



# Métodos de análise de aminoácidos e proteínas — Parte 1

Felipe Jun Fuzita

# Análise de aminoácidos puros

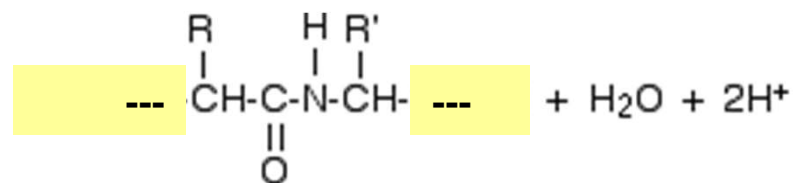
Apenas qualitativas, não são quantitativas.

Normalmente a  
amostra não é  
recuperada

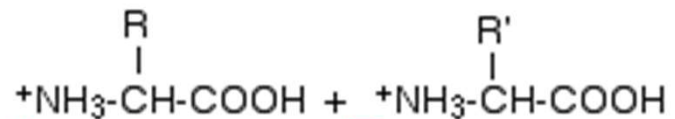
- Análise elementar (C, N, H, O, S).
- Espectroscopia de infravermelho (IFTR).
- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ( $H^1$ -RMN).
- Titulação.
- Medida de atividade ótica.

## Conteúdo de aminoácidos

### Hidrólise total de peptídeos e proteínas



↓ 24 h, 110 °C



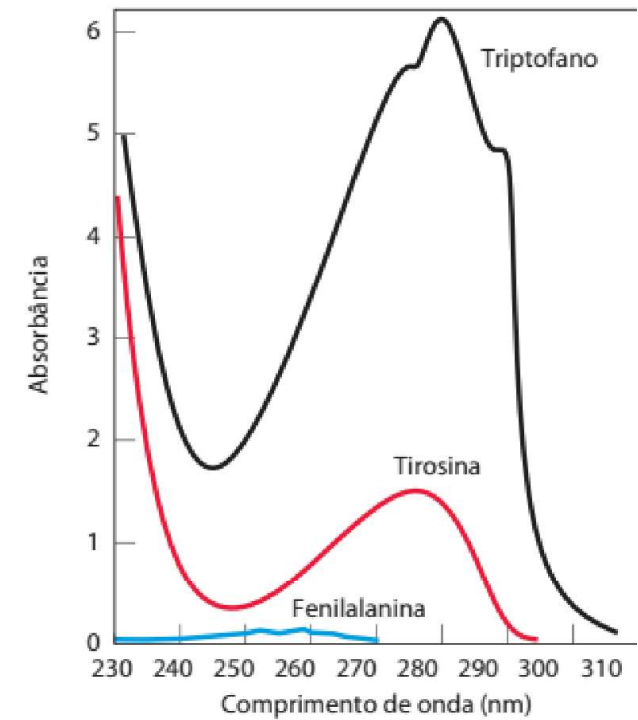
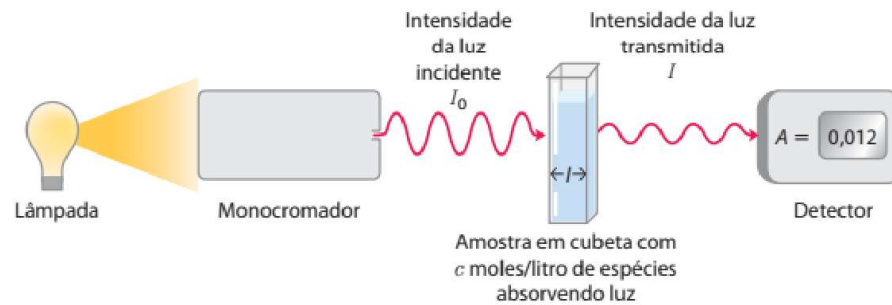
↑ ↑  
Separação, Análise, Identificação e Caracterização

**TABELA 3-3** Composição de aminoácidos de duas proteínas

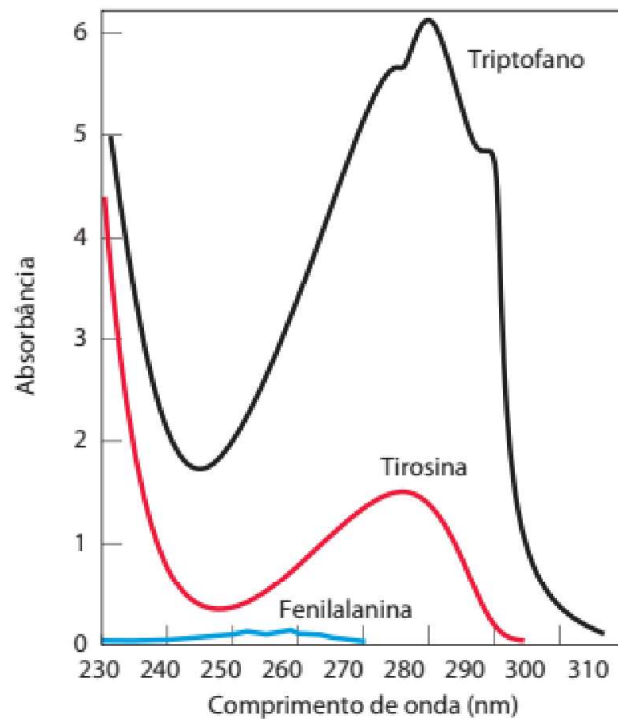
| Aminoácido | Citocromo c bovino              |                       | Quimotripsinogênio bovino       |                       |
|------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
|            | Número de resíduos por molécula | Porcentagem do total* | Número de resíduos por molécula | Porcentagem do total* |
| Ala        | 6                               | 6                     | 22                              | 9                     |
| Arg        | 2                               | 2                     | 4                               | 1,6                   |
| Asn        | 5                               | 5                     | 14                              | 5,7                   |
| Asp        | 3                               | 3                     | 9                               | 3,7                   |
| Cys        | 2                               | 2                     | 10                              | 4                     |
| Gln        | 3                               | 3                     | 10                              | 4                     |
| Glu        | 9                               | 9                     | 5                               | 2                     |
| Gly        | 14                              | 13                    | 23                              | 9,4                   |
| His        | 3                               | 3                     | 2                               | 0,8                   |
| Ile        | 6                               | 6                     | 10                              | 4                     |
| Leu        | 6                               | 6                     | 19                              | 7,8                   |
| Lys        | 18                              | 17                    | 14                              | 5,7                   |
| Met        | 2                               | 2                     | 2                               | 0,8                   |
| Phe        | 4                               | 4                     | 6                               | 2,4                   |
| Pro        | 4                               | 4                     | 9                               | 3,7                   |
| Ser        | 1                               | 1                     | 28                              | 11,4                  |
| Thr        | 8                               | 8                     | 23                              | 9,4                   |
| Trp        | 1                               | 1                     | 8                               | 3,3                   |
| Tyr        | 4                               | 4                     | 4                               | 1,6                   |
| Val        | 3                               | 3                     | 23                              | 9,4                   |
| Total      | 104                             | 102                   | 245                             | 99,7                  |

**Nota:** Em algumas análises usuais, como a hidrólise ácida, Asp e Asn não são distinguidos um do outro, sendo designados em conjunto como Asx (ou B). De forma semelhante, quando Glu e Gln não podem ser distinguidos, eles são designados juntos como Glx (ou Z). Adicionalmente, Trp é destruído por hidrólise ácida. Métodos adicionais devem ser utilizados para se obter uma avaliação precisa do conteúdo completo de aminoácidos.

# Absorbância



- Para proteínas e peptídeos uma limitação é a baixa ocorrência de triptofano.



