



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FCF/USP



AULA:

PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS II

Prof. Dr. Tales Alexandre Costa e Silva

costa.silva@usp.br



Disciplina: FBT 0535 - BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA – Novembro de 2020

ETAPAS	OPERAÇÕES UNITÁRIAS	PRINCÍPIO
CLARIFICAÇÃO	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
ROMPIMENTO CELULAR	Homegeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise ou solubilização de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (Membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico
	Extração em Sistemas de Duas Fases	Solubilidade
PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar ou sítios específicos da superfície de uma proteína
TRATAMENTOS FINAIS	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

PRECIPITAÇÃO

- Precipitação: operação na qual uma perturbação, química ou física, em uma solução, promove a formação de partículas insolúveis;
 - Etapa preliminar em diversos procedimentos de purificação;
 - Tradicionalmente usada também como etapa de concentração;
 - Remoção do precipitado: separação sólido-líquido;
 - Proteínas precipitadas têm sua estrutura tridimensional modificada. Trata-se, portanto, de método agressivo para estas moléculas, pois sua função bioquímica depende da estrutura;
 - **A aplicação deste método somente é viável, portanto, quando a adequada conformação da proteína é recuperada após a precipitação**
-

➤ VANTAGENS:

- ❑ Facilidade de operação;
 - ❑ Equipamentos relativamente simples;
 - ❑ Facilidade de ampliação de escala;
 - ❑ Grande número de agentes precipitantes
(sendo muitos de baixo custo ou usados em concentrações pequenas).
 - ❑ **Para proteínas extracelulares e dependendo da aplicação industrial pode ser um etapa única de purificação;**
-

Principais métodos de precipitação de proteínas

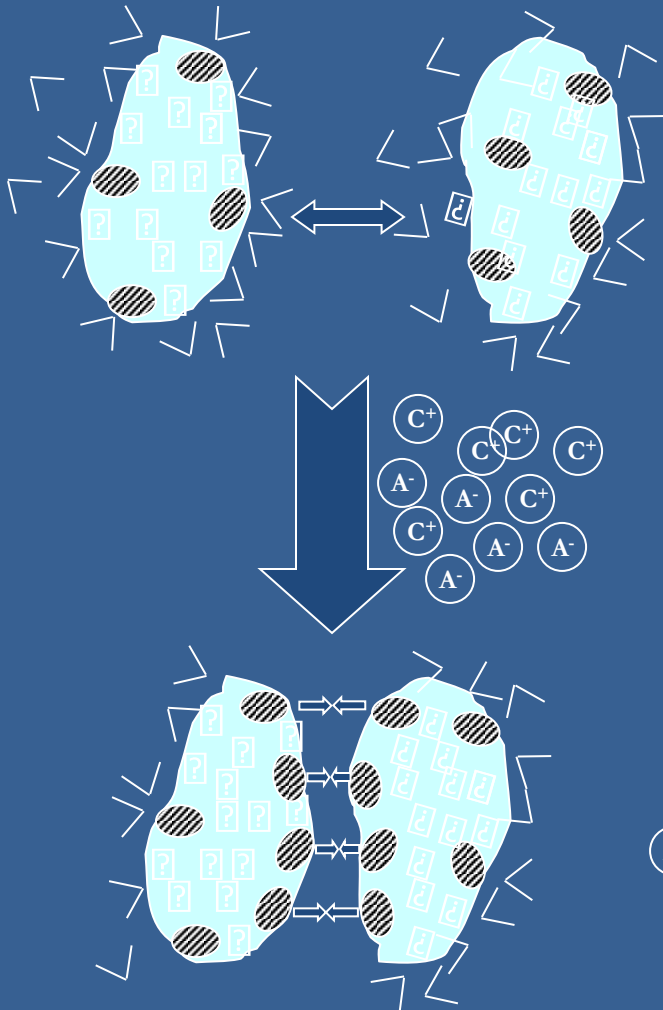
AGENTE	PRINCÍPIO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Sais neutros (salting-out)	Interações hidrofóbicas → redução da camada de hidratação da proteína	Uso universal Baixo custo	Corrosivo Liberação de amônia em pH alcalino
Polímeros não-iônicos	Exclusão da proteína da fase aquosa → reduzindo a solvatação da proteína	Uso de pequenas quantidades	Aumento da viscosidade
Calor	Interações hidrofóbicas e interferência das moléculas de água nas ligações de hidrogênio	Baixo custo Simple	Risco de desnaturação
Polieletrólitos	Ligação com a molécula de proteína atuando como agente floculante	Uso de pequenas quantidades	Risco de desnaturação
Precipitação isoelétrica	Neutralização da carga global da proteína pela alteração do pH do meio	Uso de pequenas quantidades	Risco de desnaturação
Sais metálicos	Formação de complexos	Uso de pequenas quantidades	Risco de desnaturação
Solventes orgânicos	Redução da constante dielétrica do meio aumentando as interações eletrostáticas intermoleculares	Facilidade de reciclagem Facilidade na remoção do precipitado	Risco de desnaturação Inflamável e explosivo

Polieletrólitos → PEI – poliacrílico polietilenoimina e PAA – poliânion ácido poliacrílico

Polieletrólito e Proteína devem ter cargas opostas → precipitação

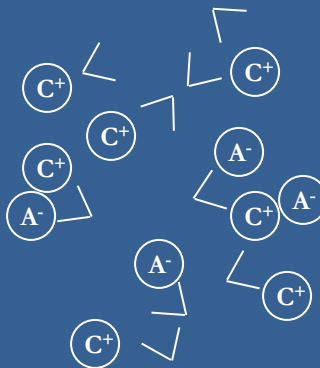
1. Precipitação por adição de sais

Adição da sais → aumento da força iônica
→ solvatação dos íons de sal →
desidratação das zonas hidrofóbicas da
proteína



Sais mais efetivos:

- Ânions com múltiplas cargas (sulfatos, fosfatos, citratos)
- Cátions: Mais usado - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

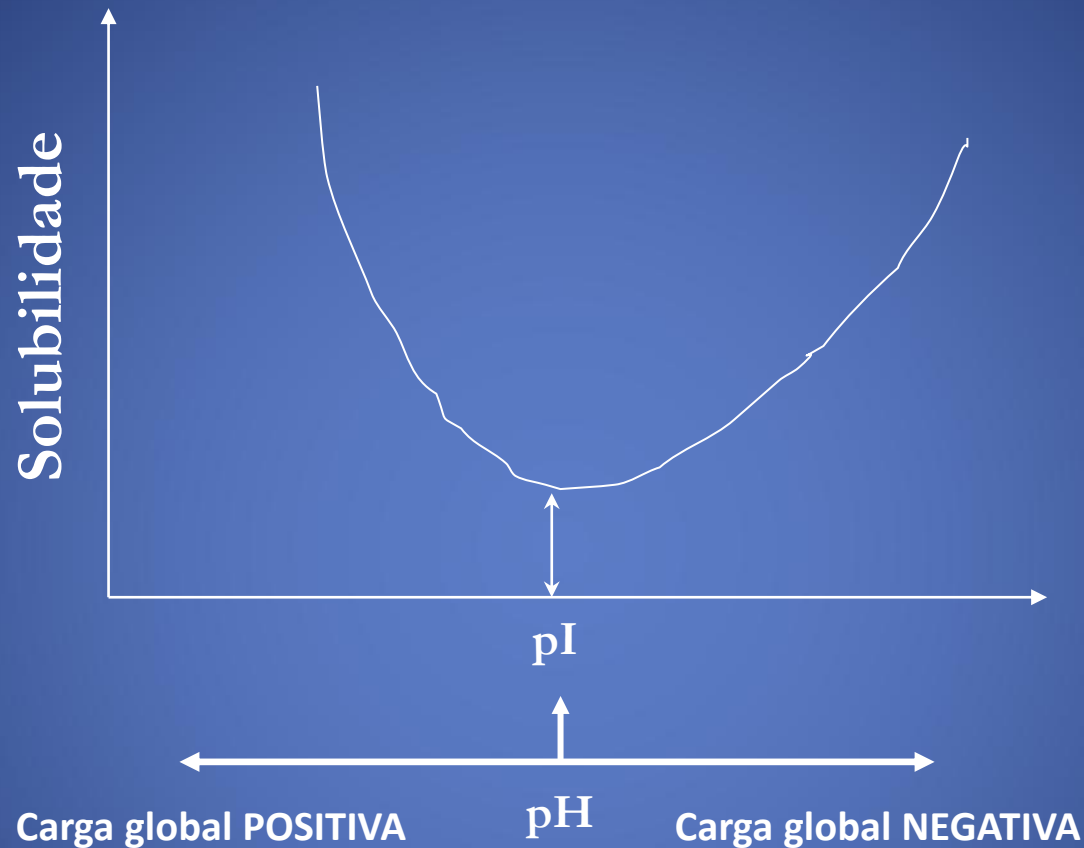


Precipitação por adição de sais

Aspectos que influenciam o processo de solubilização de *salting out*:

- 1 - Proteínas com maior número de regiões hidrofóbicas na superfície se agregam mais rapidamente;
- 2 - Característica dos sais;
- 3 - pH, próximo ao ponto isoelétrico, a agregação da proteína é facilitada;
- 4 - A solubilidade das proteínas diminui com o aumento da temperatura.

2. PRECIPITAÇÃO ISOELÉTRICA (ou por mudança de pH)



Quanto mais negativa ou positiva a carga global → ocorre repulsão eletrostática e aumenta a interação com o solvente

A precipitação isoelétrica pode se combinar com o efeito salino para tornar a precipitação mais eficiente.

3. PRECIPITAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO

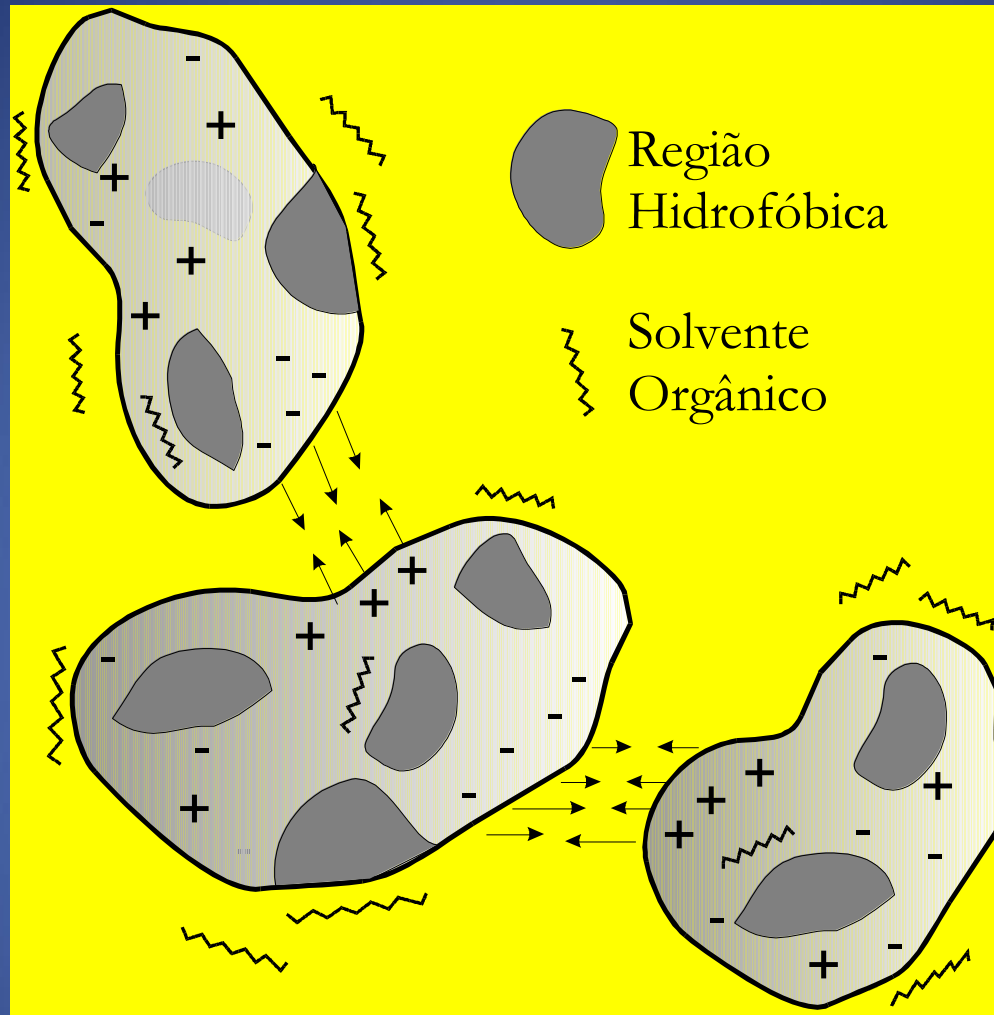
Ocorre diminuição da constante dielétrica do meio → diminuição da atividade de água → diminui o poder de solvatação da água nas regiões carregadas e hidrofílicas → **precipitação**

Constante dielétrica ou polaridade do meio

NESTE TIPO DE PRECIPITAÇÃO:

O solvente deve ser completamente miscível, não reagir com a proteína e ter um bom efeito de precipitação.

