



# Isolamento e Purificação de Biomoléculas



CFBio 2014

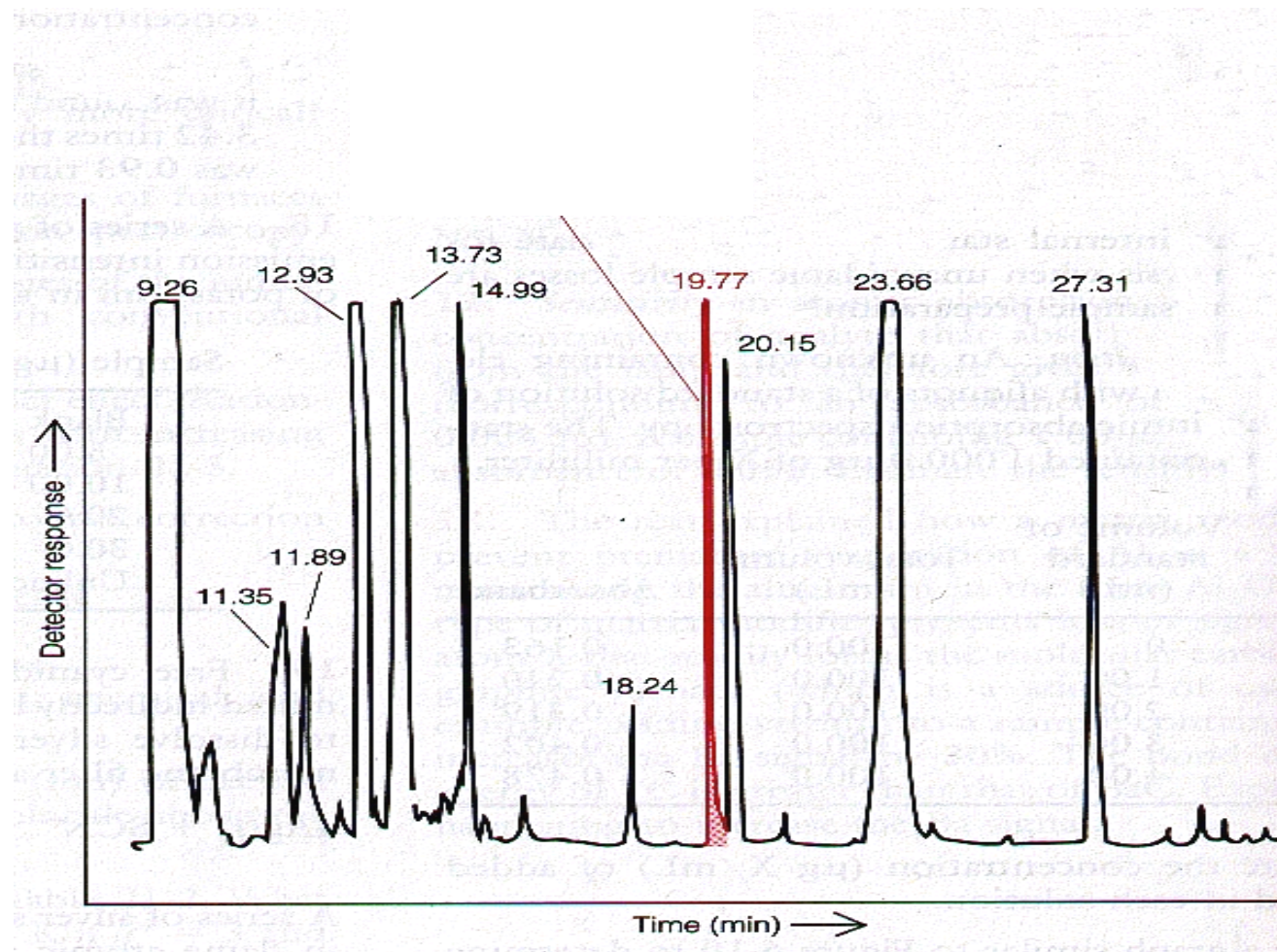
Emanuel Carrilho

[emanuel@iqsc.usp.br](mailto:emanuel@iqsc.usp.br)