| Aminoácido                        | Abreviação/<br>símbolo | M <sub>r</sub> * | Valores de pK <sub>a</sub> |                                                     |                              | pI    | Índice de<br>hidropatia <sup>†</sup> | Ocorrência em<br>proteínas (%) <sup>†</sup> |
|-----------------------------------|------------------------|------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|-------|--------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                   |                        |                  | pK <sub>1</sub><br>(—COOH) | pK <sub>2</sub><br>(—NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) | pK <sub>R</sub><br>(grupo R) |       |                                      |                                             |
| Grupos R alifáticos, apolares     |                        |                  |                            |                                                     |                              |       |                                      |                                             |
| Glicina                           | Gly G                  | 75               | 2,34                       | 9,60                                                |                              | 5,97  | −0,4                                 | 7,2                                         |
| Alanina                           | Ala A                  | 89               | 2,34                       | 9,69                                                |                              | 6,01  | 1,8                                  | 7,8                                         |
| Prolina                           | Pro P                  | 115              | 1,99                       | 10,96                                               |                              | 6,48  | −1,6                                 | 5,2                                         |
| Valina                            | Val V                  | 117              | 2,32                       | 9,62                                                |                              | 5,97  | 4,2                                  | 6,6                                         |
| Leucina                           | Leu L                  | 131              | 2,36                       | 9,60                                                |                              | 5,98  | 3,8                                  | 9,1                                         |
| Isoleucina                        | Ile I                  | 131              | 2,36                       | 9,68                                                |                              | 6,02  | 4,5                                  | 5,3                                         |
| Metionina                         | Met M                  | 149              | 2,28                       | 9,21                                                |                              | 5,74  | 1,9                                  | 2,3                                         |
| Grupos R aromáticos               |                        |                  |                            |                                                     |                              |       |                                      |                                             |
| Fenilalanina                      | Phe F                  | 165              | 1,83                       | 9,13                                                |                              | 5,48  | 2,8                                  | 3,9                                         |
| Tirosina                          | Tyr Y                  | 181              | 2,20                       | 9,11                                                | 10,07                        | 5,66  | −1,3                                 | 3,2                                         |
| Triptofano                        | Trp W                  | 204              | 2,38                       | 9,39                                                |                              | 5,89  | −0,9                                 | 1,4                                         |
| Grupos R polares, não carregados  |                        |                  |                            |                                                     |                              |       |                                      |                                             |
| Serina                            | Ser S                  | 105              | 2,21                       | 9,15                                                |                              | 5,68  | −0,8                                 | 6,8                                         |
| Treonina                          | Thr T                  | 119              | 2,11                       | 9,62                                                |                              | 5,87  | −0,7                                 | 5,9                                         |
| Cisteína <sup>†</sup>             | Cys C                  | 121              | 1,96                       | 10,28                                               | 8,18                         | 5,07  | 2,5                                  | 1,9                                         |
| Asparagina                        | Asn N                  | 132              | 2,02                       | 8,80                                                |                              | 5,41  | −3,5                                 | 4,3                                         |
| Glutamina                         | Gln Q                  | 146              | 2,17                       | 9,13                                                |                              | 5,65  | −3,5                                 | 4,2                                         |
| Grupos R carregados positivamente |                        |                  |                            |                                                     |                              |       |                                      |                                             |
| Lisina                            | Lys K                  | 146              | 2,18                       | 8,95                                                | 10,53                        | 9,74  | −3,9                                 | 5,9                                         |
| Histidina                         | His H                  | 155              | 1,82                       | 9,17                                                | 6,00                         | 7,59  | −3,2                                 | 2,3                                         |
| Arginina                          | Arg R                  | 174              | 2,17                       | 9,04                                                | 12,48                        | 10,76 | −4,5                                 | 5,1                                         |
| Grupos R carregados negativamente |                        |                  |                            |                                                     |                              |       |                                      |                                             |
| Aspartato                         | Asp D                  | 133              | 1,88                       | 9,60                                                | 3,65                         | 2,77  | −3,5                                 | 5,3                                         |
| Glutamato                         | Glu E                  | 147              | 2,19                       | 9,67                                                | 4,25                         | 3,22  | −3,5                                 | 6,3                                         |

- Para proteínas e peptídeos uma limitação é a baixa ocorrência de triptofano.

# Proteínas e espectroscopia UV-Vis

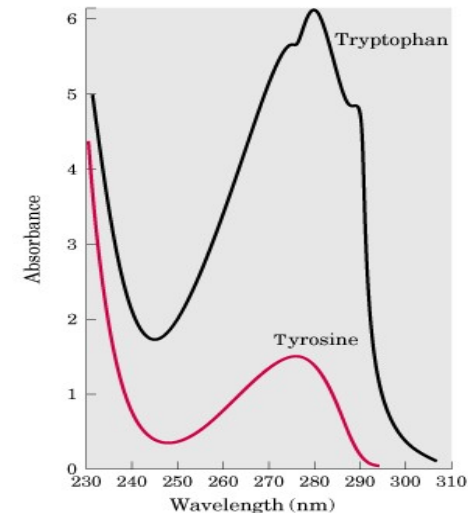
Métodos espectrofotométricos diretos são restritos:

- a proteínas com grupos prostéticos/coenzimas que absorvem no uv-vis.

- à absorção na região de ~230 nm (ligação peptídica)  
*(grande interferência de constituintes celulares).*

- à absorção na região de ~280 nm (resíduos aromáticos)

*proporções de Tyr e Trp variam nas diferentes proteínas. ( $A_{280} = 1$  (cubeta 1 cm)  $\sim 1\text{mg/ml}$ ); interferência de contaminantes, principalmente RNA e DNA ( $A_{260}\text{ nm}$ ).*



Métodos espectrofotométricos indiretos

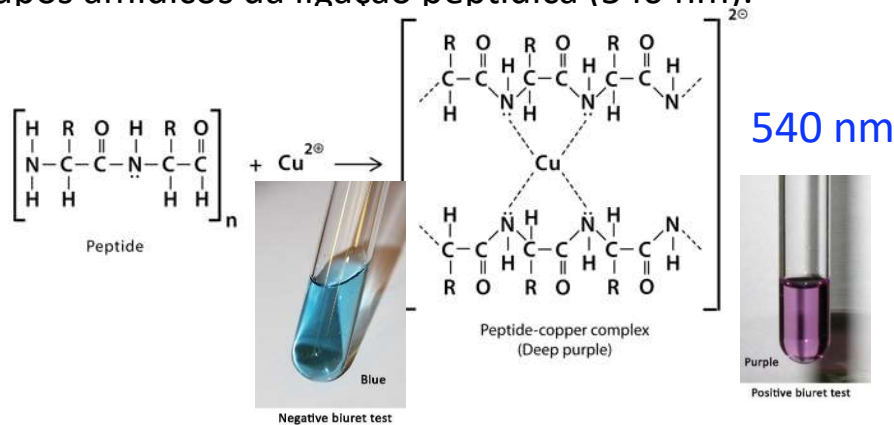
- baseados na absorção de luz visível são gerais e empregados para dosar proteínas em lisados de células e tecidos.

## Métodos indiretos para dosar proteínas

- Baseados na absorção de luz visível por produtos resultantes da interação de proteínas com compostos químicos.

### Método do biureto

- Baseia-se na reação em meio fortemente alcalino entre íons de  $\text{Cu(II)}$  e os grupos amídicos da ligação peptídica (540 nm).



Baixa sensibilidade: detecta [ ]s  $\geq 1 \text{ mg/ml}$

### Método de Folin-Ciocalteu

- Baseia-se na redução de íons de  $\text{Cu}^{+2}$  pelos amino ácidos aromáticos e reação dos íons de  $\text{Cu(I)}$  resultantes com uma mistura de fosfotungstato e fosfomolibdato formando complexos que absorvem na região de 660-700 nm.

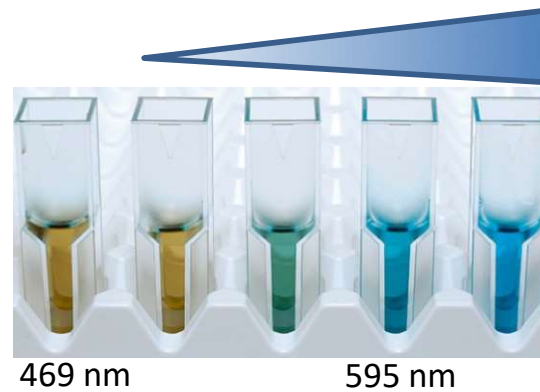
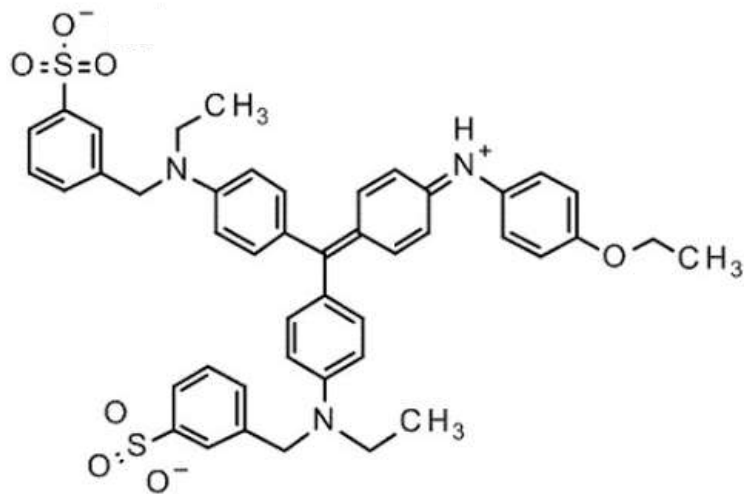
Boa sensibilidade: detecta [ ]s  $\geq 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$

*Desvantagem: pouca especificidade detecta poder redutor, não especificamente proteínas; no caso delas a intensidade depende do conteúdo de resíduos aromáticos; tióis são interferentes.*

# Métodos indiretos para dosar proteínas

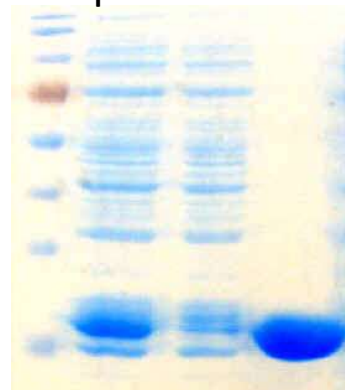
## Método de Bradford (Commassie brilliant blue G)

-Corante forma complexos com proteínas principalmente por meio de interações iônicas com amino ácidos básicos (Lys e Arg) que absorvem luz a de 595 nm (enquanto o reagente absorve a 469 nm).



Solução:  
proteína  $\geq 5 \mu\text{g/ml}$

Revelar proteínas em géis



proteína  $\geq 5 \text{ ng}$

*Desvantagem: intensidade depende do conteúdo de resíduos de Lys e Arg.* Usualmente, a proteína empregada para obter a curva padrão é a albumina de soro bovino.