Deve ser operado em baixa temperatura ($<10^{\circ}\text{C}$)

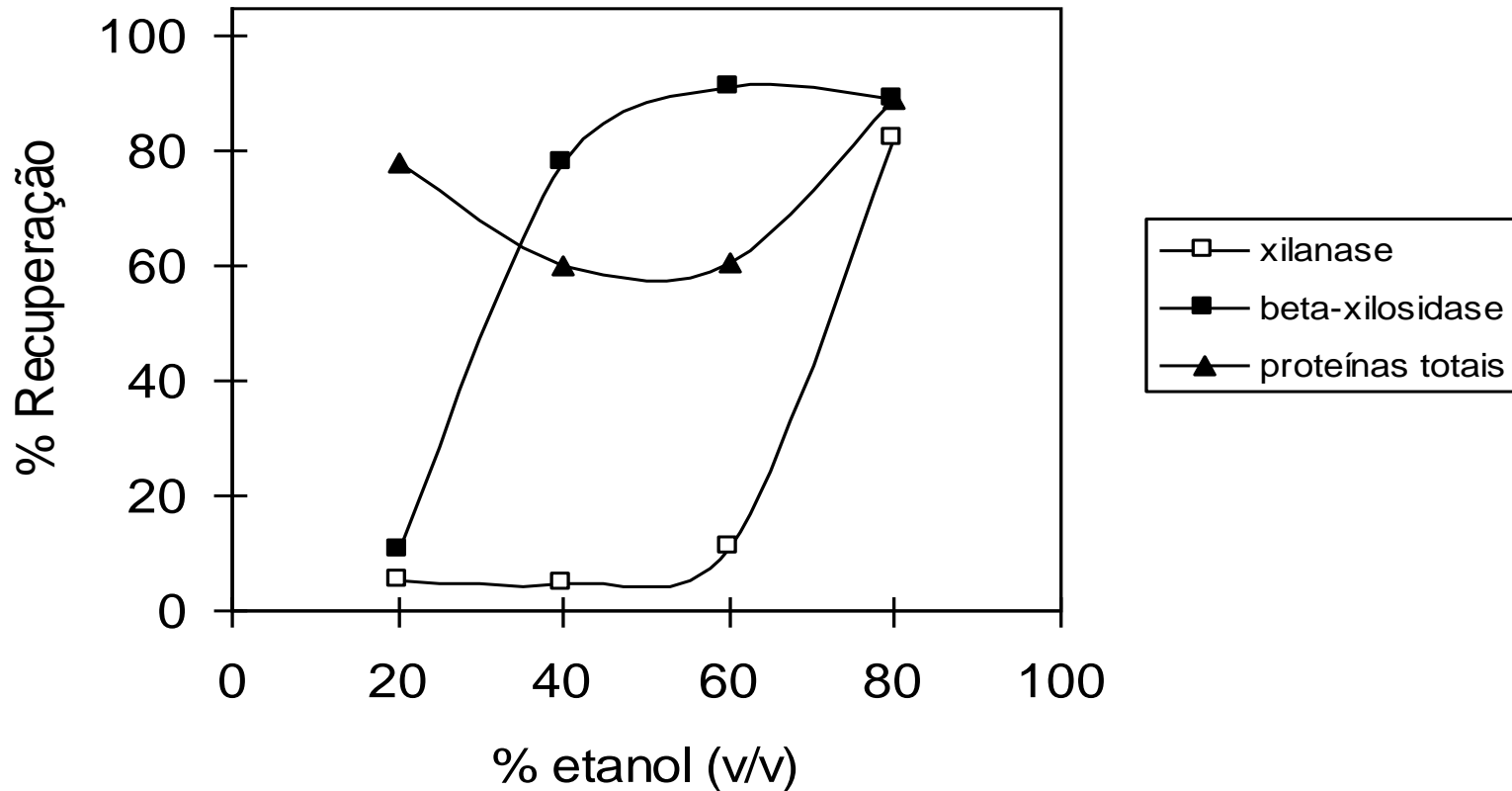


Agregação de proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas de sinal oposto em meio aquoso contendo solvente orgânico.

PRECIPITAÇÃO FRACIONADA

- A PRECIPITAÇÃO FRACIONADA corresponde à precipitação em **duas ou mais etapas**:
- Na **primeira** removem-se proteínas indesejáveis menos solúveis e, na(s) **seguinte(s)**, precipitam-se uma ou mais moléculas-alvo;
 - Em um estágio: útil como técnica de concentração;
- Na precipitação fracionada em geral varia-se a concentração do agente precipitante, mas também pode-se variar outros fatores;
 - Os estágios são chamados de “cortes” (em geral, **dois**);

pH 4,6



Recuperação (%) das enzimas: xilanase (-□-), β -xilosidase (-■-) e proteínas totais (-▲-).

PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO

- **Recuperação de Proteínas Totais:**

$$R_p = \frac{\text{Teor de proteínas após a etapa de purificação}}{\text{Teor de proteínas inicial}} \times 100$$

- **Recuperação da Atividade Enzimática:**

$$R_{AE} = \frac{\text{Atividade após a etapa de purificação}}{\text{Atividade inicial}} \times 100$$

- **Aumento de Pureza:**

$$A_{Pu} = \frac{\text{Atividade específica após a etapa de purificação}}{\text{Atividade específica inicial}}$$

ATIVIDADE ESPECÍFICA

$$AE = U/mg_{\text{proteína}}$$

Atividade Enzimática Inicial = 25 U

Proteína Total inicial = 5 mg

$$AE_{\text{inicial}} = 5U/mg_{\text{proteína}}$$

Atividade Enzimática Final = 15 U

Proteína Total final = 1 mg

$$AE_{\text{final}} = 15 U/mg_{\text{proteína}}$$

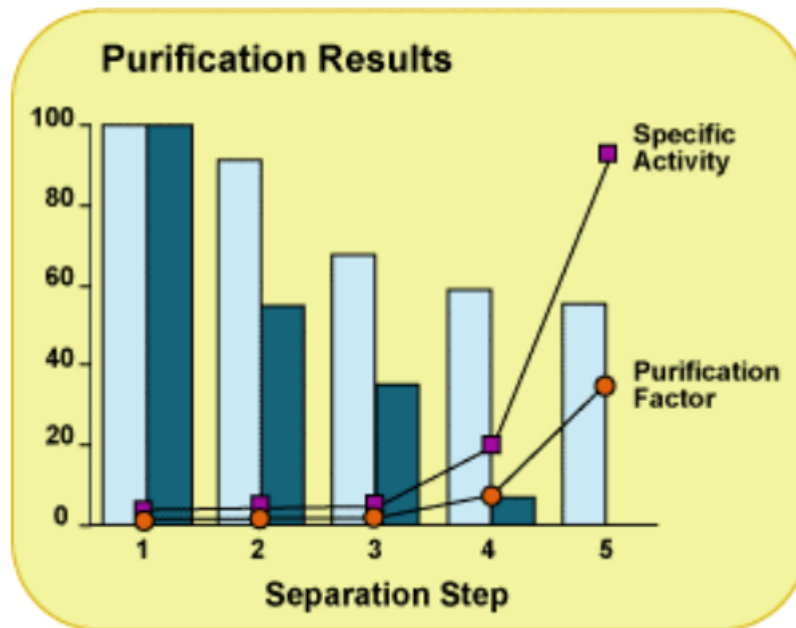


Figure 1.2: Typical results from a 5-step protein purification scheme are presented. The graph demonstrates that good recovery of biological activity, together with reduced protein mass, results in increasing specific activity and protein purity at each step.

■ Aumento de Pureza:

$$A_{Pu} = AE_{\text{FINAL}} / AE_{\text{INICIAL}}$$

$$A_{Pu} = 15/5 = 3$$

Resultados obtidos após precipitação fracionada com etanol das enzimas xilanase, β -xilosidase e proteínas totais.

β -XILOSIDASE

Amostra	RP ¹ (%)	RA ² (%)	AP ³
Inicial	-	-	1,0
20% etanol	70	8	0,1
60% etanol	12	74	6,1
80% etanol	18	6	0,4

XILANASE

Amostra	RP (%)	RA (%)	AP (AE_f/AE_{ini})
Inicial	-	-	1,0
20% etanol	70	6	0,1
60% etanol	12	7	0,6
80% etanol	18	81	4,5

¹Recuperação de proteínas totais; ²Recuperação de Atividade;
³Aumento de pureza.

