



Isolamento e Purificação de Biomoléculas



CFBio 2014

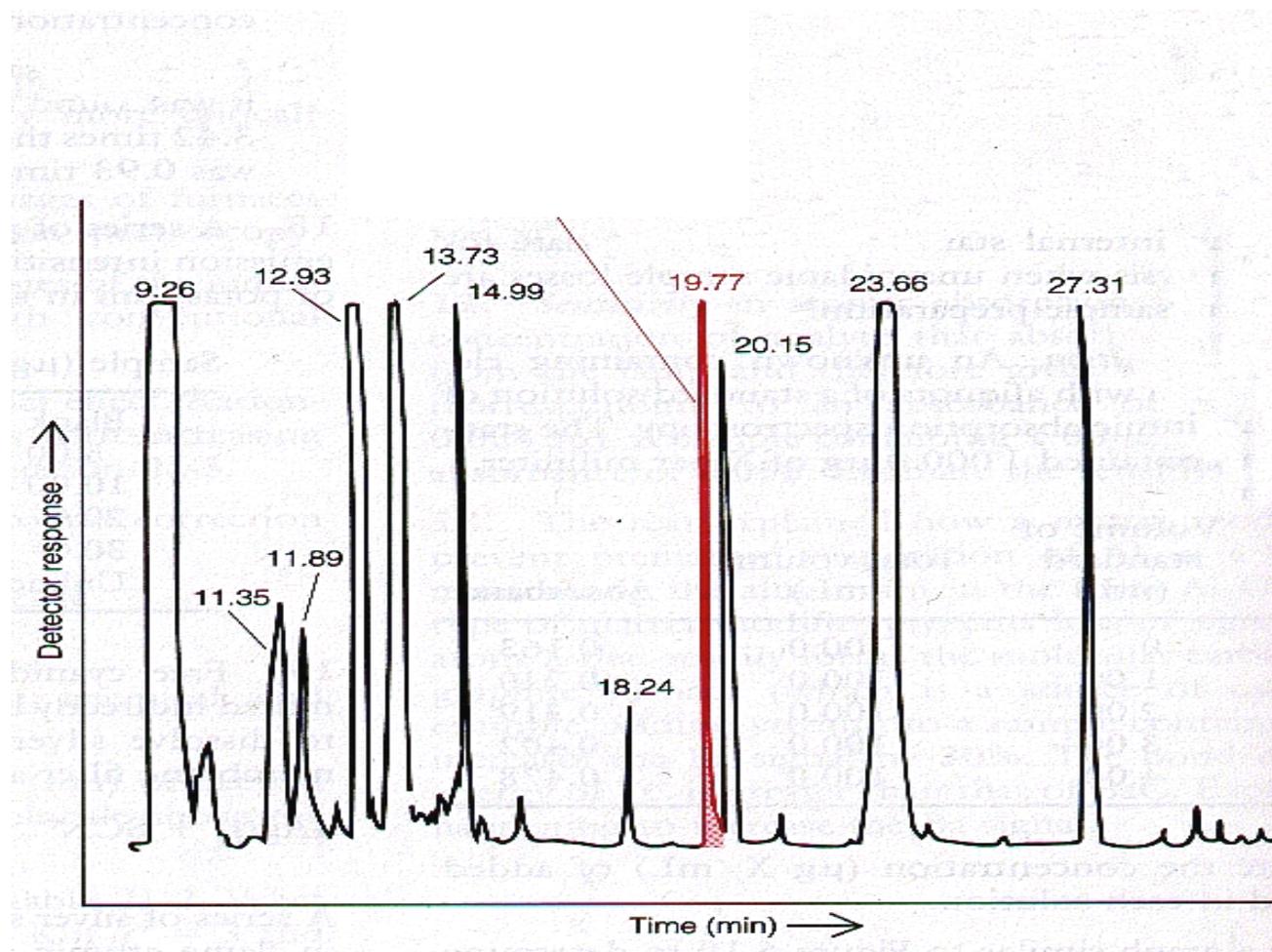
Emanuel Carrilho

emanuel@iqsc.usp.br

Sala 104 Q1 – Ramal 739441

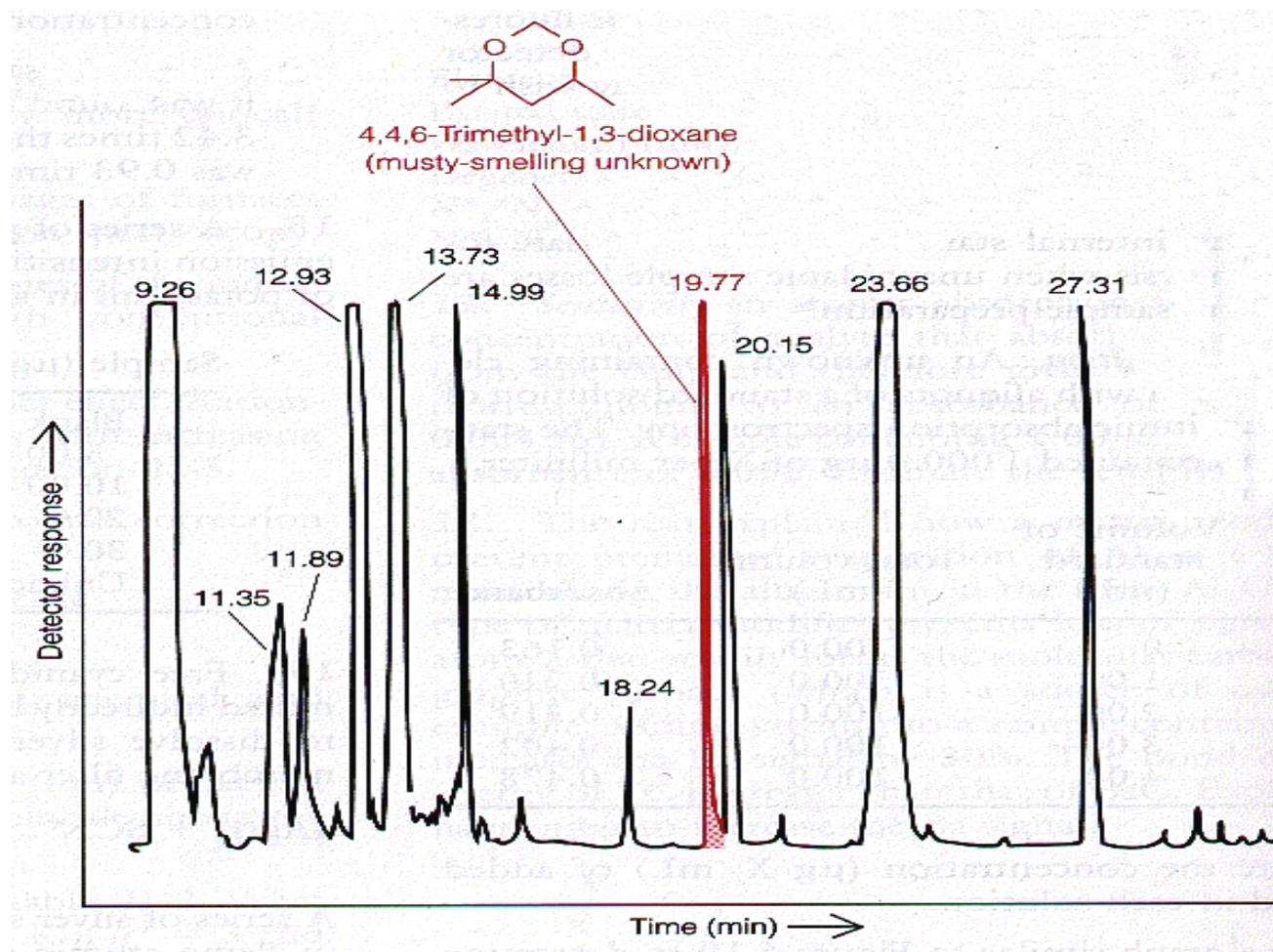


◆ Introdução à Separações Analíticas



Anal. Chem. **1987**, 59, 1109A

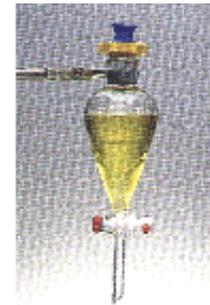
◆ Introdução à Separações Analíticas



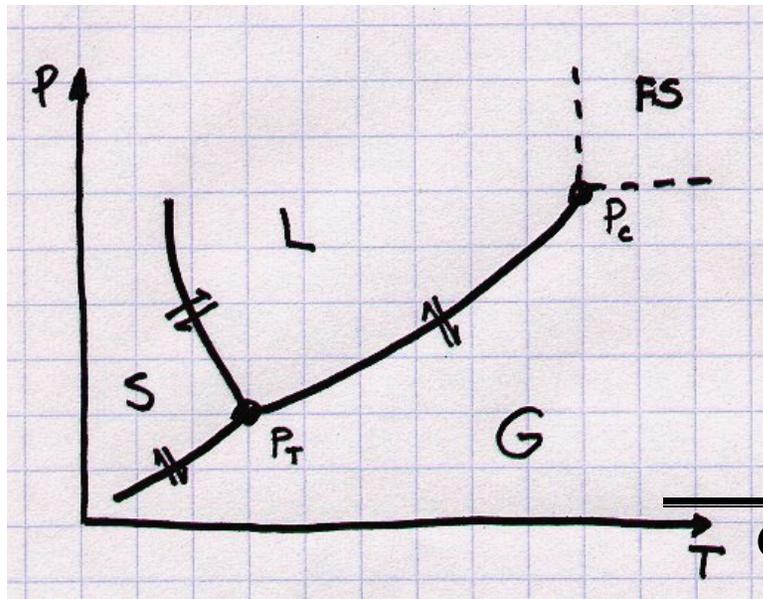
Anal. Chem. **1987**, 59, 1109A

◆ Métodos de extração e preparo de amostra

- Métodos Físicos
- Extração com Fluido Supercrítico (SFE)
- Extração em Fase Sólida (SPE)
- Microextração em Fase Sólida (SPME)



1 Métodos baseados em equilíbrio* de fases



	GL	GS	LL	SL
	Destilação	Adsorção	Extração	Precipitação
			LL	
