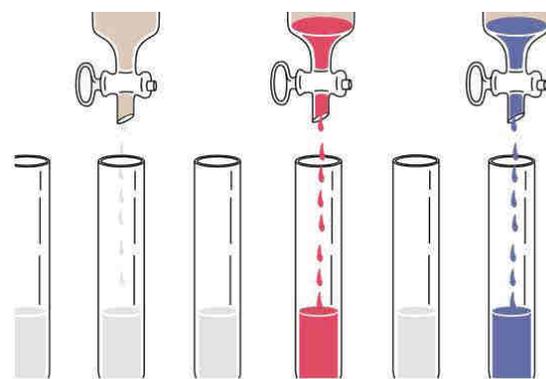


# Técnicas de Purificação de Proteínas e Ácidos Nucleicos



## CAPÍTULO 6

### 1 Isolamento de proteínas

- A. Seleção da fonte proteica
- B. Métodos de solubilização
- C. Estabilização de proteínas
- D. Análise de proteínas
- E. Estratégia geral para a purificação de proteínas

### 2 Solubilidade das proteínas

- A. Efeitos das concentrações de sais
- B. Efeitos dos solventes orgânicos
- C. Efeitos do pH
- D. Cristalização

### 3 Separação cromatográfica

- A. Cromatografia de troca iônica
- B. Cromatografia de gel filtração
- C. Cromatografia de afinidade
- D. Outras técnicas cromatográficas

### 4 Eletroforese

- A. Eletroforese em papel
- B. Eletroforese em gel
- C. SDS-PAGE
- D. Focalização isoeletrica
- E. Eletroforese capilar

### 5 Ultracentrifugação

- A. Sedimentação
- B. Ultracentrifugação preparativa

### 6 Fracionamento de ácidos nucleicos

- A. Métodos em solução
- B. Cromatografia
- C. Eletroforese
- D. Ultracentrifugação

Grande parte da maioria das investigações bioquímicas envolve a purificação dos materiais aqui considerados, pois estas substâncias precisam ser relativamente livres de contaminantes para que possam ser devidamente caracterizadas. Isso pode se tornar uma tarefa gigantesca, pois, geralmente, cada célula contém milhares de substâncias diferentes, muitas das quais apresentam propriedades físicas e químicas bastante semelhantes às de outros constituintes celulares. Além disso, o material de interesse pode ser instável e existir em quantidades mínimas. Normalmente, uma substância que corresponda a  $< 0,1\%$  do peso seco de um tecido deve atingir uma pureza de  $\sim 98\%$ . Problemas de purificação dessa magnitude seriam considerados demasiado difíceis pela maioria dos químicos. É, portanto, pouco surpreendente que no conhecimento so-

bre os processos bioquímicos tenha sido alcançado paralelamente à habilidade em purificar materiais biológicos.

Este capítulo apresenta uma visão geral das técnicas mais utilizadas para o isolamento, a purificação e, até certo ponto, a caracterização de proteínas e de ácidos nucleicos, bem como de outros tipos de moléculas biológicas. Esses métodos constituem as ferramentas básicas da bioquímica e fazem parte do trabalho prático cotidiano dos bioquímicos. Além disso, muitas dessas técnicas são regularmente utilizadas em aplicações clínicas. De fato, *uma compreensão básica dos métodos aqui descritos é imprescindível para entender o significado e as limitações da maioria das informações apresentadas neste livro*. Este capítulo deveria, portanto, ser considerado como material de referência a ser consultado repetidamente, à medida que se fizer necessário, durante a leitura dos outros capítulos. Muitas das técnicas utilizadas para o fracionamento de proteínas e de ácidos nucleicos são semelhantes. Por isso, será focado primeiramente como é que as proteínas são purificadas e só depois trata-se de como é que essas técnicas são utilizadas para o fracionamento de ácidos nucleicos.

### 1 ISOLAMENTO DE PROTEÍNAS

As proteínas constituem uma grande parte da massa de todos os organismos. Uma determinada proteína, como a **hemoglobina** dos glóbulos vermelhos do sangue, pode ser a substância predominante em certo tecido. Já uma proteína como o **repressor lac** de *E. coli* (Seção 31.3B) normalmente apresenta uma população de apenas poucas moléculas por célula. Técnicas semelhantes são utilizadas para o isolamento e a purificação de ambas as proteínas, apesar de que, em geral, quanto menor a concentração inicial de uma substância, maior é o esforço necessário para isolá-la na forma pura.

Nesta seção, discute-se os cuidados a serem tomados quando se trabalha com proteínas, bem como seu manuseio, e resume-se a estratégia geral para a sua purificação. Para muitas proteínas, o processo de isolamento e purificação é uma tarefa minuciosa que requer dias de esforço para que se obtenha apenas alguns miligramas, ou até menos, do produto desejado. Entretanto, como será visto a seguir, as técnicas analíticas modernas atingiram um grau tão alto de sensibilidade que, muitas vezes, essa pequena quantidade de material é suficiente para ampla caracterização de uma proteína. Você deve lembrar que as técnicas descritas neste capítulo são aplicáveis à separação da maioria dos tipos de moléculas biológicas.

### A. Seleção da fonte proteica

Proteínas com funções idênticas em geral estão presentes em uma multiplicidade de organismos. Por exemplo, a maioria das enzimas que faz mediação dos processos metabólicos básicos ou que estão envolvidas na expressão e transmissão da informação genética são comuns a todas as células vivas. Claro que existe uma variação considerável das propriedades de uma proteína em particular obtida de diversas fontes. De fato, diferentes variantes de uma determinada proteína podem estar presentes em diferentes tecidos de um mesmo organismo ou mesmo em diferentes compartimentos de uma mesma célula. Portanto, se houver possibilidade de escolha, o isolamento de uma proteína pode ser muito simplificado pela escolha adequada da fonte proteica. A escolha deve ser fundamentada em critérios tais como a facilidade de obtenção de quantidades suficientes do tecido a partir do qual a proteína será isolada, a quantidade da proteína escolhida presente nesse tecido, e quaisquer propriedades peculiares à proteína escolhida que possam auxiliar na sua estabilização e no seu isolamento. Tecidos obtidos de animais domesticados, como galinhas, vacas, porcos ou ratos, em geral são os escolhidos. Como fontes alternativas, incluem-se microrganismos de fácil obtenção, como, por exemplo, *E. coli* ou a **levedura do pão** (*Saccharomyces cerevisiae*). Será visto, entretanto, que proteínas de uma grande variedade de organismos já foram estudadas.

Métodos de clonagem molecular (Seção 5.5) se tornaram, rapidamente, técnicas de produção de proteínas igualmente, senão mais, importantes. Praticamente qualquer gene que codifique para uma proteína pode ser isolado do seu organismo parental, especificamente alterado (por meio da engenharia genética), caso desejado, e expressado em altos níveis (superproduzido) em um organismo cultivado de maneira adequada, como *E. coli* ou levedura, podendo chegar a constituir até 30% da proteína total da célula superprodutora. Esse alto nível de produção proteica em geral leva a uma quantidade de proteína clonada maior do que aquela presente no organismo parental (no qual a proteína pode estar presente em quantidades mínimas), tornando muito mais fácil o seu isolamento.

### B. Métodos de solubilização

A primeira etapa no isolamento de uma proteína, ou de qualquer outra molécula biológica, é obtê-la em solução. Em alguns casos, como as proteínas do soro sanguíneo, a natureza já o fez. No entanto, geralmente uma proteína deve ser liberada das células que a contêm. O método a ser escolhido para esse procedimento depende das características mecânicas do tecido de origem, bem como da localização da proteína na célula.

Se a proteína de interesse estiver localizada no citosol da célula, sua liberação exige apenas o rompimento (**lise**) das células. No método mais simples de lise, conhecido como **lise osmótica**, as células são suspensas em uma **solução hipotônica**, ou seja, uma solução na qual a concentração molar total de solutos é menor do que aquela do interior das células no estado fisiológico normal. Sob a influência de forças osmóticas, a água difunde para a solução intracelular, que é mais concentrada, fazendo com que as células inchem e se rompam. Esse método funciona bem para células animais, mas para células que contêm parede celular, como as células de bactérias e de vegetais, ele em geral é ineficaz. O uso de enzimas, como a **lisozima**, que degrada quimicamente a parede

celular bacteriana (Seção 15.2), às vezes é eficaz para essas células. Detergentes ou solventes orgânicos, como acetona ou tolueno, também são úteis para lisar células, mas um certo cuidado deve ser tomado ao utilizá-los, visto que eles podem desnaturar a proteína de interesse (Seção 8.4E).

Muitas células precisam de algum tipo de processo de destruição mecânica para serem rompidas. Isso inclui vários ciclos de congelamento e descongelamento, trituração com areia, alumina ou pequenas esferas de vidro, ou o uso de um triturador de alta velocidade (semelhante ao liquidificador doméstico), um **homogeneizador** (um tubo de vidro dentro do qual o tecido é esmagado com o uso de um pistão que se encaixa de forma justa no interior do tubo, o qual pode ser manualmente ou mecanicamente operado), uma **pressa francesa** (um aparelho que cisalha as células esguichando-as sob alta pressão através de um pequeno orifício, arrebetando-as), ou um **sonicador** (que rompe as células por meio de vibrações ultrassônicas). Uma vez tendo sido rompidas as células, o **lisado** bruto pode ser filtrado ou centrifugado para a remoção dos fragmentos celulares, ficando a proteína de interesse na solução sobrenadante.

Se a proteína desejada é um componente de complexos subcelulares, tais como membranas ou mitocôndrias, uma purificação considerável da proteína pode ser obtida separando-se primeiramente o complexo subcelular do resto do material da célula. Isso em geral é realizado por **centrifugação diferencial**, um processo em que o lisado celular é centrifugado em uma velocidade que remove apenas os componentes celulares que são mais densos do que aquele que se deseja isolar, seguido por uma centrifugação a uma velocidade que sedimenta o componente de interesse. A proteína é então separada do componente subcelular purificado por meio da extração com soluções salinas concentradas ou, no caso de proteínas fortemente ligadas a membranas, com o uso de soluções detergentes ou solventes orgânicos, como butanol, que solubiliza lipídeos.

### C. Estabilização de proteínas

Uma vez que uma proteína tenha sido removida do seu ambiente natural, ela fica exposta a muitos agentes que podem danificá-la irreversivelmente. Essas influências devem ser cuidadosamente controladas em todas as etapas do processo de purificação, caso contrário o rendimento da proteína desejada pode ser muito reduzido ou mesmo chegar a zero.

A integridade estrutural de muitas proteínas é sensível ao pH devido à presença de um grande número de grupos ácido-base. Para evitar danos em materiais biológicos decorrentes de variações de pH, esses materiais em geral são dissolvidos em soluções tamponantes eficazes na faixa de pH na qual o material é estável.

As proteínas são facilmente desnaturáveis em altas temperaturas. Apesar da estabilidade térmica das proteínas variar muito, muitas delas desnaturam lentamente acima de 25°C. Assim sendo, a purificação de proteínas é normalmente realizada a temperaturas próximas a 0°C. Entretanto, existem muitas proteínas que requerem temperaturas mais baixas, algumas até mesmo abaixo de -100°C, para se manterem estáveis. Já algumas proteínas **lábeis no frio** tornam-se instáveis abaixo da temperatura característica.

As características da estabilidade térmica de uma proteína podem às vezes ser utilizadas para auxiliar na sua purificação. Uma proteína, resistente ao calor, presente em um extrato bru-

to pode ser purificada aquecendo-se rapidamente a mistura de forma a desnaturar e precipitar a maior parte das proteínas contaminantes, sem no entanto afetar a proteína desejada.

As células contêm **proteases** (enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas) e outras enzimas degradativas que, após lise celular, são liberadas na solução junto com a proteína de interesse. Deve-se tomar cuidado para que a proteína não seja degradada por essas enzimas. As enzimas degradativas podem ficar inativas em pH e temperaturas que não sejam danosos à proteína de interesse. Alternativamente, essas enzimas podem ser especificamente inibidas por agentes químicos sem afetar a proteína desejada. Evidentemente, à medida que se avança na purificação de uma proteína, mais e mais enzimas degradativas são eliminadas.

Algumas proteínas são mais resistentes à degradação proteolítica do que outras. A purificação de uma proteína que é resistente a proteases pode ser feita mantendo-se o extrato proteico bruto em condições nas quais as enzimas proteolíticas presentes permanecem ativas. Essa técnica, denominada **autólise**, simplifica a purificação da proteína resistente, pois, em geral, é mais fácil remover seletivamente os produtos de degradação das proteínas contaminantes do que das proteínas intactas.

Muitas proteínas são desnaturadas pelo contato com a interface água-ar e, em baixas concentrações, uma fração significativa da proteína presente pode ser perdida por adsorção a superfícies. Portanto, uma solução proteica deve ser manuseada de maneira a minimizar a produção de espuma e deve ser mantida relativamente concentrada. Existem, é claro, outros fatores aos quais uma proteína pode ser sensível, incluindo a oxidação de resíduos de cisteína, formando ligações dissulfeto; metais pesados contaminantes, que podem se ligar irreversivelmente à proteína; e a concentração de sal e a polaridade da solução, que devem ser mantidos na faixa de estabilidade da proteína. Por fim, muitos microrganismos consideram as proteínas deliciosas, portanto soluções proteicas devem ser armazenadas sob condições que inibam o crescimento de microrganismos (p. ex., em geladeira e/ou com pequenas quantidades de alguma substância tóxica que não reaja com proteínas, como **azida sódica** [ $\text{NaN}_3$ ]).

#### D. Análise de proteínas

Para purificar qualquer substância, deve-se procurar meios para detectar quantitativamente a presença da substância. Uma dada proteína raramente perfaz mais do que uma pequena porcentagem do peso do seu tecido de origem e em geral está presente em quantidades bem menores. Além do mais, grande parte do material a partir do qual a proteína é extraída assemelha-se muito à própria proteína de interesse. Consequentemente, o ensaio analítico deve ser específico para a proteína que está sendo purificada e altamente sensível à sua presença. Além disso, a maneira de realizar o ensaio deve ser conveniente para que possa ser realizado repetidamente, em geral a cada etapa do processo de purificação.

Dentre os ensaios mais simples para análise de proteínas estão aqueles para enzimas que catalisam reações gerando produtos facilmente detectáveis. Esses produtos podem apresentar fluorescência ou absorvância espectroscópica características que possam ser monitoradas. Alternativamente, a reação enzimática pode consumir ou gerar ácido de forma que a enzima possa ser analisada por titulação ácido-base. Se o produto de

uma reação enzimática não for facilmente quantificado, sua presença ainda pode ser revelada por um tratamento químico posterior que produza algum produto mais facilmente observável. Muitas vezes isso é realizado por uma **reação enzimática acoplada**, na qual o produto da enzima a ser analisada é convertido, por uma outra enzima, em uma substância observável.

Proteínas que não sejam enzimas podem ser analisadas pela capacidade de se ligarem a substâncias específicas ou pela observação dos seus efeitos biológicos. Por exemplo, proteínas receptoras são muitas vezes analisadas incubando-as com uma molécula radioativa à qual elas se ligam especificamente, em seguida a mistura é passada por um filtro que retém proteínas e então é medida a quantidade de radioatividade no filtro. A presença de um hormônio pode ser detectada por seu efeito sobre uma amostra de tecido-padrão ou sobre um organismo inteiro. Esses tipos de ensaios são procedimentos geralmente mais demorados, pois a reação (resposta) provocada pelo ensaio pode levar dias para ser evidenciada. Além disso, sua reprodutibilidade é muitas vezes pouco satisfatória, devido ao comportamento complexo dos organismos vivos. Tais ensaios são, portanto, utilizados apenas quando não há procedimento alternativo disponível.

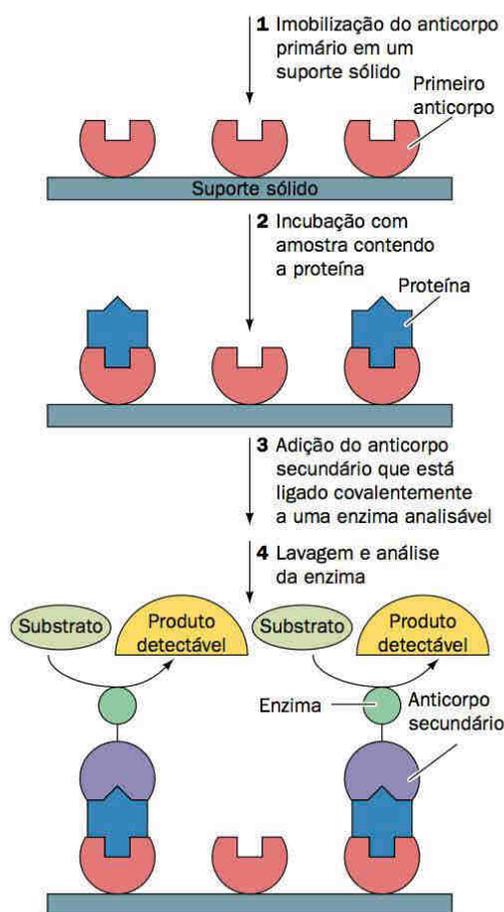
#### a. Técnicas imunoquímicas podem detectar rapidamente quantidades mínimas de proteínas específicas

Procedimentos **imunoquímicos** propiciam técnicas de análise de proteínas com sensibilidade e seletividade altas. Esses métodos empregam **anticorpos**, proteínas que são produzidas pelo sistema imune dos animais em resposta à introdução de uma proteína estranha e que se ligam especificamente à proteína estranha (os anticorpos e o sistema imune são discutidos na Seção 35.2).

Anticorpos extraídos do soro sanguíneo de animais que tenham sido imunizados contra uma proteína em particular são o produto das diferentes células produtoras de anticorpos. Eles formam, portanto, uma mistura heterogênea de moléculas, que variam quanto à sua exata especificidade e afinidade de ligação à proteína-alvo. Células produtoras de anticorpos normalmente morrem após algumas divisões celulares, logo uma célula dessas não pode ser clonada para produzir quantidades suficientes de uma única espécie de anticorpo para ser utilizado. Entretanto, esses **anticorpos monoclonais** podem ser obtidos pela fusão da célula que produz o anticorpo desejado com uma célula de um câncer do sistema imune, conhecida como **mieloma** (Seção 35.2Bd). A célula resultante, **hibridoma**, apresenta capacidade ilimitada de divisão e, quando cultivada em meio de cultivo celular, produz grandes quantidades do anticorpo monoclonal.

Uma proteína pode ser prontamente detectada, ou mesmo isolada, por meio da precipitação por seu anticorpo correspondente. Alternativamente, no **radioensaio** uma proteína pode ser detectada indiretamente pela determinação do seu grau de competição (pela ligação ao anticorpo) com um padrão marcado radioativamente (Seção 19.1Aa). No ensaio imunoensaio de (**Elisa**, *enzyme-linked immunosorbent assay*; Fig. 6.1):

1. Anticorpos contra a proteína de interesse são imobilizados em um sólido inerte, como poliestireno.
2. A solução contendo a proteína a ser analisada é aplicada à superfície coberta com anticorpos sob condições nas quais os anticorpos ligam-se à proteína. A proteína não ligada é depois removida por lavagem.



**FIGURA 6.1** Enzima-Imunoensaio (ELISA). Ver Figuras animadas

3. O complexo proteína-anticorpo resultante reage posteriormente com um anticorpo secundário específico para a proteína, ao qual uma enzima facilmente analisável foi ligada covalentemente.

4. Após remover, por lavagem, todo o anticorpo secundário que não se ligou ao complexo, a enzima do complexo imobilizado anticorpo-proteína-anticorpo-enzima é analisada, indicando assim a quantidade de proteína presente.

Tanto os radioimunoensaios como os Elisa são amplamente utilizados para detectar pequenas quantidades de proteínas específicas e outras substâncias biológicas nos laboratórios e nas aplicações clínicas. Por exemplo, um dos testes de gravidez de fácil acesso, e que dá uma resposta segura poucos dias após a concepção, faz uso de Elisa para detectar o hormônio placentário **gonadotrofina coriônica** (Seção 19.11) na urina da mãe.