Exemplos de precipitação de produtos biotecnológicos

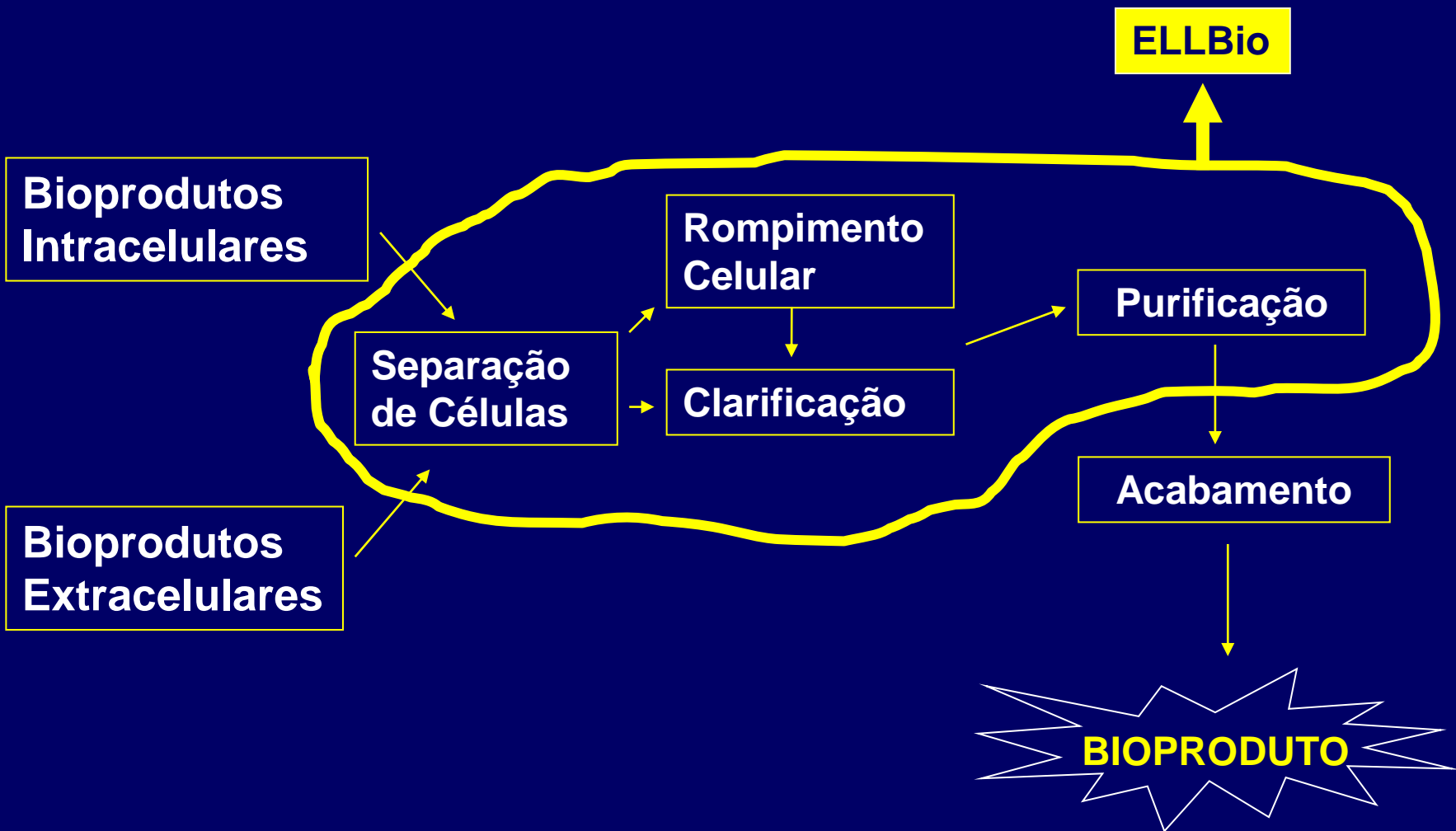
- Produção de ácido succínico via microbiana → hidróxido de cálcio ou óxido de cálcio;
 - Produção de anticorpos → adição de etanol a 5 °C ou sulfato de amônio → etapas cromatográficas.
 - Remoção de lipídeos, ácidos nucleicos e fragmentos da membrana celular → adição de cloreto de cálcio ou fosfato de potássio.
-

ETAPAS	OPERAÇÕES UNITÁRIAS	PRINCÍPIO
CLARIFICAÇÃO	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
ROMPIMENTO CELULAR	Homegeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise ou solubilização de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (Membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico
	Extração em Sistemas de Duas Fases	Solubilidade
PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar ou sítios específicos da superfície de uma proteína
TRATAMENTOS FINAIS	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

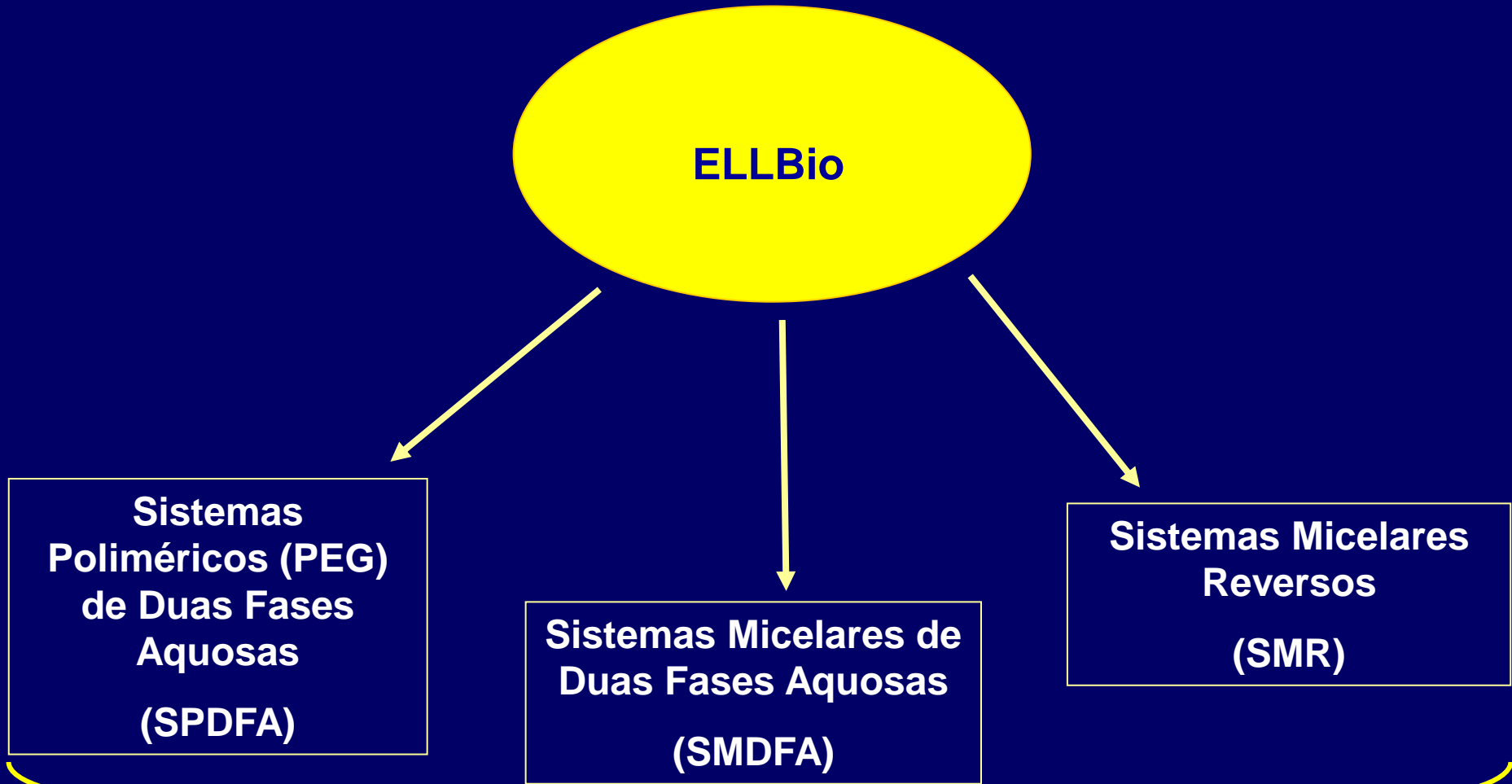
EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE BIOMOLÉCULAS

Operação Unitária de transferência de massa utilizada para separação de componentes presentes em uma mesma solução, distribuindo-os entre as duas fases líquidas insolúveis.

PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS



EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE BIOMOLÉCULAS



**Vantagens comuns
aos 3 métodos**

- Rápidos
- Menor custo
- Biocompatíveis

**Extração Líquido-Líquido
em Sistemas Poliméricos
de Duas Fases Aquosas**

TIPOS DE SISTEMAS

1) DOIS POLÍMEROS NÃO-IÔNICOS:

PEG x Dextrana

PEG x Polivinil álcool

Polipropilenoglicol - PPG x Dextrana

Metil Celulose x Hidroxipropil dextrana

PEG x Ácido poliacrílico

2) POLÍMERO NÃO-IÔNICO X COMPOSTO DE BAIXA MASSA MOLAR

Polipropilenoglicol - PPG x Fosfato de potássio

PEG x Fosfato de potássio

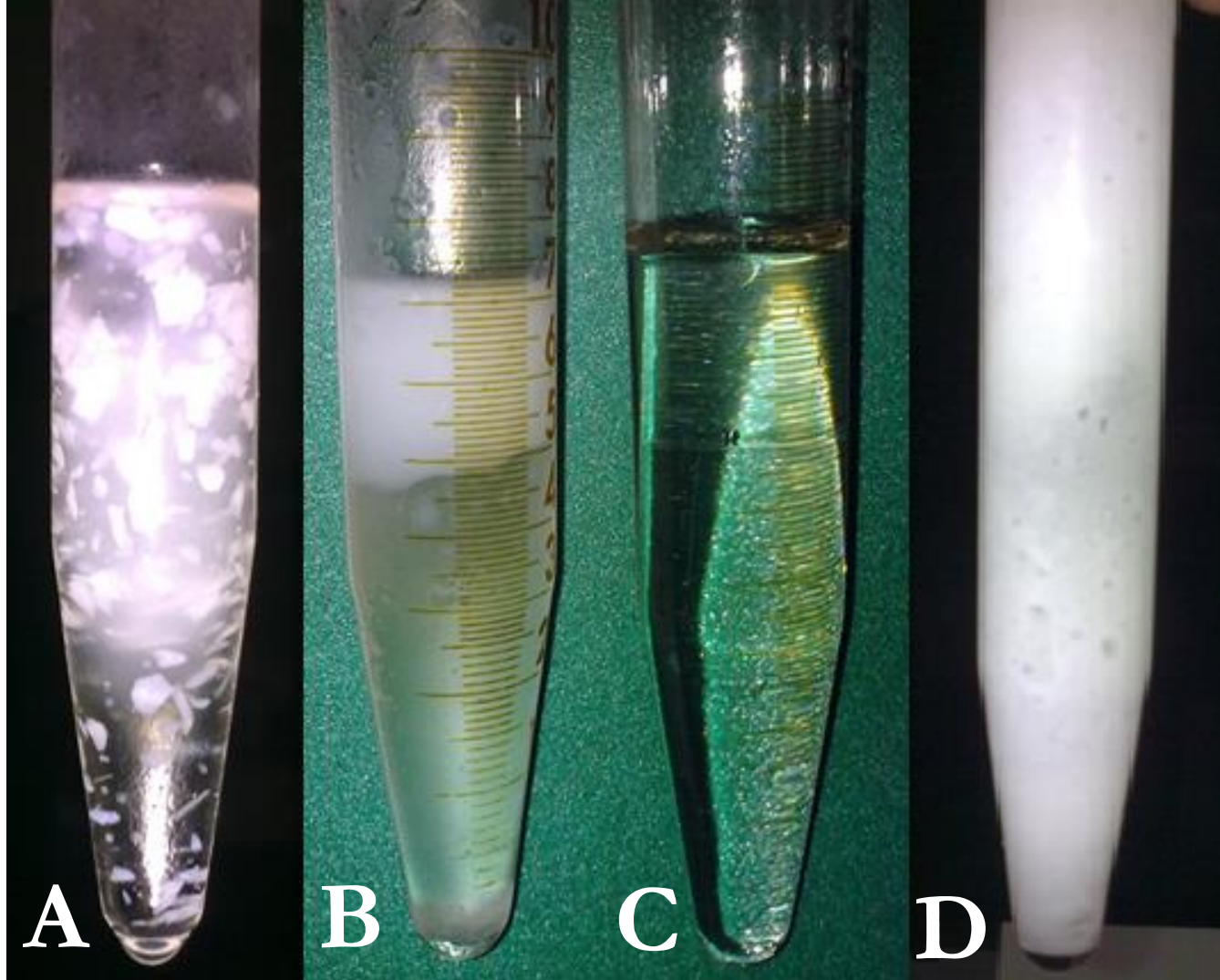
Metoxipolietileno glicol x Fosfato de potássio