	Cromato- grafia GL	Sublimação	Cromato- grafia LL	Adsorção
			Partição	

**equilíbrio* \equiv *constante*

2 Métodos de extração

- **Extração**: Processo preliminar de separação, com objetivo de isolar componentes de interesse de uma matriz complexa.

Amostra

gás
líquido
sólido

Agentes Extrativos

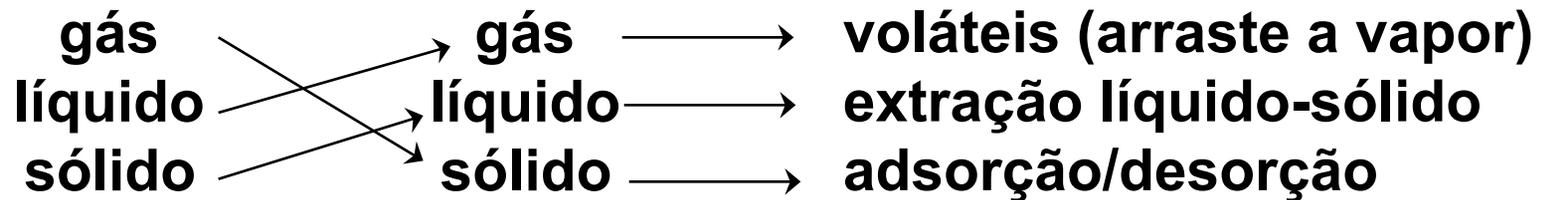
gás
líquido
sólido

2 Métodos de extração

- **Extração**: Processo preliminar de separação, com objetivo de isolar componentes de interesse de uma matriz complexa.

Amostra

Agentes Extrativos

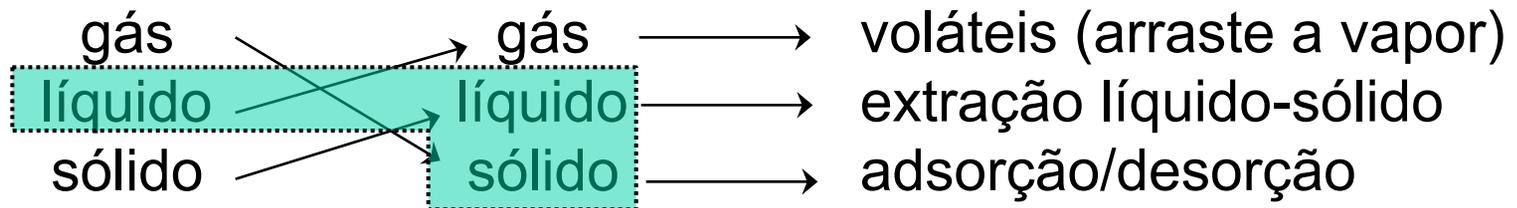


2 Métodos de extração

- **Extração**: Processo preliminar de separação, com objetivo de isolar componentes de interesse de uma matriz complexa.