### E. Estratégia geral para a purificação de proteínas

O fato que as proteínas são substâncias bem-definidas não era muito aceito até 1926, quando James Sumner cristalizou pela primeira vez uma enzima, a **urease** do feijão-de-porco. Antes disso, pensava-se que as altas massas moleculares das proteínas resultavam de um agregado coloidal de substâncias misteriosas e pouco definidas de massas moleculares menores. Após se perceber que era possível, em princípio, purificar proteínas, os trabalhos nesse sentido passaram a ser levados mais a sério.

Na primeira metade do século XX, os métodos de purificação de proteínas disponíveis eram extremamente grosseiros para os padrões atuais. A purificação de proteínas era uma tarefa árdua, que consistia tanto em arte quanto em ciência. Em geral, o desenvolvimento de uma técnica de purificação satisfatória para uma dada proteína significava anos de trabalho, que envolvia quantidades imensas de material de partida. Ainda assim, até 1940, cerca de 20 enzimas haviam sido obtidas na forma pura.

Desde então, dezenas de milhares de proteínas já foram purificadas e caracterizadas em diferentes níveis. As técnicas modernas de separação apresentam um grau tão alto de discriminação que é possível obter, e em grande quantidade, uma série de proteínas com propriedades tão semelhantes entre si que a mistura delas, há até poucos anos, era considerada uma substância pura. Contudo, o desenvolvimento de uma técnica eficiente para a purificação de uma dada proteína ainda pode ser uma tarefa intelectualmente desafiadora e demorada.

*As proteínas são purificadas por técnicas de fracionamento.* Em uma série de etapas independentes, as diversas propriedades físico-químicas da proteína de interesse são utilizadas para separá-la progressivamente de outras substâncias. A ideia não é, necessariamente, minimizar a perda da proteína desejada, mas eliminar de forma seletiva os outros componentes da mistura de forma que reste apenas a substância desejada.

Talvez não seja filosoficamente possível provar que uma substância esteja pura. Entretanto, *o critério operacional para estabelecer a pureza constitui-se em um método exaustivo: a demonstração, por todos os métodos disponíveis, de que a amostra de interesse consiste em apenas um componente.* Assim, à medida que novas técnicas de separação são criadas, os padrões de pureza devem ser revisados. A experiência tem mostrado que, às vezes, quando uma amostra de material antes considerada substância pura é submetida a uma nova técnica de separação, acaba por se provar que ela consiste em uma mistura de vários componentes.

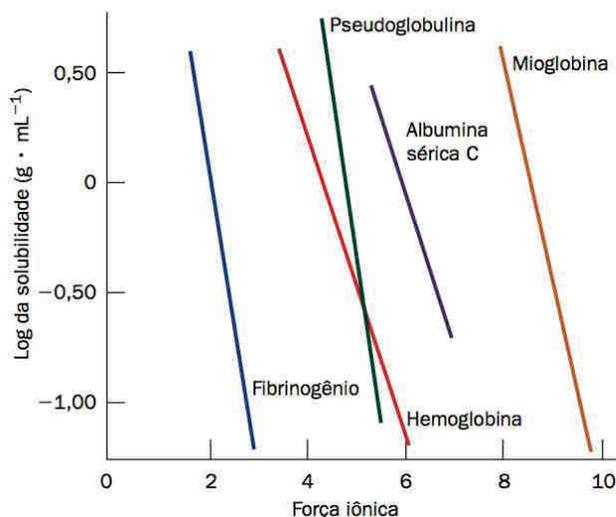
As características das proteínas e de outras biomoléculas que são utilizadas nas várias técnicas de separação são: solubilidade, carga iônica, polaridade, tamanho molecular e especificidade de ligação para outras moléculas biológicas. Algumas das técnicas que serão discutidas e as características proteicas das quais elas dependem são:

Característica	Técnica
<b>Solubilidade</b>	1. <i>Salting in</i> 2. <i>Salting out</i>
<b>Carga iônica</b>	1. Cromatografia de troca iônica 2. Eletroforese 3. Focalização isoelétrica
<b>Polaridade</b>	1. Cromatografia de adsorção 2. Cromatografia em papel 3. Cromatografia de fase reversa 4. Cromatografia de interação hidrofóbica
<b>Tamanho molecular</b>	1. Diálise e ultrafiltração 2. Eletroforese em gel 3. Cromatografia de gel filtração 4. Ultracentrifugação
<b>Especificidade de ligação</b>	1. Cromatografia de afinidade

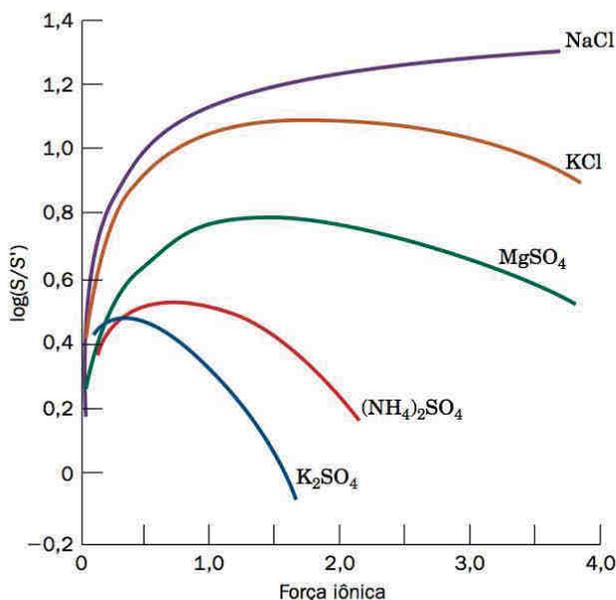
No restante deste capítulo, serão discutidas essas técnicas de separação.

## 2 SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS

Os múltiplos grupos ácido-base de uma proteína fazem com que as suas propriedades de solubilidade sejam dependentes das concentrações dos sais dissolvidos, da polaridade do solvente, do pH e da temperatura. Diferentes proteínas variam



**FIGURA 6.2** Solubilidade de diversas proteínas em soluções de sulfato de amônio. (Segundo Cohn, E.J., and Edsall, J.T., *Proteins, Amino Acids and Peptides*, p. 602, Academic Press [1943].)



**FIGURA 6.3** Solubilidade da carboxiemoglobina no seu ponto isoelétrico em função da força iônica e do tipo de íon. Aqui S e S' referem-se, respectivamente, às solubilidades da proteína em solução salina e em água pura. Está colocado no gráfico o logaritmo dessa razão para que as curvas de solubilidade possam ser colocadas em uma mesma escala. (Segundo Green, A.A., *J. Biol. Chem.* **95**, 47 [1932].)

muito quanto à solubilidade em um determinado conjunto de condições: algumas proteínas precipitam em soluções sob as mesmas condições em que outras proteínas permanecem solúveis. Esse efeito é frequentemente utilizado como base para a purificação de proteínas.

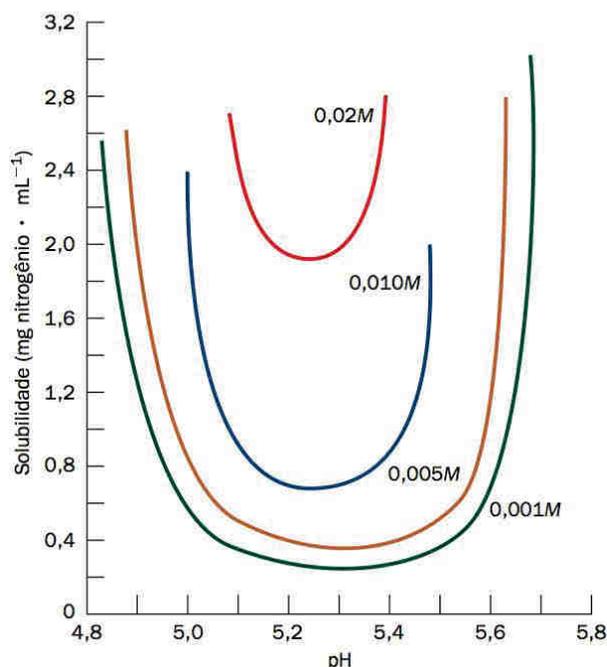
### A. Efeitos das concentrações de sais

A solubilidade de uma proteína em solução aquosa é uma função sensível às concentrações dos sais dissolvidos (Figs. 6.2 a 6.4). A concentração de sal nas Figs. 6.2 e 6.3 é expressa em termos de **força iônica, I**, que é definida por

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i Z_i^2 \quad [6.1]$$

onde  $c_i$  é a concentração molar da espécie iônica  $i$  e  $Z_i$  é a carga iônica. O uso desse parâmetro para calcular os efeitos das cargas iônicas resulta de considerações teóricas a respeito das soluções iônicas. Entretanto, como indica a Fig. 6.3, a solubilidade de uma proteína em uma dada força iônica varia conforme os tipos de íons presentes na solução. O grau de eficiência desses vários íons em influenciar na solubilidade da proteína é bastante semelhante para diferentes proteínas e, aparentemente, deve-se sobretudo à hidratação e ao tamanho do íon.

A solubilidade de uma proteína em uma baixa força iônica em geral aumenta com a concentração de sal (lado esquerdo da Fig. 6.3 e as diferentes curvas da Fig. 6.4). A explicação para esse fenômeno, denominado **salting in**, é que, à medida que a concentração de sal da solução proteica aumenta, os íons de carga oposta adicionais protegem de forma mais efetiva as múltiplas cargas iônicas das moléculas da proteína, aumentando assim a solubilidade da proteína.



**FIGURA 6.4** Solubilidade da β-lactoglobulina em função do pH e em diferentes concentrações de NaCl. (Segundo Fox, S., and Foster, J.S., *Introduction to Protein Chemistry*, p. 242, Wiley [1975].)

Em forças iônicas altas, a solubilidade das proteínas, bem como a da maioria das outras substâncias, diminui. Esse efeito, conhecido como **salting out**, resulta principalmente da competição entre os íons do sal adicionado com os outros solutos dissolvidos pelas moléculas de solvatação. Em altas concentrações salinas, tantos dos íons adicionados são solvatados que a quantidade de solvente disponível torna-se insuficiente para dissolver outros solutos. Em termos termodinâmicos, a atividade do solvente (concentração efetiva; Apêndice do Capítulo 3) diminui. Portanto, as interações soluto-soluto se tornam mais fortes do que as interações soluto-solvente, e o soluto precipita.

Salting out é a base para uma das técnicas mais frequentemente usadas para purificar proteínas. A Fig. 6.2 mostra que a solubilidade de diferentes proteínas varia amplamente em função da concentração de sal. Por exemplo, a uma força iônica 3, o fibrinogênio é muito menos solúvel do que as outras proteínas da Fig. 6.2. O ajuste da concentração de sal de uma solução contendo uma mistura de proteínas para valores logo abaixo do ponto de precipitação da proteína a ser purificada faz muitas proteínas indesejáveis serem eliminadas da solução. Após a remoção do precipitado por filtração ou por centrifugação, a concentração de sal da solução remanescente é aumentada de forma a precipitar a proteína desejada. Dessa maneira, uma purificação significativa e a concentração de uma grande quantidade de proteína podem ser convenientemente obtidas. Em vista disso, salting out é, muitas vezes, a etapa inicial nos procedimentos de purificação de proteínas. O sulfato de amônio é o reagente mais utilizado para a precipitação de proteínas por salting out, pois sua alta solubilidade (3,9 M em água a 0°C) permite a obtenção de soluções com altas forças iônicas (até 23,4 em água a 0°C).

Determinados íons, principalmente  $I^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $SCN^-$ ,  $Li^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Ba^{2+}$ , aumentam a solubilidade em vez de levarem à precipitação por salting out. Esses íons também tendem a desnaturar as proteínas (Seção 8.4E). Já íons que diminuem a solubilidade das proteínas estabilizam suas estruturas nativas, de forma que as proteínas que são precipitadas por salting out não sofrem desnaturação.

**TABELA 6.1 Pontos isoelétricos de várias proteínas conhecidas**

Proteína	pH Isoelétrico
Pepsina	< 1,0
Ovalbumina (de galinha)	4,6
Albumina sérica (humana)	4,9
Tropomiosina	5,1
Insulina (bovina)	5,4
Fibrinogênio (humano)	5,8
$\gamma$ -Globulina (humana)	6,6
Colágeno	6,6
Mioglobina (equina)	7,0
Hemoglobina (humana)	7,1
Ribonuclease A (bovina)	7,8
Citocromo c (equino)	10,6
Histona (bovina)	10,8
Lisozima (de galinha)	11,0
Salmina (de salmão)	12,1

## B. Efeitos dos solventes orgânicos

Solventes orgânicos miscíveis em água, como acetona e etanol, em geral são bons precipitadores de proteínas, pois suas baixas constantes isoelétricas reduzem a força de solvatação das soluções aquosas para íons dissolvidos, como proteínas. As diferentes solubilidades das proteínas nessa mistura de solventes são a base de uma técnica de fracionamento muito utilizada. Essa técnica em geral é realizada próximo a 0°C ou menos, pois, a temperaturas mais altas, os solventes orgânicos tendem a desnaturar proteínas. O abaixamento da constante isoelétrica por solventes orgânicos também aumenta as diferenças no comportamento das proteínas no salting out, assim essas duas técnicas podem ser combinadas com eficiência. Alguns solventes orgânicos miscíveis em água, entretanto, como por exemplo dimetilsulfóxido (DMSO) ou *N,N*-dimetilformamida (DMF), são bons solventes para proteínas, pois têm constantes dielétricas relativamente altas.

## C. Efeitos do pH

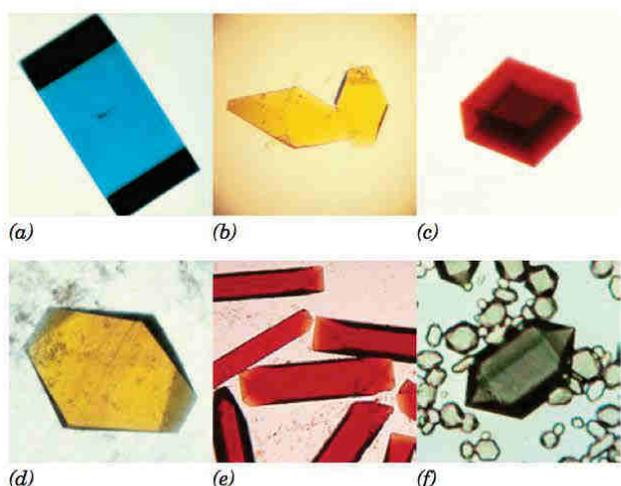
As proteínas geralmente possuem vários grupos ionizáveis que apresentam uma variedade de *pK*. Em um pH característico para cada proteína, as cargas positivas da molécula equilibram exatamente as cargas negativas. Nesse pH, ou ponto isoelétrico da proteína, *pI* (Seção 4.1D), a molécula proteica não apresenta carga líquida e, portanto, fica imóvel em um campo elétrico.

A Fig. 6.4 indica que a solubilidade da proteína  $\beta$ -lactoglobulina é mínima próximo ao seu *pI* (5,2) em soluções diluídas de NaCl e aumenta, mais ou menos simetricamente, em valores próximos ao *pI*, com as mudanças de pH. Esse comportamento de solubilidade, que é compartilhado pela maioria das proteínas, é facilmente explicável. Considerações físico-químicas sugerem que as propriedades de solubilidade das moléculas sem carga são insensíveis à concentração de sal. À primeira vista, portanto, uma proteína no seu ponto isoelétrico não está sujeita a salting in. Contudo, à medida que o pH varia em relação ao *pI* da proteína, ou seja, à medida que a carga da proteína aumenta, ela fica cada vez mais sujeita ao salting in, pois as interações eletrostáticas entre as moléculas vizinhas que promovem agregação e precipitação também aumentam. Logo, em soluções com concentrações de sal moderadas, é de se esperar que a solubilidade de uma proteína em função do pH seja mínima no seu *pI* e aumente a partir desse valor com relação ao pH.

As proteínas variam quanto à composição de aminoácidos e, portanto, como indica a Tabela 6.1, quanto aos seus *pIs*. Esse fenômeno constitui a base de uma técnica de purificação de proteína conhecida como **precipitação isoelétrica**, na qual o pH de uma mistura proteica é ajustado para o *pI* da proteína a ser isolada, minimizando seletivamente a sua solubilidade. Na prática, essa técnica é combinada com salting out de maneira que a proteína que está sendo purificada precipita por salting out quando próxima ao seu *pI*.

## D. Cristalização

Uma vez que uma proteína tenha alcançado um estado de pureza razoável, pode ser possível cristalizá-la. Isso, em geral, é realizado com o uso de agentes precipitantes, como os



**FIGURA 6.5** Cristais de proteínas. (a) Azurina de *Pseudomonas aeruginosa*, (b) flavodoxina de *Desulfovibrio vulgaris*, (c) rubredoxina de *Clostridium pasteurianum*, (d) azidometio-meritina da lesma marinha *Siphonosoma funafuti*, (e) hemoglobina de lampreia e (f) bacterioclorofila a de *Prosthecochloris aestuarii*. Essas proteínas são coloridas devido aos cromóforos (grupos que absorvem a luz) associados a elas; as proteínas ficam incolores na ausência desses grupos. (Imagens a-c, cortesia de Larry Sieker, University of Washington, EUA; d e e, cortesia de Wayne Hendrickson, Columbia University, EUA; f, cortesia de John Olsen, Brookhaven National Laboratories, e Brian Matthews, University of Oregon, EUA.)

descritos anteriormente, de forma a deixar a solução proteica logo acima do seu ponto de saturação. Quando fica parada por um tempo (que pode variar de 5 minutos até vários meses), durante o qual, muitas vezes, a concentração do agente precipitante é lentamente aumentada, a proteína pode precipitar da solução na forma cristalizada. Muitas vezes, é necessário testar a cristalização com soluções sob diferentes condições e com vários agentes precipitantes até que seja possível obter os cristais. O tamanho dos cristais pode variar desde microscópicos até 1 mm ou mais de diâmetro. Os cristais maiores, que geralmente exigem mais cuidado para crescer, são apropriados para a análise por cristalografia por raios X (Seção 8.3A). Alguns cristais são mostrados na Fig. 6.5.

### 3 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Em 1903, o botânico russo Mikhail Tswett descreveu a separação dos pigmentos de folhas vegetais em solução utilizando adsorventes sólidos. Ele denominou esse processo **cromatografia** (do grego: *chroma*, cor + *graphein*, escrever), presumivelmente devido às bandas coloridas que eram formadas no adsorvente à medida que os componentes das misturas pigmentadas separavam-se uns dos outros (e possivelmente porque Tswett significa “cor” em russo).

Os métodos modernos de separação fundamentam-se muito em procedimentos cromatográficos. Em todos eles, uma mistura de substâncias a ser fracionada é dissolvida em um fluido líquido ou gasoso, conhecido como **fase móvel**. A solução resultante é percolada através de uma coluna contendo uma matriz sólida porosa, conhecida como **fase esta-**

**cionária**, a qual, em alguns tipos de cromatografia, pode estar associada a um líquido. A interação de cada um dos solutos com a fase estacionária age de forma a retardar o seu fluxo pela matriz, e a maneira pela qual isso ocorre varia com as propriedades de cada soluto. Se a mistura que está sendo fracionada inicia sua trajetória através da coluna como uma camada estreita, as diferentes forças retardadoras de cada componente, que fazem com que eles migrem a velocidades diferentes, acabam fazendo com que a mistura se separe em camadas (ou bandas) de substâncias puras.

O poder da cromatografia deriva da natureza contínua dos processos de separação. Uma única etapa de purificação (ou “placa teórica”, como é chamada em analogia às técnicas de destilação) pode apresentar uma baixa tendência de separar uma mistura em componentes puros. Entretanto, uma vez que esse processo é aplicado de forma contínua, sendo repetido centenas ou mesmo centenas de milhares de vezes, ao final ocorre a segregação da mistura em seus diferentes componentes. Os componentes que foram separados podem então ser coletados em frações separadas para análise e/ou posterior fracionamento.

Os vários métodos de cromatografia são classificados com base nas fases móveis e estacionárias. Por exemplo, na cromatografia gasosa-líquida, a fase móvel e a estacionária são a gasosa e a líquida, respectivamente, enquanto na cromatografia líquida-líquida elas são líquidos não miscíveis, estando um deles ligado a um suporte sólido inerte. Os métodos cromatográficos podem ainda ser classificados de acordo com a natureza da interação predominante entre a fase estacionária e as substâncias que estão sendo separadas. Por exemplo, se a força retardadora tem caráter iônico, a técnica de separação constitui uma **cromatografia de troca iônica**, enquanto se a força for resultado da adsorção dos solutos à fase estacionária, a técnica é conhecida como **cromatografia de adsorção**.