Polipropilenoglicol - PPG x Glicose

PEG x Glicose

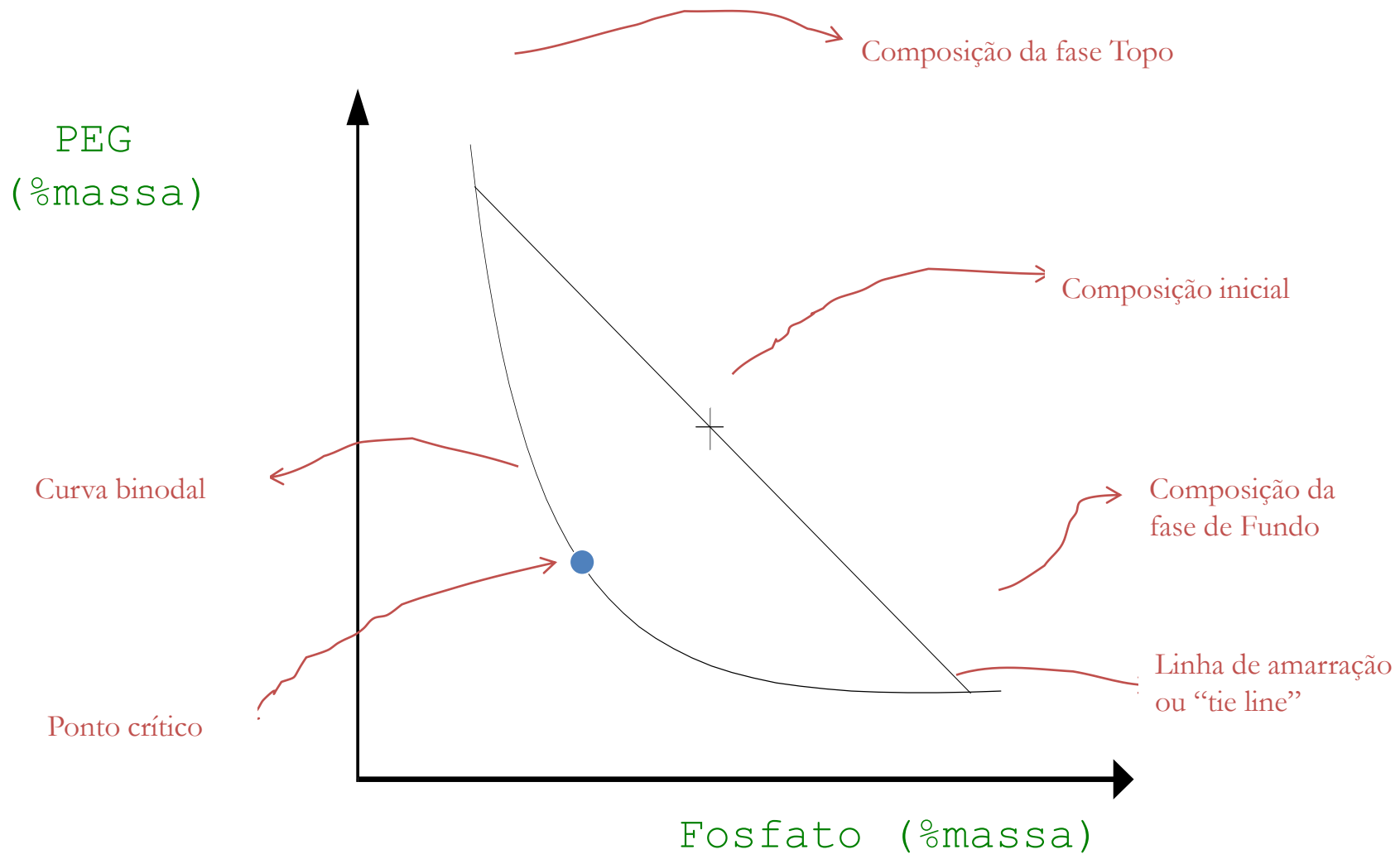
PEG x Sulfato de magnésio

PEG x Citrato

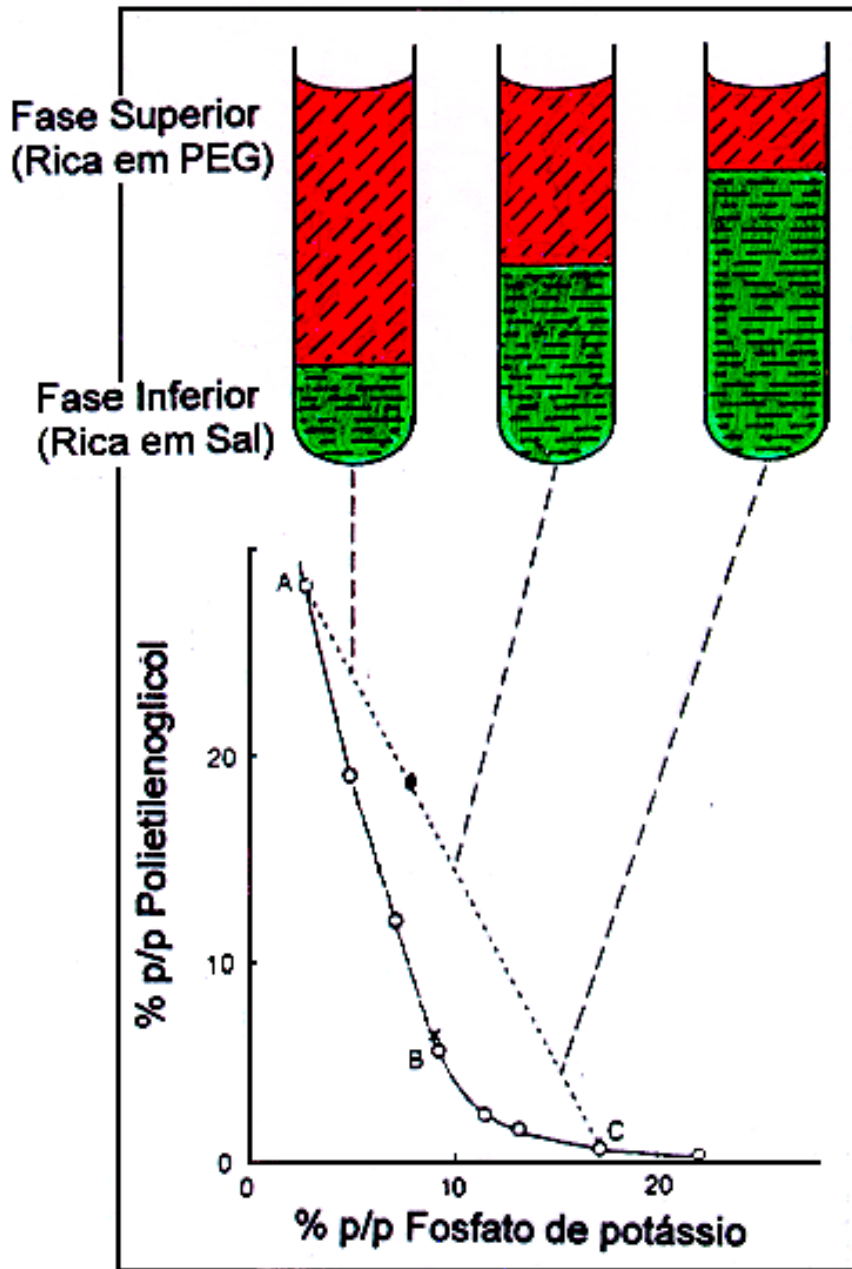


SISTEMAS BIFÁSICOS:

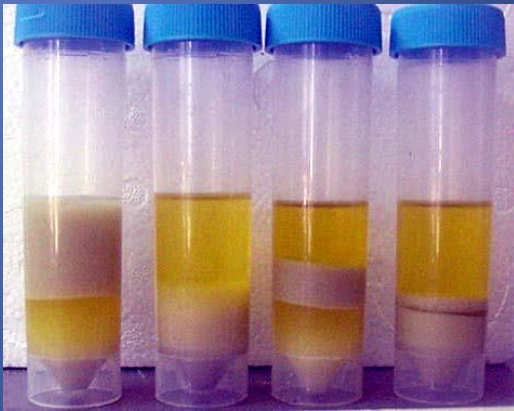
- a) Em processo de dissolução,
- b) Polímero superior muito concentrado,
- c) Condição ideal do sistema,
- d) Ambos os polímeros concentrados.



Curva de equilíbrio de um sistema PEG/fosfato



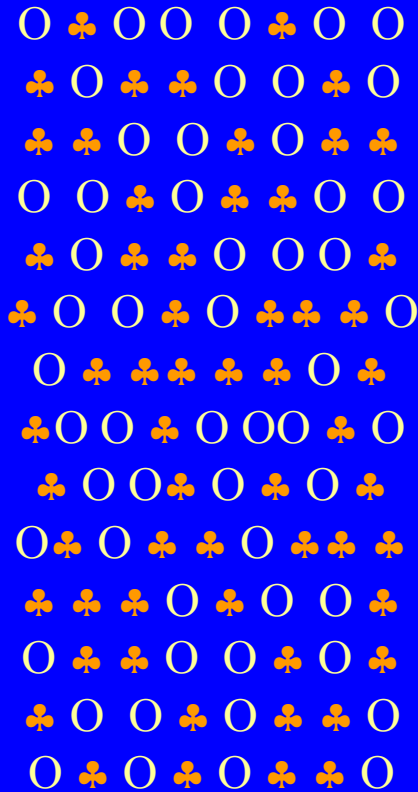
VOLUMES DAS FASES EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS COMPONENTES DO SISTEMA DE EXTRAÇÃO POR SPDFA



SEPARAÇÃO DE FASES

SOLUÇÃO INICIAL

Liquid Phase



O ♣ - mass

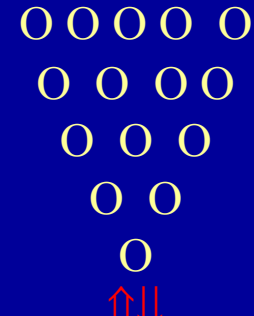
$$K = \frac{A_{F_{ext}}}{A_{F_{ref}}}$$

TRANSFERÊNCIA DE MASSA

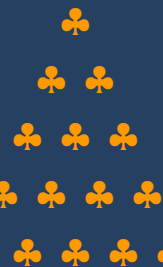
$$Y(\text{Rendimento}) = \frac{(A_{\text{Fase extraída}})}{A_{\text{Inicial}}} \cdot 100$$

SISTEMA DE DUAS FASES

Liquid Phase I
(TOP)



V_I



V_{II}

Liquid Phase II
(BOTTOM)

COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

$$K = \frac{C_{Ti}}{C_{Fi}}$$

C_{Ti} - concentração, ou atividade, do soluto i na fase de topo.

C_{Fi} - concentração, ou atividade, do soluto i na fase de fundo.

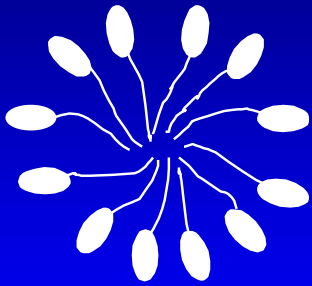
- O Valor de K é utilizado para avaliar a extensão da separação entre a molécula-alvo e impurezas → coeficientes de partição significativamente distintos indicam ocorrência de purificação.
- O K é regido pela menor potencial químico ou maior solubilidade da biomolécula → hidrofobicidade, carga superficial, molar, pH, força iônica.