Amostra

Agentes Extrativos

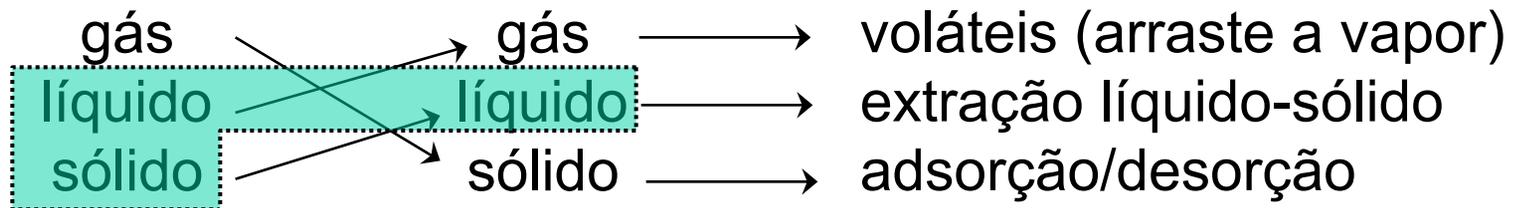


2 Métodos de extração

- **Extração**: Processo preliminar de separação, com objetivo de isolar componentes de interesse de uma matriz complexa.

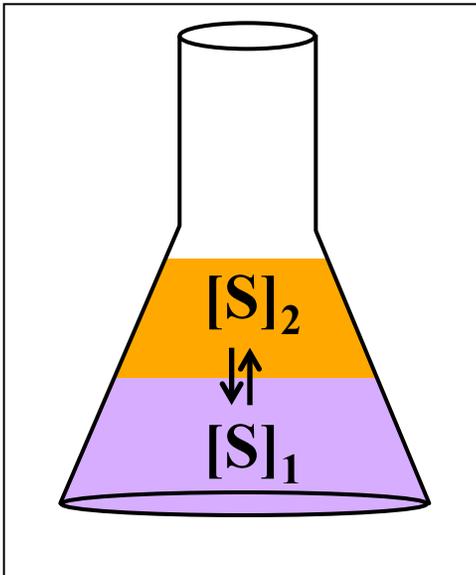
Amostra

Agentes Extrativos



◆ *Extração Líquido-Líquido: Partição**

**"semelhante dissolve semelhante"*



◆ Suponha que um soluto **S** é particionado entre duas fases imiscíveis **1** e **2**.

◆ O **coeficiente de distribuição**, **K_D** será a constante de equilíbrio para a reação):



$$K_D = \frac{a_{S_2}}{a_{S_1}} \approx \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

◆ Extração Líquido-Líquido (ELL)



$$K_D = \frac{C_2}{C_1} \quad \frac{\text{fase superior}}{\text{fase inferior}}$$

Exemplo:

Separação de ácidos graxos de sabão

$$K_D = \frac{C_{\text{éter}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}} \quad \begin{array}{l} S_{\text{Ác. Graxos}}^{\text{H}_2\text{O}} < S_{\text{Ác. Graxos}}^{\text{éter}} \\ S_{\text{sabão}}^{\text{H}_2\text{O}} > S_{\text{sabão}}^{\text{éter}} \end{array}$$

$K_D \gg 1$ p/ ácidos graxos e $K_D \ll 1$ p/ sabão

◆ Extrações Sucessivas

- Para $K_D \gg 1$ (~ 1000), uma extração é suficiente!
 - Se $2 < K_D < 10 \Rightarrow$ extrações sucessivas
- \Rightarrow Extrações com alíquotas de menor volume e um maior número de alíquotas!

Exemplo: extração de 4,0 g de ác. butírico de 500 mL de H_2O com 500 mL de éter ($K_D = 3$)

Para 1 extração:

$$K_D = \frac{C_{\text{éter}} (\text{g/L})}{C_{H_2O} (\text{g/L})} = 3,0 = \frac{(4,0 - x)/0,5}{x/0,5} \Rightarrow x = 1,0 \therefore m_{\text{éter}} = 3,0$$

x é a massa de soluto remanescente na solução 1

Para duas extrações com 250 mL cada:

$$K_D = \frac{C_{\text{éter}} (\text{g/L})}{C_{\text{H}_2\text{O}} (\text{g/L})} = 3,0 = \frac{(4,0 - x_1)/0,25}{x_1/0,5} \Rightarrow x_1 = 1,6\text{g}$$

$$\therefore m_{\text{éter}}^1 = 2,4\text{g}$$

$$K_D = \frac{C_{\text{éter}} (\text{g/L})}{C_{\text{H}_2\text{O}} (\text{g/L})} = 3,0 = \frac{(1,6 - x_2)/0,25}{x_2/0,5} \Rightarrow x_2 = 0,64\text{g}$$

$$\therefore m_{\text{éter}}^2 = 0,96\text{g}$$

Após 2 extrações: $m_{\text{éter}} = 3,36\text{ g}$

Para 5 extrações com 100 mL cada: $m_{\text{éter}} = 3,77\text{ g}$

◆Suponha que o soluto S em V_1 ml de solvente 1 é extraído com V_2 ml de solvente 2. Se m for o n^o total de moles no sistema, q será a fração remanescente na fase 1 e $(1-q)$ a fração transferida para a fase 2.