Sala 104 Q1 – Ramal 739441

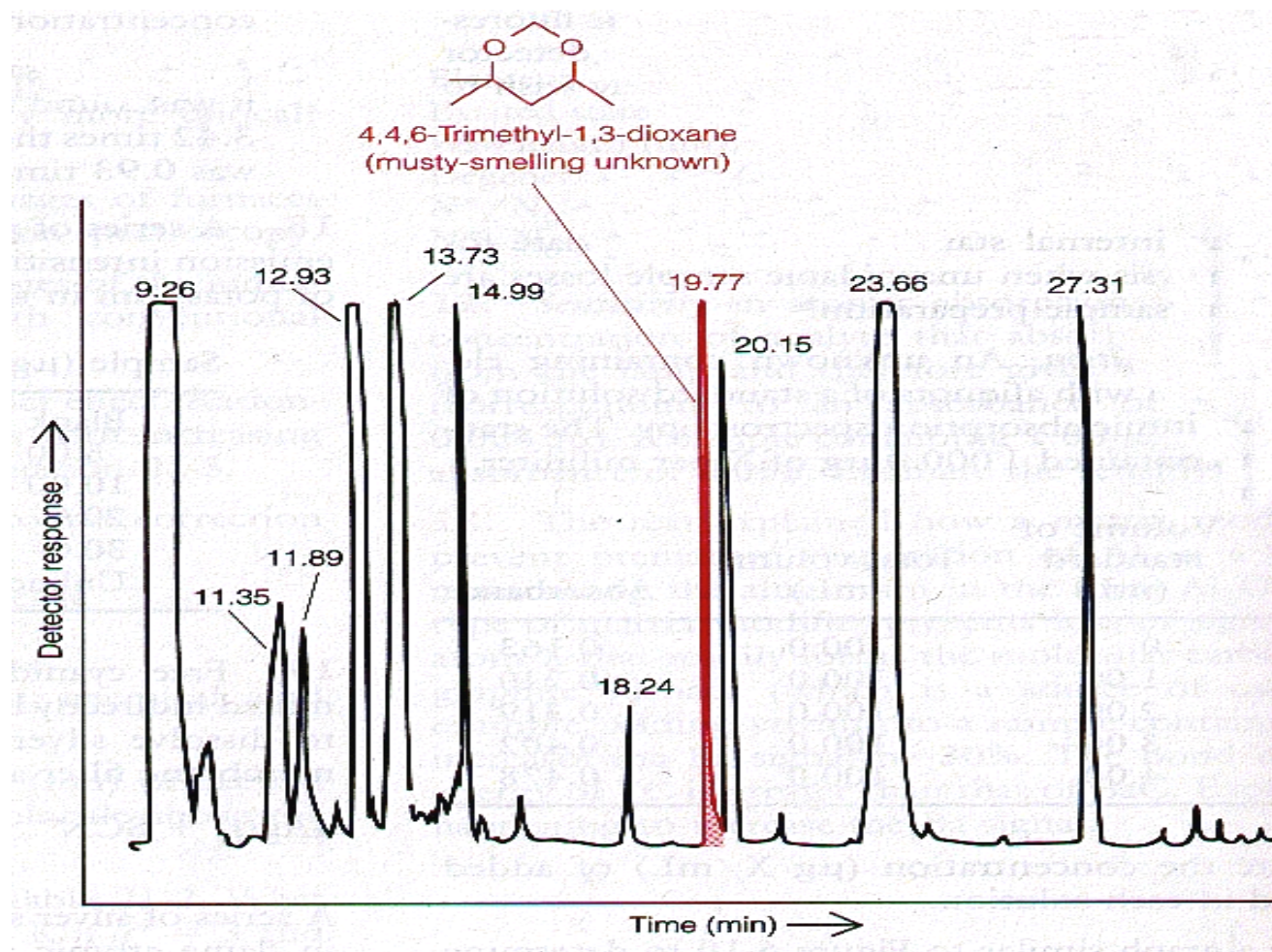


# ◆ Introdução à Separações Analíticas



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

# ◆ Introdução à Separações Analíticas



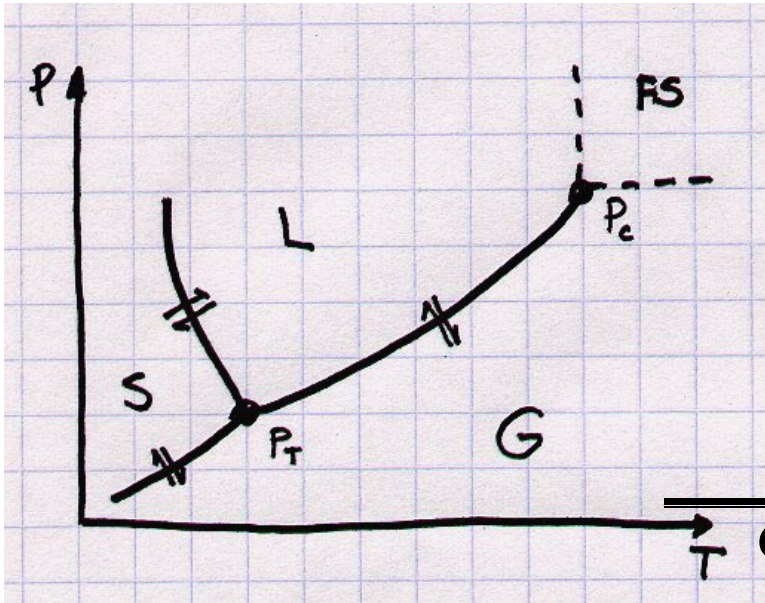
Anal. Chem. **1987**, 59, 1109A

# ◆ 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

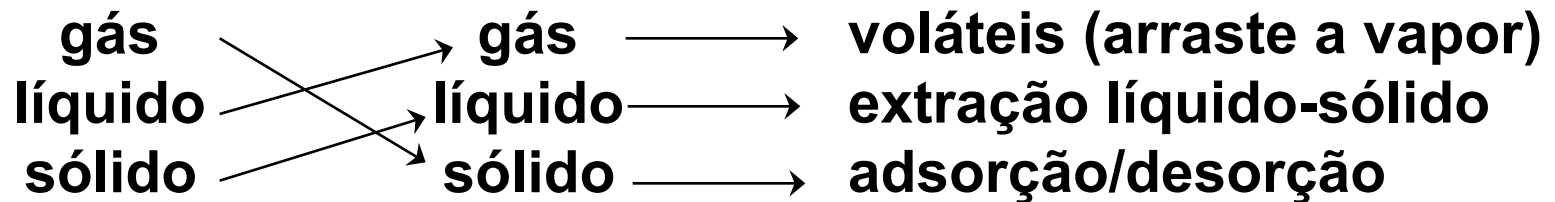
gás  
líquido  
sólido

## 2 Métodos de extração

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

### Amostra

### Agentes Extrativos

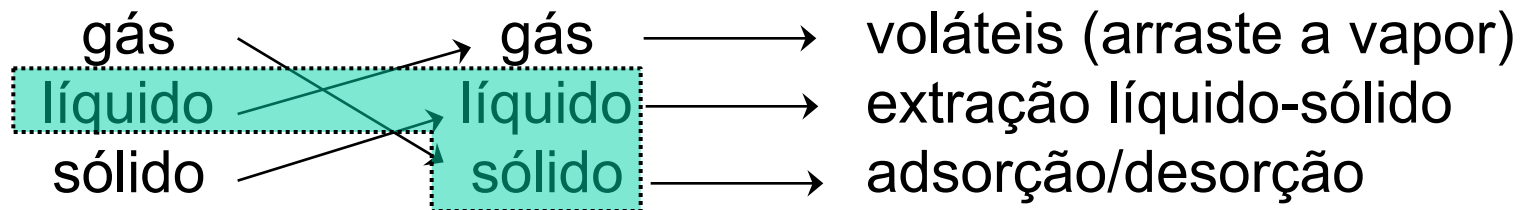


## 2 Métodos de extração

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

### Amostra

### Agentes Extrativos



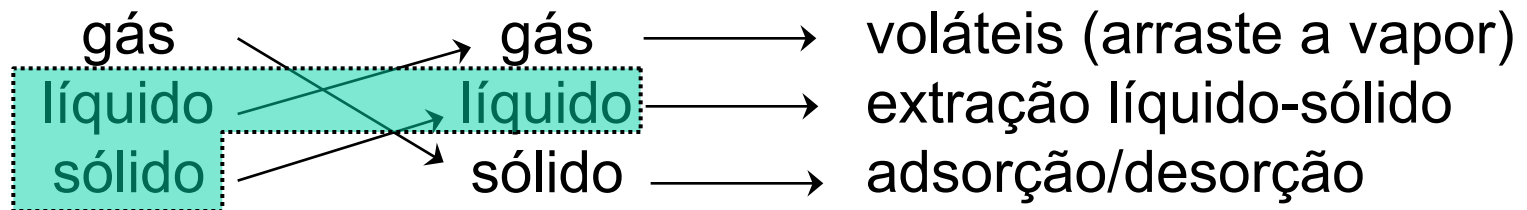


## 2 Métodos de extração

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

