensão da parede durante o crescimento celular (Lamport, 1969; Brysk and Chrispeels, 1972). Mais recentemente, novas proteínas semelhantes às extensinas, contendo 20% de prolina e 20% de hidroxil-prolina, foram extraídas de paredes de células de soja em uma cultura largamente caracterizada (Averyhart-Fullard et al., 1988; Hong and Nagao, 1989).

10 A solubilização de HRGP das paredes das células foi executada por vários grupos de pesquisa com métodos análogos. O primeiro trabalho é de 1969, quando foi executada uma primeira purificação e identificação das proteínas ligadas na parede da célula (Lamport, 1969). Um protocolo semelhante com base na remoção de cadeias de açúcar ligadas nas
15 glicoproteínas da parede com ácido clorídrico e o tratamento conseqüente com tripsina, foi aplicado posteriormente nas culturas das células de cenoura para o isolamento e a análise dos peptídeos ricos em hidroxiprolina derivada da hidrólise das glicoproteínas da parede (Cho and Chrispeels, 1976).

20 Os protocolos com base na tripsinização de glicoproteínas da parede foram também aplicados com sucesso em culturas de células de algodão (QI et al., 1995).

25 Proteínas semelhantes às extensinas foram purificadas das paredes das células de soja com processos baseados no forte tratamento com ácido tricloroacético, o qual hidrolisa as ligações de glicosídeo destas glicoproteínas e também permite a sua separação da matriz de celulose, e em conseqüência, isoladas por técnicas HPLC mais modernas (Averyhart-Fullard et al., 1988). Um tratamento análogo com ácidos fortes e processos de filtração com gel foram também utilizados para o isolamento e a caracterização das extensinas da parede de culturas celulares de tomate

(Brownleader and Dey, 1993).

Somente uns poucos estudos orientados na direção da caracterização única das referidas glicoproteínas e verificações experimentais da sua função na fisiologia vegetal, são atualmente conhecidos.

5 4-HO-Pro (Plant Physiology (1984), "Effects of the Proline Analog L-Thiazolidine-4-carboxylic Acid on Proline Metabolism", vol. 74, páginas 213 - 218, 1984) é também conhecido como sendo capaz de aumentar o nível de prolina em tecidos vegetais, reforçando as respostas naturais da planta para aliviar/opor-se aos efeitos causados pelos agentes de tensão
10 abiótica (por exemplo, temperaturas extremas, seca, salinidade do solo, mas também a vários tipos de contaminações químicas), e também para auxiliar as respostas da planta ou o efeito dos agentes fitoiátricos exógenos no controle de fitopatógenos.

 4-HO-Pro proveniente de fontes animais de fato é já
15 comercializado para este fim, mas somente em uma mistura com outros aminoácidos. Para estas aplicações, de fato ele é disponível somente na forma diluída em produtos hidrolisados de proteína, e especialmente, produtos hidrolisados provenientes de tratamento químico ou enzimático de epitélio animal. Esta fonte, no entanto, representa um risco possível de contaminação,
20 devido à presença potencial de vetores de encefalopatia espongiiforme bovina (BSA).

No estado atual, a disponibilidade de fontes alternativas para a obtenção de 4-HO-Pro reduzindo os riscos de contaminação biológica, tornou-se necessária.

25 Um dos objetivos da presente invenção, portanto, consiste na apresentação de um método para a obtenção de 4-hidróxi-L-prolina ou composições enriquecidas neste aminoácido na forma livre ou na forma de oligopeptídeos, que não têm riscos de contaminação biológica.

Um outro objetivo da presente invenção consiste no

fornecimento de 4-hidroxi-L-prolina ou composições com base neste aminoácidos que podem ser usadas como intermediários para a preparação de outras substâncias químicas.

5 Outro objetivo da presente invenção consiste na apresentação de composições com base em hidroxiprolina que podem ser aplicadas no campo agrônômico e especialmente, na agricultura biológica.

