



Universidade de São Paulo  
Instituto de Física de São Carlos  
Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares



## Plano de Aula

**Disciplina:** SQM0425 Isolamento e Purificação de Biomoléculas

**Docentes:** Francesco Brugnera Teixeira (francesco.teixeira@usp.br)

Pedro Michelão Neuber (pedro.neuber@usp.br)

**Tema da Aula:** Cromatografia Líquida: Exclusão e Afinidade

**Duração:** 50 minutos

**Método:** Aula expositiva dialogada com resolução de exercícios

### **Objetivos:**

Introduzir duas das principais técnicas de separação por cromatografia líquida: exclusão e afinidade.

### **Conhecimentos prévios trabalhados pelo Professor:**

- 1) Conceitos básicos de cromatografia líquida: modo de desenvolvimento, classificação das técnicas, mecanismos de separação, coeficiente de partição, fator de retenção, fator de separação, teoria dos pratos, teoria cinética, eficiência da coluna, resolução, alargamento de banda.
- 2) Equação de Van Deemter e seus termos ( caminhos múltiplos, difusão longitudinal, coeficientes de transferência de massa), alargamento de banda extra-coluna.

### **Roteiro da Aula:**

Inicialmente será apresentado a descrição da técnica de cromatografia de exclusão: sua definição, aplicações e mecanismo de funcionamento na separação de moléculas. Em seguida será feita uma breve descrição teórica a qual ajudará o aluno a entender os regimes de funcionamento de uma coluna cromatográfica: exclusão total, permeação seletiva e permeação total.

Uma atividade (Atividade 1) será proposta com resolução em sala de aula com o programa Origin 6.1. O exercício consiste em fazer uma curva de calibração a partir de dados reais de uma coluna cromatográfica de exclusão, trabalhando os conceitos de regimes de funcionamento e fator de retenção.

Logo após a atividade será apresentada a antiga classificação das técnicas de exclusão (permeação em gel e filtração em gel) que separava as

técnicas de acordo com a hidrofobicidade da fase estacionária. Em seguida alguns exemplos de géis comerciais serão apresentados na aula.

Na segunda parte da aula será abordado o conceito de cromatografia de afinidade. Inicialmente será apresentado o vídeo <http://www.youtube.com/watch?v=Hb791WsC78s> (acessado em 24/04/2012) para uma discussão prévia da ideia formada sobre o assunto pelos alunos.

Em seguida, será apresentada a teoria básica da técnica, componentes e metodologia. Será utilizada uma animação interativa para ilustrar as etapas do processo de purificação em [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdocGE\\_Affinity\\_20110831040733.swf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdocGE_Affinity_20110831040733.swf) (acessado em 24/04/2012). A seguir, será feito um estudo de dois exemplos de cromatogramas.

### **Atividades:**

#### *Atividade 1: Exercício em sala de aula*

Os dados a seguir são da calibração de uma coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade de volume total de 318ml.

**Protein/compound**   **M<sub>r</sub> (10<sup>3</sup>)**   **log(M<sub>r</sub>)**   **V<sub>el</sub> (ml)**

Thyroglobulin	670	5.826	119.8	a) Faça a curva de calibração da coluna sabendo que Blue Dextran está em regime de exclusão total e a Vitamina B-12 em permeação total.
Ferritin	440	5.643	132.9	
Catalase	232	5.365	158.7	
gamma-Globulin	158	5.199	158.0	b) Calcule K para cada uma das proteínas.
Aldolase	158	5.199	164.0	
Ovalbumin	44	4.643	204.0	c) Uma proteína de massa desconhecida eluiu em 224,3ml. Estime sua massa a partir da curva de calibração.
Myoblobulin	17	4.230	239.9	
Blue Dextran	>2000		112.5	
Vitamin B-12	1.35		293.1	

#### *Atividade 2: Aula prática de 4 horas*

O aluno fará a purificação de uma proteína que contém cauda de histidina a partir do extrato bruto não purificado. Será utilizada uma resina de níquel (Ni-NTA agarose) para o processo. O aluno deverá adicionar à coluna

concentrações crescentes de imidazol em tampão e verificar, utilizando gel de eletroforese e espectroscopia UV-vis, em qual concentração de imidazol a proteína elui.

### *Atividade 3: Estudo dirigido*

1. Que tipo de técnica cromatográfica poderia ser utilizada para separar:
  - a) três proteínas de 10KDa, 22KDa e 45KDa, respectivamente?
  - b) um anticorpo monoclonal de um extrato de soro sanguíneo?
  - c) três proteínas, X, Y e Z, sendo que X possui 15KDa e uma cauda Poli(His); Y possui 10KDa e afinidade por íons de Zinco; e Z possui 10KDa e uma cauda Poli(His)?
2. Cite três situações hipotéticas em que seria possível isolar um composto utilizando a técnica de cromatografia de afinidade, e explique cada uma delas.
3. Explique como os tempos de ligação, lavagem e eluição podem afetar a purificação de uma molécula por cromatografia de afinidade.
4. Por que a utilização de um gradiente de pH promove a eluição de alguns tipos de proteínas?
5. Como é possível determinar a concentração de um competidor a ser utilizada em uma *Step Elution*, para eluição de uma amostra ligada à coluna?
6. Apesar de o regime de permeação seletiva da cromatografia de exclusão ser vastamente utilizado, uma aplicação em particular, ditas colunas *desalting* não necessariamente utilizam esse regime de funcionamento. Elas servem para retirar o sal ou fazer troca de tampão de amostras. Uma amostra proteica num tampão A será transferida para um tampão B por uma coluna *desalting*. Sob quais regimes devem estar a proteína e os componentes do tampão A para uma eficiente troca de tampão. Discorra.