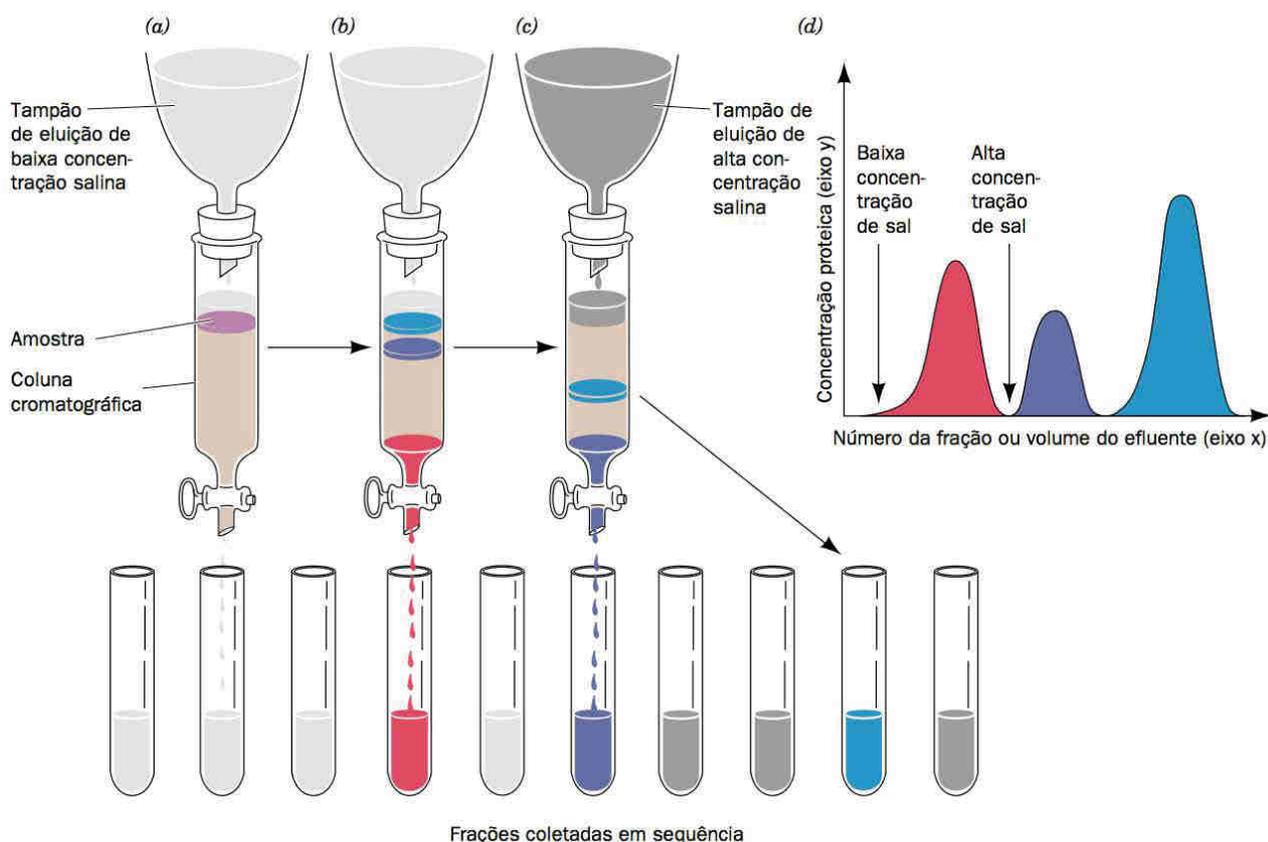
Como já foi comentado, uma célula contém um número imenso de diferentes componentes, muitos dos quais apresentam propriedades bastante semelhantes. Portanto, as técnicas de isolamento para a maioria das substâncias biológicas incorporam várias etapas de cromatografia independentes, de modo que a substância de interesse possa ser purificada de acordo com diversos critérios. Nesta seção, são descritas as técnicas mais comuns de cromatografia.

#### A. Cromatografia de troca iônica

No processo de **troca iônica**, os íons que estão ligados eletrostaticamente a uma matriz insolúvel e quimicamente inerte são substituídos, reversivelmente, pelos íons em solução.



Na equação,  $R^+A^-$  é um **trocador de ânions** na forma  $A^-$ , e  $B^-$  representa os ânions em solução. Os **trocadores de cátions** possuem, similarmente, grupos carregados negativamente que se ligam reversivelmente a cátions. Poliânions e policátions, portanto, ligam-se a trocadores de ânions e de cátions, respectivamente. Entretanto, proteínas e outros **polieletrólitos** (polímeros poliônicos), que possuem cargas positivas e negativas, podem ligar-se tanto a trocadores de cátions como de ânions, dependendo da sua carga final. A



**FIGURA 6.6** Cromatografia de troca iônica utilizando eluição em gradiente descontínuo. Na figura, a área bege da coluna representa o trocador de íons, e as bandas coloridas representam as várias proteínas. (a) A mistura proteica é ligada à porção superior do trocador de íons na coluna cromatográfica. (b) À medida que a eluição progride, as várias proteínas são separadas em bandas discretas como consequência das diferentes afinidades pelo trocador de íons sob essas condições de solução. A primeira banda de proteína (*em vermelho*) passou através da coluna e está sendo isolada em uma fração, enquanto as outras bandas permanecem próximo ao topo da coluna. (c) A concentração de sal no tampão de eluição é aumentada para aumentar a mobilidade das demais bandas, fazendo com que elas sejam eluídas. (d) Diagrama de eluição da mistura protéica da coluna. Ver Figuras animadas

afinidade com a qual um polieletrólito se liga a um determinado trocador de íons depende das identidades e concentrações dos outros íons em solução devido à competição entre esses vários íons pelos sítios de ligação no trocador de íons. As afinidades de ligação de polieletrólitos que possuem grupos ácido-base são também altamente dependentes do pH, devido à variação de suas cargas em função do pH. Esses princípios são de grande utilidade para o isolamento de moléculas biológicas por **cromatografia de troca iônica** (Fig. 6.6), como descrito a seguir.

Ao purificar uma dada proteína (ou outro polieletrólito), o pH e a concentração de sal da solução na qual está dissolvida a proteína são definidos de maneira que a proteína de interesse se ligue fortemente ao trocador de íons escolhido. Um pequeno volume da solução proteica impura é aplicado no topo da coluna, a qual foi preenchida com o trocador de íons, e a coluna é lavada com a solução tamponada.

Diferentes proteínas ligam-se ao trocador de íons com diferentes afinidades. À medida que a coluna vai sendo la-

vada com o tampão, processo chamado **eluição**, aquelas proteínas com afinidade relativamente baixa pelo trocador de íons movem-se através da coluna mais rapidamente do que as proteínas que se ligam ao trocador de íons com afinidades mais altas. Isso ocorre porque o avanço de uma determinada proteína através da coluna é retardado em relação ao avanço do solvente devido às interações entre as moléculas proteicas com o trocador de íons.

Quanto maior a afinidade de ligação de uma proteína pelo trocador de íons, mais ela será retardada. Logo, proteínas que se ligam firmemente ao trocador de íons podem ser eluídas trocando-se o tampão de eluição por algum outro que tenha uma concentração de sal (e/ou de pH diferente) maior, um processo denominado **eluição em gradiente descontínuo**.

Com o uso de um coletor de frações, a purificação de uma substância pode ser realizada selecionando-se apenas aquelas frações do efluente da coluna contendo a substância. Os materiais separados cromatograficamente podem ser de-

tectados de diversas maneiras. Os conteúdos do efluente da coluna podem ser monitorados diretamente, por meio de detectores acoplados à coluna, de acordo com sua absorvância em UV em comprimentos de onda específicos (geralmente 280 nm para proteínas [pois as cadeias laterais aromáticas de Phe, Trp e Tyr apresentam alta absorvância nesses comprimentos de onda; Seção 9.1Cb] e 260 nm para ácidos nucleicos [seu máximo de absorção; Fig. 5.15b]), sua fluorescência, sua radioatividade, seu índice refratário, seu pH ou sua condutividade elétrica. Essas propriedades também podem ser medidas em cada fração da coluna depois que a corrida cromatográfica tiver terminado. Além disso, as biomoléculas podem ser detectadas por suas atividades enzimáticas e biológicas, como discutido na Seção 6.1D.

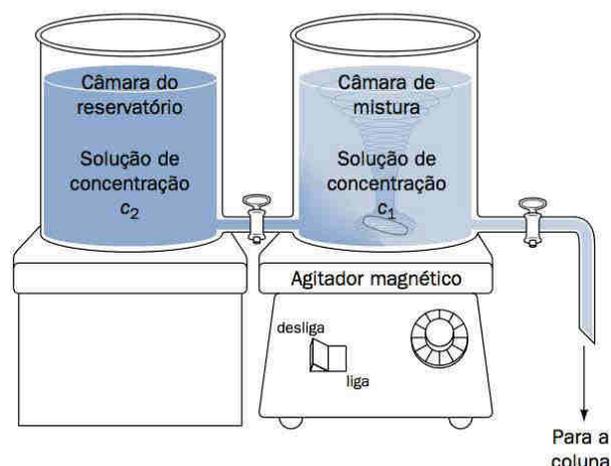
#### a. A eluição em gradiente contínuo melhora a separação cromatográfica

O processo de purificação pode ser melhorado lavando-se a coluna contendo a proteína pelo método de **eluição em gradiente contínuo** (ou, simplesmente, eluição em gradiente). Nesse método, o pH e/ou a concentração de sal variam continuamente à medida que a coluna vai sendo eluída, liberando sequencialmente as várias proteínas que estão ligadas ao trocador de íons. Essa técnica em geral leva a uma melhor separação de proteínas, se comparada à eluição da coluna utilizando uma única solução ou à eluição em gradiente descontínuo.

Muitos tipos diferentes de eluição em gradiente têm sido empregados com sucesso na purificação de moléculas biológicas. O mais utilizado é o **gradiente linear**, no qual a concentração da solução de eluição varia linearmente com o volume de solução passado na coluna. Um aparelho simples para gerar esse tipo de gradiente está ilustrado na Fig. 6.7. Na figura, a concentração de soluto,  $c$ , na solução que é retirada da câmara de mistura é expressa por

$$c = c_2 - (c_2 - c_1)f \quad [6.2]$$

onde  $c_1$  é a concentração inicial da solução na câmara de mistura,  $c_2$  é a concentração da solução na câmara do reservatório, e  $f$  é a fração remanescente dos volumes combinados das soluções inicialmente presentes em ambas as câmaras. Gradientes lineares de concentração salina crescente provavelmente são mais utilizados do que qualquer outro tipo de eluição. Entretanto, gradientes de diferentes perfis podem ser gerados utilizando duas ou mais câmaras de diferentes diâmetros ou então aparelhos de mistura programáveis.



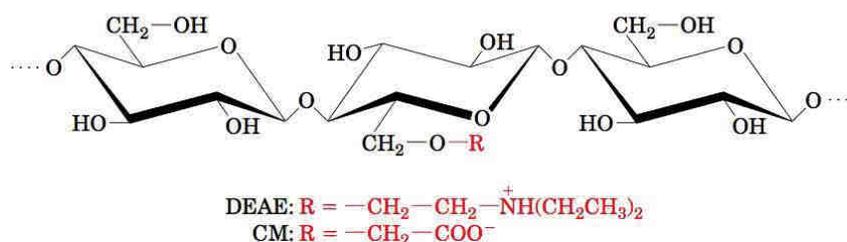
**FIGURA 6.7** Aparelho para gerar um gradiente de concentração linear. Duas câmaras abertas conectadas, que possuem seções transversais idênticas, são inicialmente preenchidas com volumes iguais de soluções de concentrações diferentes. À medida que a solução de concentração  $c_1$  vai saindo da câmara de mistura, ela vai sendo substituída pela solução de concentração  $c_2$  da câmara do reservatório. A concentração da solução na câmara de mistura varia linearmente a partir da concentração inicial,  $c_1$ , até a concentração final,  $c_2$ , como expressado pela Equação [6.2].

#### b. Existem diversos tipos de trocadores de íons

Os trocadores de íons consistem em grupos carregados acoplados covalentemente a uma matriz. A natureza química dos grupos carregados determina os tipos de íons que se ligam ao trocador de íons e a força com a qual se ligam. As propriedades químicas e mecânicas da matriz governam as características do fluxo, a acessibilidade dos íons e a estabilidade do trocador de íons.

Diversas classes de materiais, chamados coloquialmente de **resinas**, são usadas como matrizes de suporte para trocadores de íons na purificação de proteínas, incluindo celulose (Fig. 6.8), poliestireno, géis de agarose e géis de dextrana (Seção 6.3Bb). A Tabela 6.2 descreve alguns dos trocadores de íons disponíveis comercialmente que são utilizados com mais frequência.

Trocadores de íons com base em celulose são um dos materiais mais frequentemente empregados para separar moléculas biológicas. A celulose, originária da madeira ou do algodão, é levemente alterada com grupos iônicos para



**FIGURA 6.8** Fórmulas moleculares de trocadores de íons com base em celulose.

**TABELA 6.2** Alguns trocadores de íons utilizados em bioquímica

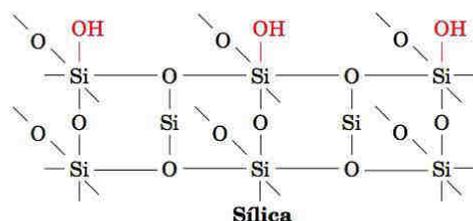
Nome	Tipo	Grupo ionizável	Características
DEAE-celulose	Levemente básico	Dietilaminoetil —CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	Utilizado para separar proteínas ácidas e neutras
CM-celulose	Levemente ácido	Carboximetil —CH <sub>2</sub> COOH	Utilizado para separar proteínas básicas e neutras
P-celulose	Fortemente e levemente ácido	Fosfato —OPO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	Dibásico, liga fortemente proteínas básicas
Bio-Rex 70*	Levemente ácido, com base em poliestireno	Ácido carboxílico —COOH	Utilizado para separar proteínas básicas e aminas
DEAE-Sephadex*	Gel de dextrana com ligações cruzadas levemente básico	Dietilaminoetil —CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	Combinação de cromatografia e gel filtração de proteínas ácidas e neutras
SP-Sepharose*	Gel de agarose com ligações cruzadas fortemente ácido	Metilsulfonato —CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H	Combinação de cromatografia e gel filtração de proteínas básicas

\*Sephadex e Sepharose são produtos da GE Healthcare; resinas Bio-Rex são produtos da BioRad Laboratories.

formar o trocador de íons. O trocador de ânions com base em celulose mais usado é a **dietilaminoetil (DEAE)-celulose**, enquanto a **carboximetil (CM)-celulose** é o trocador de cátions com base em celulose mais popular (Fig. 6.8).

Trocadores de íons com base em gel podem ter os mesmos tipos de grupos carregados que os com base em celulose. A vantagem dos trocadores de íons de gel é que eles combinam as propriedades de separação da gel filtração (Seção 6.3B) com aquelas da troca iônica. Devido ao alto grau de substituição de grupos carregados, que resulta de suas estruturas porosas, esses géis possuem uma capacidade de carga maior do que os trocadores de celulose.

Uma desvantagem das matrizes com base em celulose e em gel é que elas são facilmente comprimíveis (em geral devido às altas pressões resultantes de tentativas de aumentar o fluxo de eluição), reduzindo assim o fluxo da solução de eluição. Esse problema tem sido reduzido com a fabricação de matrizes incompressíveis, como, por exemplo, as derivadas de sílica e de pérolas de vidro.



Esses materiais permitem pressões e velocidades de fluxo altas, mesmo quando formados de partículas em pó bastante finas, permitindo assim separações cromatográficas mais eficazes (ver HPLC na Seção 6.3DH).

### B. Cromatografia de gel filtração

Na **cromatografia de gel filtração**, que também é chamada de **cromatografia por exclusão de tamanho** e **peneira molecular**, as moléculas são separadas de acordo com a forma e o tamanho. Nessa técnica, a fase estacionária consiste em esferas de um material hidratado e esponjiforme contendo poros que abrangem uma faixa de tamanho molecular relativamente pequena. Se uma solução aquosa que contém moléculas de

vários tamanhos é passada através da coluna contendo essas “peneiras moleculares”, as moléculas que são muito grandes para passar pelos poros são excluídas do volume do solvente dentro das esferas do gel. Logo, essas moléculas grandes passam pela coluna mais rapidamente, ou seja, em um volume menor de solução de eluição, do que as moléculas que passam através dos poros (Fig. 6.9).

A massa molecular da menor molécula que é incapaz de penetrar nos poros de um determinado gel é considerada como seu **limite de exclusão**. Esse limite é, até certo ponto, uma consequência da forma da molécula, pois moléculas alongadas, em consequência de seu maior raio de hidratação, têm menor capacidade de penetrar no poro de um gel do que moléculas esféricas que tenham um mesmo volume molecular.

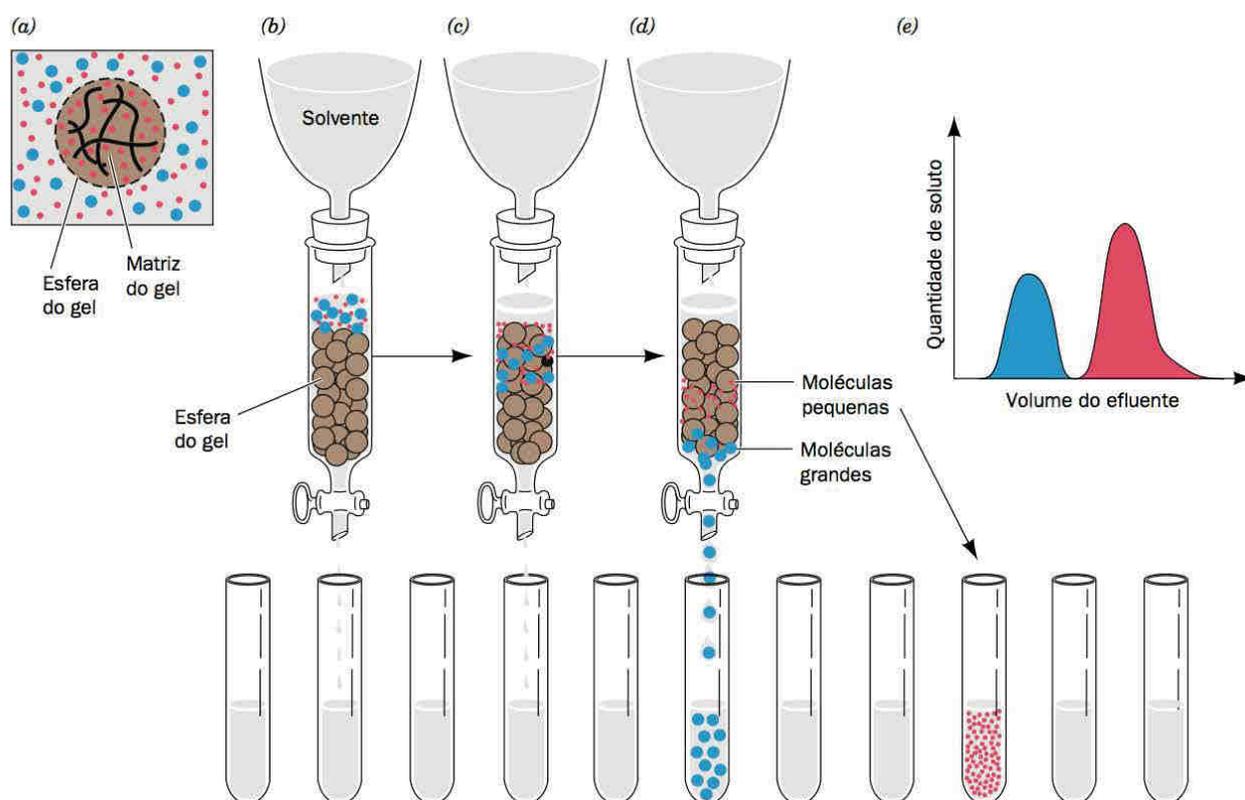
O comportamento de uma molécula em uma coluna de gel pode ser quantitativamente caracterizado. Se  $V_x$  é o volume ocupado pelas partículas do gel e  $V_0$ , ou **volume morto**, é o volume do espaço do solvente que envolve as partículas do gel, então  $V_t$ , o **volume total do gel da coluna**, é simplesmente a soma desses:

$$V_t = V_x + V_0 \quad [6.3]$$

$V_0$  é geralmente  $\sim 35\%$  de  $V_t$ .