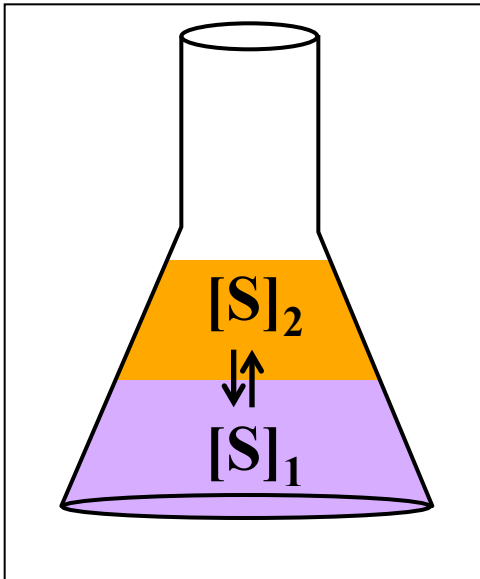
**Amostra**

**Agentes Extrativos**



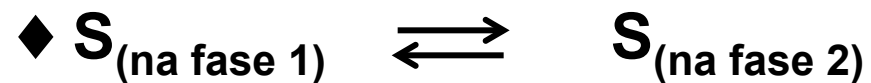
# ◆ *Extração Líquido-Líquido: Partição\**

*\*"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**

$$K_D = \frac{C_{\text{éter}}}{C_{H_2O}} \quad \begin{array}{l} S_{\text{Ác. Graxos}}^{H_2O} < S_{\text{Ác. Graxos}}^{\text{éter}} \\ S_{\text{sabão}}^{H_2O} > S_{\text{sabão}}^{\text{éter}} \end{array}$$

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

## ◆ Extrações Sucessivas

- Para  $K_D \gg 1$  ( $\sim 1000$ ), 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<sup>o</sup> total de moles no sistema,  $q$  será a fração remanescente na fase 1 e  $(1-q)$  a fração transferida para a fase 2.