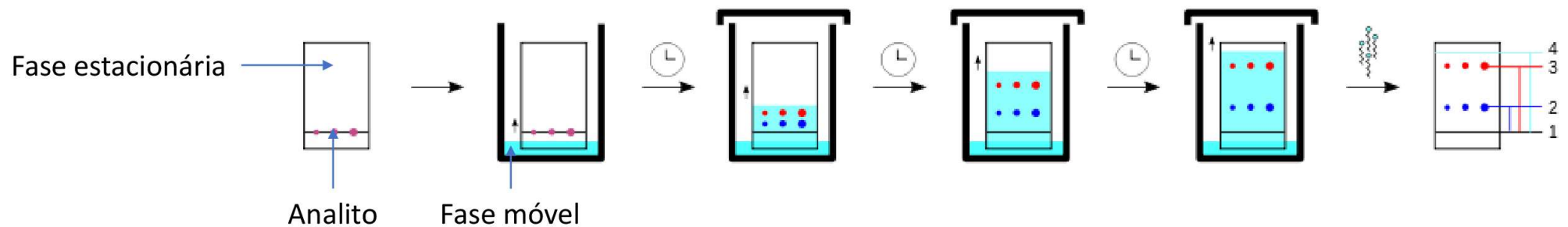
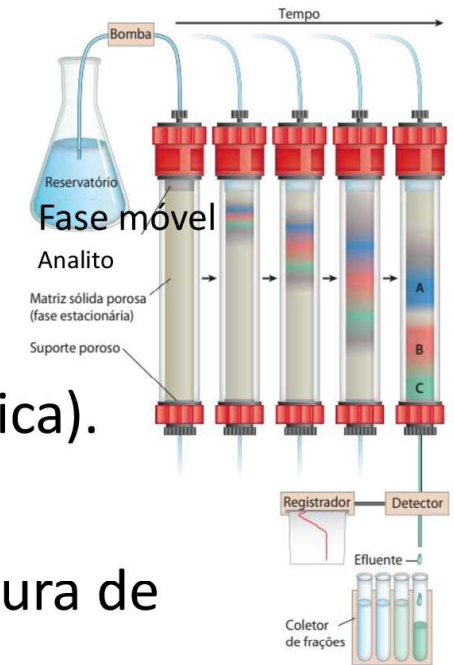
# Análise de misturas de aminoácidos (e proteínas)

Quantitativas e qualitativas.

- Absorbância.
- Eletroforese (papel ou gel poroso).
- Focalização isoelétrica.
- Cromatografia em papel.
- Cromatografia em coluna.
- Espectrometria de massa.

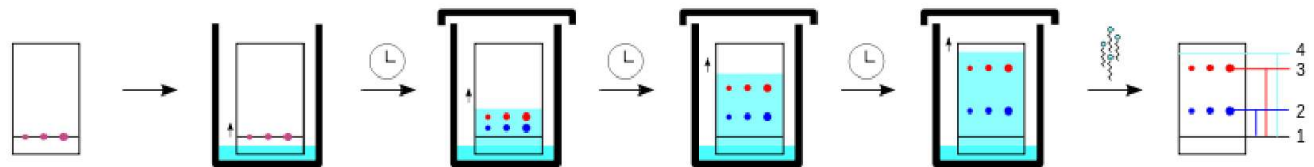
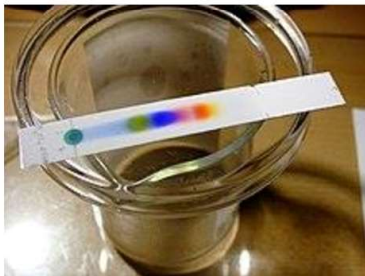
# Cromatografia

- **Analitos:** moléculas a serem separadas.
- **Fase estacionária:** fixa, geralmente porosa e sólida (papel ou sílica).
- **Fase móvel:** líquida ou gasosa, carrega os componentes da mistura de analitos a serem separados.

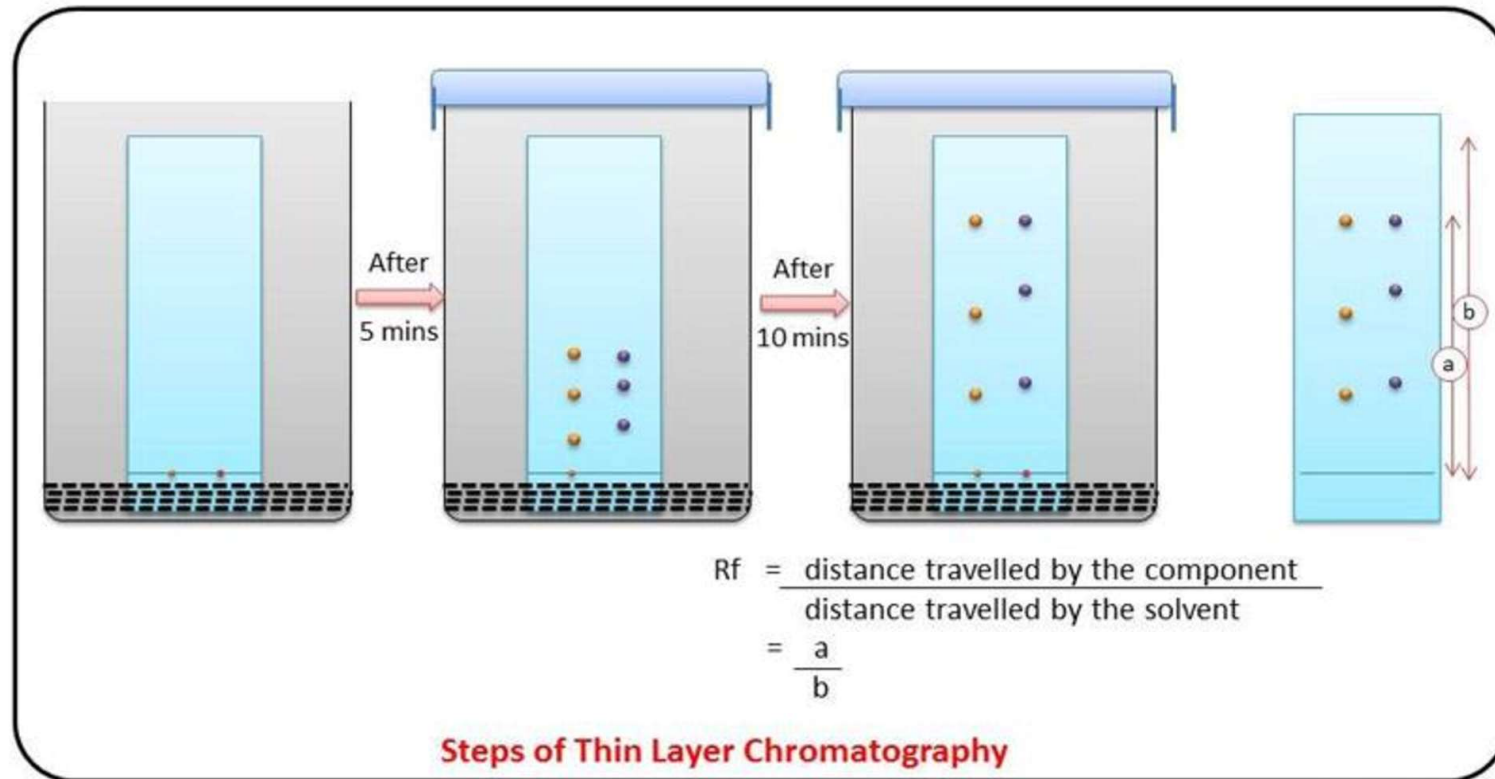


# Cromatografia em camada delgada (CCD)

- Em inglês TLC (Thin Layer Chromatography).
- Fase estacionária: folha de vidro ou plástico revestida por sílica gel, alumina ou celulose.
- Fase móvel: polar, apolar, ou misturas.
- Ambas as fases influenciam nas propriedades de separação.



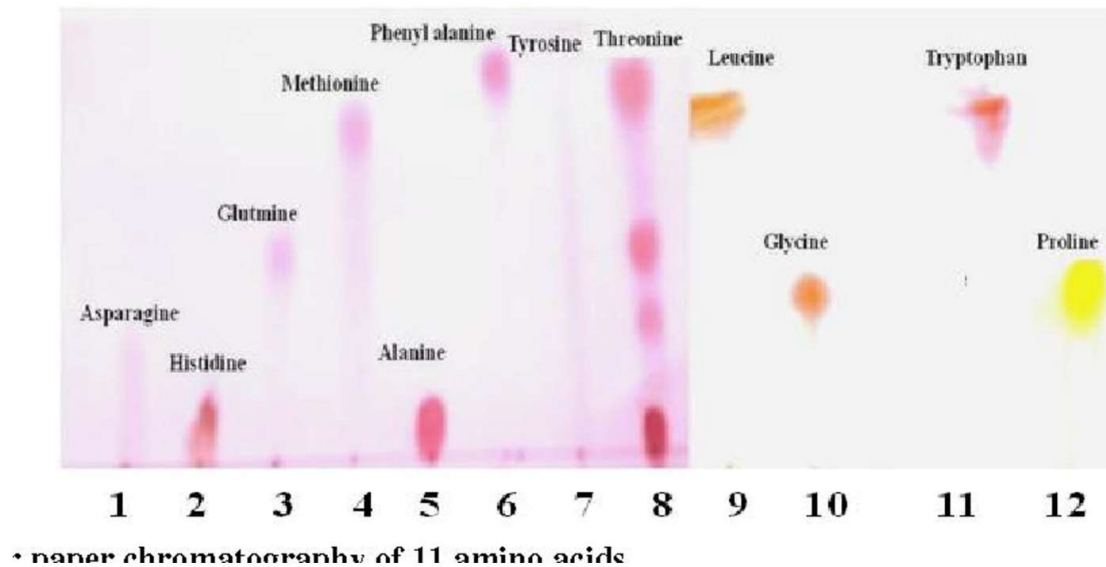
# Cromatografia em camada delgada (TLC)



- Os analitos migrarão em diferentes taxas de acordo com a sua interação com a fase estacionária e sua variada solubilidade na fase móvel.