10 Em vista dos objetivos acima, de acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é apresentado um método para a preparação de uma composição composta de 4-hidroxiprolina de acordo com a reivindicação 1.

Outras características acessórias do método da invenção são indicadas nas reivindicações dependentes anexas 2-7.

15 O requerente verificou que partindo-se de culturas de células de plantas, e especialmente tratando-se adequadamente as paredes das células de várias espécies de plantas, é possível obter-se composições de aminoácidos ricas em 4-hidroxi-L-prolina, substancialmente isentas de outros contaminantes biológicos.

20 Especialmente, de acordo com uma realização da invenção, as composições enriquecidas em 4-hidroxi-L-prolina são obtidas através da fermentação de culturas de células de plantas, a separação e a lises das paredes celulares das células.

25 De acordo com outra realização, o método da invenção também constitui a degradação de proteínas em peptídeos, com base em poli-4-HO-Pro liberado pela lises das paredes celulares quimicamente e/ou enzimaticamente, e a purificação opcional, parcial ou total, do 4-HO-Pro assim obtido, como aminoácido livre.

De acordo com uma realização preferida da invenção, a cultura celular inicial é baseada em células BY2 de tabaco.

As características e vantagens de uma realização do método de

acordo com a presente invenção ficarão mais evidentes a partir da seguinte descrição ilustrativa e não limitante, com referência ao seguinte esquema que é composto das seguintes fases:

- a) fermentação de células BY2 em uma cultura líquida;
- ↓
- 5 b) separação das células BY2 do meio de fermentação;
- ↓
- c) homogeneização, de preferência, com PBS, contendo 1% de Triton X-100;
- ↓
- 10 d) precipitação das paredes celulares e lavagem subsequente em PBS para remover os componentes citoplasmáticos;
- ↓
- e) ebulição das paredes celulares em uma solução de 2 mM EDTA para a remoção das pectinas e do amido;
- ↓
- f) tratamento das paredes com uma solução ácida para separar os açúcares ligados nas proteínas das paredes;
- ↓
- 15 g) digestão das proteínas das paredes, em um meio ácido e/ou enzimaticamente;
- ↓
- h) separação através de cromatografia dos peptídeos e aminoácidos.

As fases a-h são convenientemente efetuadas de acordo com os seguintes procedimentos e condições:

- 20 a) fermentação das células vegetais, de preferência, de BY2 de tabaco, em um meio líquido; a fermentação pode ser executada conforme descrito, por exemplo, por Kato et al, 1972, inoculando-se 50 ml de uma cultura densa de células em 1 litro de meio de cultura, contendo 30 g/litro de

sacarose, 4,4 g/litro de mistura de sal basal Murashige/Skoog (sal MS, Sigma), 0,1 g/litro de Inositol, 1 mg/litro de tiamina e, 0,2 mg/litro de 2,4 D e, 0,18 g/litro de KH_2PO_4 em um pH de 5,7.

5 A fermentação também pode acontecer em volumes diferentes e meios de cultura modificados com relação àqueles propostos por Kato et al.

b) a separação das células BY2: isto pode ser efetuado por sedimentação das células e filtração posterior do líquido através de uma camada de tecido Miracloth (Calbiochem), que retém as células mas permite a passagem da solução aquosa. De acordo com outra realização, ela pode ser
10 efetuada por centrifugação ou também por decantação simples do meio de cultura. As células são então recolhidas com qualquer sistema de recolhimento, por exemplo, uma espátula, que pode ser conveniente e são recolocadas em suspensão em PBS (1,44 g/litro de NaH_2PO_4 , 0,24 g/litro de KH_2PO_4 , NaCl 8 g/l em um pH de 7,4) e contendo um detergente, por
15 exemplo, dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1%. A suspensão de solução tampão pode ser diferente do PBS, tanto com relação à composição química como ao pH. O SDS pode ser substituído por outros detergentes que podem ser mais adequados para a quantidade de células utilizadas.