$$K_D = \frac{[S]_2}{[S]_1} = \frac{(1-q)m/V_2}{qm/V_1}$$

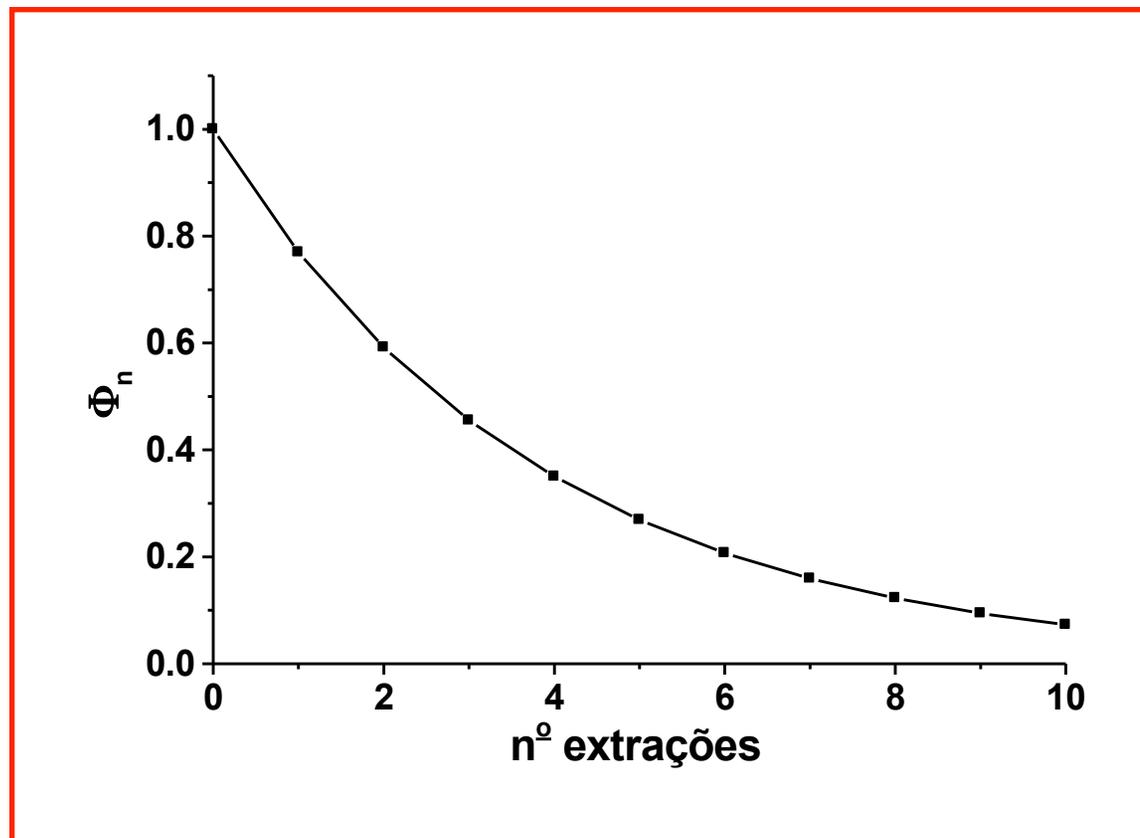
Qual será a fração remanescente (q) na fase 1 depois de uma extração?

$$q = \frac{V_1}{V_1 + K_D V_2}$$

E após duas, três,.... n?

$$\Phi_2 = q \cdot q = \left(\frac{V_1}{V_1 + K_D V_2} \right)^2$$

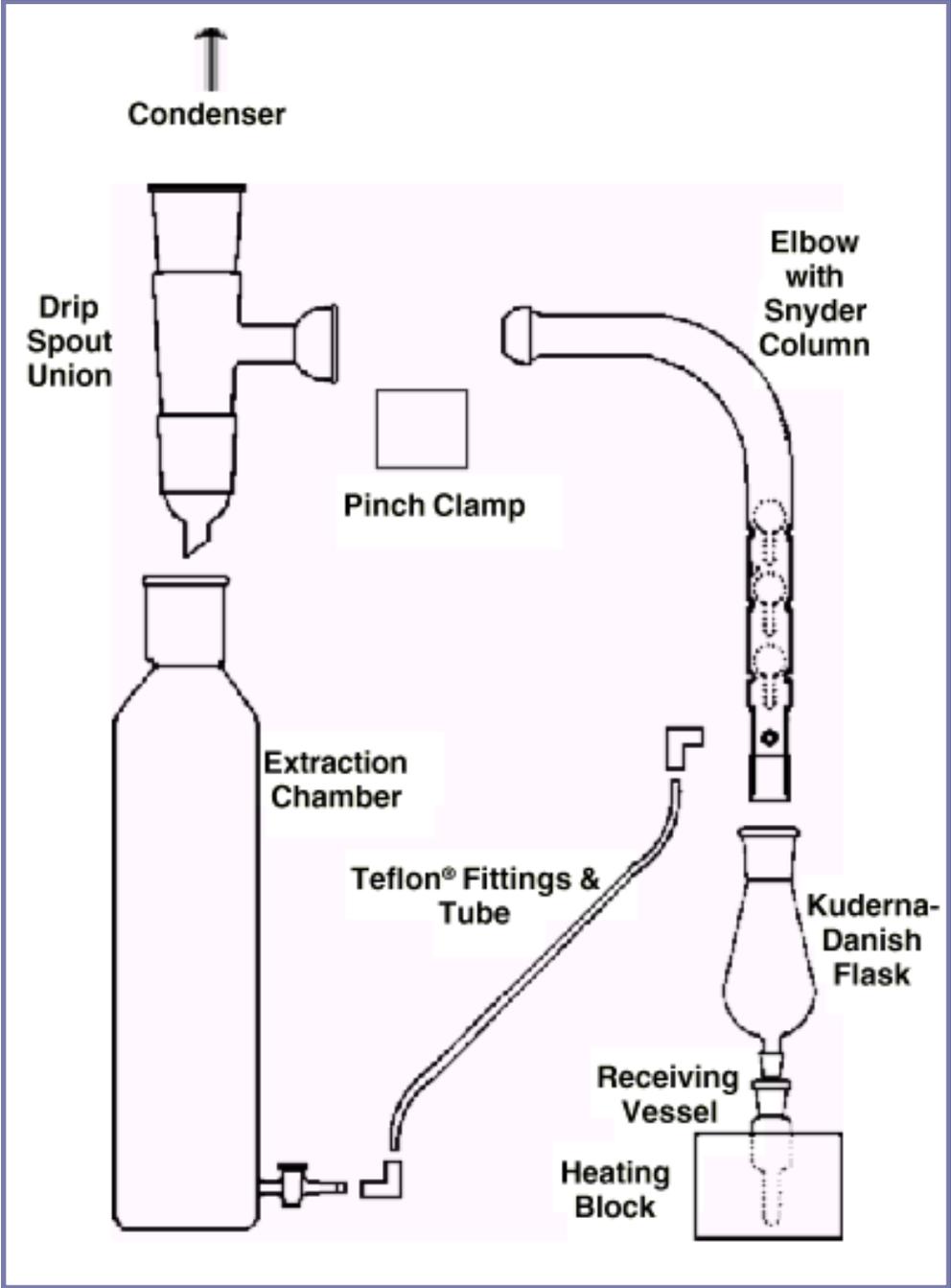
$$\Phi_n = q^n = \left(\frac{V_1}{V_1 + K_D V_2} \right)^n$$