# Cromatografia em camada delgada (TLC)

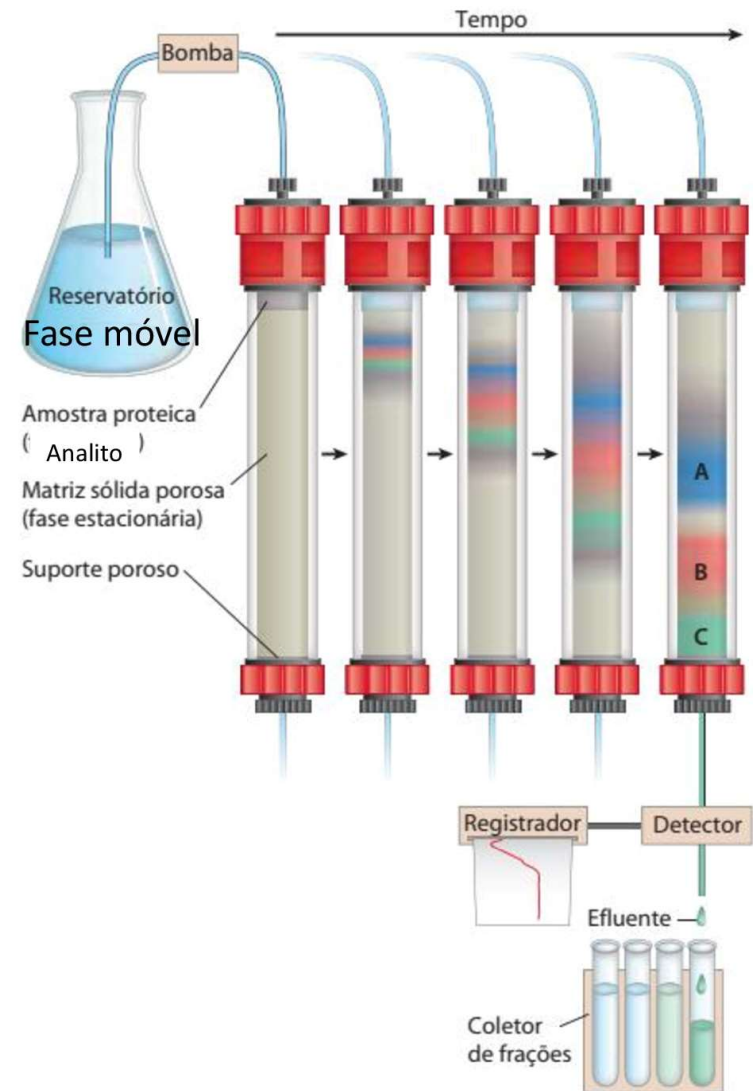
Figure 12-10: Thin-layer chromatography of 11 amino acids [11].



- Devem ser usados padrões, ou modificação química que gere cor específica nos aminoácidos (como acima).

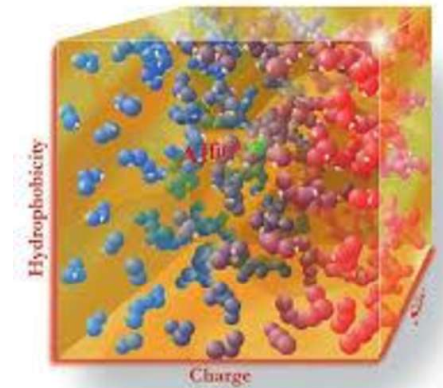
# Cromatografia

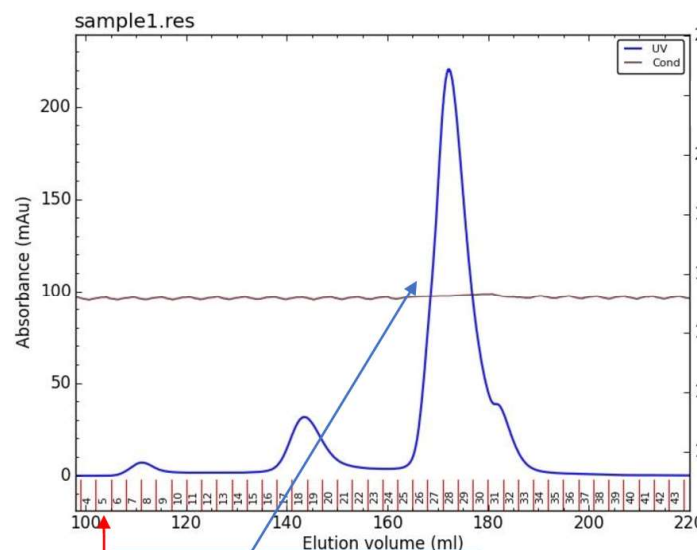
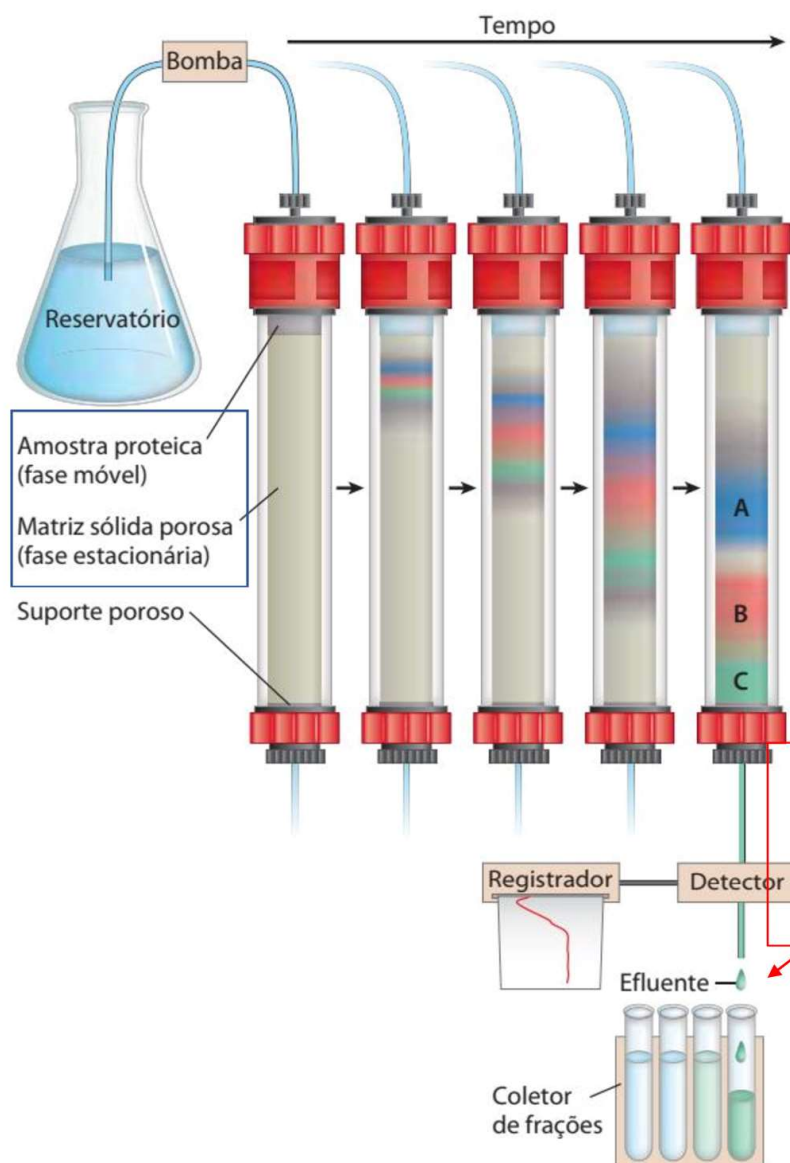
- **Analitos:** moléculas a serem separadas.
- **Fase estacionária:** fixa, geralmente porosa e sólida (papel ou sílica).
- **Fase móvel:** líquida ou gasosa, carrega os componentes da mistura de analitos a serem separados.



# Cromatografia em coluna

- A amostra é recuperada e mantém sua atividade biológica.
- A fase estacionária (resina de sílica) possui diferentes grupos químicos para explorar as propriedades das proteínas.
- A fase móvel (tampão) pode favorecer ou desfavorecer a interação das proteínas com a fase estacionária.