c) homogeneização das células BY2: a homogeneização das
20 células pode ser efetuada em um recipiente adequado, como uma argamassa cerâmica com um pilão também cerâmico. A quantidade de células e os volumes relativos de solução tampão a serem utilizados varia em relação ao procedimento previamente escolhido. A homogeneização também pode ser efetuado com prensas do tipo mecânico ou hidráulico ou por outros aparelhos
25 disponíveis no mercado adequados para a quebra das células por fricção, sob condições resfriadas e não resfriadas.

d) precipitação das paredes celulares: tão logo um lisato celular homogêneo tenha sido obtido por intermédio da homogeneização, a amostra de células é centrifugada, por exemplo, a 3000 rotações por 15

minutos aproximadamente, para precipitar as paredes celulares. O sobrenadante obtido da centrifugação é eliminado, enquanto que os grânulos das paredes são lavados três vezes com uma solução tampão até que todos os componentes citoplasmáticos e detergentes tenham sido eliminados do sobrenadante.

5 e) ebulição das paredes celulares: as paredes celulares assim obtidas entram em ebulição na presença de um agente seqüestrante, por exemplo, EDTA 2mM, para eliminar as pectinas e amidos que contaminam a preparação da parede. Os grânulos assim obtidos são lavados outra vez em
10 PBS.

f) tratamento das paredes com uma solução ácida: os grânulos das paredes celulares são recolocados em suspensão em uma solução ácida, por exemplo, HCl 0,1 N (pH 1,0) e entram em ebulição, tipicamente durante cerca de 1 hora. Desta forma, todos os açúcares ligados covalentemente com
15 as proteínas das paredes são separados e colocados em solução. As proteínas da parede são agora acessíveis ao ataque das enzimas proteolíticas que hidrolisam as mesmas em peptídeos e/ou aminoácidos simples.

g) digestão das proteínas das paredes: isto pode ser feito vantajosamente com meios ácidos ou enzimaticamente, ou utilizando ambos
20 os métodos, alternando-se, por exemplo, a hidrólise enzimática com a hidrólise ácida. Para o tratamento ácido, são utilizados ácidos inorgânicos, por exemplo, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico; ou ácidos orgânicos, tais como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido metanossulfônico, ácido trifluorometanossulfônico. Quando a referida
25 digestão é executada enzimaticamente, podem ser utilizadas enzimas proteolíticas, como por exemplo, tripsina (com métodos tipicamente descritos em Cho e Chrispeels, 1976) mais de preferência com pepsina, que permite que o tratamento seja feito diretamente na solução ácida usada para a hidrólise dos açúcares, sem a necessidade de lavagens ou neutralizações adicionais com

bases.

h) separação dos aminoácidos por cromatografia: uma purificação adicional pode ser executada na mistura de peptídeos/aminoácidos extraídos das paredes para separar os componentes de proteínas tendo vários pesos moleculares dos açúcares, principalmente arabinoses. Isto pode ser feito com cromatografia de troca de íons fraca ou com filtração por gel, utilizando colunas Dowex50 (troca de íons) ou colunas de filtração por gel Sephadex G10 ou G15 (filtração por gel).

De acordo com outro aspecto, é apresentada uma composição com base em polipeptídeo, composta de 4- hidroxiprolina obtida de acordo com o método da invenção.

De acordo com outro aspecto, é apresentado o uso de 4- hidroxiprolina de uma composição de polipeptídeo composta de 4- hidroxiprolina, obtida de acordo com o método da invenção, no campo agrônômico, especialmente para dar às safras uma tolerância maior às tensões abióticas e/ou bióticas, i.e. causada pelos microorganismos fitopatógenos.

O requerente, de fato com surpresa, verificou que o 4-HO-Pro e as composições contendo 4-HO-Pro, objeto da presente invenção, são capazes de induzir significativamente genes envolvidos na autodefesa de plantas, por exemplo, através da indução da proteína de defesa induzida pelos ataques dos patógenos (Pathogen Related 1, PR1).