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

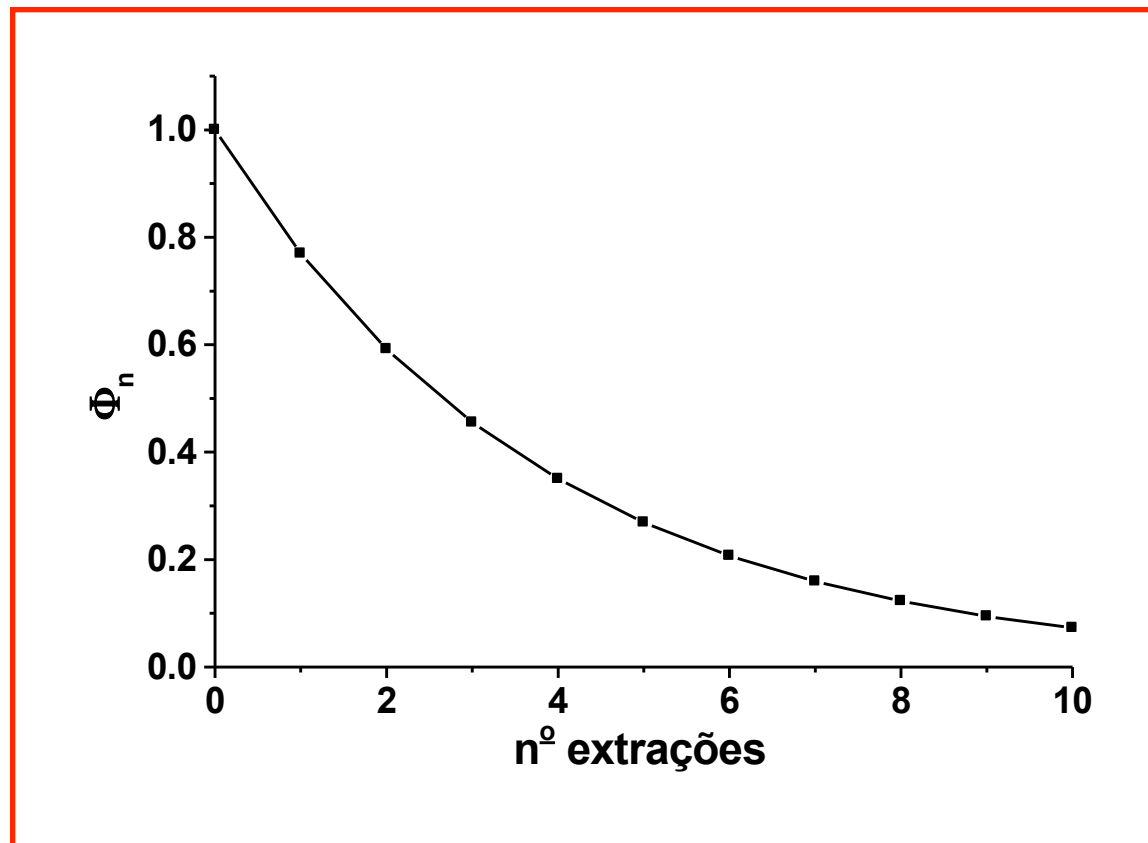
Qual será a fração remanescente ( $q$ ) na fase 1 depois de uma extração?

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

E após duas, três,.... n?