◆ **Extração Líquido-Líquido Contínua**



- 😊 **Instrumentação barata**
- 😊 **Muito simples; Não requer treinamento**
- 😞 **Grande volume (50 - 500 mL de solvente (problemas com descarte))**
- 😞 **Moroso (12 - 48 h)**
- 😞 **Concentração da amostra (perda de voláteis)**



◆ **Extração Líquido-Sólido (ELS)**

Objetivo: Extração de compostos orgânicos solúveis de uma matriz sólida (solo, alimentos, fibras)

Exemplos:

- hidrocarbonetos de carvão mineral
- alcalóides de plantas
- resíduo de pesticidas/fármacos em alimentos

- **Métodos:**

- Agitação mecânica
- Ultrassom

- não muito eficiente;
- grandes volumes de solvente;
- relativamente rápido (< 1h)
- comum em extração de pesticidas em solos

- **Soxhlet**

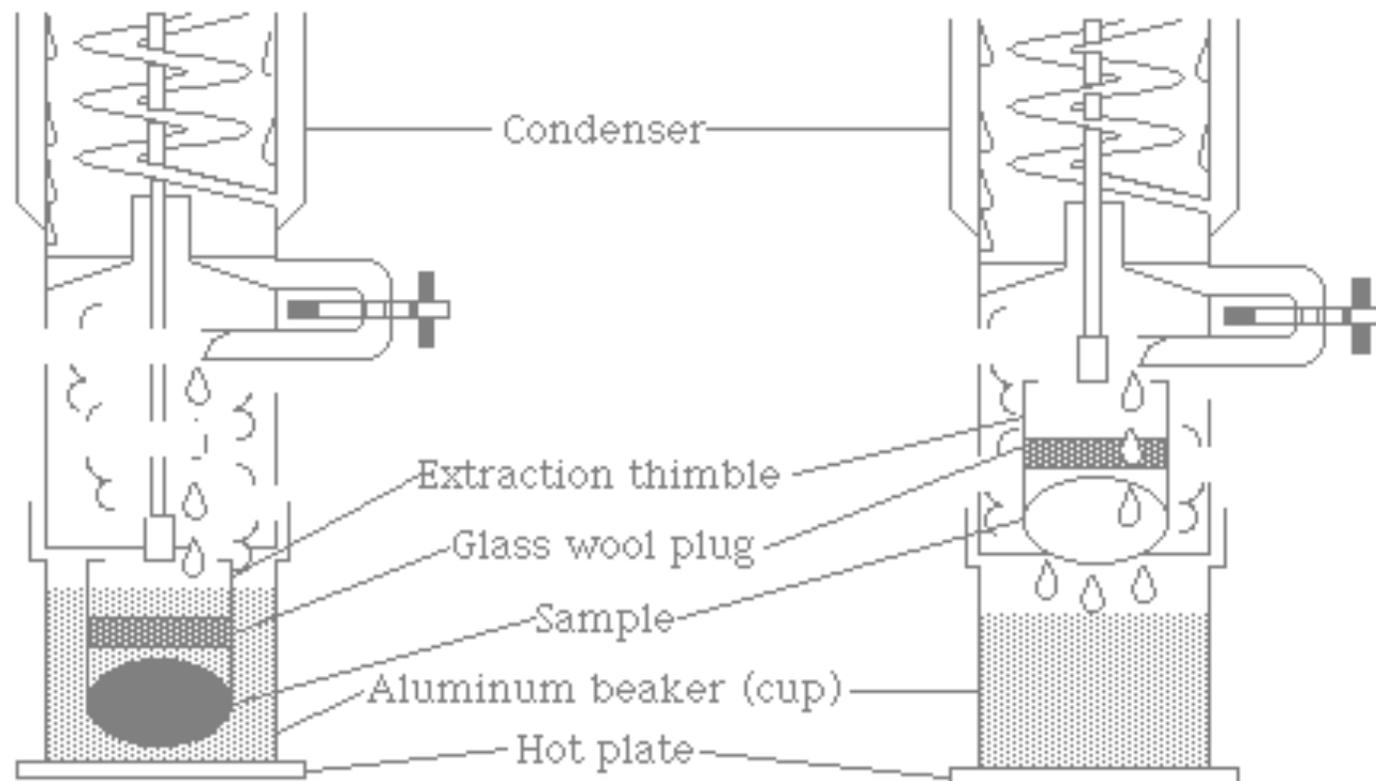
- **Extração com FSC**

◆ Soxhlet



- 😊 **Eficiente e exaustiva**
- 😊 **Extração relativamente fria - análise de voláteis & termolábeis**
- 😞 **Volume fixo de solvente (grande)**
- 😞 **Muito demorado (8 - 24 - 72 h)**