Especialmente, o requerente observou um efeito significativo das 4-hidroxi-L-prolina e das composições enriquecidas neste aminoácido, objeto da presente invenção, para o controle do desenvolvimento de agentes responsáveis pelo estresse biótico, como microorganismos fitopatogênicos, através da indução de substâncias tendo uma atividade anti-fungicida, como a proteína de defesa PR1.

De acordo com uma realização, o uso é previsto no campo agrônômico, especialmente em safras agrícolas biológicas de composições

compostas de 4-HO-Pro na presença de polissacarídeos, tipicamente cadeias de arabinose, presentes nas paredes das células BY2 de tabaco, opcionalmente separadas da matriz de proteína, mas não removidas da referida composição.

Além disso, o 4-HO-Pro obtido com o método da invenção também permite que sejam obtidas associações diferentes, como por exemplo, com aminoácidos predeterminados, ou com polissacarídeos ou com osmoprotetores de uma natureza química e/ou ação mecânica variada, e também facilita as operações de separação do 4-HO-Pro com um alto grau de pureza para usos sintéticos (como para a produção de peptídeos com estruturas quaternárias específicas).

Outra realização prevê o uso agronômico das paredes celulares, de preferência, de células BY2 de tabaco, através da assimilação do processo de degradação descrito acima para o seu metabolismo natural produzido sobre ou dentro da planta, ou no solo, pela ação de microorganismos ou pela própria planta, e o efeito sinérgico que o componente de hidroxiprolina e o componente arabinosídeo produz para limitar ou aliviar os efeitos causados pelo estresse abiótico e biótico.

A hidroxiprolina e/ou as composições baseadas neste aminoácido obtidas de acordo com o método da invenção podem ser usadas para o tratamento de toda a planta, ou de uma porção da mesma. Eles, portanto, podem ser aplicados nas folhas, mas também no tronco ou caule, ou nas raízes, através da aspersão de soluções ou suspensões ou pela incorporação de grânulos ou pós no solo. As sementes também podem ser tratadas convenientemente com os compostos objeto da patente atual, como resultado das propriedades osmoprotetoras mostradas.

A hidroxiprolina e as composições obtidas de acordo com a invenção podem ser aplicadas em todos os tipos de safras, monocotiledônea ou dicotiledônea, e em conseqüência, produzirem uma assistência excelente para o cultivo, por exemplo, de cereais, árvores frutíferas, legumes, safras

"solanaceous", vários tipos de vegetais, mas também plantas ornamentais, plantas oleaginosas para usos não alimentícios, gramados, etc.

5 As referidas composições podem ser utilizadas sozinhas ou em uma mistura com qualquer outro produto utilizado tradicionalmente em agronomia, em qualquer proporção o procedimento aplicativo, ambos para a proteção de safras (fungicidas, herbicidas, inseticidas, nemotocidas, bioestimulantes), mas também para a sua nutrição (adubos, vários tipos de fertilizantes, microelementos).

10 Um objetivo da invenção também se refere a composições com base em 4-HO-Pro, derivadas do processo descrito acima e com graus diferentes de pureza, opcionalmente contendo sacarídeos associados.

15 As doses de aplicação, expressas como uma relação com o conteúdo em peso de 4-HO-Pro presente em 1 litro ou kg de composição da invenção, pode variar, por exemplo, de 0,005 de 4-HO-Pro a 5.000 g de 4-HO-Pro/hl, de preferência, de 0,05 g de 4-HO-Pro/hl a 500 g de 4-HO-Pro /hl, ainda mais de preferência, de 0,5 g de 4-HO-Pro/hl a 100 g de 4-HO-Pro/hl. Este aminoácido e as composições enriquecidas do mesmo têm a vantagem adicional de serem isentos de contaminantes biológicos e em consequência, de serem capazes de serem utilizados livremente no campo da agricultura biológica.

20 De acordo com outro aspecto da invenção, prevê-se o uso de 4-HO-Pro ou de polipeptídeos contendo 4-hidroxiprolina como intermediários para a preparação de moléculas de síntese.