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

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

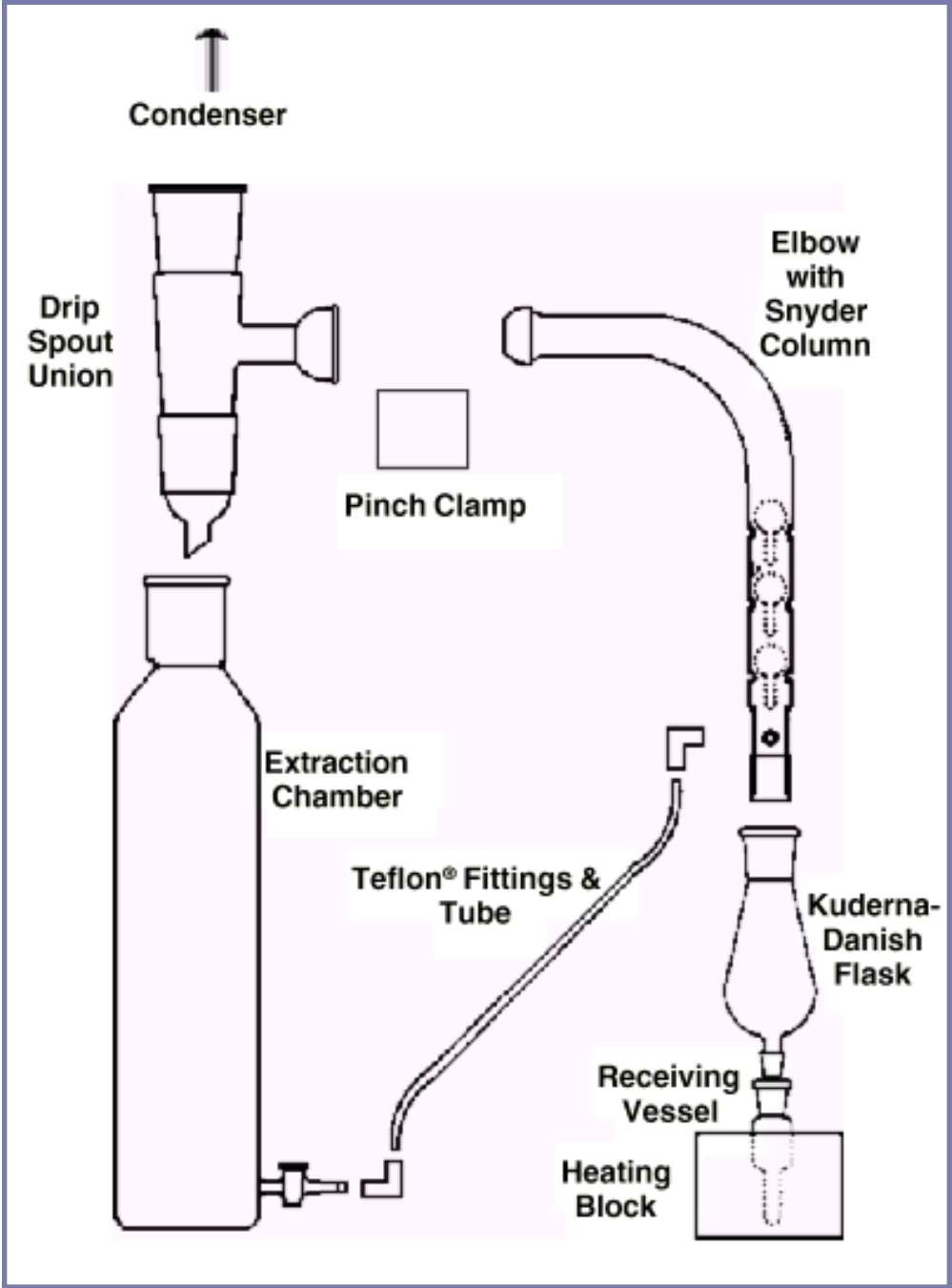


# ◆ **Extração Líquido-Líquido Contínua**



- 😊 **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

- Soxhlet

- Extração com FSC

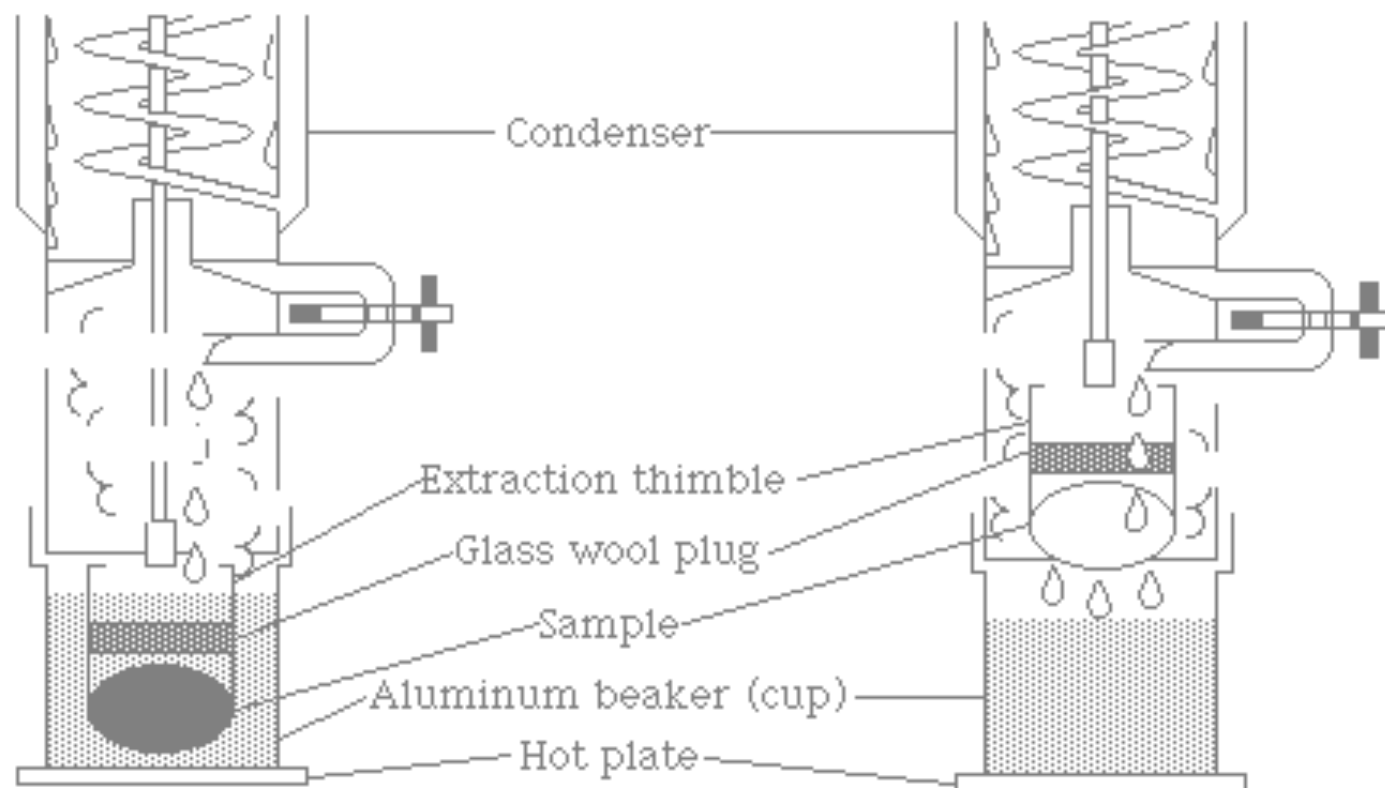
- não muito eficiente;
- grandes volumes de solvente;
- relativamente rápido (< 1h)
- comum em extração de pesticidas em solos