- PLANEJAMENTO FATORIAL

FATORES QUE INFLUENCIAM NO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (K) DE BIOMOLÉCULAS

- 1 Concentração de Polímeros (Diagrama de Fases)
- 2 Tipo e Concentração de Sal/ Efeito de “Salting-Out” da fase salina
- 3 Ligantes/ Interações bioespecíficas
- 4 Massa Molar do PEG/exclusão pelo volume
- 5 pH/cargas superficiais
- 6 Temperatura
- 7 Reduzir a viscosidade da fase Superior
- 8 Diferença de densidade entre as fases

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares



MICELAS = agregados de tensoativos

Formação de micelas → balanço complexo de forças intermoleculares:

eletrostáticas

ligações de hidrogênio

van der Waals

hidrofóbicas

estéricas

Razão principal para a formação de micelas = obtenção de estado mínimo de energia livre

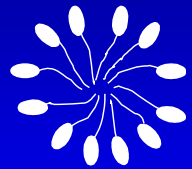
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

entropia
(miscibilidade das micelas)

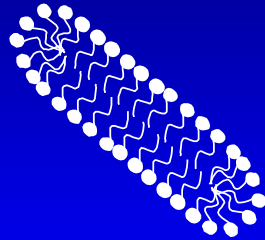
X

entalpia
(separação das micelas da água)

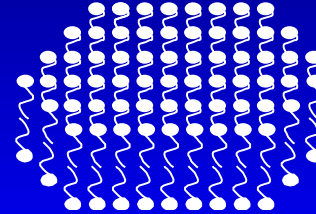
TIPOS DE AGREGADOS FORMADOS (MICELAS)



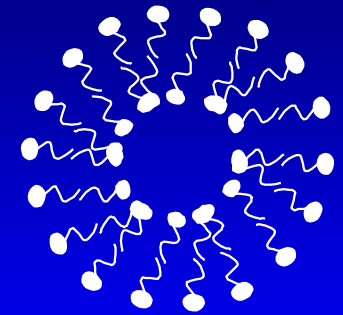
**micela
esférica**



**micela
cilíndrica**



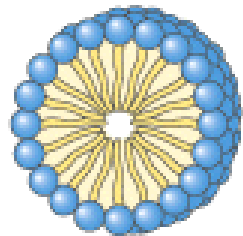
bicamada



**vesícula
(lipossoma)**



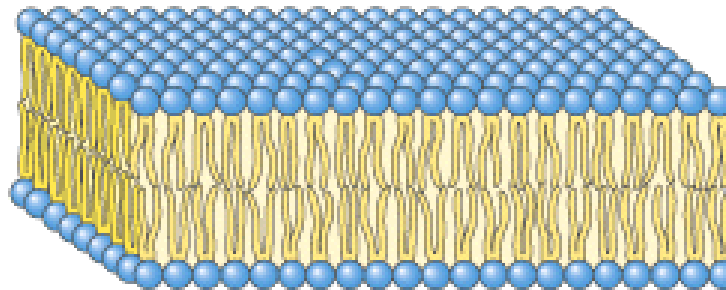
Individual units are wedge-shaped (cross-section of head greater than that of side chain)



**Micelle
(a)**

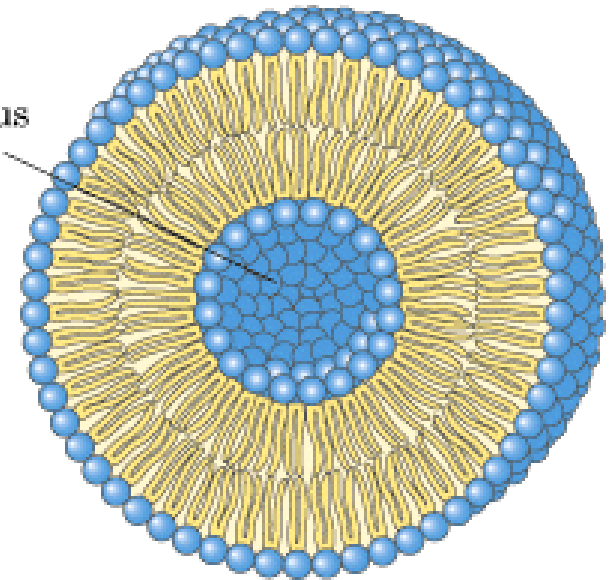


Individual units are cylindrical (cross-section of head equals that of side chain)



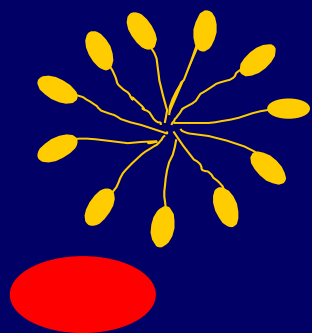
**Bilayer
(b)**

Aqueous cavity

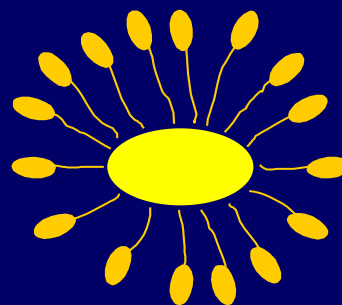


**Liposome
(c)**

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)



**biomolécula
hidrofílica**



**biomolécula
hidrofóbica**

**Possibilidades de interação entre
biomoléculas e as micelas**

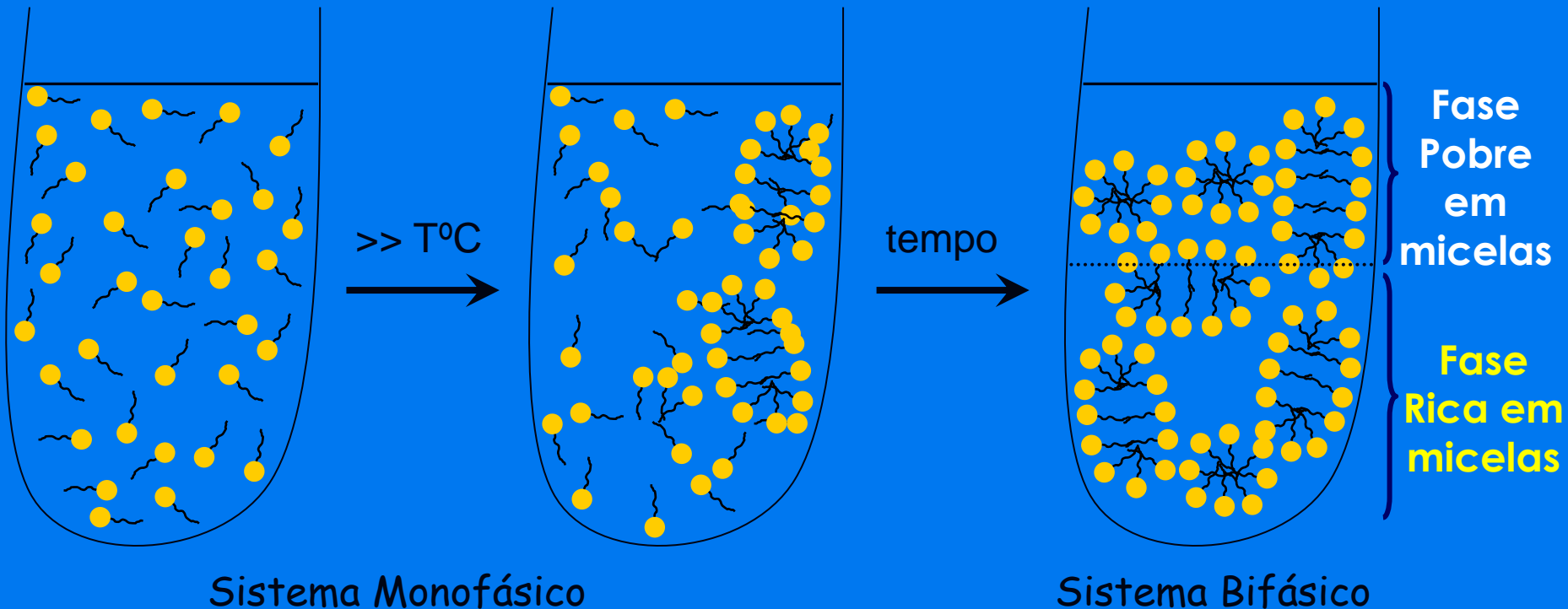
CARACTERÍSTICAS

- ✓ Ambiente ameno para materiais biológicos → Biocompatibilidade
- ✓ Método seguro, não utiliza compostos inflamáveis e explosivos;
- ✓ Micelas fornecem ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos;
- ✓ Pode ser aplicado a sistemas envolvendo células Intactas;
- ✓ Alternativa na purificação de proteínas de plantas - compostos presentes em plantas que interferem nas técnicas convencionais de extração, como fenóis e clorofila, podem ser facilmente removidos por SMDFA.
- ✓ A seletividade da partição pode ser melhorada com a utilização de micelas contendo ligantes de afinidade ou misturas de tensoativos;

- ✓ **Fácil separação do material desejado das moléculas de tensoativo após a purificação;**
- ✓ **Baixo custo (a princípio requer somente um tensoativo e em baixas concentrações);**
- ✓ **Fácil ampliação de escala;**
- ✓ **Gera resíduos de fácil manuseio (baixa toxicidade, fácil acondicionamento, etc.);**
- ✓ **Técnica não interfere em metodologias como cromatografia líquida, eletroforese, ELISA, etc.**

Extração Líquido-Líquido em Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE FASES



Extração Líquido-Líquido em Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas - SMDFA

DIAGRAMA DE FASES

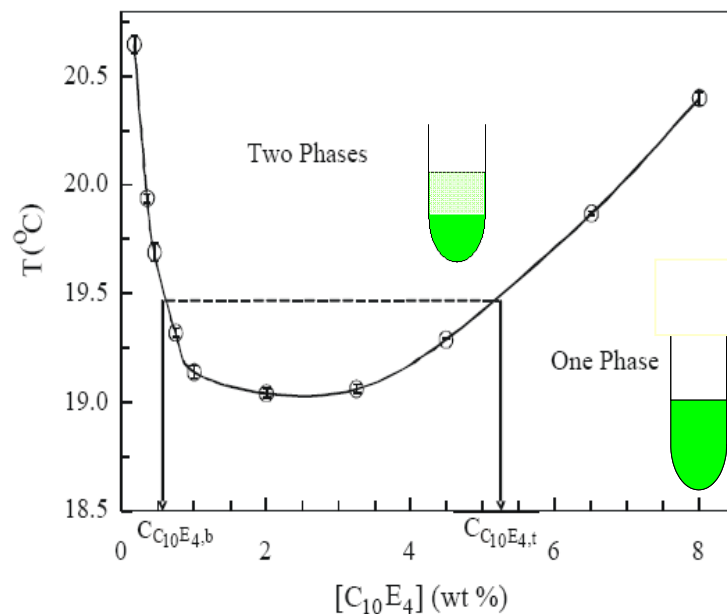
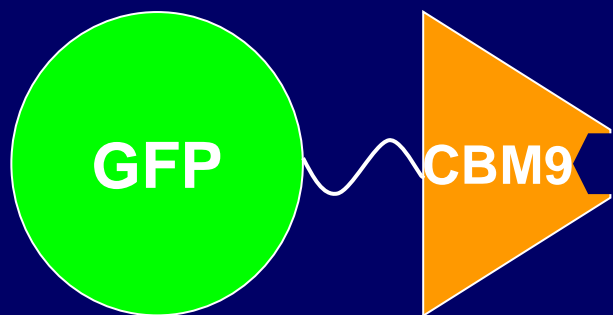


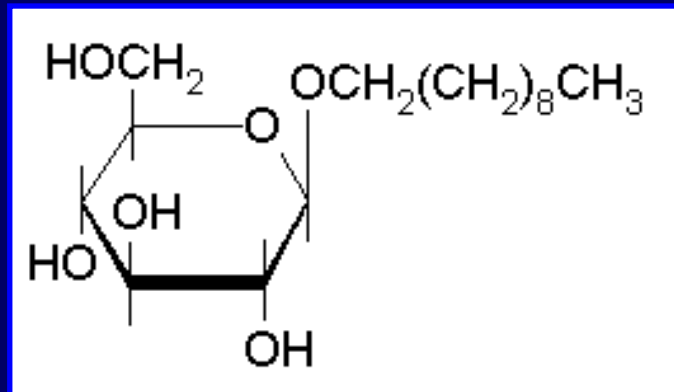
Figure 5: Experimentally determined coexistence curve of the $C_{10}E_4$ /buffer micellar system. The region within the curve is the two-phase region, representing conditions under which the micellar solution separates into two macroscopic phases. The region outside the curve is the one-phase region, representing conditions under which the micellar solution is a single, homogeneous phase. The dashed line represents a tie line corresponding to 19.5 °C. At $T = 19.5$ °C, a $C_{10}E_4$ micellar solution having any $C_{10}E_4$ concentration along the tie line will phase separate into top and bottom phases having concentrations $C_{C_{10}E_4,t} = 5.8$ wt % and $C_{C_{10}E_4,b} = 0.6$ wt %, respectively. The error bars represent 95% confidence levels for the measurements.

EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE - GFP_{uv} UTILIZANDO LIGANTE DE AFINIDADE

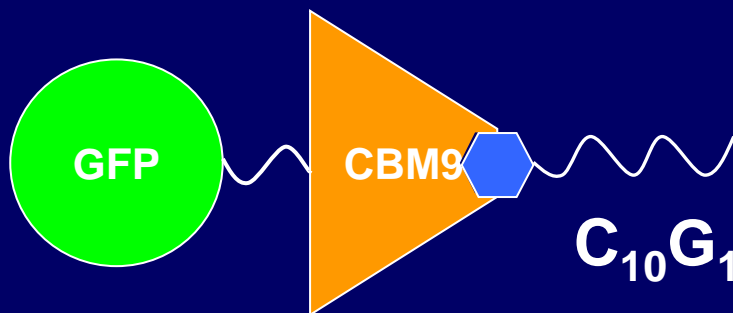


liga à celulose, di- e monossacarídeos

+

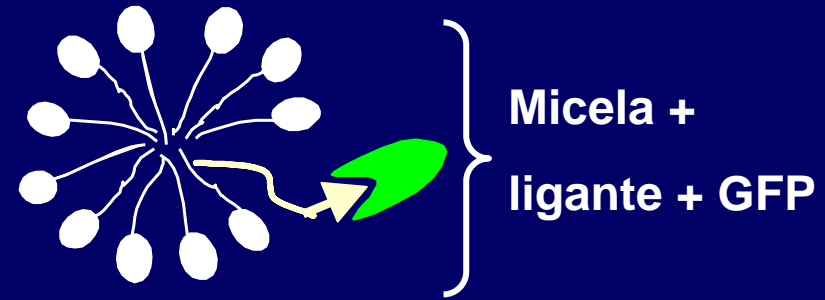


Surfactant - C₁₀G₁
(Decyl β -D-glucopyranoside)

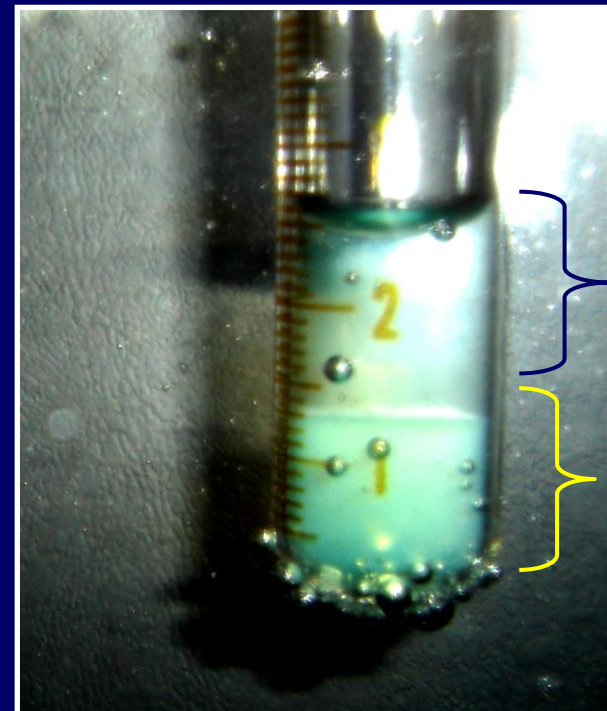
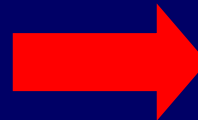


Mazzola, P. G., Lam, H., Kavosi, M., Haynes, C. A., Pessoa A., Penna, T. C. V., Wang, D. I. C., Blankschein, D. Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from clarified *E. coli* cell lysate using a two-phase aqueous micellar system. **Biotechnology and Bioengineering**. 93(5):998-1004, 2006.

Extração Líquido-Líquido em Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas - SMDFA



29°C, após 6h



C₁₀G₁ (5%) Lisado Celular + CBM9-GFP Tampão pH 7,2

Coeficientes de Partição da GFP_{UV} na Extração por Afinidade

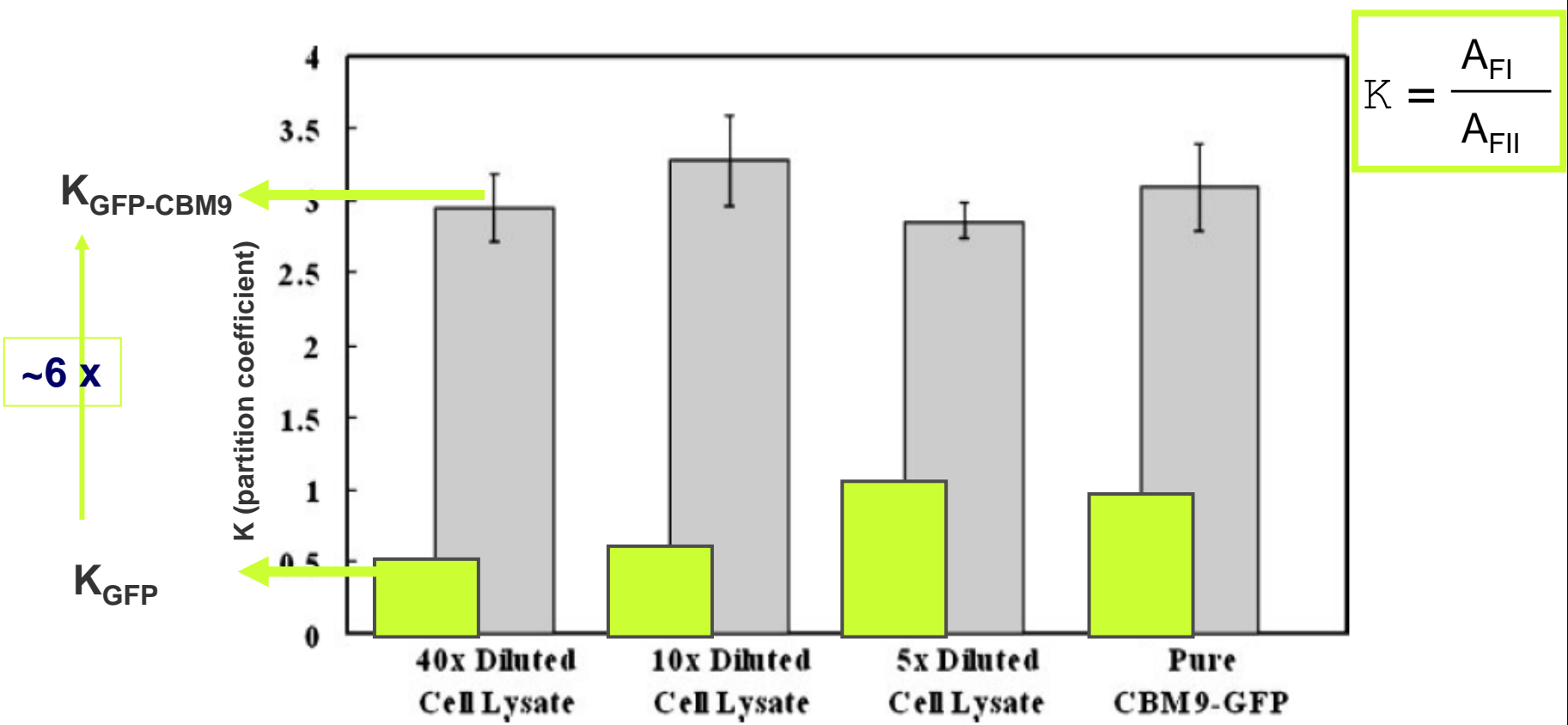
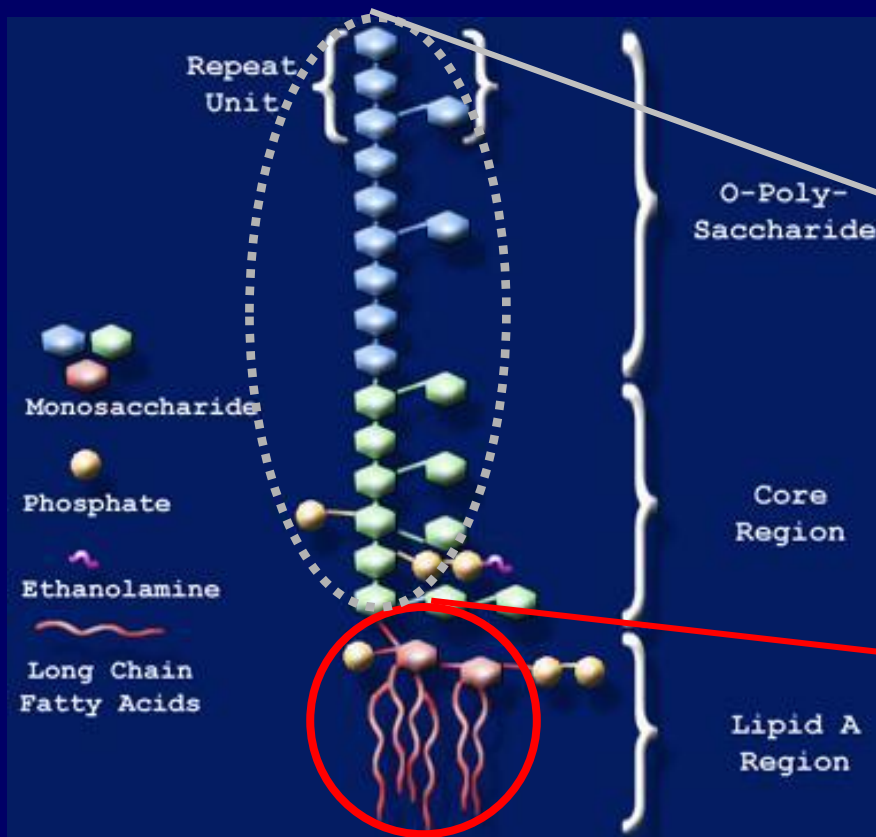


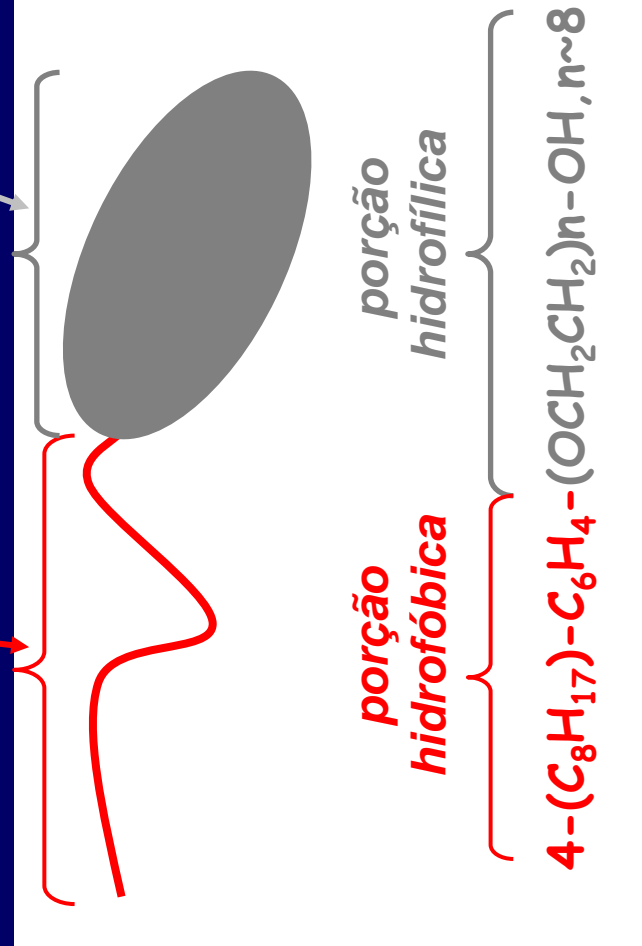
Figure 2. Experimentally measured partition coefficients of the target protein CBM9-GFP ($K_{CBM9-GFP}$) at the three cell lysate dilution levels considered: 40× diluted cell lysate, 10× diluted cell lysate, and 5× diluted cell lysate. The $K_{CBM9-GFP}$ value corresponding to the partitioning of the purified CBM9-GFP (Lam et al., 2004), under the same experimental conditions (29°C, 5 wt% C₁₀G₁), is shown for comparison purposes. The error bars represent 95% confidence limits for the measurements.