O **volume de eluição** de um dado soluto,  $V_e$ , é o volume de solvente necessário para eluir o soluto da coluna depois que ele tenha sido aplicado no gel. O volume morto de uma coluna é facilmente mensurável, sendo esse o volume de eluição de um soluto cuja massa molecular é maior do que o limite de exclusão do gel. O comportamento de um dado soluto em um gel é, portanto, caracterizado pela razão  $V_e/V_0$ , o **volume relativo de eluição**, uma grandeza que independe do tamanho da coluna utilizada.

As moléculas com massas moleculares menores do que o limite de exclusão de um gel eluirão do gel na ordem das suas massas moleculares, com as maiores eluindo primeiro. Isso ocorre porque os tamanhos dos poros em um gel variam dentro de uma faixa limitada, de forma que as moléculas maiores, ao contrário das menores, não têm o volume interno de gel disponível. Esse efeito é a base da cromatografia de gel filtração.



**FIGURA 6.9** Cromatografia de gel filtração. (a) Uma partícula esférica de gel, cujo contorno está representado por uma linha pontilhada, consiste na matriz do gel (linhas sólidas onduladas), que possui um espaço interno com solvente. As moléculas menores (pontos vermelhos) podem penetrar livremente nesse espaço da esfera do gel. Entretanto, as moléculas grandes (pontos azuis) são muito grandes para penetrar nos poros do gel. (b) A solução de amostra começa a entrar na coluna de gel (em que as esferas de gel estão representadas por esferas marrons). (c) As moléculas menores conseguem penetrar no gel e conseqüentemente migram através da coluna mais lentamente do que as moléculas maiores, que são excluídas do gel. (d) As moléculas maiores emergem da coluna e são coletadas separadamente das moléculas menores, as quais necessitam de mais solvente para serem eluídas da coluna. (e) Diagrama de eluição do cromatograma, indicando a separação completa dos dois componentes, com o componente maior eluindo antes. Ver Figuras animadas

#### a. A cromatografia de gel filtração pode ser usada para estimar massas moleculares

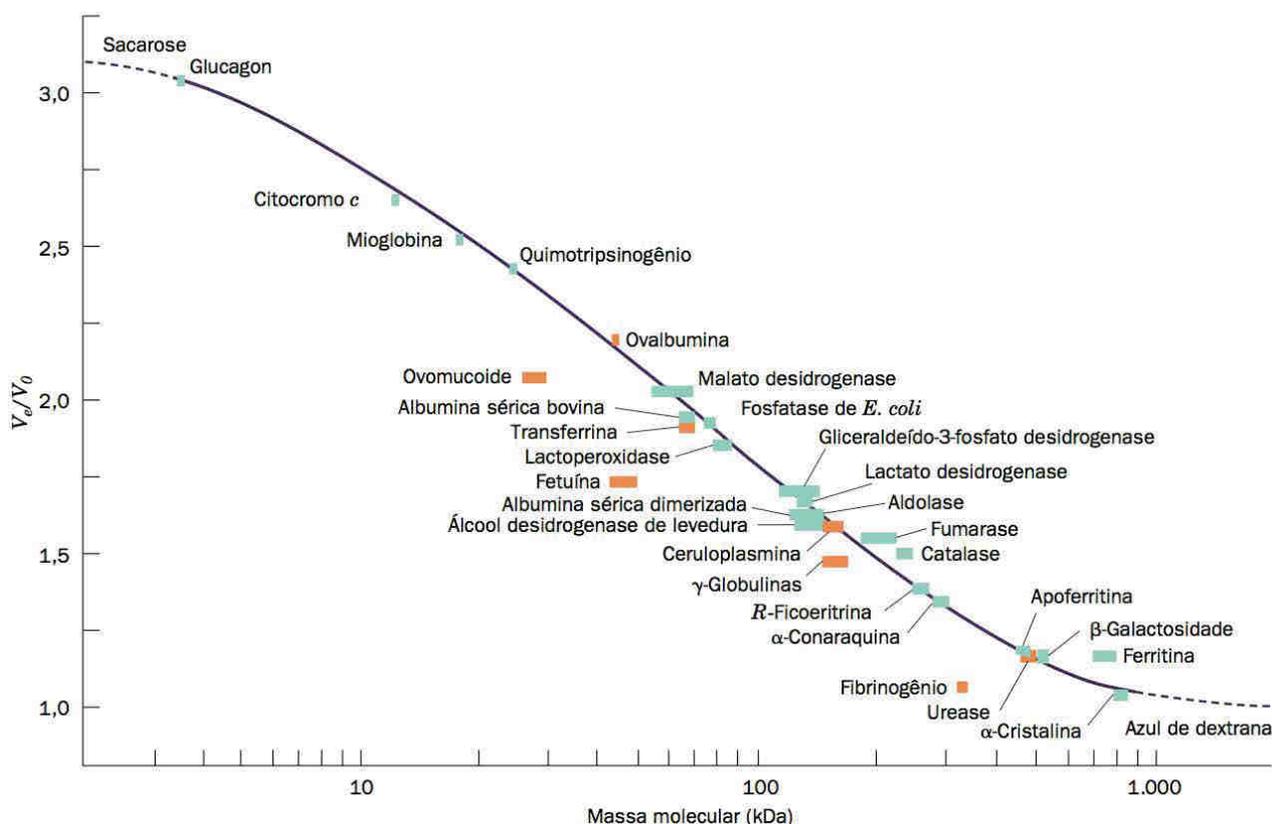
Há uma relação linear entre o volume de eluição relativo de uma substância e o logaritmo de sua massa molecular, dentro de uma faixa considerável de massas moleculares (Fig. 6.10). Se um gráfico como o da Fig. 6.10 for feito para uma determinada coluna de gel filtração, utilizando-se macromoléculas de massas moleculares conhecidas, a massa molecular de uma substância desconhecida pode ser estimada a partir de sua posição no gráfico. A precisão dessa técnica é limitada pelo grau de precisão da premissa de que tanto macromoléculas conhecidas como desconhecidas possuem formas idênticas. Mesmo assim, a cromatografia de gel filtração é bastante usada para estimar massas moleculares, pois pode ser aplicada para amostras relativamente impuras (proporcionando a identificação da molécula de interesse) e porque pode ser realizada utilizando equipamentos simples.

#### b. A maioria dos géis é feita de dextrana, agarose ou poliácridamida

Os materiais mais utilizados para fazer géis cromatográficos são **dextrana** (um polímero de glicose de alta massa molecular produzido pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides*),

**agarose** (um polímero linear de moléculas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose alternadas, obtido de algas vermelhas) e **poliácridamida** (Seção 6.4B). As propriedades dos diversos géis que são empregados com frequência na separação de moléculas biológicas estão listadas na Tabela 6.3. A porosidade dos géis de dextrana, comercializados com o nome de Sephadex, é controlada pela massa molecular da dextrana utilizada e pela introdução de unidades de gliceril-éter que se ligam transversalmente aos grupos hidroxila das cadeias de poliglicose, formando uma malha. As diversas classes de Sephadex disponíveis apresentam limites de exclusão entre 0,7 e 600 kDa. O tamanho do poro nos géis de poliácridamida é controlado, de forma semelhante, pelo grau de ligações cruzadas que formam a malha entre as moléculas de poliácridamida (Seção 6.4B). Eles são comercializados com o nome Bio-Gel P e possuem limites de exclusão entre 0,2 e 400 kDa. Moléculas bastante grandes e complexos supramoleculares podem ser separados utilizando géis de agarose, comercializados com os nomes Sepharose e Bio-Gel A, que têm limites de exclusão de até 150.000 kDa.

A gel filtração, em geral, é utilizada para retirar o sal de uma solução proteica. Por exemplo, uma proteína precipitada



**FIGURA 6.10** Determinação da massa molecular por cromatografia de gel filtração. O gráfico mostra o volume de eluição relativo em função do logaritmo da massa molecular de diversas proteínas de uma coluna de dextrana (Sephadex G-200) em pH 7,5. As barras laranjas representam glicoproteínas (proteínas com grupos de carboidratos ligados). (Segundo Andrews, P., *Biochem. J.* **96**, 597 [1965].)

**TABELA 6.3** Alguns materiais frequentemente utilizados em gel filtração

Nome	Tipo	Faixa de fracionamento (kDa)
Sephadex G-10	Dextrana	0,05-0,7
Sephadex G-25	Dextrana	1-5
Sephadex G-50	Dextrana	1-30
Sephadex G-100	Dextrana	4-150
Sephadex G-200	Dextrana	5-600
Sephacryl S-100	Dextrana com ligações cruzadas	1-100
Sephacryl S-200	Dextrana com ligações cruzadas	5-250
Sephacryl S-300	Dextrana com ligações cruzadas	4-150
Sephacryl S-400	Dextrana com ligações cruzadas	20-8.000
Bio-Gel P-2	Poliacrilamida	0,1-1,8
Bio-Gel P-6	Poliacrilamida	1-6
Bio-Gel P-10	Poliacrilamida	1,5-20
Bio-Gel P-30	Poliacrilamida	2,5-40
Bio-Gel P-100	Poliacrilamida	5-100
Sepharose 6B	Agarose	10-4.000
Sepharose 4B	Agarose	60-20.000
Sepharose 2B	Agarose	70-40.000

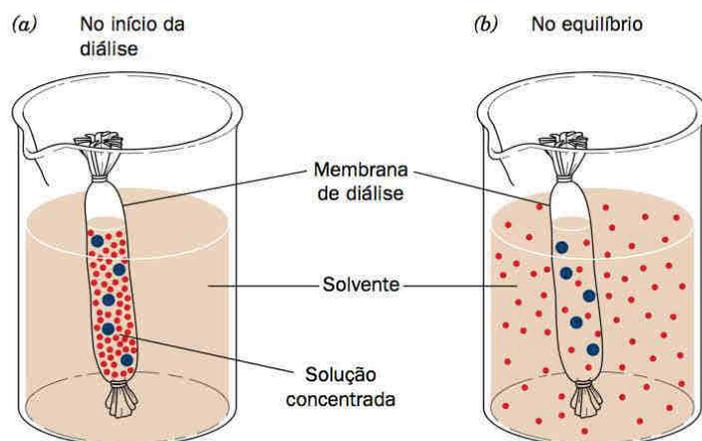
com sulfato de amônio pode ser separada do sulfato de amônio, dissolvendo-se o precipitado proteico em um volume mínimo de um tampão adequado e aplicando-se a solução em uma coluna de gel com limite de exclusão menor do que a massa molecular da proteína. Na eluição da coluna com tampão, a proteína seguirá na frente do sulfato de amônio através da coluna.

Géis de dextrana e de agarose podem ser alterados com grupos ionizáveis, tais como DEAE e CM, para formar géis de troca iônica (Seção 6.3Ab). As substâncias cromatografadas nesses géis são, portanto, separadas tanto de acordo com suas cargas iônicas como de acordo com seus tamanhos e formas.

### c. A diálise é um tipo de filtração molecular

**Diálise** é um processo que separa as moléculas de acordo com o seu tamanho utilizando membranas semipermeáveis que contêm poros de dimensões menores do que a dimensão das macromoléculas. Esses poros permitem que as moléculas pequenas, como aquelas de solventes, sais e outros metabólitos, sofram difusão através da membrana, mas bloqueiam a passagem de moléculas maiores. O **celofane** (acetato de celulose) é o material de diálise geralmente mais utilizado, apesar de várias outras substâncias, como por exemplo a celulose e o **colódio**, também serem empregadas. Esses materiais podem ser encontrados com vários **limites de exclusão de massa molecular** (o tamanho da menor partícula que não passa pela membrana), que variam de 0,5 a 500 kDa.

A diálise (que não é considerada um tipo de cromatografia) é utilizada para trocar o solvente no qual macromoléculas estão dissolvidas. Uma solução macromolecular é colocada dentro de um saco de diálise (que geralmente é fechado amarrando-se a membrana de diálise em ambas as extremidades), que é mergulhado em um volume relativamente grande do novo solvente (Fig. 6.11a). Após várias horas de agitação, as soluções estarão equilibradas, mas as macromoléculas permanecerão dentro do saco de diálise (Fig. 6.11b). O processo pode ser repetido diversas vezes para substituir totalmente um solvente por outro.



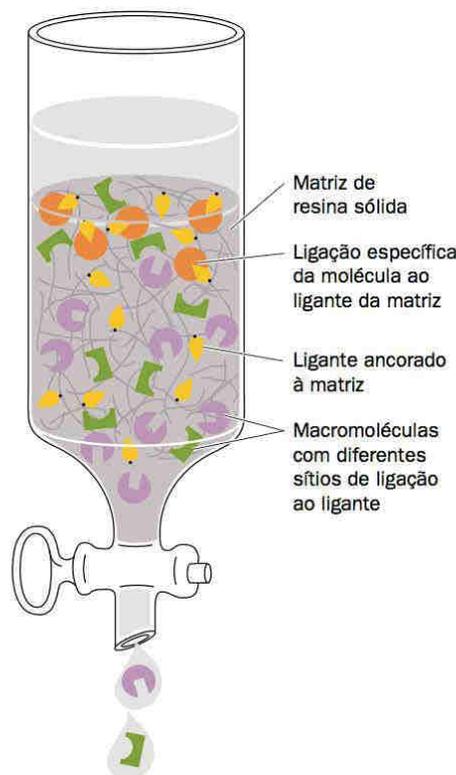
**FIGURA 6.11** Uso da diálise para separar moléculas pequenas e grandes. (a) Apenas as moléculas pequenas difundem pelos poros do saco de diálise, mostrado aqui como um tubo amarrado em ambas as extremidades. (b) No equilíbrio, as concentrações das moléculas pequenas são quase iguais dentro e fora do saco de diálise, enquanto as macromoléculas permanecem dentro do saco.

A diálise tem sido amplamente substituída por uma técnica semelhante e relacionada, conhecida como **ultrafiltração**, na qual uma solução de macromoléculas é forçada, sob pressão ou por centrifugação, através de uma membrana semipermeável, a qual pode ser feita de diversos materiais, incluindo acetato de celulose, náilon ou fluoreto de polivinilideno (PVDF). O solvente e os solutos pequenos passam através da membrana, deixando para trás a solução de macromoléculas mais concentrada. Assim, a ultrafiltração pode ser utilizada para dessalinizar uma solução macromolecular. Como existem membranas de ultracentrifugação com diversos tamanhos de poros, essa técnica pode ser utilizada para separar macromoléculas de diferentes tamanhos.

O solvente também pode ser removido de uma amostra em solução através da **liofilização**, um processo no qual a solução é congelada e o solvente é sublimado sob vácuo. A liofilização é geralmente utilizada para preparar materiais biológicos para o armazenamento por longos períodos ou para o transporte deles.

### C. Cromatografia de afinidade

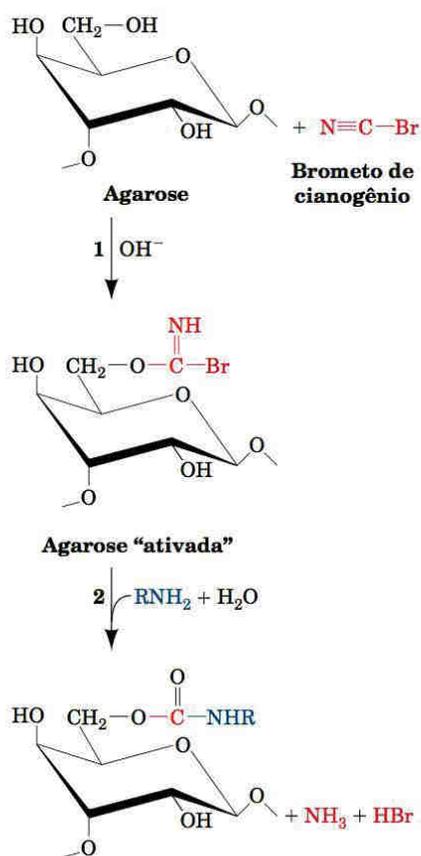
Uma característica marcante de algumas proteínas é a habilidade que elas têm em se ligarem fortemente, mas de forma não covalente, a moléculas específicas. Essa propriedade pode ser utilizada para purificar essas proteínas por meio de



**FIGURA 6.12** Cromatografia de afinidade. Um ligante (amarelo) é ancorado covalentemente a uma matriz porosa. A amostra (cujos sítios de ligação ao ligante estão representados por triângulos, semicírculos e quadrados recortados) é passada através da coluna. Apenas algumas moléculas (representadas por círculos laranjas) se ligam com especificidade ao ligante; as outras são lavadas da coluna.

**cromatografia de afinidade** (Fig. 6.12). Nessa técnica, uma molécula, conhecida como **ligante** (em analogia aos ligantes dos compostos de coordenação), que se liga especificamente à proteína de interesse, é acoplada covalentemente a uma matriz porosa inerte. Quando se passa uma solução proteica impura através desse material cromatográfico, a proteína de interesse liga-se ao ligante imobilizado, enquanto as outras substâncias são lavadas da coluna pelo tampão. A proteína de interesse pode ser depois recuperada na forma pura trocando-se as condições de eluição de maneira que a proteína seja liberada da matriz cromatográfica. A grande vantagem da cromatografia de afinidade é a possibilidade de utilizar propriedades bioquímicas que sejam próprias da proteína de interesse, em vez das pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas entre as proteínas, como é utilizado pelos outros métodos cromatográficos.

A matriz cromatográfica, na cromatografia de afinidade, deve ser quimicamente inerte, apresentar alta porosidade e possuir um grande número de grupos funcionais capazes de formar ligações covalentes com os ligantes. Dentre os poucos materiais disponíveis que cumprem esses critérios, a agarose, que possui numerosos grupos hidroxila livres, é sem dúvida a mais utilizada. Se o ligante possuir um grupo amina primário que não é essencial para a sua ligação à proteína de interesse,



**FIGURA 6.13** Ligação covalente do ligante à agarose. A formação de agarose ativada por brometo de cianogênio (parte superior da figura) e sua reação com uma amina primária para formar um ligante acoplado covalentemente para uso em cromatografia de afinidade (parte inferior da figura).

o ligante pode ser ligado covalentemente à agarose em duas etapas (Fig. 6.13):

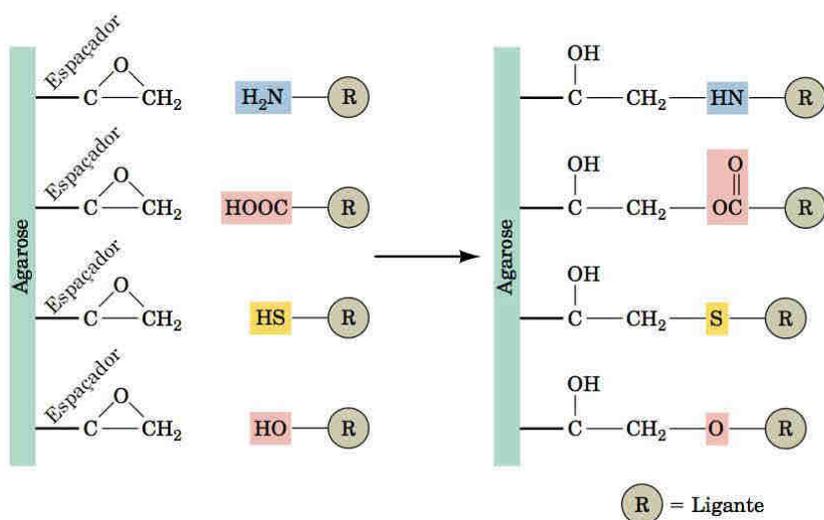
1. A agarose reage com **brometo de cianogênio** para formar um intermediário "ativado", porém estável (normalmente disponível no comércio).
2. O ligante reage com a agarose ativada para formar um produto ligado covalentemente.