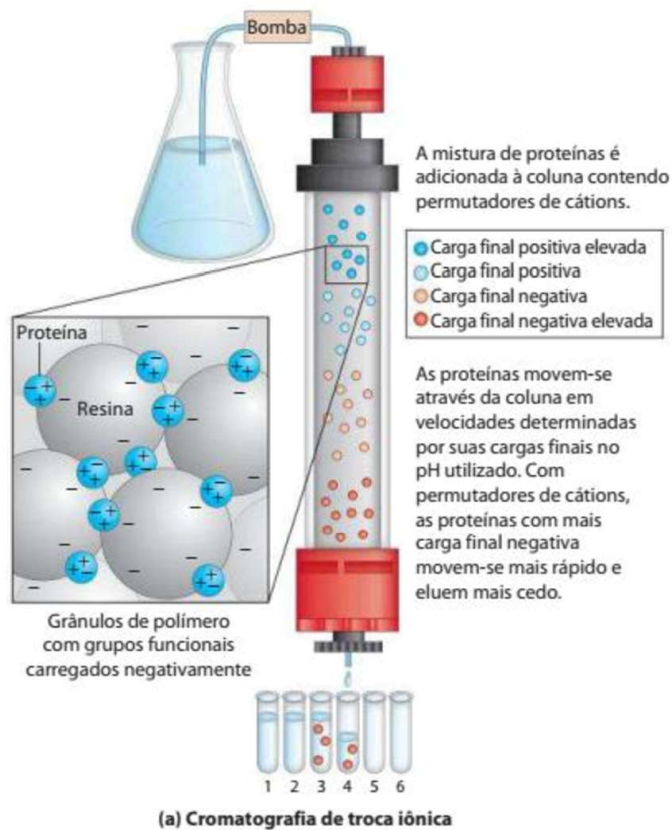


Deteccção de proteína por absorbância em 280 nm (linha azul).

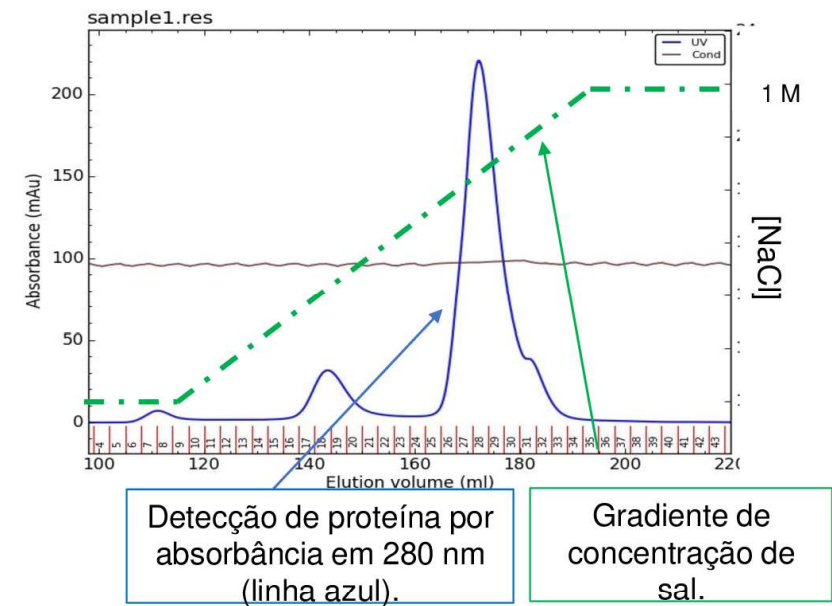
Os traços vermelhos indicam a coleta de uma fração, representada abaixo pelos diferentes tubos

**Fase móvel**: tampão mais amostra  
**Fase estacionária**: resina da coluna  
**Eluição**: processo de passagem da amostra (fase móvel ou eluente) pela coluna (fase estacionária) através do uso de um solvente fluido (geralmente uma solução tampão de pH e concentração de sais conhecidas). Ocorre diluição da amostra.

## Cromatografia em coluna

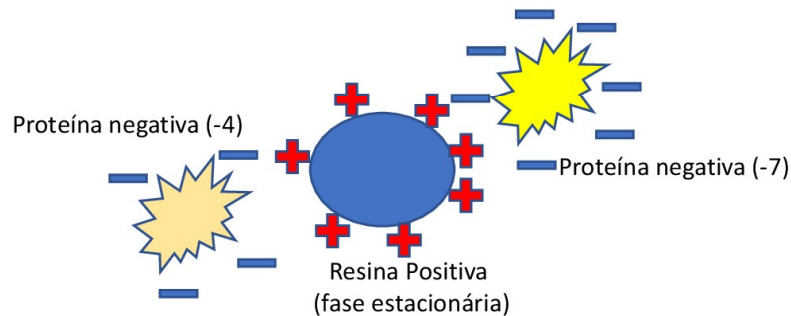


## Cromatografia de Troca Iônica



Vídeo

# Cromatografia de Troca Iônica



Resina positiva: liga moléculas negativas, portanto troca ânions

## Cromatografia de troca aniônica

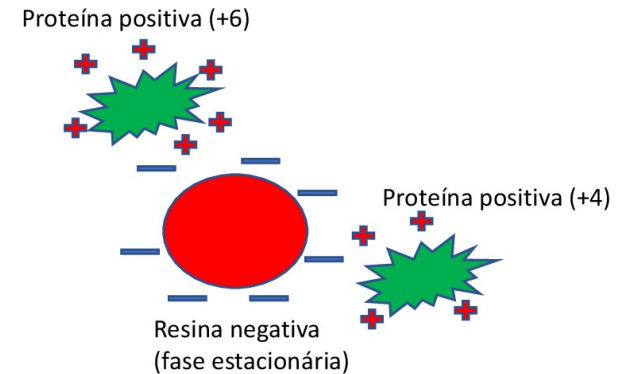
O balanço de cargas da molécula influi no grau de interação.

Quanto maior, mais interação.

Eluição em diferentes frações.

Separação das moléculas por carga.

Proteínas com carga líquida positiva não interagem com a resina negativa.



Resina negativa: liga moléculas positivas, portanto troca cátions

## Cromatografia de troca catiônica

O balanço de cargas da molécula influi no grau de interação.

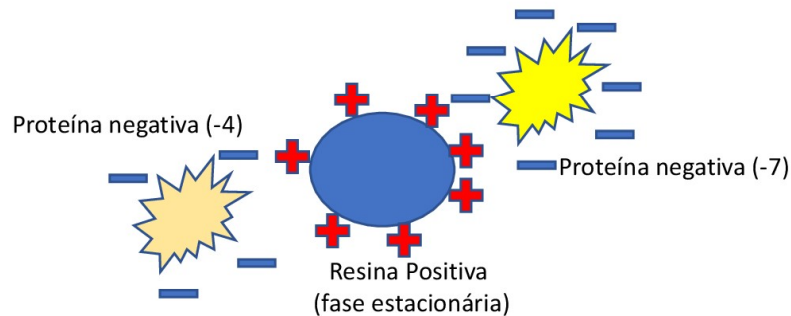
Quanto maior, mais interação.

Eluição em diferentes frações.

Separação das moléculas por carga.

Proteínas com carga líquida negativa não interagem com a resina negativa.

# Cromatografia de Troca Iônica



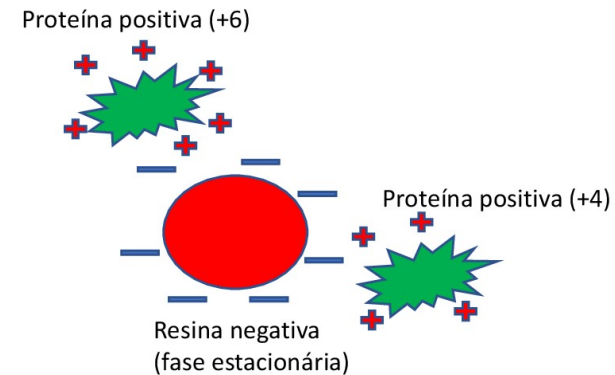
Resina positiva: liga moléculas negativas, portanto troca ânions

## Cromatografia de troca aniônica

O balanço de cargas da molécula influi no grau de interação.

A passagem de sal em gradiente de concentração crescente faz com que haja competição pelas cargas da resina, eluindo (desligando) as proteínas de acordo com suas diferentes cargas líquidas, separando-as.

Alternativamente, um gradiente de pH altera o balanço de cargas das proteínas, fazendo com que elas se eluam gradativamente de acordo com seus PIs.



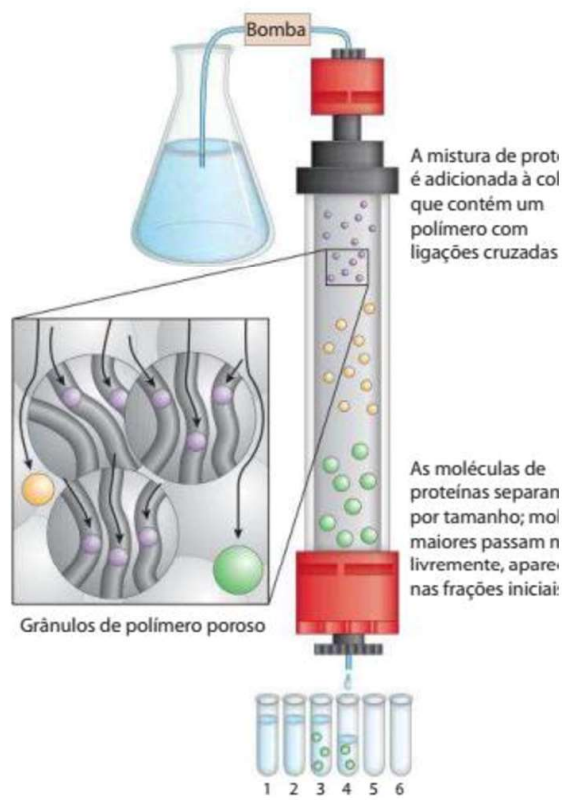
Resina negativa: liga moléculas positivas, portanto troca cátions