25 Para ilustração mas não para fins de limitação da presente invenção, são apresentados alguns exemplos abaixo, relativos à preparação de composições enriquecidas em 4-HO-Pro de acordo com a invenção e a atividade biológica dos mesmos.

EXEMPLO 1

Isolamento de peptídeos ricos em hidroxiprolina das paredes

das células BY2.

As células BY2 foram obtidas por meio de fermentações executadas conforme descrito por Kato et al., 1972. 50 ml de uma cultura de células densa foram utilizados como o material inicial para a inoculação de 1
 5 litro de meio de cultura, contendo 30 g/litro de sacarose, 4,4 g/litro de mistura de sal basal Murashige/Skoog (sal MS, Sigma), 0,1 g/litro de Inositol, 1 mg/litro de tiamina, 0,2 mg/litro de 2,4 D, 0,18 g/litro de KH_2PO_4 em um pH de 5,7. A cultura é então incubada a 27 °C, no escuro, sob agitação orbital constante (110 rpm) e após 8 dias as células são filtradas através de uma
 10 camada de tecido Miracloth (Calbiochem), e homogeneizadas em uma argamassa na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) 1% (ou Triton X-100, 1%) em uma solução tampão PBS (solução tampão salina de fosfato: 1,44 g/litro de NaH_2PO_4 , 0,24 g/litro de KH_2PO_4 , NaCl 8 g/litro em um pH de 7,4). O lisato resultante é primeiramente fervido na presença de EDTA,
 15 tratado com HCl 0,1N e então é digerido com pepsina em um ambiente ácido. Este procedimento leva à solubilização da fração de proteína presente nas paredes das células, quantificável com o teste Bradford (Bradford, 1976) ou com a adição de ninhidrina.

Mais especificamente:

20 Células BY2 (300 g), derivadas de 1 litro de cultura são homogeneizadas em uma argamassa com cerca de 300 ml de PBS contendo 1% de SDS (Triton X-100). O lisato obtido é centrifugado a 3000 rpm para precipitar as paredes das células que são então lavadas com quantidades adicionais de PBS para a remoção dos componentes citoplasmáticos.

25 O produto obtido, definido como composição número 1, pode ser usado para aplicações agronômicas.

A ebulição adicional das paredes das células em 150 ml de EDTA 2mM permite a remoção das pectinas e do amido. As paredes são então tratadas com HCl 0,1N (150 ml) para separar os açúcares ligados nas

proteínas das paredes, obtendo a composição número 2 a qual, tão logo seja neutralizada com NaOH e diluída de forma adequada, pode ser usada para aplicações agronômicas.

5 Pepsina (1 mg/ml) é então adicionada para a digestão das proteínas das paredes, mantendo o pH em um valor de 1,0, em um volume de 150 ml. A quantidade de proteínas obtidas da digestão é medida com o método Bradford, utilizando BSA (albumina de soro bovino) como padrão.

10 Os peptídeos assim obtidos (cerca de 120 - 130 mg) em solução ácida que também contém a fração de sacarídeos, são liofilizados e recolocados em suspensão em uma solução tampão (pH 6) para o teste biológico (composição nº 3).

EXEMPLO 2

Purificação adicional dos peptídeos ricos em hidroxiprolina das paredes das células BY2: Separação por cromatografia dos aminoácidos.

15 A composição nº 3, derivada da digestão das paredes com ácido e pepsina, foi liofilizada e recolocada em suspensão em 10 - 15 ml de uma solução tampão de formiato de piridina 10 mM, pH 3,3, a ser aplicada em uma coluna cromatográfica previamente lavada e balanceada com uma solução tampão de piridina 1mM.