Muitas proteínas são incapazes de se ligarem aos seus ligantes acoplados a brometo de cianogênio devido a interferências espaciais (estéricas) com a matriz de agarose. Esse problema é amenizado acoplando-se o ligante à agarose por meio de um grupo "espaçador" flexível. Isso é feito mais facilmente utilizando-se resinas ativadas disponíveis no mercado. Uma dessas resinas é a agarose "epóxi-ativada", na qual um grupo espaçador (contendo, p. ex., uma cadeia de 12 átomos) liga a resina a um grupo epóxi reativo. O grupo epóxi pode reagir com vários dos grupos nucleofílicos dos ligantes, permitindo assim que o ligante de escolha se ligue covalentemente à agarose por meio de um braço de tamanho definido (Fig. 6.14).

O ligante utilizado no isolamento de uma proteína específica por meio de cromatografia de afinidade deve apresentar uma afinidade pela proteína alta o suficiente para imobilizá-la no gel de agarose, mas não tão alta que a impeça de ser liberada subsequentemente. Se o ligante for um substrato para a enzima a ser isolada, as condições da cromatografia devem ser tais que a enzima não aja cataliticamente, senão o ligante será destruído.

Depois que a proteína tiver sido ligada à coluna de cromatografia de afinidade e lavada para a retirada de impurezas, ela precisa ser desligada da coluna. Uma maneira de fazê-lo é eluir a coluna com uma solução contendo um composto que tenha maior afinidade pelo sítio de ligação ao ligante da proteína do que o próprio ligante. Outra maneira é alterar as condições da solução de tal forma que o complexo proteína-ligante não seja mais estável, mudando-se, por exemplo, o pH, a força iônica e/ou a temperatura. Entretanto, deve-se tomar cuidado para que as condições não sejam tão desfavoráveis a ponto de danificar irreversivelmente a proteína. Um exemplo de purificação de proteína por cromatografia de afinidade é mostrado na Fig. 6.15.

A cromatografia de afinidade já foi utilizada para isolar substâncias como enzimas, anticorpos, proteínas de transporte, receptores hormonais, membranas e até células inteiras. Por exemplo, o hormônio **insulina** (Seção 7.1) foi acoplado covalentemente à agarose e utilizado para isolar o **receptor de insulina** (Seção 19.3Ac), uma proteína de superfície celular cujas propriedades eram desconhecidas e que está presente nos tecidos em quantidades muito pequenas. Técnicas de engenharia genética (Seção 5.5G) têm permitido a purificação, por afinidade, de proteínas para as quais não existem ligantes, por meio da formação de proteínas de fusão, ligando a proteína a ser isolada com outra proteína que possua um ligante disponível para uso. Por exemplo, proteínas de fusão cujas porções N-terminais consistem na enzima **glutaciona-S-transferase (GST; Seção 25.7Cb)** ligam-se firmemente ao tripeptídeo **glutaciona** (Seção 21.2Ba) e, assim, podem ser purificadas facilmente por cromatografia de afinidade empregando uma matriz de agarose-glutaciona.



**FIGURA 6.14** Produção de derivados da agarose epóxi-ativada. Vários tipos de grupos nucleofílicos podem ser ligados covalentemente à agarose epóxi-ativada pela reação com seus grupos epóxi.

O poder de separação da cromatografia de afinidade para uma determinada proteína em geral é bem maior do que o de outras técnicas cromatográficas. De fato, em um protocolo de isolamento de uma proteína, a substituição de várias etapas cromatográficas por uma única etapa de cromatografia de afinidade geralmente resulta em proteína mais pura e com rendimento maior.

**a. A cromatografia de imunoafinidade utiliza-se da especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais**

Uma combinação de imun química com cromatografia de afinidade originou um método muito eficaz para a purificação de moléculas biológicas. A ligação de anticorpos monoclonais (Seção 6.1Da) a um material de coluna adequado gera uma substância que ligará apenas a proteína contra a qual o anticorpo foi produzido. Com essa **cromatografia**

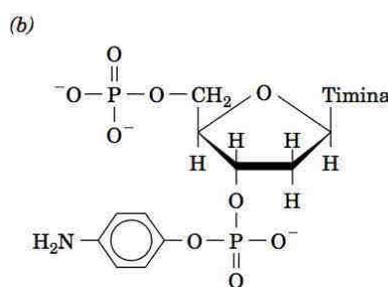
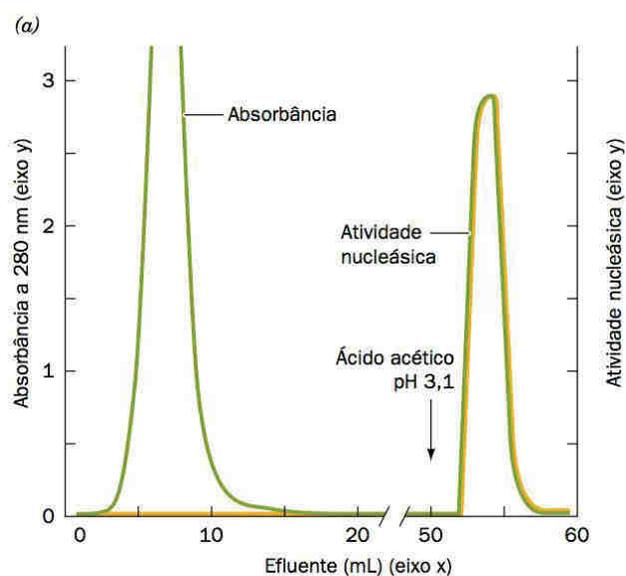
**de imunoafinidade** pode-se atingir uma purificação de até 10.000 vezes em uma única etapa. Dentre as desvantagens da cromatografia de imunoafinidade incluem-se as dificuldades técnicas de produzir anticorpos monoclonais e as condições severas que em geral são necessárias para eluir a proteína da coluna.

**D. Outras técnicas cromatográficas**

Existem algumas outras técnicas cromatográficas de importância bioquímica. Elas serão discutidas brevemente a seguir.

**a. A cromatografia de adsorção separa substâncias apolares**

Na **cromatografia de adsorção** (o método cromatográfico original), as moléculas são adsorvidas fisicamente na superfície de uma substância insolúvel, como por exemplo **alumi-**



**FIGURA 6.15** (a) Purificação da **nuclease de estafilococos** (uma enzima que hidrolisa o DNA) por cromatografia de afinidade. O composto mostrado em *b*, cuja porção difosfotimidina liga-se especificamente à enzima, foi ligado covalentemente à agarose ativada por brometo de cianogênio. A coluna foi equilibrada com tampão borato 0,05 M, pH 8,0, contendo 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, e aproximadamente 40 mg de material parcialmente purificado foram aplicados na coluna. Depois que 50 mL do tampão foram passados pela coluna para a retirada de material não ligado, 0,1 M de ácido acético foi adicionado para eluir a enzima. Toda a atividade enzimática original, compreendendo 8,2 mg de nuclease pura, foi recuperada. (Segundo Cuatrecasas, P., Wilchek, M., and Anfinsen, C.B., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**, 636 [1968].)

na ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), carvão, **terra de diatomáceas** (também chamada de *kieselguhr*, fósseis de silício de organismos unicelulares conhecidos como diatomáceas), sacarose finamente pulverizada e **gel de sílica** (ácido silícico), por meio de interações de van der Waals ou ligações de hidrogênio. Após, as moléculas são eluídas da coluna por um solvente puro como clorofórmio, hexano ou éter etílico, ou por uma mistura desses solventes. O processo de separação baseia-se na partição das várias substâncias entre a coluna polar e o solvente apolar. Essa técnica é mais utilizada para separar moléculas apolares do que proteínas.

#### b. A cromatografia em hidroxiapatita separa proteínas

As proteínas são adsorvidas por géis de **hidroxiapatita** cristalina, uma forma insolúvel do fosfato de cálcio com a fórmula empírica  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ . A separação das proteínas ocorre na eluição em gradiente da coluna com tampão fosfato (a presença de outros ânions não é importante). A base físico-química dessa técnica de fracionamento não é totalmente compreendida, mas aparentemente envolve a adsorção de ânions aos sítios de  $\text{Ca}^{2+}$  e de cátions aos sítios de  $\text{PO}_4^{3-}$  da rede de hidroxiapatita cristalina.

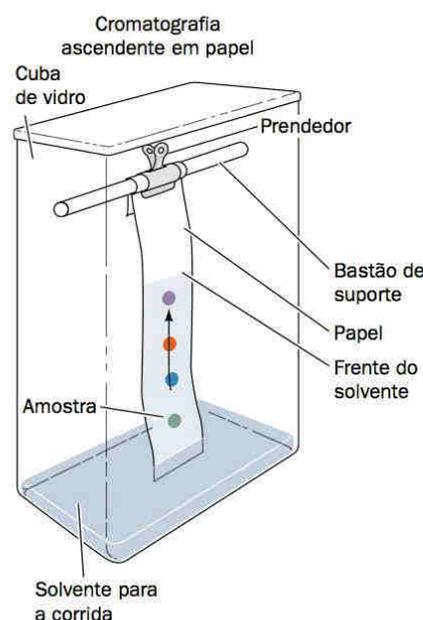
#### c. A cromatografia em papel separa moléculas polares pequenas

A **cromatografia em papel**, desenvolvida em 1941 por Archer Martin e Richard Syngé, teve um papel indispensável na análise bioquímica devido à sua capacidade de separar de maneira eficiente moléculas pequenas, como aminoácidos, oligopeptídeos, nucleotídeos e oligonucleotídeos, e também por necessitar de equipamentos muito simples. Apesar da cromatografia em papel ter sido substituída por técnicas mais modernas, discutidas neste capítulo, ela é descrita brevemente devido à sua importância histórica e também porque muitos dos seus princípios e técnicas auxiliares são diretamente aplicáveis às técnicas mais modernas.

Na cromatografia em papel (Fig. 6.16), algumas gotas da solução contendo a mistura dos componentes a serem separados são aplicadas (pingadas) cerca de 2 cm acima de uma das extremidades de uma tira de papel filtro. Após secar, essa extremidade é mergulhada dentro de uma mistura de solventes contendo componentes aquosos e orgânicos, como por exemplo água/butanol/ácido acético em uma proporção 4:5:1, 77% etanol em água, ou 6:7:7 água/álcool *t*-amílico/piridina. O papel também deve ficar em contato com os vapores de equilíbrio do solvente. O solvente embebe o papel por capilaridade devido à sua natureza fibrosa. O componente aquoso do solvente liga-se à celulose e assim forma uma fase estacionária, tipo um gel. O componente orgânico do solvente continua migrando, formando assim a fase móvel.

As velocidades de migração das várias substâncias que estão sendo separadas são governadas por suas solubilidades relativas na fase estacionária polar e na fase móvel apolar. Em uma única etapa do processo de separação, um dado soluto é distribuído entre as fases móvel e estacionária de acordo com seu **coeficiente de partição**, uma constante de equilíbrio definida como

$$K_p = \frac{\text{concentração na fase estacionária}}{\text{concentração na fase móvel}} \quad [6.4]$$



**FIGURA 6.16** Montagem experimental para a cromatografia em papel.

*As moléculas são assim separadas de acordo com as suas polaridades, com as moléculas apolares movendo-se mais rapidamente que as polares.*

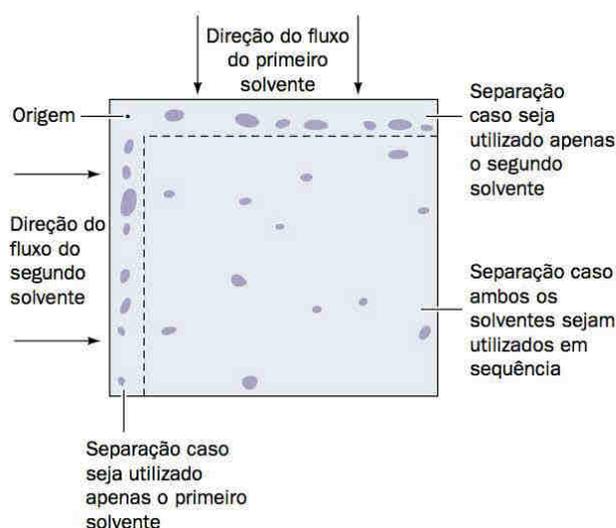
Depois que a frente do solvente tiver migrado uma distância apropriada, o **cromatograma** é removido do solvente e seco. Os materiais separados, se não tiverem cor, podem ser detectados por sua radioatividade, fluorescência ou capacidade de suprimir a fluorescência natural do papel sob luz UV, ou ainda podem ser detectados borrfando-se o cromatograma com uma solução de alguma substância que forme um produto corado após reagir com a(s) substância(s) investigada(s).

A taxa de migração da substância pode ser expressada de acordo com a razão

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pela frente do solvente}} \quad [6.5]$$

*Para um dado sistema de solvente e tipo de papel, cada substância tem um valor  $R_f$  característico.*

Uma mistura complexa que não é separada completamente em um único cromatograma em papel pode ser resolvida totalmente por **cromatografia bidimensional em papel** (Fig. 6.17). Nessa técnica, um cromatograma é feito como descrito anteriormente, com a exceção de que a amostra é aplicada em um dos cantos de uma folha de papel filtro e o cromatograma é corrido paralelamente a uma das bordas do papel. Depois que a cromatografia tiver sido completada e o papel estiver seco, o cromatograma é girado  $90^\circ$  e é cromatografado paralelamente à segunda borda do papel, utilizando um outro sistema de solvente. Como cada composto migra a uma velocidade característica em um determinado sistema de solvente, a segunda etapa da cromatografia melhora muito a separação da mistura em seus componentes.



**FIGURA 6.17** Cromatografia bidimensional em papel.

#### d. A cromatografia em camada delgada é usada para separar moléculas orgânicas

Na **cromatografia em camada delgada**, uma fina camada (~0,25 mm) de um material sólido espalhado em uma placa de vidro ou de plástico é utilizada de forma semelhante àquela do papel na cromatografia em papel. No caso da cromatografia em camada delgada, no entanto, o material cromatográfico pode consistir em diversas substâncias, como trocadores de íons, agentes de gel filtração e adsorventes físicos. Dependendo da escolha do solvente a ser usado para a fase móvel, a separação pode basear-se nos seguintes processos: adsorção, partição, gel filtração, troca iônica, ou mesmo em uma combinação desses processos. As vantagens da cromatografia em camada delgada – conveniência, rapidez e alto grau de resolução – levaram ao uso rotineiro dessa técnica na análise de moléculas orgânicas.

#### e. A cromatografia de fase reversa separa substâncias apolares, incluindo proteínas desnaturadas

A **cromatografia de fase reversa** é um tipo de cromatografia de partição líquido-líquido na qual o caráter polar das fases é o inverso (reverso) do caráter da cromatografia em papel. A fase estacionária consiste normalmente em um líquido apolar imobilizado em sílica substituída com cadeias *n*-alcalil, tais como  $C_8$  e  $C_{18}$ , e a fase móvel é um líquido mais polar. A cromatografia de fase reversa foi inicialmente desenvolvida para separar misturas de substâncias apolares, como lipídeos, por exemplo, mas depois descobriu-se que ela é eficaz na separação de substâncias polares, tais como oligonucleotídeos e proteínas, desde que essas substâncias apresentem áreas apolares expostas. Apesar de que as cadeias laterais apolares tendam a se localizar na parte interna das proteínas nativas, onde não há moléculas de água (Seção 8.3Bb), a desnaturação leva à exposição dessas cadeias laterais ao solvente. Mesmo quando a proteína ainda está na forma nativa, uma fração significativa desses grupos hidrofóbicos está, pelo menos parcialmente, exposta ao solvente na superfície da proteína. Conseqüentemente, sob condições favoráveis, as proteínas interagem hidrofobicamente com os grupos apo-

lares em uma matriz imobilizada. As interações hidrofóbicas em uma cromatografia de fase reversa são fortes, portanto a fase móvel eluente deve ser altamente apolar (contendo altas concentrações de solventes orgânicos, como acetonitrila) para deslocar as substâncias adsorvidas da fase estacionária. Desse modo, a cromatografia de fase reversa, em geral, desnatura as proteínas.

#### f. A cromatografia de interação hidrofóbica separa proteínas nativas com base na hidrofobicidade de superfície

As interações hidrofóbicas são a base não apenas da cromatografia de fase reversa, mas também da **cromatografia de interação hidrofóbica**. No entanto, enquanto na cromatografia de fase reversa a fase estacionária é altamente hidrofóbica, resultando, em geral, na desnaturação da proteína, na cromatografia de interação hidrofóbica a fase estacionária é uma substância hidrofílica, como, por exemplo, um gel de agarose, que é levemente alterada com grupos hidrofóbicos, em geral resíduos de octil ou fenil. As interações hidrofóbicas na cromatografia de interação hidrofóbica são, portanto, relativamente fracas, logo as proteínas mantêm suas estruturas nativas. Os eluentes na cromatografia de interação hidrofóbica, cujos gradientes devem reduzir progressivamente essas interações hidrofóbicas fracas, são tampões aquosos de, por exemplo, concentrações de sal decrescentes (as interações hidrofóbicas são fortalecidas por forças iônicas maiores; Seção 6.2A), concentrações crescentes de detergentes ou aumento de pH. Assim, a cromatografia de interação hidrofóbica separa proteínas nativas de acordo com o seu grau de hidrofobicidade de superfície, um critério que difere daqueles nos quais outros tipos de cromatografia são fundamentados.

#### g. A cromatografia de afinidade com quelante de metal separa proteínas contendo grupamentos metal-quelantes

Na **cromatografia de afinidade com quelante de metal**, um íon metálico divalente, como  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou  $Ni^{2+}$  é ligado a uma matriz cromatográfica, como por exemplo agarose, covalentemente ligada a grupamentos quelantes de metal sob condições tais que as proteínas que possuem grupos quelantes (p.ex., múltiplas cadeias laterais de His ou Cys) ficam retidas. Técnicas de DNA recombinante (Seção 5.5G) podem ser empregadas para adicionar segmentos de seis resíduos His consecutivos, conhecidos como **Cauda de Histidina (Cauda His)**, à extremidade N-terminal ou C-terminal do polipeptídeo a ser isolado. Isso gera um sítio de ligação ao íon metálico que possibilita que a proteína recombinante seja purificada por cromatografia de afinidade com quelação de metais. Depois que a proteína tiver sido eluída, geralmente através da mudança do pH, a cauda His pode ser removida pela ação de uma protease específica, cuja sequência de reconhecimento cliva a sequência (His)<sub>6</sub>, separando-a do resto da proteína.

#### h. HPLC possibilitou um grande aprimoramento das separações

Na **cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, de high-performance liquid chromatography)**, a separação pode basear-se em adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho, interação hidrofóbica ou cromatografia de fase reversa, como descrito anteriormente. A separação é muito aprimorada

pelo uso de colunas de alta resolução, e, ademais, os tempos de retenção das colunas são bem reduzidos. As colunas, estreitas e relativamente longas, são preenchidas com uma matriz não comprimível de partículas de sílica muito finas (1-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro), cujos grupos hidroxila expostos podem ser modificados com muitos dos grupos funcionais frequentemente utilizados nas cromatografias de troca iônica, de fase reversa, de interação hidrofóbica ou de afinidade. Alternativamente, partículas muito finas de vidro ou de plástico são cobertas com uma película da fase estacionária. A fase móvel é constituída por um dos sistemas de solventes já discutidos, inclusive eluições em gradiente com misturas binárias ou até mesmo terciárias. No caso da HPLC, no entanto, a fase móvel é forçada através da coluna, que está preenchida muito compactamente, sob pressões de até 15.000 psi (libras por polegadas quadradas), levando a tempos de análise bastante reduzidos. Os materiais eluídos são detectados à medida que saem da coluna de acordo com a absorção em UV, índice de refração ou fluorescência. As vantagens da HPLC são

1. Alta resolução, que permite a purificação rotineira de misturas que não são separáveis por outras técnicas.
2. Velocidade, que permite que as separações sejam realizadas em poucos minutos.
3. Alta sensibilidade, que, em casos favoráveis, permite a estimativa quantitativa de quantidades de material menores que 1 picomol.
4. Capacidade de automação.

Assim, poucos laboratórios de bioquímica trabalham atualmente sem acesso a pelo menos um sistema de HPLC. A HPLC também é muito utilizada em análises clínicas de fluidos corporais, pois pode rápida, rotineira e automaticamente fornecer estimativas confiáveis de quantidades na faixa dos nanogramas de materiais biológicos, como, por exemplo, vitaminas, esteroides, lipídeos e metabólitos resultantes de fármacos.