## Cromatografia de troca catiônica

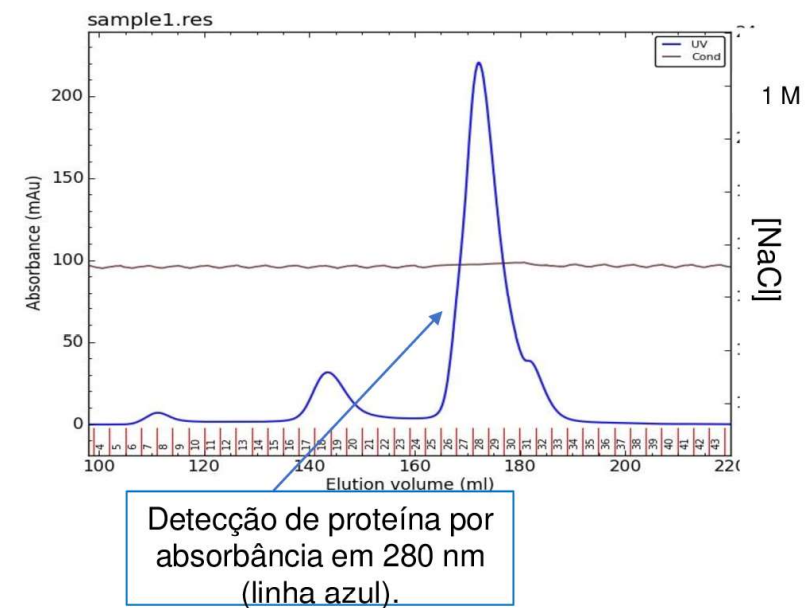
O balanço de cargas da molécula influi no grau de interação.

A mesma lógica é usada nesta situação.

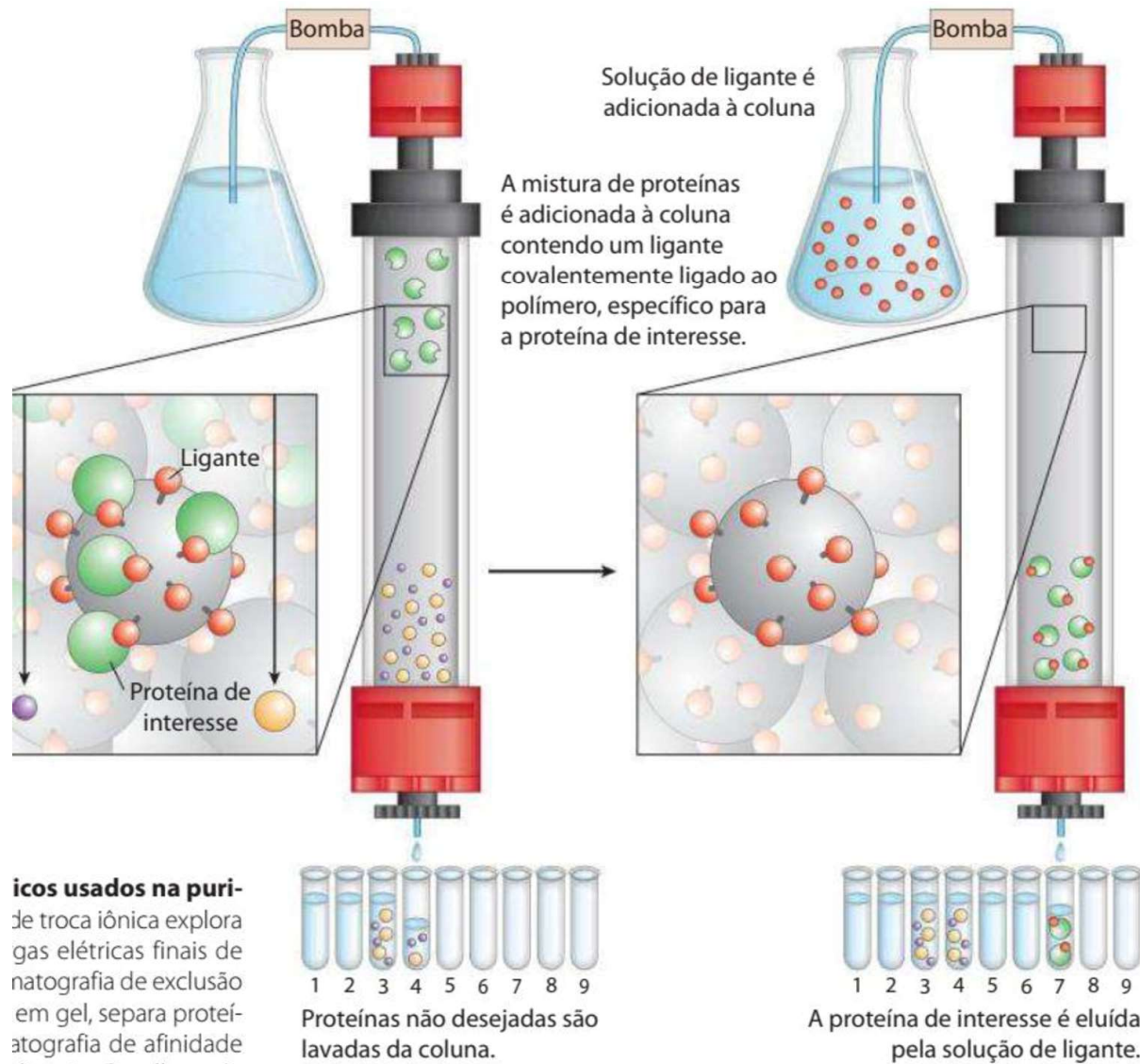
Vídeo



(b) Cromatografia de exclusão por tamanho



## Cromatografia de filtração em gel (ou de exclusão por tamanho)



(c) Cromatografia de afinidade

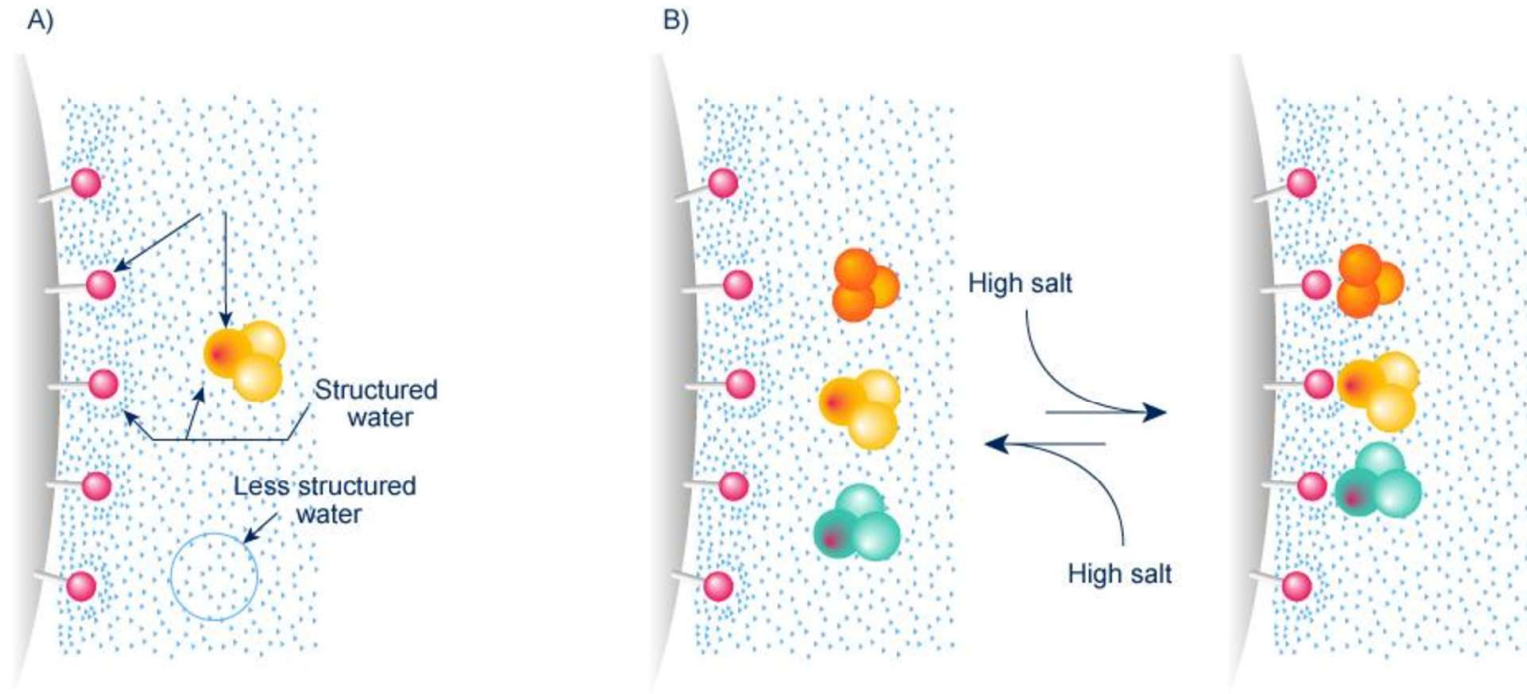
# Cromatografia de Afinidade

Ao invés de carga, a resina (fase estacionária) possui ligantes que interagem especificamente com a proteína-alvo.