## ◆ Soxhlet



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

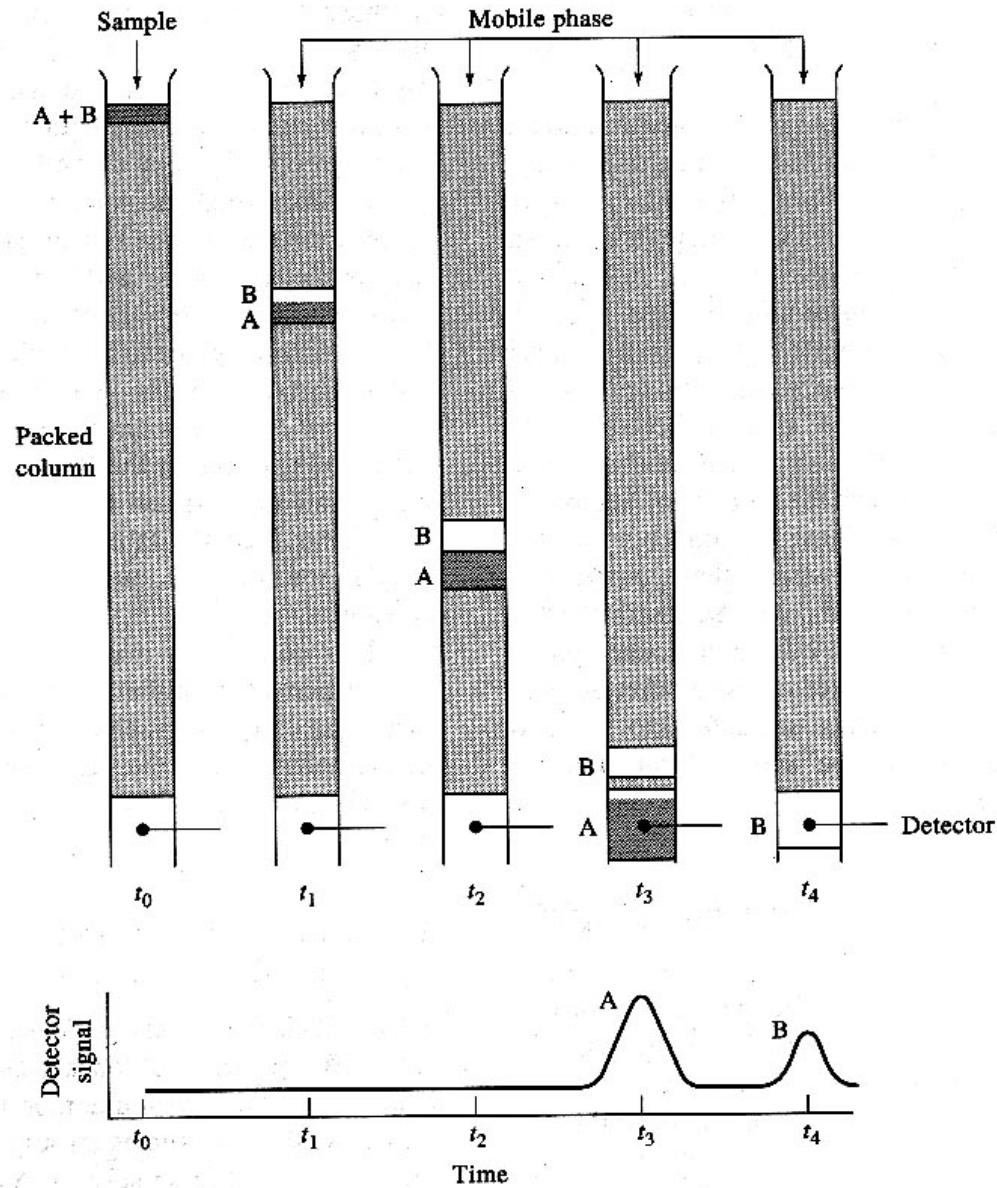
## Soxhlet Extraction



## ◆ **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

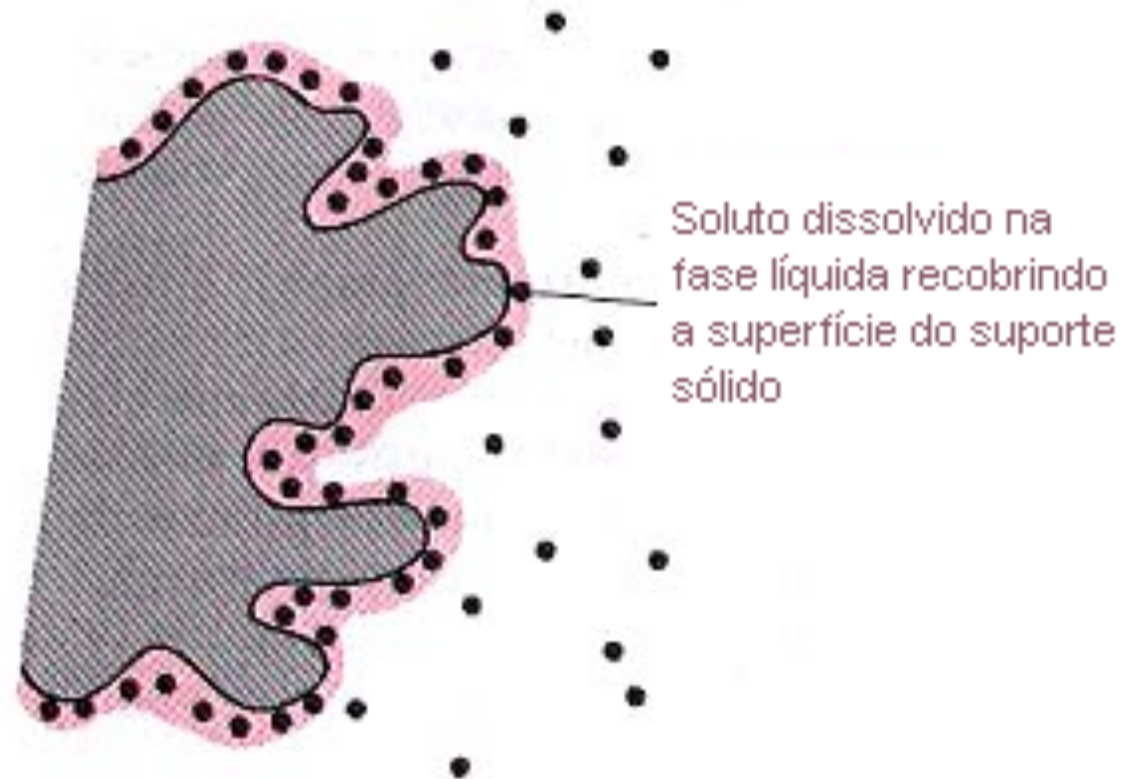
- Adsorção





## ◆ Tipos de Cromatografia

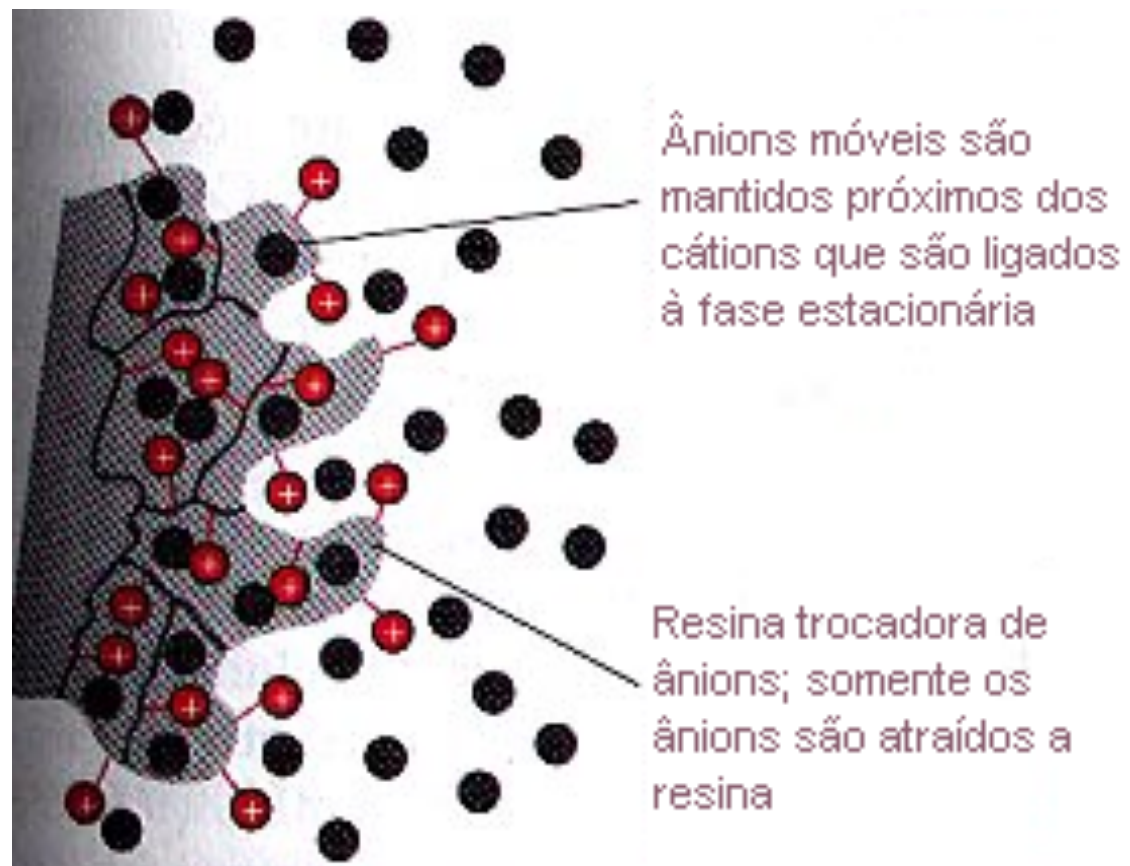