Remoção de Endotoxina (pirogênio) por Extração Líquido-Líquido de Meio Fermentado Contendo GFP_{uv}

- Formação de micela mista: tensoativo + pirogênio

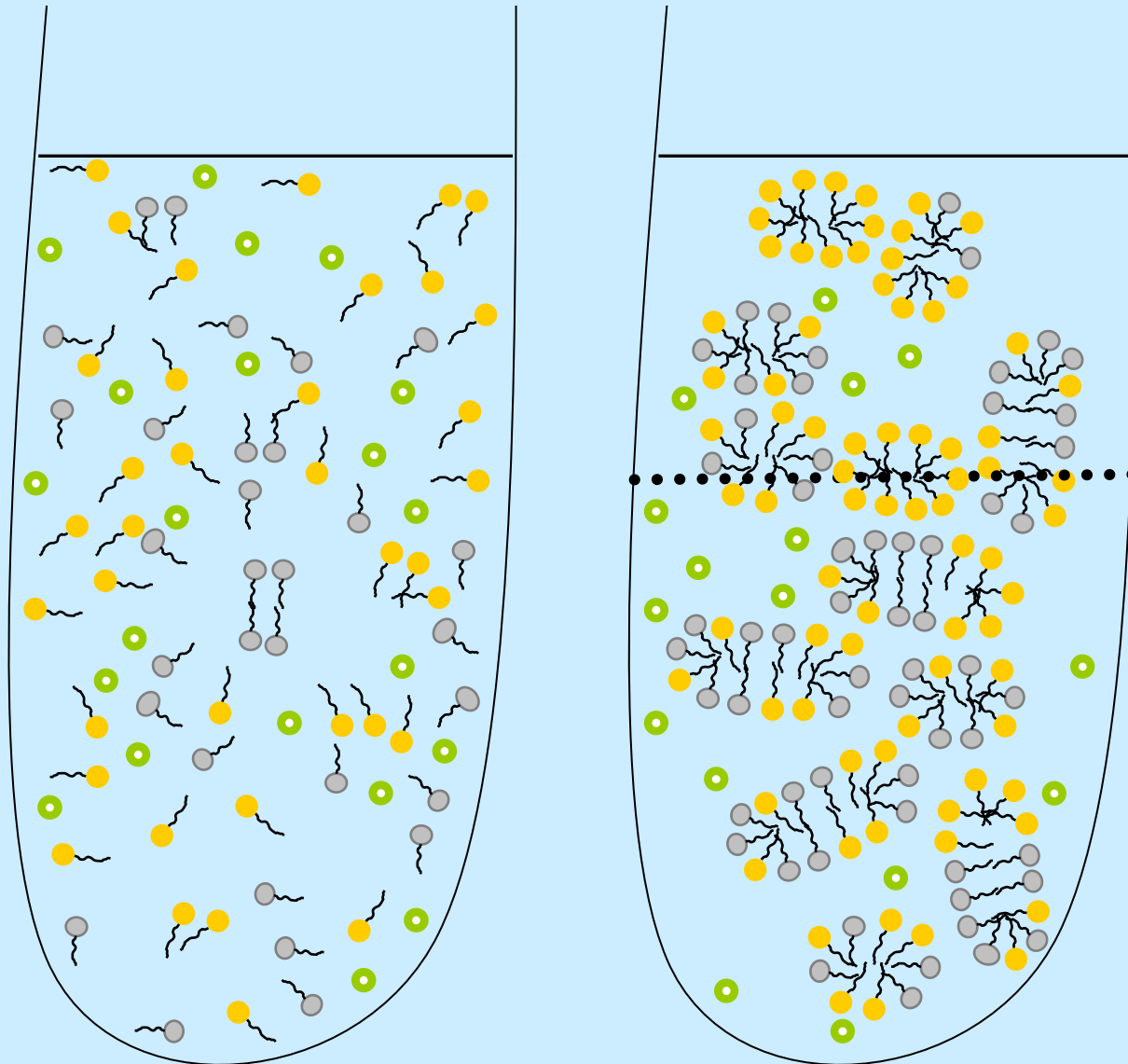


**Estrutura da Endotoxina:
LipoPoliSsacarídeo (LPS)**



**TRITON X-114
polioxietileno *p-t*-octil fenol**

Comportamento da GFPuv (●) e do LPS (●) na Extração em SMDFA Utilizando Triton X-114 (●)



Tubo visto a olho nu

Tubo em câmara de luz UV



Remoção de Pirogênio por Extração Líquido-Líquido de Meio Fermentado de *E. coli*

Condições experimentais e resultados obtidos nos ensaios de partição de pirogênio em sistema micelar Triton X-114

$$K = \frac{A_{F_{ext}}}{A_{F_{ref}}}$$

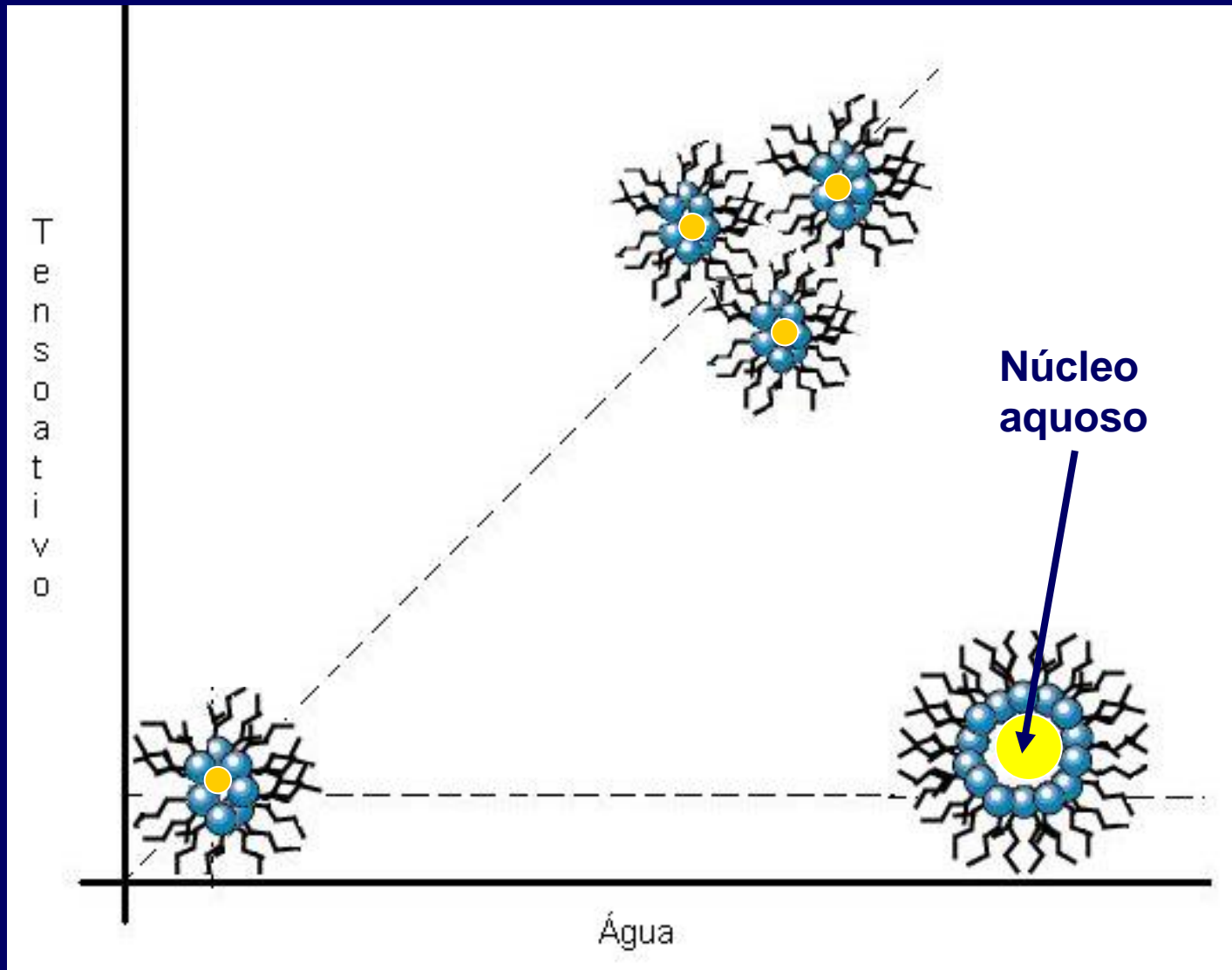
SISTEMA	TX-114 (% p/p)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% p/p)	T (°C)	pirogênio (EU/mL)	R (V _e /V _r)	K _{LPS}
Controle 1	3,00	0	30,9	0	0,50	-
1	3,00	0	30,9	2000000	0,61	3,5
Controle 2	3,00	5,00	12,0	0	0,66	-
2	3,00	5,00	12,0	2000000	0,52	1680
Controle 3	5,00	5,00	12,0	0	2,76	-
3	5,00	5,00	12,0	2000000	2,10	16,5
Controle 4	5,00	5,00	17,0	0	0,61	-
4	5,00	5,00	17,0	2.000.000	0,69	26.200

Patente: Remoção de Pirogênio por Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (em fase de depósito na Agência de Inovação USP)



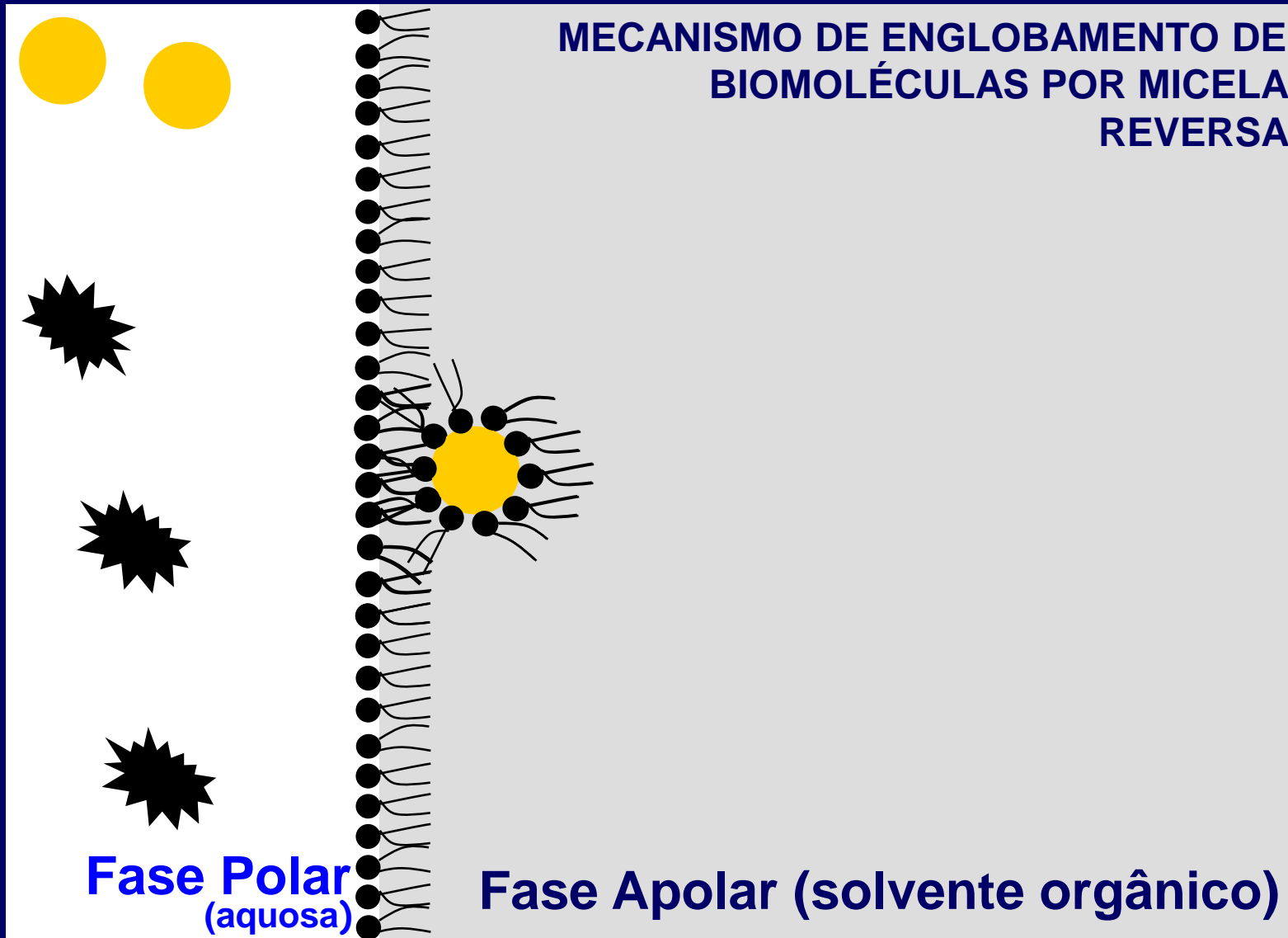
Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos (SMR)