#### 4 ELETROFORESE

A **eletroforese**, que é a migração de íons em um campo elétrico, é amplamente utilizada para a separação analítica de moléculas biológicas. As leis da eletrostática estabelecem que a força elétrica,  $F_{\text{elétrica}}$  sobre um íon de carga  $q$  em um campo elétrico de força  $E$  é expressa por

$$F_{\text{elétrica}} = qE \quad [6.6]$$

A migração eletroforética resultante do íon através da solução sofre oposição da força de fricção, ou de atrito,

$$F_{\text{fricção}} = vf \quad [6.7]$$

onde  $v$  é a velocidade de migração do íon e  $f$  é seu **coeficiente de atrito**. O coeficiente de atrito é uma medida do atrito que a solução exerce sobre o íon em movimento e depende do tamanho, da forma e do estado de solvatação do íon, bem como da viscosidade da solução (Seção 6.5A). Em um campo elétrico constante, as forças sobre o íon irão se contrabalancear:

$$qE = vf \quad [6.8]$$

de forma que cada íon de uma solução movimentar-se com uma velocidade característica constante. A **mobilidade eletroforética** de um íon,  $\mu$ , é definida por

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad [6.9]$$

As mobilidades eletroforéticas (iônicas) de diversos íons pequenos em  $\text{H}_2\text{O}$ , a  $25^\circ\text{C}$ , estão listadas na Tabela 2.2.

A Equação [6.9] aplica-se de fato apenas a íons em diluições infinitas em solventes não condutores. Em soluções aquosas, polieletrólitos, como as proteínas, são envolvidos por uma nuvem de íons opostos, os quais impõem um campo elétrico adicional de uma magnitude tal que a Equação [6.9] torna-se, na melhor das hipóteses, uma aproximação pobre da realidade. Infelizmente, a complexidade das soluções iônicas tem impedido, até o momento, o desenvolvimento de uma teoria que possa prever, com precisão, a mobilidade dos polieletrólitos. Já a Equação [6.9] indica corretamente que as moléculas, nos seus respectivos pontos isoelétricos,  $pI$ , possuem mobilidade eletroforética zero. Além disso, para proteínas e outros polieletrólitos que apresentam propriedades de ácido-base, a carga iônica  $e$ , portanto, a mobilidade eletroforética são dependentes do pH.

O uso da eletroforese para separar proteínas foi relatado pela primeira vez em 1937 pelo bioquímico sueco Arne Tiselius. A técnica introduzida por ele, a **eletroforese de fronteira móvel**, foi uma das poucas técnicas analíticas poderosas disponíveis nos primeiros anos da química de proteínas. Entretanto, pelo fato de esse método ser realizado inteiramente em solução, é necessário, para evitar as forças de convecção e impedir que as proteínas em migração se misturem, o uso de um equipamento complicado que requer amostras grandes. A eletroforese de fronteira móvel foi então substituída pela **eletroforese de zona**, uma técnica na qual a amostra é posta a migrar em um suporte sólido, como, por exemplo, papel filtro, acetato de celulose ou, mais frequentemente, algum gel. Isso elimina muito a mistura das amostras por convecção, que ocorre na eletroforese de fronteira móvel e limita a resolução. Além disso, na eletroforese de zona, os diversos componentes da amostra migram como bandas discretas (zonas) e, assim, apenas uma pequena quantidade de material é necessária.

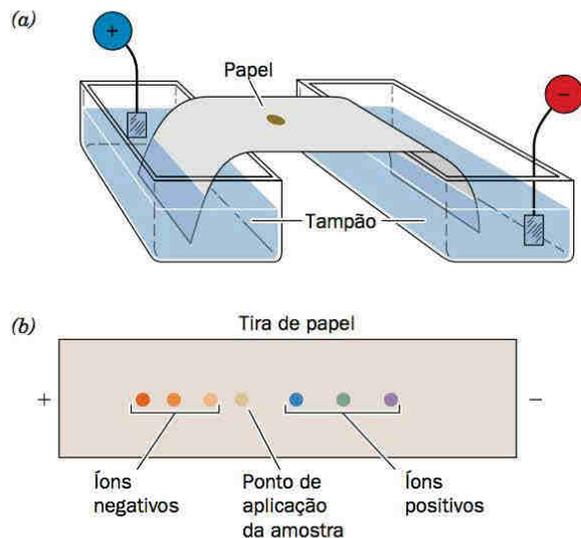
##### A. Eletroforese em papel

Na **eletroforese em papel** as amostras são aplicadas em um ponto em uma tira de papel filtro ou acetato de celulose umedecida com uma solução-tampão. As extremidades da tira são imersas em reservatórios separados contendo um tampão no qual os eletrodos são colocados (Fig. 6.18). Com a aplicação de uma corrente contínua (em geral  $\sim 20 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), os íons da amostra migram em direção ao eletrodo de polaridade contrária com velocidades características, até formarem bandas discretas. A velocidade de migração de um íon é influenciada, até certo ponto, pela interação com a matriz do suporte, mas, em grande parte, depende da carga do íon. Depois que o eletroforetograma estiver completo (o que em geral leva várias horas), deixa-se secar a tira e os componentes da amostra são localizados empregando os mesmos métodos de detecção utilizados na cromatografia em papel (Seção 6.3D).

A eletroforese em papel e a cromatografia em papel são a princípio semelhantes. No entanto, a **eletroforese em papel**

separa os íons principalmente de acordo com suas cargas iônicas, enquanto a cromatografia em papel separa as moléculas de acordo com suas polaridades. Os dois métodos podem ser combinados em uma técnica bidimensional denominada da-

**filoscopia**, na qual uma amostra é primeiramente tratada do mesmo modo que na cromatografia bidimensional em papel (Seção 6.3D), mas é submetida à eletroforese no lugar da segunda etapa cromatográfica. As moléculas são assim separadas tanto de acordo com a carga como com a polaridade.

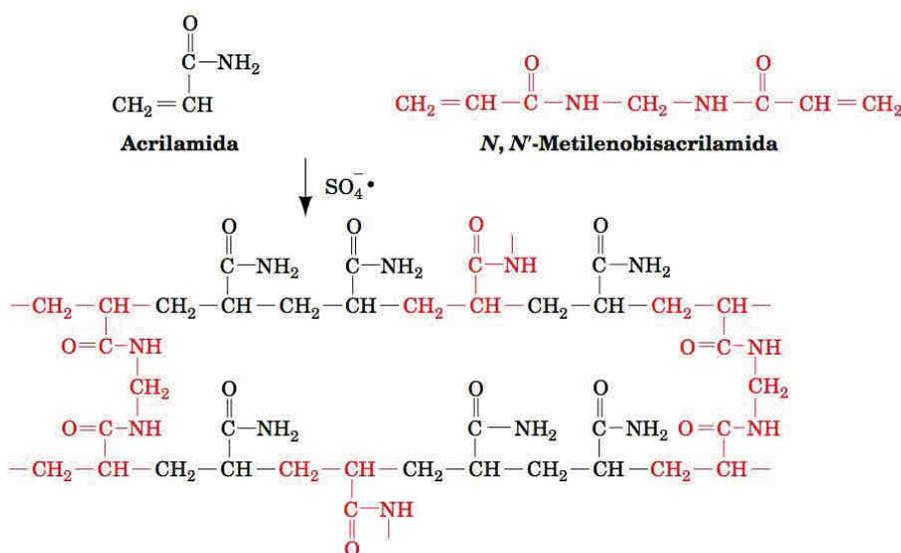


**FIGURA 6.18 Eletroforese em papel.** (a) Diagrama do equipamento utilizado. A amostra é aplicada em um ponto no papel umedecido com tampão. As extremidades do papel são mergulhadas dentro de reservatórios de tampão no qual os eletrodos estão imersos e um campo elétrico é aplicado. (b) Um eletroforetograma completo. Note que os íons positivos (cátions) migraram em direção ao cátodo e os íons negativos (ânions) migraram em direção ao ânodo. As moléculas sem carga permanecem no ponto de aplicação da amostra.

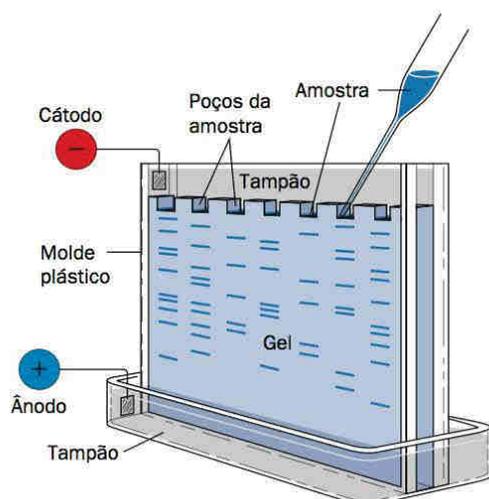
**B. Eletroforese em gel**

A **eletroforese em gel**, que está entre os métodos mais poderosos e, ainda assim, convenientes de serem utilizados para separar macromoléculas, substituiu a eletroforese em papel. Os géis mais usados, a poliacrilamida e a agarose, possuem poros de dimensões moleculares cujos tamanhos podem ser escolhidos. A separação das moléculas é, portanto, fundamentada na filtração em gel e também na mobilidade elétrica das moléculas a serem separadas. Os géis na eletroforese, contudo, retardam as moléculas maiores em relação às menores, o inverso do que ocorre na cromatografia de gel filtração, pois não há espaço com solvente na eletroforese em gel análogo àquele entre as partículas do gel da cromatografia de gel filtração (os géis de eletroforese em geral são montados dentro do equipamento de eletroforese, embora géis prontos também sejam muito utilizados). Devido ao fato de que as moléculas de uma amostra não saem do gel, o movimento eletroforético das moléculas maiores é mais dificultado em relação ao das moléculas menores.

Na **eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, de polyacrylamide gel electrophoresis)**, os géis são feitos pela polimerização de **acrilamida** e **N,N'-metilenobisacrilamida**, induzida por radicais livres, no tampão de escolha (Fig. 6.19). O gel em geral é montado com a forma de uma fatia retangular delgada, na qual diversas amostras podem ser analisadas simultaneamente em canaletas paralelas (Fig. 6.20), o que constitui uma boa maneira para comparar amostras semelhantes. O tampão, que é o mesmo nos reservatórios e no gel,



**FIGURA 6.19 Polimerização da acrilamida e da N,N'-metilenobisacrilamida para formar um gel de poliacrilamida.** A polimerização é induzida por radicais livres resultantes da decomposição química do persulfato de amônio ( $\text{S}_2\text{O}_8^{2-} \rightarrow 2\text{SO}_4^{\cdot-}$ ) ou da fotodecomposição da riboflavina na presença de traços de  $\text{O}_2$ . Em qualquer um dos casos, **N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED)**, um estabilizador de radicais livres, em geral é adicionado à mistura do gel. As propriedades físicas do gel e o tamanho dos poros são controlados pela proporção de poliacrilamida no gel e por seu grau de polimerização. A concentração de poliacrilamida utilizada com mais frequência está na faixa de 3 a 15%, com a quantidade de N,N'-metilenobisacrilamida em gel fixada em 5% do total de acrilamida presente.



**FIGURA 6.20** Equipamento para eletroforese em gel plano. As amostras, aplicadas em canaletas que são feitas na parte superior do gel, migram em linhas paralelas.

apresenta um pH tal (em geral  $\sim 9$  para proteínas) de modo que as macromoléculas ficam com carga negativa e, portanto, migram em direção ao ânodo do reservatório inferior. Cada amostra, que pode conter uma quantidade de macromoléculas tão pequena quanto  $10 \mu\text{g}$ , é dissolvida em uma quantidade mínima de uma solução relativamente densa de glicerol ou sacarose, para impedir que ela se misture com o tampão no reservatório superior, e é aplicada em canaletas feitas na parte superior do gel (Fig. 6.20). Alternativamente, a amostra pode estar contida em um pequeno segmento do “gel de amostra”, cujos poros são muito grandes para que impeçam a migração de macromoléculas. Uma corrente contínua de  $\sim 300 \text{ V}$  passa através do gel durante um período de tempo suficiente (30 a 90 minutos) para separar os componentes macromoleculares em uma série de bandas discretas; o gel é então removido do suporte e as bandas são visualizadas pelo método mais apropriado (ver a seguir). Utilizando essa técnica, uma mistura proteica de 0,1 a 0,2 mg pode ser separada e analisada, resolvendo até 20 bandas diferentes.

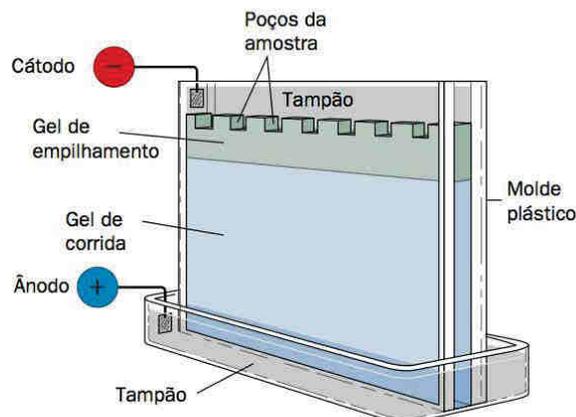
#### a. A eletroforese com pH descontínuo (eletroforese de disco) melhorou a resolução

A pequena largura das bandas no método descrito anteriormente, e portanto a resolução da separação, é limitada pelo comprimento da coluna da amostra à medida que ela penetra no gel. A largura das bandas é reduzida por uma técnica simples conhecida como **pH descontínuo** ou **eletroforese de disco**. Esse tipo de eletroforese necessita de um sistema de dois géis e vários tampões diferentes (Fig. 6.21). O “gel de corrida”, no qual ocorre a separação, é preparado como descrito anteriormente, e na sua extremidade superior é montado um “gel de empilhamento”, ou “gel espaçador”, mais curto (1 cm) e de poros largos. O tampão do reservatório inferior e do gel de corrida é o mesmo descrito anteriormente, enquanto aquele da solução de amostra e do gel de empilhamento tem um pH cerca de duas unidades abaixo daquele do reservatório inferior. O pH do tampão do reservatório superior, o qual deve conter um ácido fraco (em geral glicina,  $pK_2 = 9,78$ ), é ajustado para um pH próximo àquele do reservatório inferior.

Quando a corrente é ligada, os íons do tampão do recipiente superior migram para dentro do gel de empilhamento, enquanto os íons do tampão do gel de empilhamento migram mais à frente. À medida que isso vai acontecendo, os íons do tampão do reservatório superior encontram um pH que é bem menor do que o seu  $pK$ . Portanto, esses íons adotam sua forma neutra (ou, no caso da glicina, a forma zwitteriônica) e se tornam eletroforicamente imóveis. Isso leva à deficiência de carregadores de cargas e, conseqüentemente, a um aumento na resistência elétrica  $R$  nessa região, o que, devido à exigência de uma corrente constante  $I$  através do circuito elétrico, resulta, de acordo com a lei de Ohm ( $E = IR$ ), em um grande aumento localizado do campo elétrico  $E$ . Em resposta a esse campo aumentado, os ânions macromoleculares migram rapidamente até encontrarem a região contendo os íons do tampão do gel de empilhamento, onde então eles diminuem de velocidade, pois nesse ponto não há deficiência de íons. Esse efeito faz os íons macromoleculares chegarem no gel de corrida empilhados, formando bandas ou discos estreitos ( $\sim 0,01 \text{ mm}$  de largura) que são ordenados de acordo com suas mobilidades, e se posicionam em uma posição intermediária entre os íons em migração do reservatório superior e aqueles do gel de empilhamento. À medida que os íons macromoleculares vão entrando no gel de corrida, eles diminuem de velocidade devido aos efeitos da gel filtração. Isso permite que os íons do tampão do reservatório superior ultrapassem as bandas macromoleculares e, devido ao pH maior do gel de corrida, adotem sua forma carregada à medida que também entram no gel. Assim, a deficiência de carregadores de carga desaparece e a partir daí a separação eletroforética ocorre normalmente. Entretanto, a compactação das bandas macromoleculares que entram no gel de corrida aumenta muito a resolução das separações de macromoléculas (p. ex., Fig. 6.22).

#### b. Géis de agarose são utilizados para separar eletroforicamente moléculas grandes

A obtenção dos poros grandes que são necessários para PAGE de compostos de alta massa molecular ( $> 200 \text{ kDa}$ ) requer géis de concentrações tão baixas de poli(acrilamida) ( $< 2,5 \%$ ) que eles ficam muito moles para serem utilizados. Essa dificuldade é evitada utilizando-se agarose (Fig. 6.13). Por exemplo, utiliza-se um gel de agarose 0,8% para a sepa-



**FIGURA 6.21** Diagrama do equipamento da eletroforese de disco (pH descontínuo).

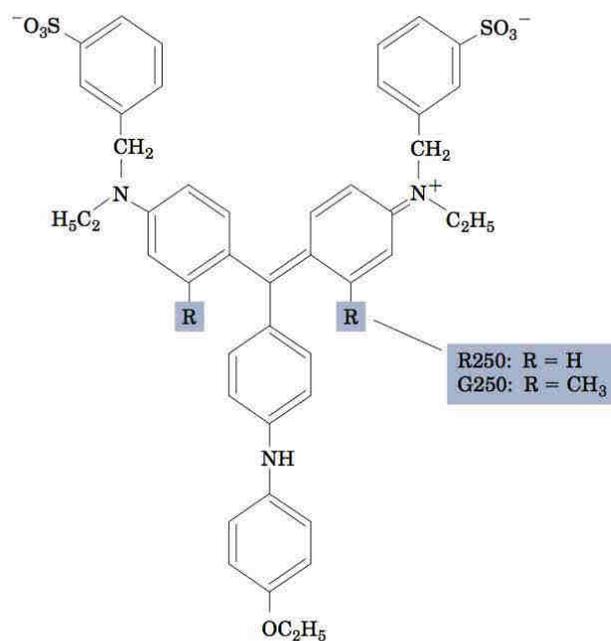


**FIGURA 6.22** Eletroforese de disco de soro humano em uma coluna de poliacrilamida de  $0,5 \times 4,0$  cm. As proteínas foram visualizadas por coloração com **negro de amido**. (Fonte: B.J. Davis, *Annals of the New York Academy of Science* 121, 404 [1964], EUA, Fig. 8.)

ração eletroforética de ácidos nucleicos com massa molecular de até 50.000 kDa.

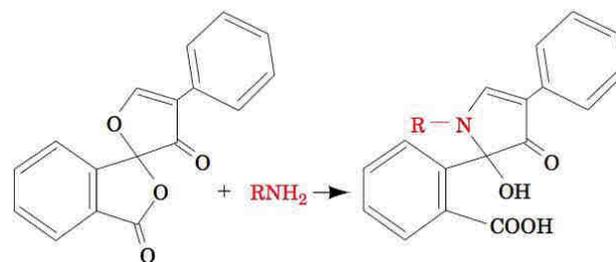
**c. As bandas de um gel podem ser detectadas por coloração, contagem radioativa ou immunoblotting**

As bandas resultantes de uma separação por eletroforese em gel podem ser localizadas por várias técnicas. As proteínas em geral são visualizadas por coloração. O **azul brilhante de Coomassie**,



**Azul brilhante de Coomassie**

o corante mais amplamente utilizado, é aplicado mergulhando-se o gel em uma solução ácida e alcoólica contendo o corante. Essa solução fixa a proteína por desnaturação e o corante forma um complexo com a proteína. O excesso de corante é retirado lavando-se o gel exaustivamente com uma solução ácida ou por descoloração eletroforética. Bandas proteicas contendo um mínimo de  $0,1 \mu\text{g}$  de proteína podem ser detectadas dessa maneira. Bandas contendo menos do que essa quantidade de proteína podem ser visualizadas por meio de **coloração com prata**, que é  $\sim 50$  vezes mais sensível, porém é uma técnica mais difícil de ser realizada. Os **corantes SYPRO**, recentemente desenvolvidos, os quais fluorescem muito sob luz ultravioleta quando ligados a proteínas, são tão sensíveis quanto a coloração com prata, mas mais fáceis de aplicar. A **fluorescamina**, um corante de proteínas amplamente utilizado, é uma molécula não fluorescente que reage com aminas primárias, como resíduos de lisina, gerando outro produto que é altamente fluorescente sob UV.