Anticorpo

Parceiros de ligação que ocorrem nas células

# Cromatografia de interação hidrofóbica



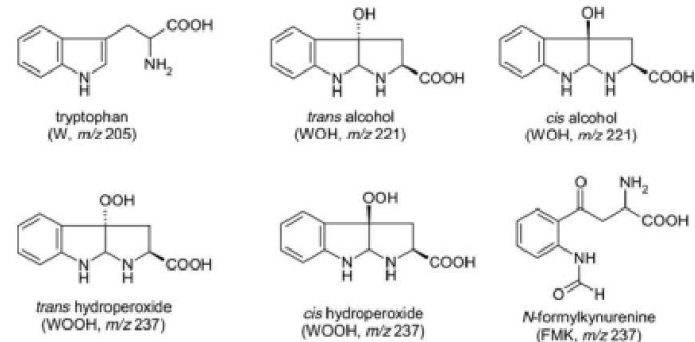
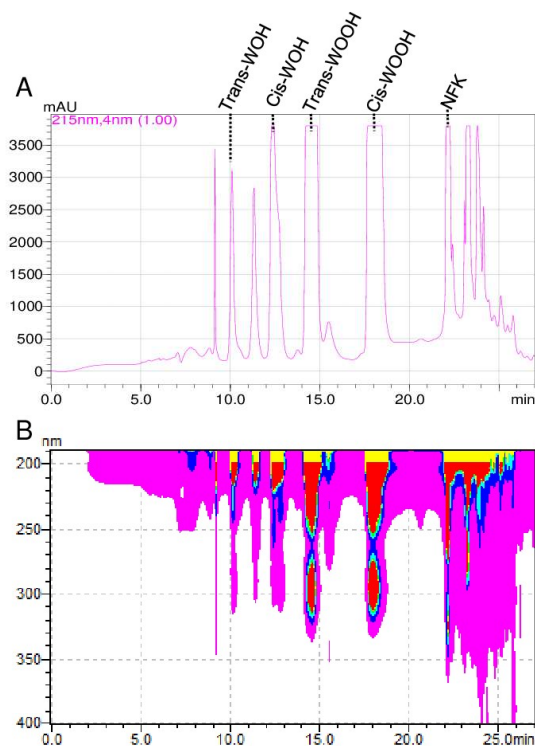
Grupos apolares ligados à resina (butil, fenil).

Alta concentração de sal inicial favorece a interação com a resina.

Eluição é feita com diminuição na concentração de sal.

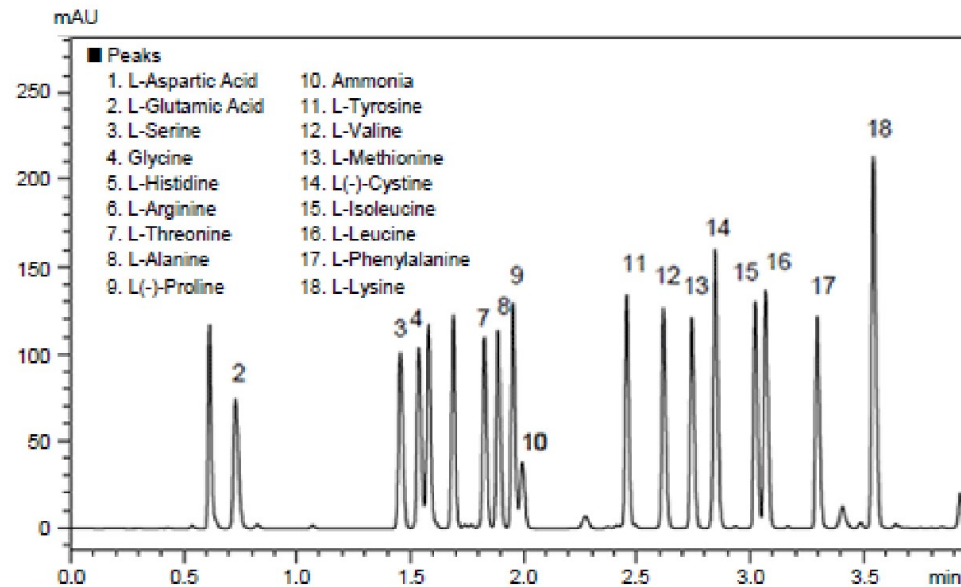
# Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

- Até o momento estávamos citando sistemas do tipo FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography).
- FPLC (baixa pressão no sistema): menor capacidade de separação.
- Mas geralmente mantém a estrutura nativa das proteínas.
- High Performance Liquid Chromatography: alta pressão; resinas, colunas e sistema mais robustos; maior capacidade de separação; menor quantidade de amostra



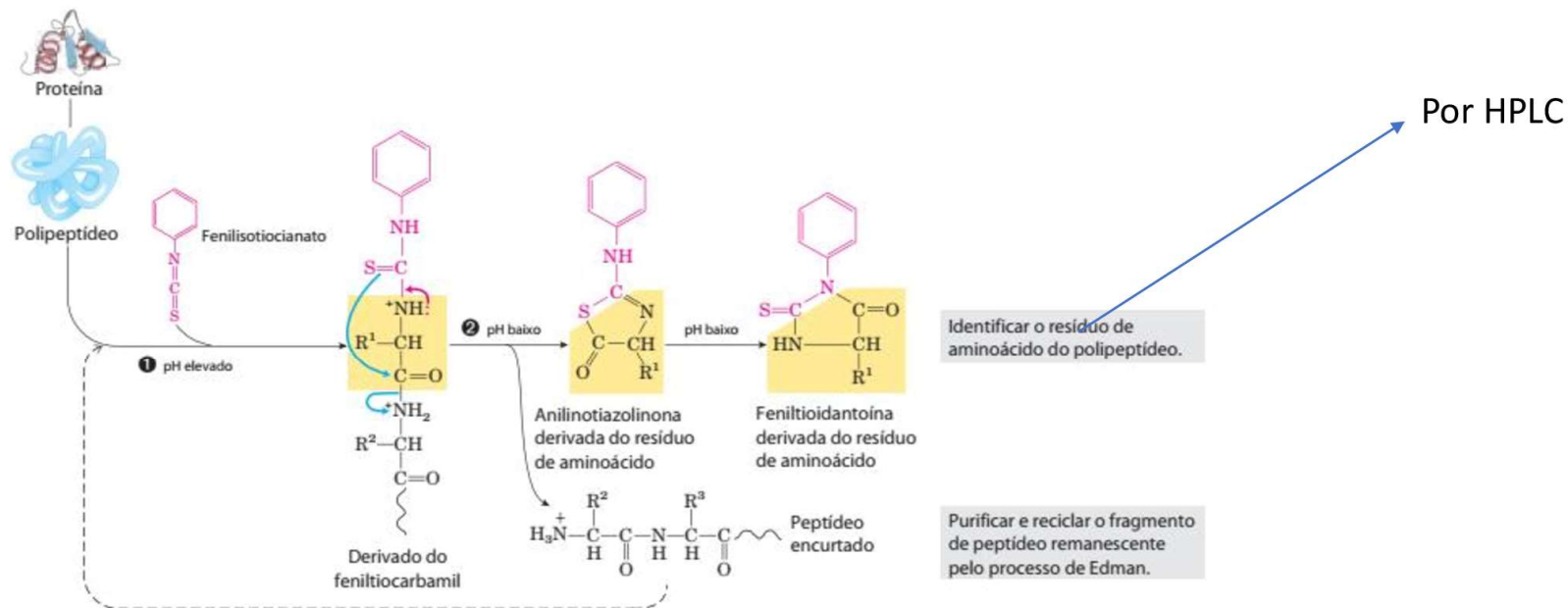
**Figure 1:** Purification of the tryptophan oxidation products by singlet oxygen. A) HPLC chromatogram ( $\lambda = 215$  nm) showing the collected fractions and its composition. B) Uv spectrum intensity ranging from  $\lambda = 200 - 400$  nm. AU, arbitrary units; FMK, *N*-formylkynurenine; WOH, tryptophan tricyclic alcohol; WOOH, tryptophan tricyclic hydroperoxide. Separation was performed using a C18 column.

# Análise de aminoácidos por HPLC



- **Derivatização** dos aminoácidos: reação química que muda a sua estrutura para aumentar sua detectabilidade e/ou performance cromatográfica.
- Por exemplo, substituição de grupos polares das cadeias laterais por grupos apolares.
- A partir de padrões com conhecidos tempos de retenção (RT) é possível saber o conteúdo da sua amostra.
- A área do cromatograma é usada para quantificação com alta precisão (para qualquer analito quantificado por HPLC).
- Principal técnica usada pela indústria farmacêutica.