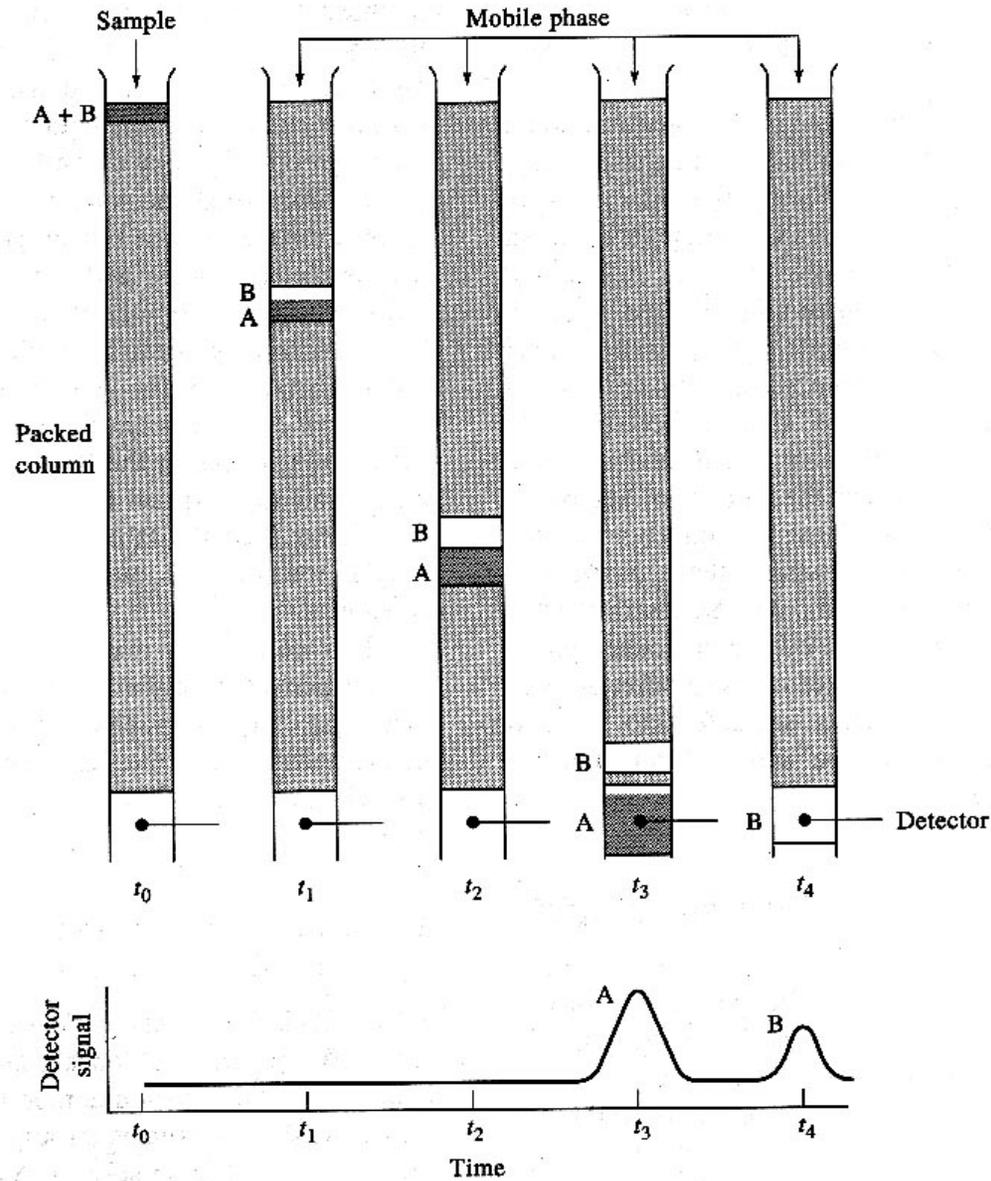
Soxhlet Extraction



◆ **Separação Multi-Componente**

- ◆ Para haver separação entre dois componentes, i e j , os respectivos coeficientes de partição, K_i e K_j devem ser diferentes.
- ◆ $\therefore K_i \neq K_j \Rightarrow$ cada analito ficará preferencialmente em uma fase

3 Cromatografia



◆ Definições

- Coluna (recipiente)
 - empacotada/recheada/preenchida
 - tubo aberto - capilar
- Fase móvel (solvente 1)
 - eluente
 - eluido
- Fase estacionária (solvente 2)
 - suporte sólido
 - filme líquido
- Solute (analito)