- Partição



Cromatografia de partição

## ◆ Tipos de Cromatografia

- Troca iônica



Cromatografia de troca iônica

## ◆ Tipos de Cromatografia

- **Exclusão molecular**

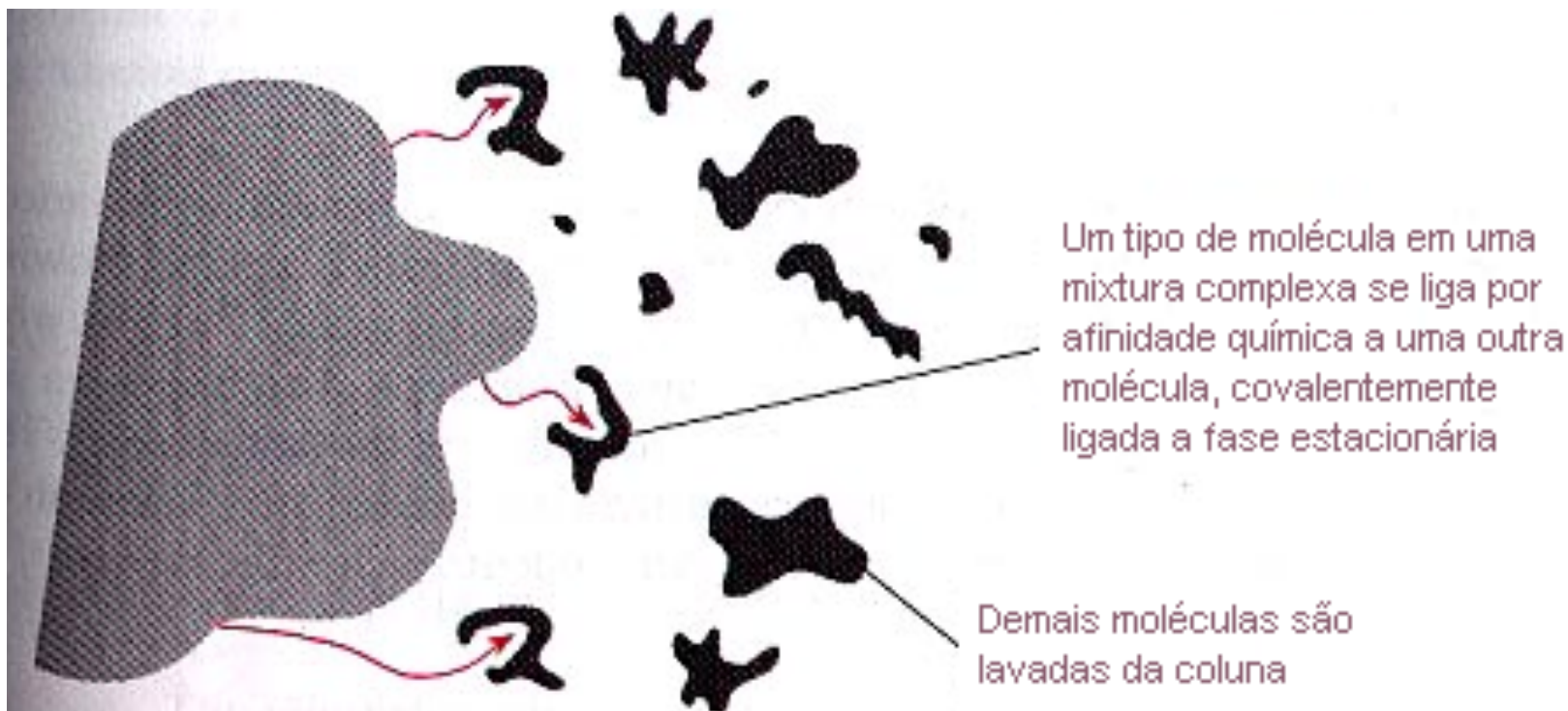
Moléculas pequenas penetram nos poros das partículas