# Degradação de Edman – sequenciamento de proteínas (amino-terminal)

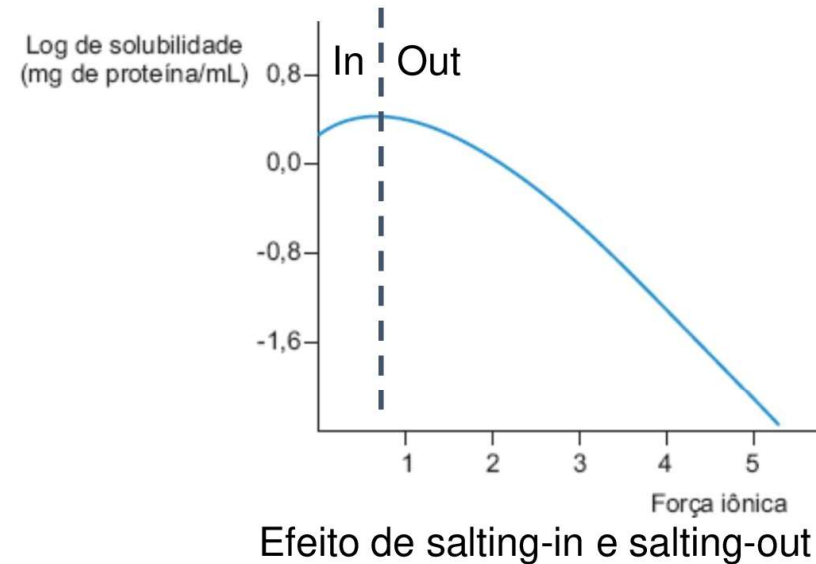
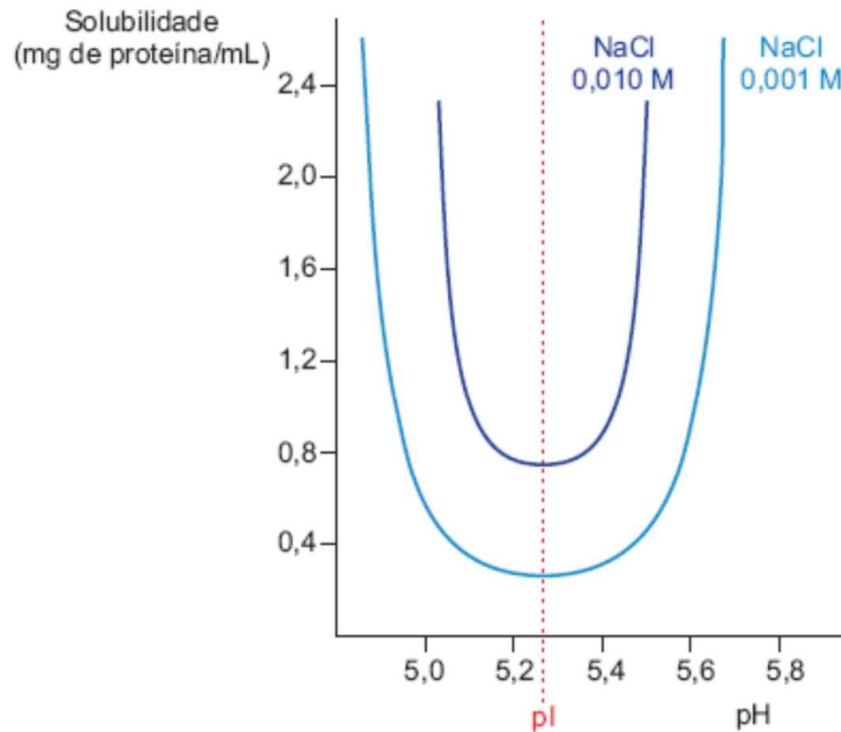


**FIGURA 3-27 A química do sequenciamento de proteínas desenvolvida por Pehr Edman.** A ligação peptídica mais próxima do aminoterminal da proteína ou polipeptídeo é clivada em duas etapas. As duas etapas são

levadas a cabo sob condições de reação muito diferentes (condições básicas na etapa 1 e ácidas na etapa 2, permitindo que uma etapa prossiga até sua conclusão antes que a segunda se inicie).

Pouco usada atualmente, o sequenciamento de proteínas em larga escala é feito majoritariamente por espectrometria de massas.

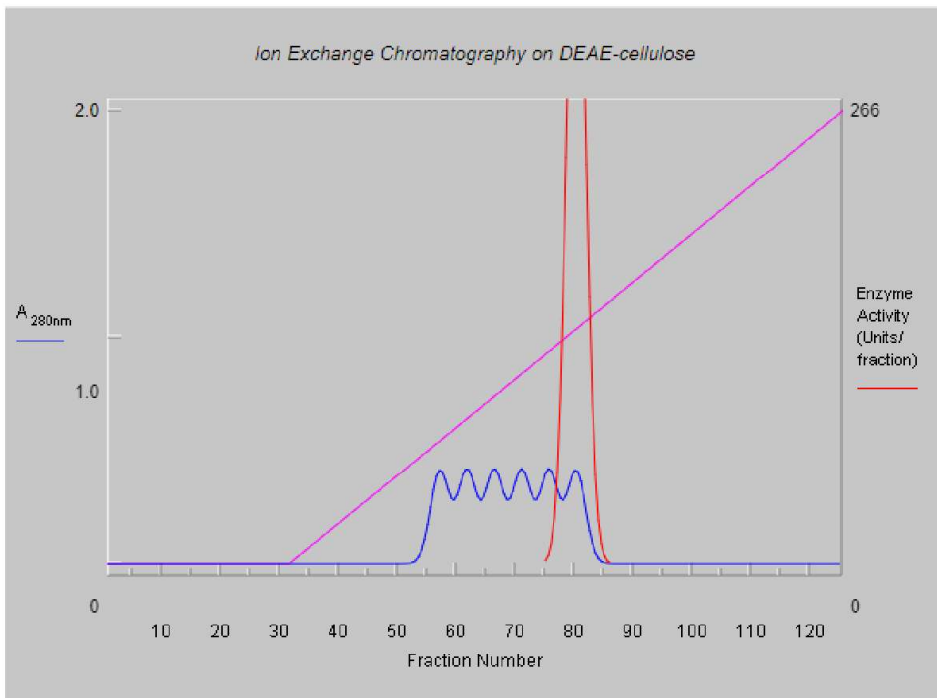
# Sal e a solubilidade de proteínas



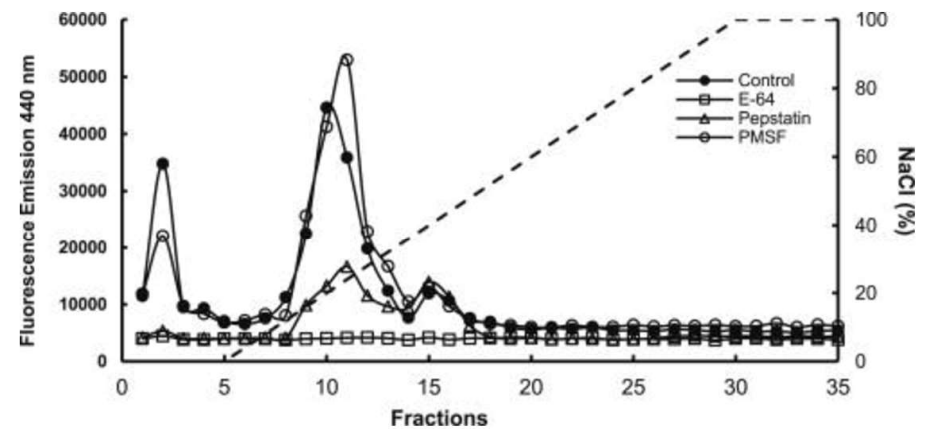
- Usar excesso de sal em um tampão pode fazer a sua proteína (ou “contaminantes”) saírem de solução, sendo comumente um passo inicial de purificação. Mantém a atividade biológica (testar empiricamente).

# Purificação de proteínas na prática

[http://www.agbooth.com/pp\\_ajax/](http://www.agbooth.com/pp_ajax/)



Acompanhando a purificação de proteínas por atividade enzimática.



# Calculando o rendimento do processo de purificação

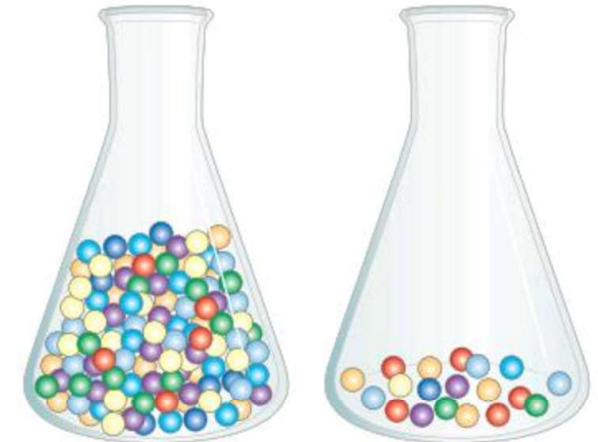
**TABELA 3-5** Tabela de purificação para uma enzima hipotética

| Procedimento ou etapa                    | Volume da fração (mL) | Proteína total (mg) | Atividade (unidades) | Atividade específica (unidades/mg) |
|------------------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|------------------------------------|
| 1. Extrato celular bruto                 | 1.400                 | 10.000              | 100.000              | 10                                 |
| 2. Precipitação com sulfato de amônio    | 280                   | 3.000               | 96.000               | 32                                 |
| 3. Cromatografia de troca iônica         | 90                    | 400                 | 80.000               | 200                                |
| 4. Cromatografia de exclusão por tamanho | 80                    | 100                 | 60.000               | 600                                |
| 5. Cromatografia de afinidade            | 6                     | 3                   | 45.000               | 15.000                             |

**Nota:** Todos os dados representam o estado da amostra após a realização do procedimento designado. A atividade e a atividade específica são definidas na página 95.

[http://www.agbooth.com/pp\\_ajax/](http://www.agbooth.com/pp_ajax/)

Acompanhando a purificação de proteínas por atividade enzimática.



**FIGURA 3-22 Atividade versus atividade específica.** A diferença entre esses termos pode ser ilustrada considerando dois béqueres contendo esferas. Os béqueres contêm o mesmo número de esferas vermelhas, mas números diferentes de esferas de outras cores. Se as esferas representam proteínas, ambos os béqueres contêm a mesma *atividade* da proteína representada pelas esferas vermelhas. O segundo béquer, no entanto, apresenta a *atividade específica* maior porque as esferas vermelhas representam uma fração mais alta do total.