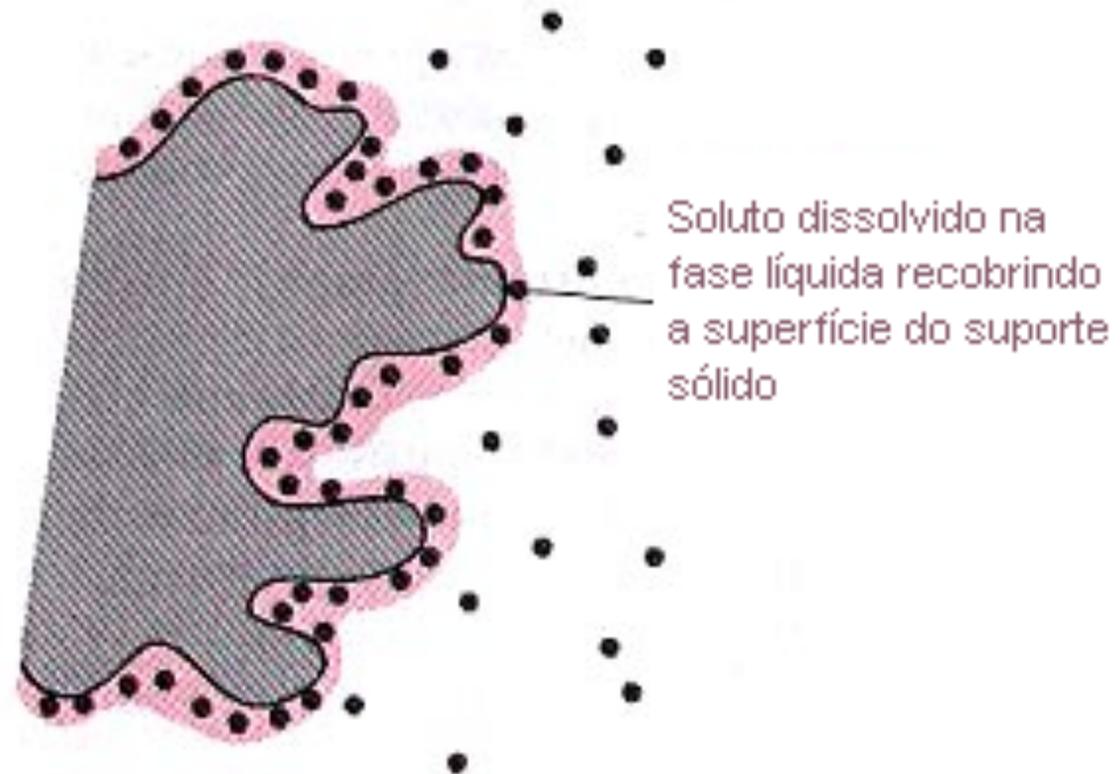
◆ Tipos de Cromatografia

- Adsorção



◆ Tipos de Cromatografia

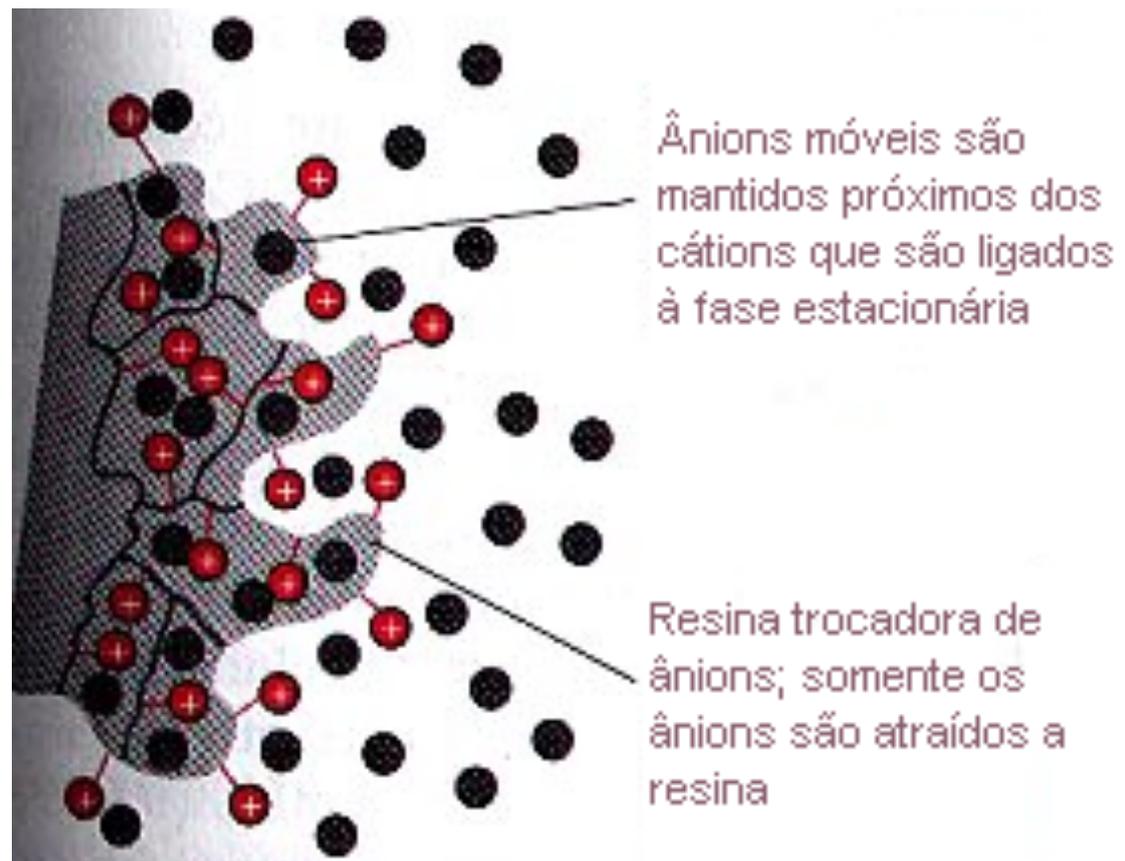
- Partição



Cromatografia de partição

◆ Tipos de Cromatografia

- Troca iônica



Cromatografia de troca iônica

◆ Tipos de Cromatografia

- **Exclusão molecular**

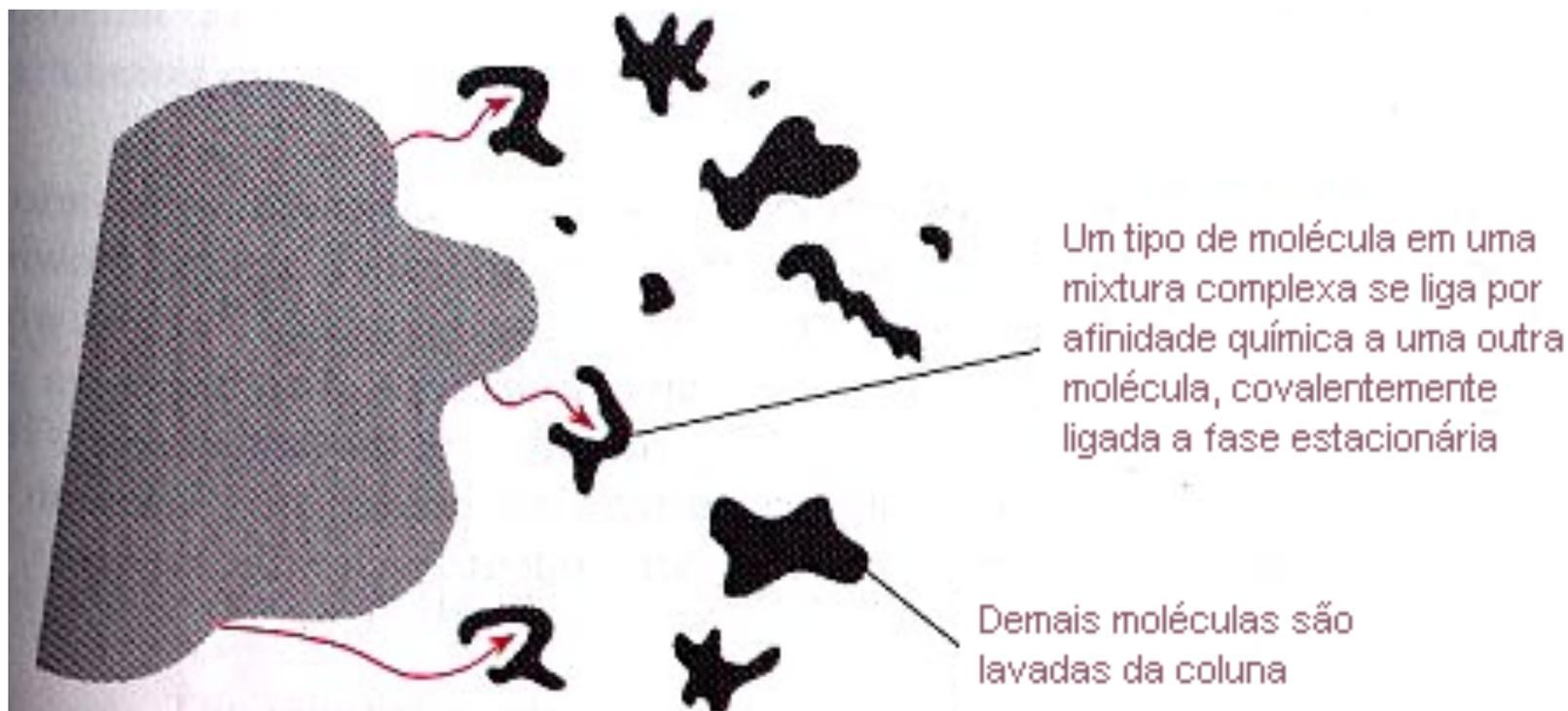
Moléculas pequenas penetram nos poros das partículas