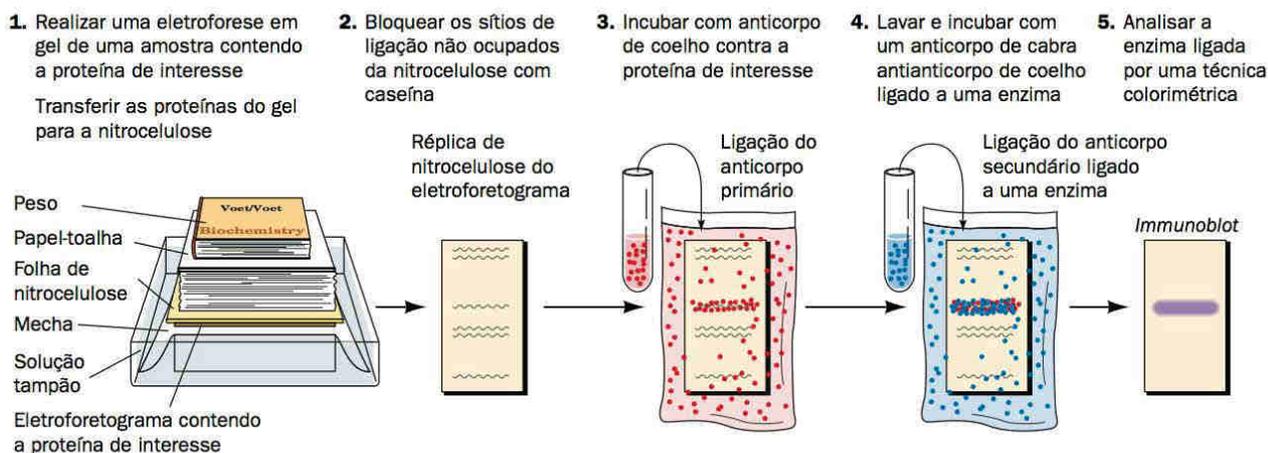
**Fluorescamina**  
(não fluorescente)

**Aduto de fluorescamina**  
(altamente fluorescente)

As proteínas, assim como outras substâncias, podem ser detectadas verificando-se a absorção de UV ao longo do gel. Se a amostra for radioativa, o gel pode ser secado a vácuo para formar uma espécie de celofane, ou então ser coberto com um filme plástico e, depois, preso sobre uma folha de filme de raios X. Após um período de tempo (de poucos minutos até várias semanas, dependendo da intensidade de radiação), o filme é revelado e a autorradiografia resultante mostra as posições dos componentes radioativos nos locais escurecidos do filme (alternativamente, um analisador de imagens, como o *fosforimager* [Seção 5.5D], pode ser empregado para revelar, em poucos minutos, a localização dos componentes radioativos). O gel também pode ser seccionado transversalmente em vários pedaços, e o nível de radiação em cada pedaço pode ser determinado com um **contador de cintilação**. Esse método produz resultados quantitativamente mais precisos do que a autorradiografia. Os materiais de uma amostra também podem ser eluídos dos pedaços de um gel para identificação ou posterior tratamento.

Se um anticorpo contra a proteína de interesse estiver disponível, é possível detectar especificamente essa proteína em um gel, mesmo na presença de várias outras proteínas, por **immunoblot** (também conhecido como **Western blot**). Essa técnica é uma variação do **Southern blotting** (Seção 5.5D) que utiliza uma técnica semelhante ao Elisa (Seção 6.1Da) para detectar a(s) proteína(s) de interesse (Fig. 6.23):

**1.** O eletroforetograma de um gel já pronto é transferido (*blotted*) para uma folha de nitrocelulose (semelhante à Fig. 5.48), que liga proteínas forte e inespecificamente (mem-



**FIGURA 6.23** Detecção de proteínas por *immunoblotting*.

branas de náilon ou fluoreto de polivinilideno [PVDF, de *polyvinylidene fluoride*] também podem ser utilizadas).

**2.** Os sítios de adsorção em excesso na membrana são bloqueados com uma proteína inespecífica, como a **caseína** (proteína do leite; nessa técnica em geral se usa leite desnatado), para evitar a adsorção inespecífica dos anticorpos (que também são proteínas) utilizados nas etapas 3 e 4.

**3.** A membrana é tratada com o anticorpo específico contra a proteína de interesse (anticorpo primário). Esse anticorpo em geral é de coelho.

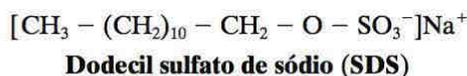
**4.** Depois de lavar a membrana para retirar o anticorpo primário que não ligou, incuba-se ela com um anticorpo de cabra específico para anticorpos de coelho, ao qual uma enzima de fácil detecção foi covalentemente ligada (anticorpo secundário).

**5.** Depois de lavar a membrana para retirar o anticorpo secundário não ligado, a enzima no anticorpo secundário ligado é analisada por uma reação que gera cor, levando ao aparecimento de bandas coloridas na nitrocelulose no local onde a proteína de interesse se ligou.

Alternativamente, o anticorpo primário usado na etapa 3 pode ser marcado com o isótopo radioativo  $^{125}\text{I}$ , o anticorpo não ligado é então removido por lavagem e a posição da proteína ligada na membrana é revelada por autorradiografia.

### C. SDS-PAGE

Os sabões e os detergentes são moléculas anfipáticas (Seção 2.1Ba) e fortes agentes desnaturantes de proteínas, pelas razões explicadas na Seção 8.4E. O **dodecil sulfato de sódio** (SDS, de *sodium dodecyl sulfate*),



um detergente que com frequência é utilizado em preparações bioquímicas, liga-se tenazmente às proteínas, fazendo com que elas adotem uma forma alongada (de bastão). A maioria das proteínas liga-se ao SDS em uma mesma proporção, de 1,4 g de SDS para cada 1 g de proteína (cerca de

uma molécula de SDS para cada dois aminoácidos). Grande parte da carga negativa do SDS mascara a carga intrínseca da proteína; logo, as proteínas tratadas com SDS tendem a apresentar relações carga-massa idênticas e formas semelhantes.

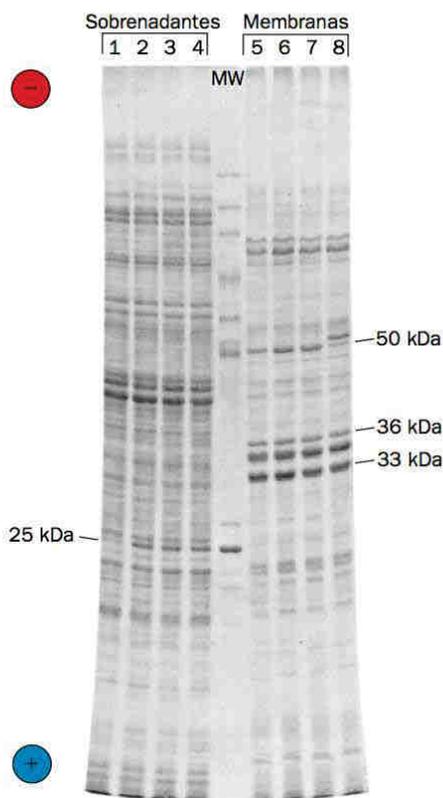
Consequentemente, a *eletroforese de proteínas em um gel de poliacrilamida contendo SDS* separa as amostras na ordem das suas massas moleculares devido ao efeito filtrador do gel. A Fig. 6.24 fornece um exemplo do poder de resolução e da reprodutibilidade do **SDS-PAGE**.

As massas moleculares de proteínas “normais” são frequentemente determinadas com uma exatidão de 5 a 10% por SDS-PAGE. As mobilidades relativas das proteínas nesses géis variam linearmente com o logaritmo de suas massas moleculares (Fig. 6.25). Na prática, a massa molecular de uma proteína é determinada realizando a eletroforese da proteína juntamente com várias proteínas “padrão” de massas moleculares conhecidas próximas à da proteína de interesse.

Muitas proteínas consistem em mais de uma cadeia polipeptídica (Seção 8.5A). O tratamento com SDS rompe as interações não covalentes entre essas subunidades. Assim, o SDS-PAGE fornece as massas moleculares das subunidades proteicas e não as da proteína intacta, a menos que as subunidades estejam ligadas por ligações dissulfeto. Contudo, mercaptoetanol é frequentemente adicionado aos géis de SDS-PAGE para desfazer, por redução, essas ligações dissulfeto (Seção 7.1B).

### D. Focalização isoeletrica

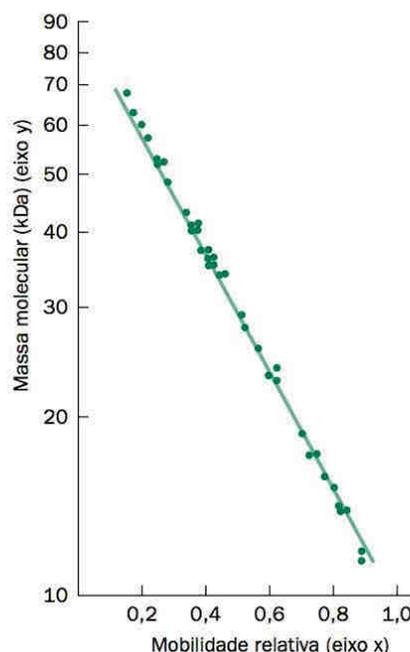
Uma proteína possui grupos carregados de ambas polaridades e, portanto, apresenta um ponto isoeletrico,  $pI$ , que é o pH no qual a proteína é imóvel em um campo elétrico (Seção 4.1D). Se uma mistura de proteínas é submetida à *eletroforese por meio de uma solução que possua um gradiente de pH estável, na qual o pH aumenta, aos poucos, do ânodo para o cátodo, cada proteína migrará para uma posição do gradiente de pH que corresponda ao seu ponto isoeletrico*. Se uma molécula proteica difundir para fora dessa posição, sua carga mudará à medida que ela for para uma região de pH diferente, e as forças eletroforéticas resultantes levarão a proteína de volta para a sua posição isoeletrica. Cada espécie de pro-



**FIGURA 6.24 SDS-PAGE.** O eletroforetograma de uma eletroforese de disco com SDS mostra a separação das proteínas do sobrenadante (*esquerda*) e das frações da membrana (*direita*) de algumas linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*. Amostras de 200 µg de proteína foram corridas paralelamente em um gel de 35 cm de comprimento por 0,8 mm de largura contendo 10% de poliacrilamida. A canaleta Mr (massa relativa) contém os padrões de massa molecular. (Cortesia de Giovanna F. Ames, University of California em Berkeley, EUA.)

teína é, portanto, “focalizada” em uma faixa estreita próximo ao seu ponto isoelétrico, que pode ser de até 0,01 unidade de pH. Por isso, essa técnica foi denominada **focalização isoelétrica (IEF, de isoelectric focusing)**.

O gradiente de pH produzido pela mistura de dois tampões diferentes em proporções constantemente variáveis é instável em um campo elétrico, pois os íons do tampão migram para o eletrodo de polaridade oposta. Por isso, o gradiente de pH na IEF é formado por uma mistura de oligômeros de baixa massa molecular (600 a 900 D) que possuem grupos alifáticos amino e carboxílico (Fig. 6.26), que apresentam uma série de pontos isoelétricos. Sob a influência de um campo elétrico em solução, cada um desses **anfólitos** (eletrólitos anfotéricos) migrará para seu ponto isoelétrico. Conseqüentemente, os anfólitos mais ácidos se agrupam no ânodo e os progressivamente mais básicos se posicionam mais próximos ao cátodo. O gradiente de pH, que é mantido por um campo elétrico de ~1.000 V, origina-se pela ação tamponante desses anfólitos. A dissipação do gradiente de pH por convecção é evitada realizando-se a

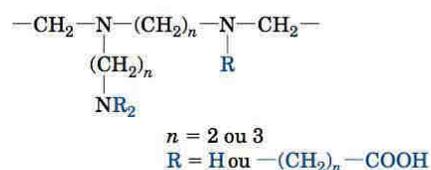


**FIGURA 6.25 Relação logarítmica entre a massa molecular de uma proteína e sua mobilidade eletroforética relativa em SDS-PAGE.** A relação de 37 polipeptídeos, que variam de 11 a 70 kDa, foi colocada no gráfico. (Segundo Weber, K., and Osborn, M., *J. Biol. Chem.* **244**, 4406 [1969].)

IEF em um gel de poliacrilamida, cilíndrico ou plano, pouco concentrado. Os géis de IEF em geral contêm ~6 M de ureia, um potente agente desnaturante que, ao contrário do SDS, não possui carga e, portanto, não afeta diretamente a carga de uma proteína.

Uma forma alternativa de IEF utiliza géis contendo **gradientes de pH imobilizados**. Esses géis são produzidos com derivados de acrilamida ligados covalentemente a anfólitos. Utilizando um equipamento de preparar gradiente (Fig. 6.7), um gel contendo um gradiente de pH imobilizado é polimerizado a partir de uma mistura de derivados de acrilamida com pKs diferentes e que variam continuamente, de forma que o pH do gel varia gradualmente de uma extremidade para a outra.

O fato da IEF separar as proteínas em bandas estreitas torna-a uma ferramenta analítica e preparativa muito útil. De fato, muitas preparações proteicas antes consideradas homogêneas foram separadas em vários componentes por IEF. Essa técnica pode ser combinada com a eletroforese em uma técnica extremamente poderosa de separação bidimensional, denominada **eletroforese em gel bidimensional**



**FIGURA 6.26 Forma geral dos anfólitos utilizados na IEF.**



**FIGURA 6.27 Eletroforese em gel bidimensional (eletroforese 2D).** Esse autorradiograma mostra a separação das proteínas de *E. coli* por eletroforese 2D (IEF na horizontal e SDS-PAGE na vertical). Uma amostra de 10  $\mu\text{g}$  de proteínas de *E. coli* que havia sido marcada com aminoácidos contendo  $^{14}\text{C}$  foi submetida à IEF em um tubo de gel de poliacrilamida de  $2,5 \times 130$  mm contendo ureia. O gel foi depois retirado do tubo, colocado em contato com uma das bordas de uma fatia de um gel de SDS-poliacrilamida e submetido à eletroforese. Mais de 1.000 manchas foram contadas no autorradiograma original, que resultou de uma exposição de 825 horas. (Cortesia de Patrick O'Farrell, University of California em São Francisco, EUA.)

(**eletroforese 2D**) (Fig. 6.27). Até 5.000 proteínas podem ser observadas em um único eletroforetograma bidimensional. Assim, a eletroforese 2D é uma ferramenta de extrema valia para a **proteômica** (o estudo do **proteoma** que, em analogia com o termo “genoma”, é definido como o conjunto de todas as proteínas expressas por uma célula ou organismo, mas com ênfase na quantificação, na localização, nas modificações, nas interações e nas atividades, bem como na identificação). Bandas individuais de proteínas em um gel corado podem ser cortadas do gel (com um bisturi ou por um robô guiado pela imagem digitalizada do gel obtida com um *scanner* ou com uma câmera digital), descoradas, e a proteína pode ser eluída do fragmento de gel para identificação e/ou caracterização, em geral por espectrometria de massa (Seção 7.1J). Variantes de proteínas podem ser encontradas comparando-se as posições e a intensidade das bandas em géis 2D de preparações semelhantes. Isso pode ser feito com a ajuda de um computador após a obtenção das imagens digitalizadas dos géis corados. Vários géis 2D de referência estão disponíveis, com esse propósito, na rede de informação pública, nas bases de dados acessíveis listadas em <http://www.expasy.org>. Essas bases de dados contêm imagens de géis 2D de vários organismos e tecidos, com muitas das proteínas já identificadas.

### E. Eletroforese capilar

Mesmo que as várias formas de eletroforese em gel sejam técnicas comuns e altamente eficazes para separar moléculas carregadas, elas em geral requerem uma hora ou mais

de corrida e são difíceis de quantificar e automatizar. Essas desvantagens são contornadas pelo uso da **eletroforese capilar (EC)**, técnica na qual a eletroforese é realizada em capilares muito finos (10 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno) feitos de sílica, vidro ou plástico. Esses capilares estreitos dissipam rapidamente o calor e, assim, permitem o uso de campos elétricos altos (geralmente 100 a 300  $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , cerca de 10 vezes maior do que aquele da maioria das outras técnicas), o que reduz para poucos minutos os tempos de separação. Essas separações rápidas, por sua vez, minimizam o alargamento das bandas causado pela difusão, fornecendo assim separações extremamente nítidas. Os capilares podem ser preenchidos com tampão (como na eletroforese de fronteira móvel, mas aqui o diâmetro muito fino do capilar elimina totalmente a convecção [importante fator que leva à mistura das moléculas que estão em processo de separação]). Também podem ser preenchidos com gel de SDS-poliacrilamida (separação de acordo com a massa molecular; Seção 6.4C) ou anfólitos (IEF; Seção 6.4D). Essas técnicas de EC apresentam uma resolução extremamente alta e podem ser automatizadas da mesma maneira que a HPLC, isto é, com aplicação da amostra automatizada e detecção da amostra na própria linha de processamento. Como a EC é capaz de separar apenas pequenas quantidades de material, ela está limitada a ser utilizada como técnica analítica.

## 5 ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Se um recipiente contendo areia e água for sacudido e depois deixado parado, a areia irá sedimentar rapidamente para o fundo do recipiente devido à influência da gravidade terrestre (aceleração  $g$  de  $9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ ). No entanto, as macromoléculas em solução, que sofrem o mesmo campo gravitacional, não exibem nenhuma sedimentação perceptível, pois o movimento ao acaso causado pela energia cinética (Browniano) as mantém distribuídas uniformemente na solução. *Apenas quando forem aplicadas altas acelerações é que o comportamento de sedimentação das macromoléculas irá lembrar aquele dos grãos de areia.*

A ultracentrifuga foi desenvolvida por volta de 1923 pelo bioquímico sueco The Svedberg. Utilizando esse instrumento, Svedberg demonstrou, pela primeira vez, que as proteínas são macromoléculas de composições homogêneas e que muitas proteínas são compostas por subunidades. Em poucas décadas, a ultracentrifugação tornou-se uma ferramenta indispensável para o fracionamento de proteínas, ácidos nucleicos e partículas subcelulares. Ultracentrifugas modernas podem atingir velocidades de sedimentação de até 150.000 rpm (revoluções por minuto), gerando campos de centrifugação de mais de 1 milhão  $\times g$ . Nesta seção, discute-se a teoria e a prática da ultracentrifugação.

### A. Sedimentação

A velocidade na qual uma partícula sedimenta na ultracentrífuga está relacionada com a sua massa. A força,  $F_{\text{sedimentação}}$ , que atua para sedimentar uma partícula de massa  $m$  e que está localizada a uma distância  $r$  do eixo ao

redor do qual está girando com uma velocidade angular  $\omega$  (em radianos  $\cdot$  s<sup>-1</sup>) é a força centrífuga ( $m\omega^2r$ ) que atua sobre a partícula menos a força de empuxo ( $V_p\rho\omega^2r$ ) exercida pela solução:

$$F_{\text{sedimentação}} = m\omega^2r - V_p\rho\omega^2r \quad [6.10]$$

Aqui,  $V_p$  é o volume da partícula e  $\rho$  é a densidade da solução. Entretanto, o movimento da partícula através da solução, como visto no estudo sobre eletroforese, sofre ação oposta da força de atrito:

$$F_{\text{fricção}} = vf \quad [6.7]$$

onde  $v = dr/dt$  é a taxa de migração da partícula em sedimentação e  $f$  é seu coeficiente de atrito. O coeficiente de atrito da partícula pode ser determinado a partir de medidas de sua velocidade de difusão.

Sob a influência da força gravitacional (centrífuga), a partícula acelera até que as forças sobre ela entrem em equilíbrio perfeito:

$$m\omega^2r - V_p\rho\omega^2r = vf \quad [6.11]$$

A massa de 1 mol de partículas,  $M$ , é

$$M = mN \quad [6.12]$$

onde  $N$  é o número de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23}$ ). Logo, o volume da partícula,  $V_p$ , pode ser expresso em termos da sua massa molar:

$$V_p = \bar{V}m = \frac{\bar{V}M}{N} \quad [6.13]$$

onde  $\bar{V}$ , o **volume específico parcial** da partícula, é a mudança de volume quando 1 g (peso seco) de partículas é dissolvido em um volume infinito do soluto. Para a maioria das proteínas dissolvidas em água pura a 20°C,  $\bar{V}$  é próximo a 0,73 cm<sup>3</sup>  $\cdot$  g<sup>-1</sup> (Tabela 6.4). De fato, para proteínas com composição conhecida de aminoácidos,  $\bar{V}$  pode ser calculado, com boa aproximação, pela soma dos volumes específicos parciais dos resíduos de aminoácidos que as compõem, indicando assim que os átomos nas proteínas estão bem compactados (Seção 8.3Bc).