20 Colunas contendo um resina Dowex 50WX2-400 (Sigma), usada em cromatografia de troca de íons fraca, são carregadas com material derivado das digestões ácida e de proteína das paredes. A coluna carregada dessa forma é primeiramente eluída com formiato de piridina 1mM, pH 3,3, e posteriormente com uma solução tampão de piridina a 750 mM. As moléculas
25 carregadas, tais como aminoácidos e peptídeos, são retiradas pela coluna e não são eluídas com a primeira eluição de formiato de piridina. A solução tampão 1mM elui somente as moléculas neutras ou carregadas fracamente, como os açúcares. A eluição com uma solução tampão de piridina em concentrações mais elevadas também permite que as moléculas com carga,

tais como os aminoácidos e os peptídeos, sejam eluídas.

Em uma cromatografia de filtração por gel, as colunas, contendo a resina Sephadex G10 (Sigma), permitem que sejam separadas as moléculas com um peso molecular menor do que 700 Da. A filtração por gel
5 explora a dimensão das moléculas para a separação, as moléculas maiores, tais como fragmentos de proteína e peptídeos mais volumosos sendo primeiramente eluídos, de forma diferente das moléculas pequenas, tais como aminoácidos ou açúcares simples, que são retidos pela porosidade da resina, e são eluídos com volumes maiores de solução tampão. A mesma solução
10 tampão de formiato de piridina em um pH de 3,3 também pode ser aplicada nas colunas Sephadex para eluir os peptídeos e posteriormente os aminoácidos sozinhos derivados da hidrólise das proteínas das paredes das células.

Em ambos os casos, a vantagem de utilização de uma solução
15 tampão de formiato de piridina é a sua volatilidade elevada, que permite que a mesma seja facilmente eliminada após a liofilização, para recuperar o componente de peptídeo livre de contaminações por sais ou outras moléculas orgânicas.

EXEMPLO 3

20 Expressão dos genes anti-estresse abióticos e bióticos PDH, GSTF7, PR1 após o tratamento de plantas com as composições contendo hidroxiprolina.

A composição número 3, derivada da digestão das paredes com ácido e pepsina, foi liofilizada e recolocada em suspensão em 15 ml de
25 uma solução a 250 mM de NaOH, para ter um pH final igual a 6,0. 1 ml desta solução foi adicionalmente diluído em 10 ml de água destilada, para ser utilizada diretamente sobre plantas de *Arabidopsis thaliana*. As plantas *Arabidopsis*, ecotipo Columbia, cultivadas em solo durante 3-4 semanas e expostas à luz durante um período de 16h, foram aspergidas na superfície das

folhas com a composição número 3. Depois de 24h, algumas das folhas foram removidas de cada amostra e o RNA total foi extraído com o kit da Sigma. O cDNA foi sintetizado utilizando-se os produtos Promega e Fermentas.

Foram executadas experiências quantitativas de PCR sobre vários genes envolvidos em resposta de defesa da planta utilizando-se um kit comprado da companhia Ambion, no qual dois pares de iniciadores/competímeros são utilizados para a amplificação do gene de RNA ribossomal 18S, que representa o padrão de controle.

A análise da expressão do gene foi executada em três genes, que representam marcadores moleculares excelentes para revelarem e quantificarem a resposta de defesa da planta com relação, tanto ao estresse abiótico como ao biótico. Os genes analisados são aqueles que codificam a enzima desidrogenase prolina (PDH), descrita por Hua et al., 2001, aquela de glutationa s-transferase (GST-F7) (Bechtold et al., 1993), e aquela da proteína PR1 (proteína 1 relacionada com patogênese) (Lebel et al., 1998). Os primeiros dois genes são envolvidos na resposta de defesa de plantas para estressar o tipo abiótico, que geralmente é induzido por um aumento de prolina na planta.

O último gene, por outro lado, é envolvido na resposta ao estresse do tipo biótico, i.e., ele é ativado após o ataque dos organismos patogênicos e induz uma resposta geralmente mediada pelo ácido salicílico.

Em várias experiências, é demonstrado como o tratamento com a composição número 3 leva a uma indução significativa de ambos os genes PDH e GST-F7 (resposta ao estresse abiótico) e também ao gene PR1 (resposta ao estresse biótico).