Cromatografia de exclusão molecular

◆ Tipos de Cromatografia

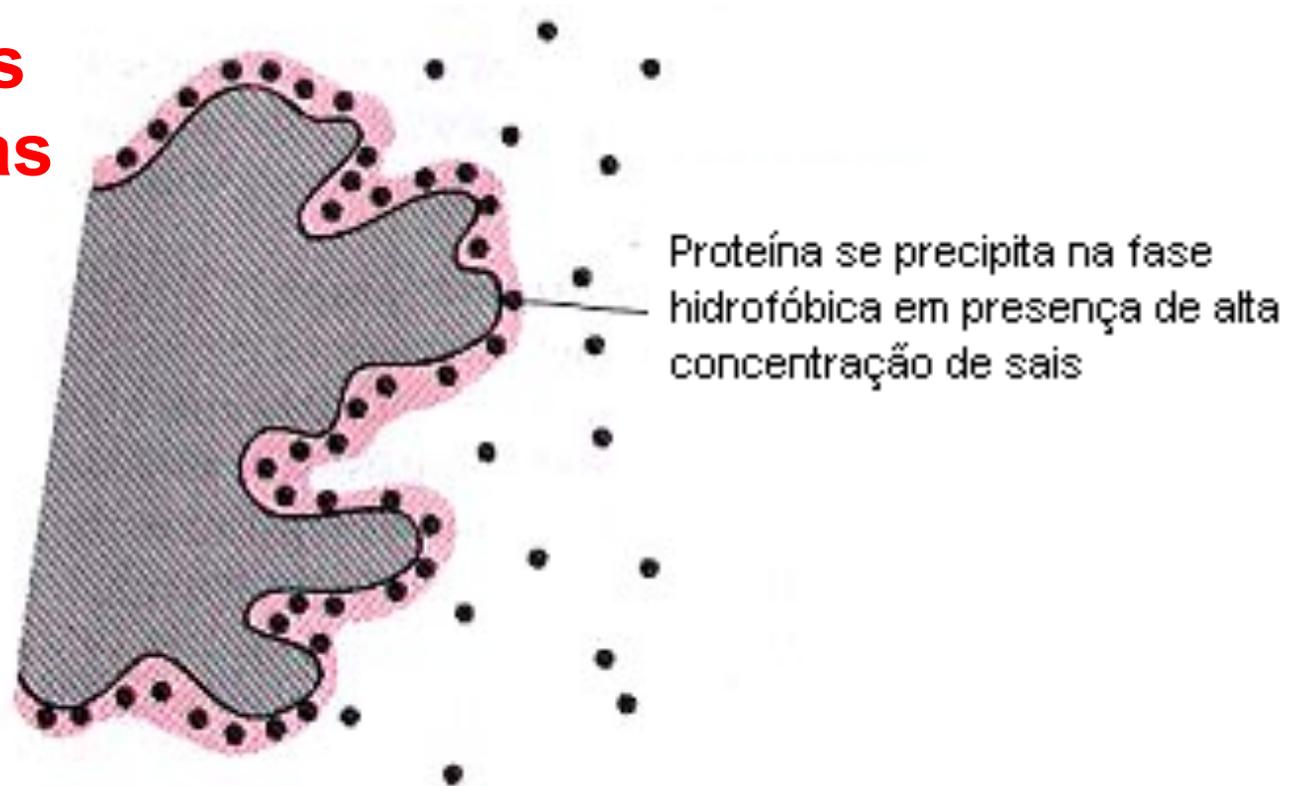
- **Afinidade**



Cromatografia de afinidade

◆ Tipos de Cromatografia

- Interações hidrofóbicas



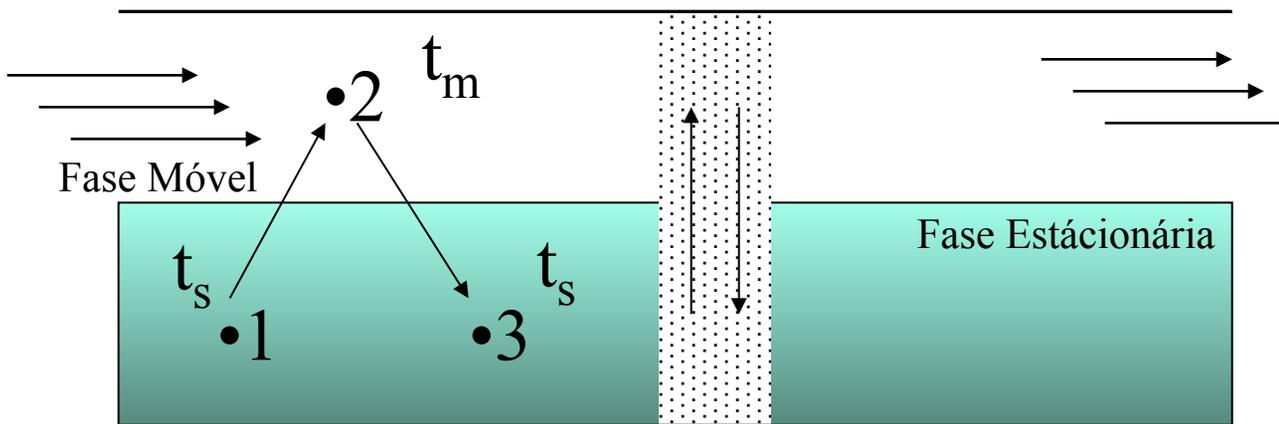
Cromatografia de interação hidrofóbica

◆ Funcionamento Básico

$$K = \frac{a_{S_2}}{a_{S_1}} \approx \frac{[S]_2}{[S]_1}$$

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{concentração soluto fase estacionária}}{\text{concentração soluto fase móvel}}$$

◆ Funcionamento Básico



- É necessário identificar a fração do tempo que o soluto gasta na fase móvel.
- Para tal é necessário identificar a fração molar dessas moléculas na fase móvel

Fração do tempo gasto na fase móvel = $\frac{\text{n}^\circ \text{ moléculas na fase móvel}}{\text{n}^\circ \text{ total de moléculas}}$

$$\Phi_{tm} = \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s}, \text{ dividindo se por } C_m V_m \text{ e}$$

$$\text{lembrando que } K = \frac{C_s}{C_m} \Rightarrow \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

$$k = K \frac{V_s}{V_m} \therefore \Phi_{tm} = \frac{1}{1 + k}$$

k = fator de retenção