Cromatografia de exclusão molecular

## ◆ Tipos de Cromatografia

### • Afinidade



Cromatografia de afinidade

## ◆ Tipos de Cromatografia

- Interações hidrofóbicas



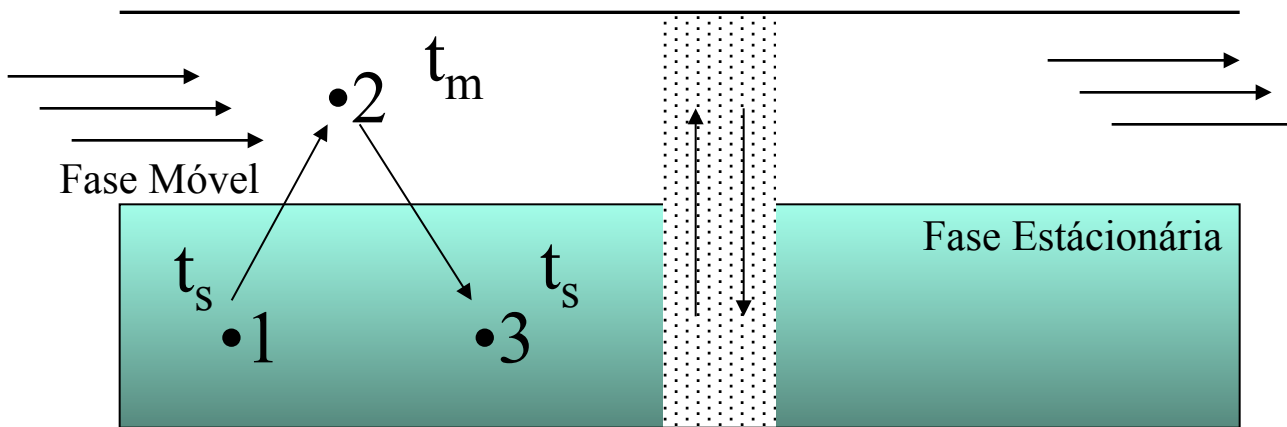
Cromatografia de interação hidrofóbica

## ◆ 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***