EXEMPLO 4

Sinergia da presença de açúcares na expressão dos genes responsáveis pelo alívio do estresse abiótico e biótico.

As experiências de indução do mesmo gene foram executadas,

utilizando-se o material da composição número 3 fracionado em uma coluna Dowex50. As frações diferentes, obtidas por eluições com uma solução tampão de formiato de piridina 1 mM principalmente contendo açúcares, foram testadas nas plantas nas mesmas condições descritas acima e produziram um fraco efeito indutivo. Os componentes de proteína, ambos as frações maiores de peptídeos e os aminoácidos sozinhos (principalmente representados pela hidroxiprolina) produziram uma resposta significativamente mais elevada na expressão do gene marcador de estresse. O efeito sobre a expressão do gene produzido pela composição número 3 é maior com relação àquele produzido pelos componentes fracionados sozinhos, isto sugerindo uma ação sinérgica do componente glicosídeo juntamente com o componente de proteína. Foi avaliado o efeito da resposta de plantas ao estresse através de analisar também outros genes, marcadores importantes de ambos o estresse abiótico e o biótico. Os outros genes analisados, que produziram resultados análogos, são o SAG29 (Senescence Associated Gene 29), SAG12 (Senescence Associated Gene 12), WHY1 (Whirly 1), TGA2 (fator de transcrição), COR47 (envolvido em estresse e seca salinos),CAT3 (codificação para uma catalase), LOX2 e ERF1 (ambos envolvidos na resposta ao estresse biótico).

20

EXEMPLO 5

Alívio dos efeitos do estresse abiótico em plantas de feijão.

As plantas de feijão cultivadas em um meio de salinidade elevada foram tratadas com a composição número 3, aplicando-se uma dose igual a 50 g/hl de componente de aminoácido-proteína por planta (tese 2). Estas plantas foram comparadas com as plantas cultivadas no mesmo meio salino, mas que não foram tratadas (tese 3) com as plantas cultivadas em um meio com a mesma composição mas que não era salina (tese 1). foram utilizadas 4 plantas para cada tese, mantidas em uma estufa durante 8 dias e então comparadas visualmente. A tese 3, não tratada, tinha uma necrose

extensa dos tecidos, enquanto que a tese 2 tinha uma redução elevada dos efeitos causados pela salinidade elevada, tendo um desenvolvimento e condição semelhantes ao da planta cultivada na ausência de salinidade e demonstrando a capacidade da composição número 3 de alívio dos efeitos causados pelo estresse abiótico típico.

A mesma experiência foi obtida com as composições número 1 e nº 2, outra vez com uma dose de 50 g/hl de componente de aminoácido-proteína, obtendo resultados análogos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação de uma composição com base em 4-hidroxiprolina, caracterizado pelo fato de ser composto da fermentação de uma cultura de célula vegetal, a separação e lise subsequente tanto quimicamente quanto enzimaticamente das paredes das células vegetais.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser composto das seguintes fases:

a) fermentação de uma cultura de células de origem vegetal;

b) separação das células vegetais do meio de fermentação;

c) homogeneização das células vegetais;

d) ebulição das paredes da célula para remover as pectinas e os amidos;

e) tratamento das paredes celulares com uma solução ácida para separar os açúcares ligados nas proteínas das paredes.

3. Método de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de ser composto, entre as fases c) e d), de uma fase de precipitação das paredes celulares e a lavagem para a remoção dos componentes citoplasmáticos celulares.

4. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de ser composto de uma fase adicional de hidrólise f) das proteínas das paredes em um meio ácido e/ou enzimaticamente.

5. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de ser composto de uma fase adicional de separação g) por cromatografia dos peptídeos e aminoácidos.

6. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1- 5, caracterizado pelo fato da referida cultura de células de origem vegetal ser derivada de uma planta escolhida do grupo composto de plantas de tabaco, *Arabidopsis*, soja, cenoura, milho, batata e tomate.

7. Método de acordo com qualquer das reivindicações 1-6,

caracterizado pelo fato da referida cultura de célula ser uma cultura de células de tabaco BY2.