#### a. Uma partícula pode ser caracterizada por sua velocidade de sedimentação

Substituindo as Equações [6.12] e [6.13] na Equação [6.11] dá-se origem a

$$vf = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2r}{N} \quad [6.14]$$

Agora define-se o **coeficiente de sedimentação**,  $s$ , como

$$s = \frac{v}{\omega^2r} = \frac{1}{\omega^2} \left( \frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf} \quad [6.15]$$

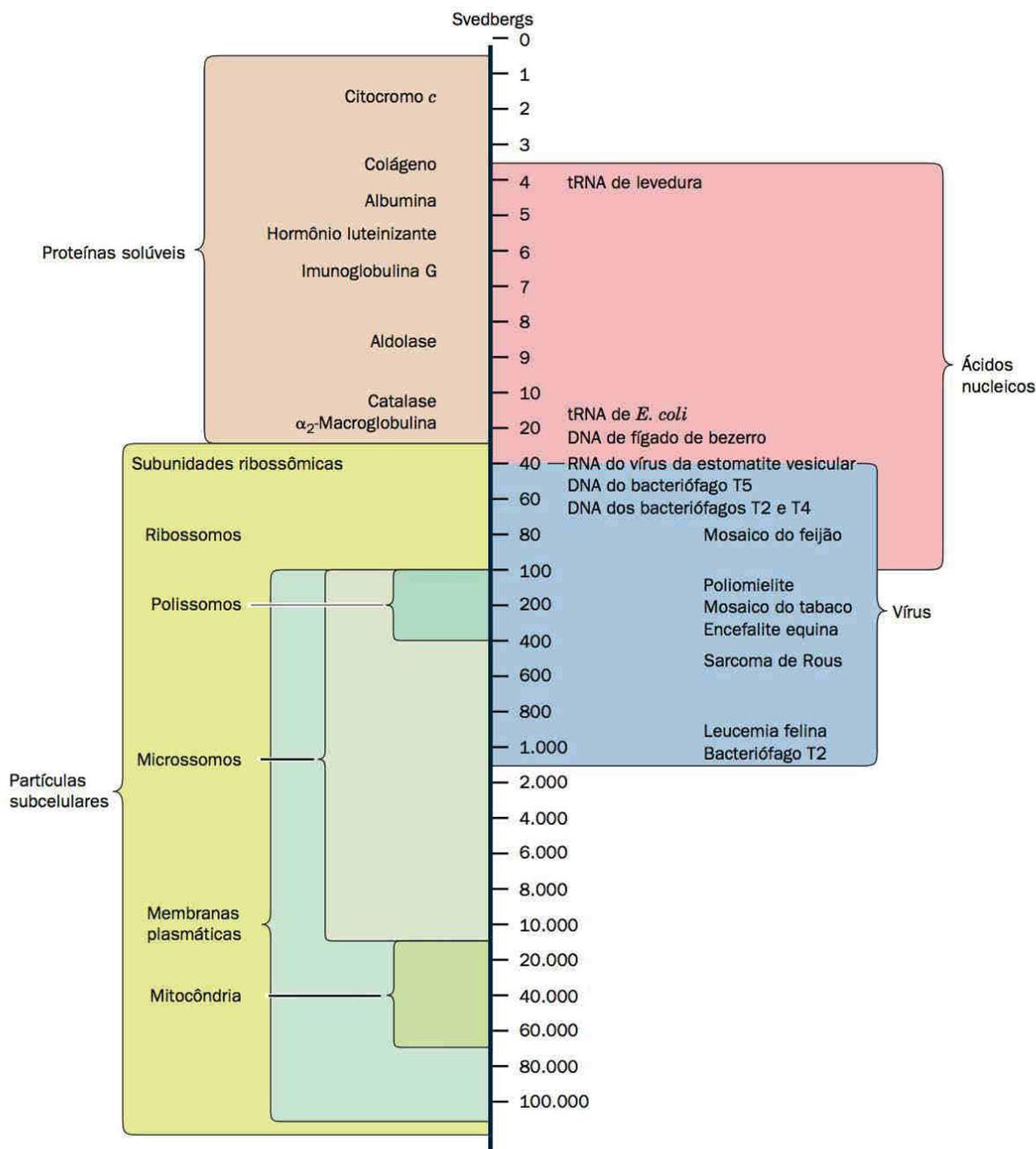
O coeficiente de sedimentação, uma grandeza que é análoga à mobilidade eletroforética (Equação [6.9]) por ser a velocidade por unidade de força, em geral é expresso em unidades de 10<sup>-13</sup> s, que são conhecidas como **svedbergs (S)**. Para fins de uniformidade, o coeficiente de sedimentação em geral é corrigido para o valor que teria a 20°C em um solvente de densidade e viscosidade iguais às da água pura. Isso é simbolizado por  $s_{20,w}$ . A Tabela 6.4 e a Fig. 6.28 indicam os valores de  $s_{20,w}$  em svedbergs de vários materiais biológicos.

A Equação [6.15] indica que a massa de uma partícula,  $m = M/N$ , pode ser determinada a partir da medida do seu

**TABELA 6.4** Constantes físicas de algumas proteínas

Proteína	Massa molecular (kDa)	Volume específico parcial, $\bar{V}_{20,w}$ (cm <sup>3</sup> $\cdot$ g <sup>-1</sup> )	Coefficiente de sedimentação $s_{20,w}$ (S)	Razão de atrito $f/f_0$
Lipase (leite)	6,7	0,714	1,14	1,190
Ribonuclease A (pâncreas bovino)	12,6	0,707	2,00	1,066
Citocromo c (coração bovino)	13,4	0,728	1,71	1,190
Mioglobina (coração equino)	16,9	0,741	2,04	1,105
$\alpha$ -Quimotripsina (pâncreas bovino)	21,6	0,736	2,40	1,130
Crotoxina (cascavel)	29,9	0,704	3,14	1,221
Concanavalina B (feijão-de-porco)	42,5	0,730	3,50	1,247
Toxina diftérica	70,4	0,736	4,60	1,296
Citocromo-oxidase ( <i>P. aeruginosa</i> )	89,8	0,730	5,80	1,240
Lactato-desidrogenase H (galinha)	150	0,740	7,31	1,330
Catalase (fígado equino)	222	0,715	11,20	1,246
Fibrinogênio (humano)	340	0,725	7,63	2,336
Hemocianina (lula)	612	0,724	19,50	1,358
Glutamato-desidrogenase (fígado bovino)	1.015	0,750	26,60	1,250
Proteína do vírus do mosaico amarelo do nabo	3.013	0,740	48,80	1,470

Fonte: Smith, M.H., in Sober, H.A. (Ed.), *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (2nd ed.), p. C-10, CRC Press (1970).



**FIGURA 6.28** Coeficientes de sedimentação em svedbergs (S) para alguns materiais biológicos. (Segundo diagrama fornecido por Beckman Coulter, Inc.)

coeficiente de sedimentação,  $s$ , e da densidade da solução,  $\rho$ , se seu coeficiente de atrito,  $f$ , e seu volume específico parcial,  $\bar{V}$ , forem conhecidos. De fato, antes de 1970, a maioria das determinações das massas macromoleculares era realizada utilizando-se **ultracentrifuga analítica**, um equipamento no qual as velocidades de sedimentação das moléculas que estão sendo centrifugadas podem ser medidas opticamente (as massas de macromoléculas são muito altas para serem determinadas com exatidão por técnicas físicas clássicas, como,

por exemplo, abaixamento do ponto de fusão ou medição da pressão osmótica). Apesar do avanço de métodos mais simples de determinação de massas moleculares, como a cromatografia de gel filtração (Seção 6.3Ba) e SDS-PAGE (Seção 6.4C), quase terem levado ao desaparecimento do uso da ultracentrifugação analítica, instrumentos desenvolvidos recentemente levaram ao ressurgimento do uso dessa técnica. Ela é particularmente útil para a caracterização de sistemas de macromoléculas associadas.

### b. A razão de atrito é um indicativo da solvatação e da forma molecular

Para uma partícula esférica não solvatada de raio  $r_p$ , o coeficiente de atrito é determinado pela **equação de Stokes**:

$$f = 6\pi\eta r_p \quad [6.16]$$

em que  $\eta$  é a **viscosidade** da solução. A solvatação aumenta o coeficiente de atrito de uma partícula por aumentar seu **volume hidrodinâmico** ou efetivo. Além disso,  $f$  é mínimo quando a partícula é uma esfera. Isso porque a área da superfície de uma partícula não esférica é maior do que a área de uma esfera de mesmo volume, devendo, portanto, em média, apresentar uma área de superfície contra o movimento maior do que a que uma esfera apresenta.

O coeficiente de atrito,  $f$ , de uma partícula de massa  $m$  e o volume específico parcial conhecido pode ser determinado por ultracentrifugação utilizando-se a Equação [6.15]. O **raio Stokes** ou efetivo de uma partícula em solução pode ser calculado resolvendo a Equação [6.16] para  $r_p$ , dados os valores  $f$  e  $\eta$  determinados experimentalmente. Já o coeficiente de atrito mínimo de uma partícula,  $f_0$ , pode ser calculado a partir da massa e do volume específico parcial da partícula, supondo que ela seja esférica ( $V_p = \frac{4}{3}\pi r_p^3$ ) e não solvatada:

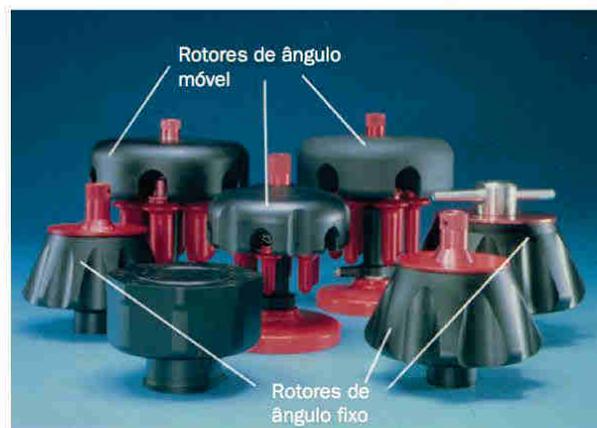
$$f_0 = 6\pi\eta \left( \frac{3M\bar{V}}{4\pi N} \right)^{1/3} \quad [6.17]$$

Se a **razão de atrito**,  $f/f_0$ , de uma partícula for muito maior do que a unidade, deve-se concluir que a partícula está altamente solvatada e/ou significativamente alongada. As razões de atrito de algumas proteínas são apresentadas na Tabela 6.5. Proteínas globulares, que, pelo que se sabe por estudos estruturais, são relativamente compactas e esféricas (Seção 8.3B), possuem razões de atrito que chegam até  $\sim 1,5$ . Moléculas fibrosas como o DNA e a proteína coaguladora do sangue, o **fibrinogênio** (Seção 35.1Aa), apresentam razões de atrito maiores. Na desnaturação, os coeficientes de atrito das proteínas globulares aumentam até duas vezes, pois as proteínas desnaturadas adotam conformações de **espirais aleatórias** flexíveis e oscilantes, nas quais todas as partes da molécula estão em contato com o solvente (Seção 8.1D).

### B. Ultracentrifugação preparativa

As **ultracentrífugas preparativas**, que, como diz o nome, são projetadas para a preparação de amostras, diferem das ultracentrífugas analíticas por não possuírem os dispositivos para a observação das amostras. Os rotores preparativos possuem tubos cilíndricos para as amostras cujos eixos podem ser paralelos, em ângulo ou perpendiculares ao eixo de rotação do rotor, dependendo da finalidade (Fig. 6.29).

Na dedução da Equação [6.15], supôs-se que a sedimentação tenha ocorrido por um meio homogêneo. A sedimentação pode ocorrer, no entanto, em uma solução de uma substância inerte, como sacarose ou CsCl, na qual a concentração e, portanto, a densidade da solução aumentam do topo ao fundo do tubo de centrifugação. O uso desses **gradientes de densidade** melhora muito o poder de resolução



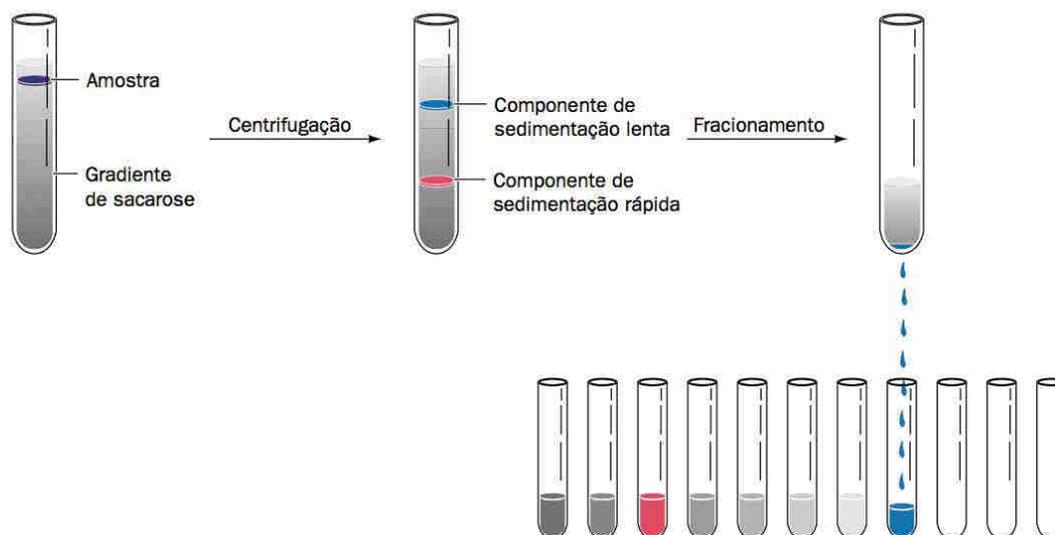
**FIGURA 6.29** Alguns rotores de ultracentrifugação preparativa. Os tubos de amostra dos rotores de ângulo móvel (*ao fundo*) possuem uma dobradiça, de forma que eles balançam da posição vertical para a horizontal à medida que o rotor começa a girar, enquanto os tubos de amostra dos outros rotores têm um ângulo fixo em relação ao eixo de rotação. (Cortesia de Beckman Coulter, Inc.)

da ultracentrífuga. Duas aplicações de gradientes de densidade são amplamente empregadas: (1) **ultracentrifugação de zona** e (2) **ultracentrifugação de equilíbrio em gradiente de densidade**.

#### a. A ultracentrifugação de zona separa partículas de acordo com seus coeficientes de sedimentação

Na ultracentrifugação de zona, uma solução de macromoléculas é cuidadosamente colocada no topo de um gradiente de densidade preparado com um aparelho semelhante àquele da Fig. 6.7. A finalidade do gradiente de densidade é permitir a passagem suave pelas várias zonas macromoleculares, diminuindo a mistura das soluções provocada pela convecção. A sacarose, que forma uma solução xaroposa e bioquimicamente benigna, em geral é usada para formar gradientes de densidade para ultracentrifugação de zona. O gradiente de densidade é, de preferência, superficial, pois a densidade máxima da solução deve ser menor do que a densidade das moléculas de interesse menos densas. Ainda assim, a Equação [6.15] indica que a velocidade de sedimentação de uma macromolécula é mais uma função da massa molecular do que da densidade. Consequentemente, *a ultracentrifugação de zona separa macromoléculas de formas parecidas, com base principalmente nas suas massas moleculares*.

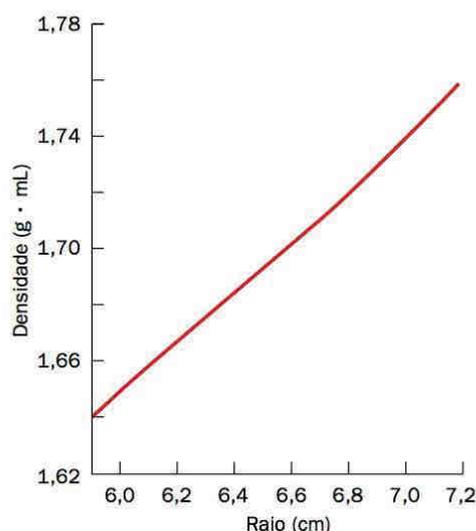
Durante a centrifugação, cada espécie de macromolécula se move através do gradiente a uma velocidade determinada, em grande parte, por seu coeficiente de sedimentação e, portanto, move-se como uma zona, que pode ser separada de outras zonas, como esquematizado na Fig. 6.30. Após a centrifugação, o fracionamento em geral é realizado furando-se o fundo do tubo de centrifugação com uma agulha, permitindo que o seu conteúdo saia em gotas, coletando-se as zonas separadas para posterior análise.



**FIGURA 6.30 Ultracentrifugação de zona.** A amostra é aplicada sobre um gradiente de sacarose (à esquerda). Durante a centrifugação (no meio), cada partícula sedimenta com uma velocidade que depende principalmente da massa da partícula. No final, o tubo de centrifugação é furado, e as partículas separadas (zonas) são coletadas (à direita).

#### b. A ultracentrifugação de equilíbrio em gradiente de densidade separa partículas de acordo com suas densidades

Na **ultracentrifugação de equilíbrio em gradiente de densidade** (alternativamente, **ultracentrifugação isopícnica** [do grego: *isos*, igual + *pyknos*, denso]), a amostra é dissolvida em uma solução relativamente concentrada de uma substância densa e de rápida difusão (e, portanto, de baixa massa molecular), como  $\text{CsCl}$  ou  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ , e é centrifugada a uma alta velocidade até que a solução atinja o equilíbrio. *O alto campo centrífugo faz o soluto de baixa massa molecular formar um forte gradiente de densidade (Fig. 6.31), no qual os componentes da amostra formam bandas nos locais onde suas densidades são*



**FIGURA 6.31 Distribuição da densidade de equilíbrio de uma solução de  $\text{CsCl}$  em uma ultracentrífuga girando a 39.460 rpm.** A densidade inicial da solução era  $1,7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . (Segundo Ifft, J.B., Voet, D.H., and Vinograd, J., *J. Phys. Chem.* **65**, 1138 (1961).)

iguais à densidade da solução; ou seja, em que  $(1 - \bar{V}_p)$  na Equação [6.15] é zero (Fig. 6.32). Essas bandas são coletadas como frações separadas quando o tubo da amostra é furado como descrito anteriormente. A concentração de sal na amostra e, portanto, a densidade da solução, são facilmente determinadas com um **refratômetro Abbé**, um instrumento óptico que mede o índice de refração das soluções.

A técnica do equilíbrio em gradiente de densidade é muitas vezes o método de escolha para separar misturas cujos componentes apresentam grande diferença entre as densidades. Essas substâncias incluem ácidos nucleicos, vírus e algumas organelas subcelulares, como os ribossomos, por exemplo. Entretanto, a ultracentrifugação isopícnica não é eficaz no fracionamento de misturas proteicas, pois a maioria das proteínas possui densidades semelhantes (a alta concentração de sal também pode levar à precipitação por *salting out* ou ainda desnaturar as proteínas). A ultracentrifugação com gradiente de densidade em uma ultracentrífuga analítica foi utilizada para mostrar que a replicação do DNA é semiconservativa (Seção 5.3B).

## 6 FRACIONAMENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Nas partes anteriores deste capítulo, foram discutidas as técnicas utilizadas com mais frequência para isolar e, até certo ponto, caracterizar proteínas. A maioria desses métodos, em geral com algumas modificações, também é regularmente utilizada no fracionamento de ácidos nucleicos de acordo com tamanho, composição e sequência. Também existem muitas técnicas que são aplicáveis apenas a ácidos nucleicos. Nesta seção serão discutidas algumas das técnicas mais úteis que são empregadas para a separação dessas moléculas.

### A. Métodos em solução

Os ácidos nucleicos, nas células, estão invariavelmente associados às proteínas. Uma vez que as células tiverem sido rompidas (Seção 6.1B), os ácidos nucleicos devem ser sepa-