5 8. Composição, caracterizado pelo fato de ser baseada em 4-hidroxirolina obtida de acordo com o método como definido em qualquer das reivindicações 1- 7.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de ser composta de uma ou mais unidades de polissacarídeo.

10 10. Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato da referida unidade de polissacarídeo ser arabinose ou uma fração da mesma.

11. Uso de uma composição como definida em qualquer das reivindicações 9-10 no campo agrônômico, caracterizado pelo fato de ser para fazer com que as safras tenham uma tolerância maior ao estresse abiótico e/ou biótico.

15 12. Composto, caracterizado pelo fato de ser 4-hidroxirolina na forma de um aminoácido livre ou incorporada em um polipeptídeo, obtida de acordo com o método como definido em qualquer das reivindicações 1-7.

20 13. Uso de 4-hidroxirolina ou de polipeptídeos contendo 4-hidroxirolina como definido na reivindicação 12, caracterizado pelo fato de ser como intermediária para a preparação de moléculas de síntese.

14. Uso de 4-hidroxirolina ou de polipeptídeos contendo 4-hidroxirolina como definido na reivindicação 13 no campo agrônômico, caracterizado pelo fato de ser para fornecer às safras uma tolerância maior ao estresse abiótico e/ou biótico.

RESUMO

“MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE POLIPEPTÍDEOS RICOS EM 4-HIDROXIPROLINA, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COMPOSIÇÃO NO CAMPO AGRONÔMICO, COMPOSTO, E, USO DE POLIPEPTÍDEOS
5 CONTENDO 4-HIDROXIPROLINA”

A presente invenção refere-se a um método para a preparação de 4-hidroxi-L-prolina ou de composições com alto teor deste aminoácido e ao uso do mesmo como agroquímico no campo agrícola e/ou como um intermediário de síntese de compostos químicos.

A requerente apresenta novas vias das reivindicações para conformar o pedido com o Relatório Preliminar Internacional sobre Patenteabilidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o isolamento de polipeptídeos ricos em 4-hidroxi prolina, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes fases:

a) fermentação de uma cultura de célula de tabaco;

5 b) separação das células de tabaco do meio de fermentação;

c) homogeneização das células de tabaco;

d) ebulição das paredes da célula para remover pectinas e amidos;

10 e) tratamento das paredes da célula com uma solução ácida ou separação dos açúcares ligados nas proteínas das paredes.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser composto, entre as etapas c) e d), de uma etapa de precipitação das paredes celulares e a lavagem para a remoção dos componentes citoplasmáticos celulares.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a digestão das proteínas das paredes da etapa f) é realizada alternando-se hidrólise ácida e hidrólise enzimática.

20 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de ser composto de uma etapa adicional de separação g) por cromatografia dos peptídeos e aminoácidos.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato da referida cultura de célula ser uma cultura de células de tabaco BY2.

25 6. Composição, caracterizado pelo fato de ser baseada em polipeptídeos contendo 4-hidroxi prolina obtida de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 1- 5.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de ser composta de uma ou mais unidades de polissacarídeo.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada

pelo fato da referida unidade de polissacarídeo ser arabinose ou uma fração da mesma.

5 9. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 6-8 no campo agronômico, caracterizado pelo fato de ser para fazer com que as safras tenham uma tolerância maior ao estresse abiótico e/ou biótico.

10 10. Composto, caracterizado pelo fato de ser 4-hidroxirolina incorporada em um ou mais polipeptídeo, obtida de acordo com o método como definido em qualquer uma das reivindicações 1-5.

10 11. Uso de polipeptídeos contendo 4-hidroxirolina como definido na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de ser como intermediária para a preparação de moléculas de síntese.

15 12. Uso de polipeptídeos contendo 4- hidroxirolina como definido na reivindicação 10 no campo agronômico, caracterizado pelo fato de ser para fornecer às safras uma tolerância maior ao estresse abiótico e/ou biótico.