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos (SMR)



SISTEMAS MICELARES REVERSOS
CONCENTRAÇÃO DE ÁGUA x TENSOATIVO

MECANISMO DE ENGLOBAMENTO DE BIOMOLÉCULAS POR MICELA REVERSA



Fase Polar
(aquosa)

Fase Apolar (solvente orgânico)

● Tensoativo

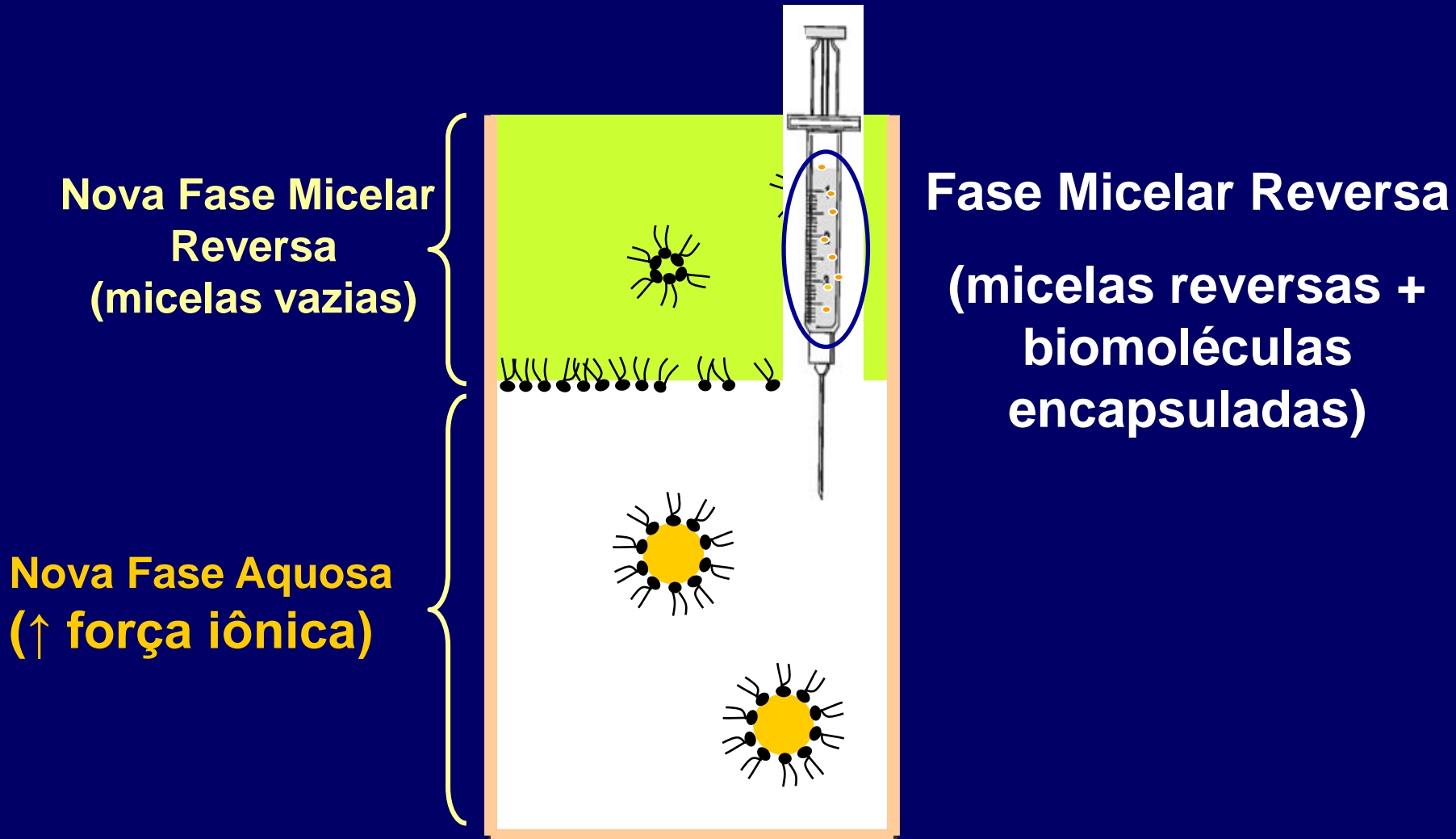
● Biomolécula-alvo

★ Contaminante

Tensoativo e
Biomolécula-alvo

↓
Cargas Opostas

Extração Líquido-Líquido em SMR - Etapa de Reextração



Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos (SMR)



**Sistema
fora da
região
micelar**



**SMR:
hidrolisado
(β -
xilosidase)**



**SMR:
hidrolisado
(β -
xilosidase) +
debris**



**SMR:
sobrenadante
(G6PD) +
leveduras**

Conclusão Geral

A extração líquido-líquido tem importante potencial para ser aplicada na purificação de biomoléculas de diferentes fontes, como: bactérias; fungos filamentosos; leveduras; e alimentos.

ETAPA	OPERAÇÕES UNITÁRIAS	PRINCÍPIO
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho das partículas
	Centrifugação	tamanho e densidade de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	tamanho de partículas
	Floculação	Hidrofobicidade de partículas
Rompimento de células	Homogeneização	Cisalhamento
	ultrassom	Cisalhamento
	moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico
	extração em sistemas de duas fases	Solubilidade
PURIFICAÇÃO DE ALTA RESOLUÇÃO	CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE (BIOLÓGICA OU QUÍMICA)	Sítios específicos da superfície de uma proteína (ligação)
	CROMATOGRAFIA DE IMUNOAFINIDADE	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA	Hidrofobicidade
	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	Massa molar
	MEMBRANAS ADSORTIVAS	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
Tratamentos finais	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido–sólido
	Liofilização e secagem	Características de equilíbrio líquido–sólido

CROMATOGRAFIA

Os processos cromatográficos se definem como técnicas de separação que envolvem transferência de massa entre a **fase móvel** e a **fase estacionária**.

FASE MÓVEL

Meio líquido que flue através da coluna e que arrasta a biomolécula

FASE ESTACIONÁRIA

Material do recheio da **coluna** — sílica porosa, polímeros sintéticos, polímeros de carboidratos

Tempo crescente

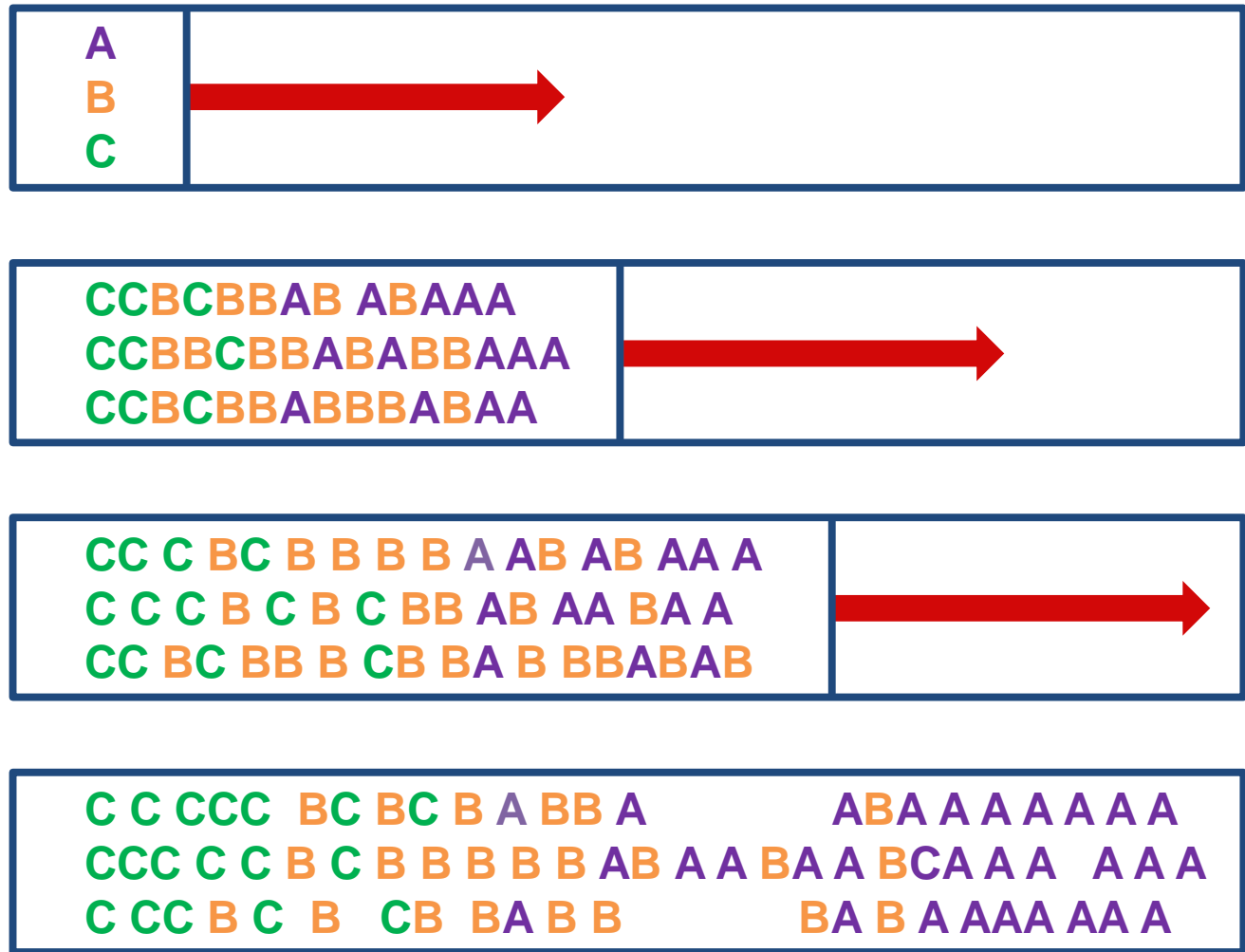


Ilustração da separação de três solutos - A, B e C – por meio de cromatografia.

Os componentes que interagem mais fortemente com a fase estacionária movem-se mais lentamente do que aqueles que interagem de forma mais fraca → ficam retidos por mais tempo na coluna.

meio com proteínas

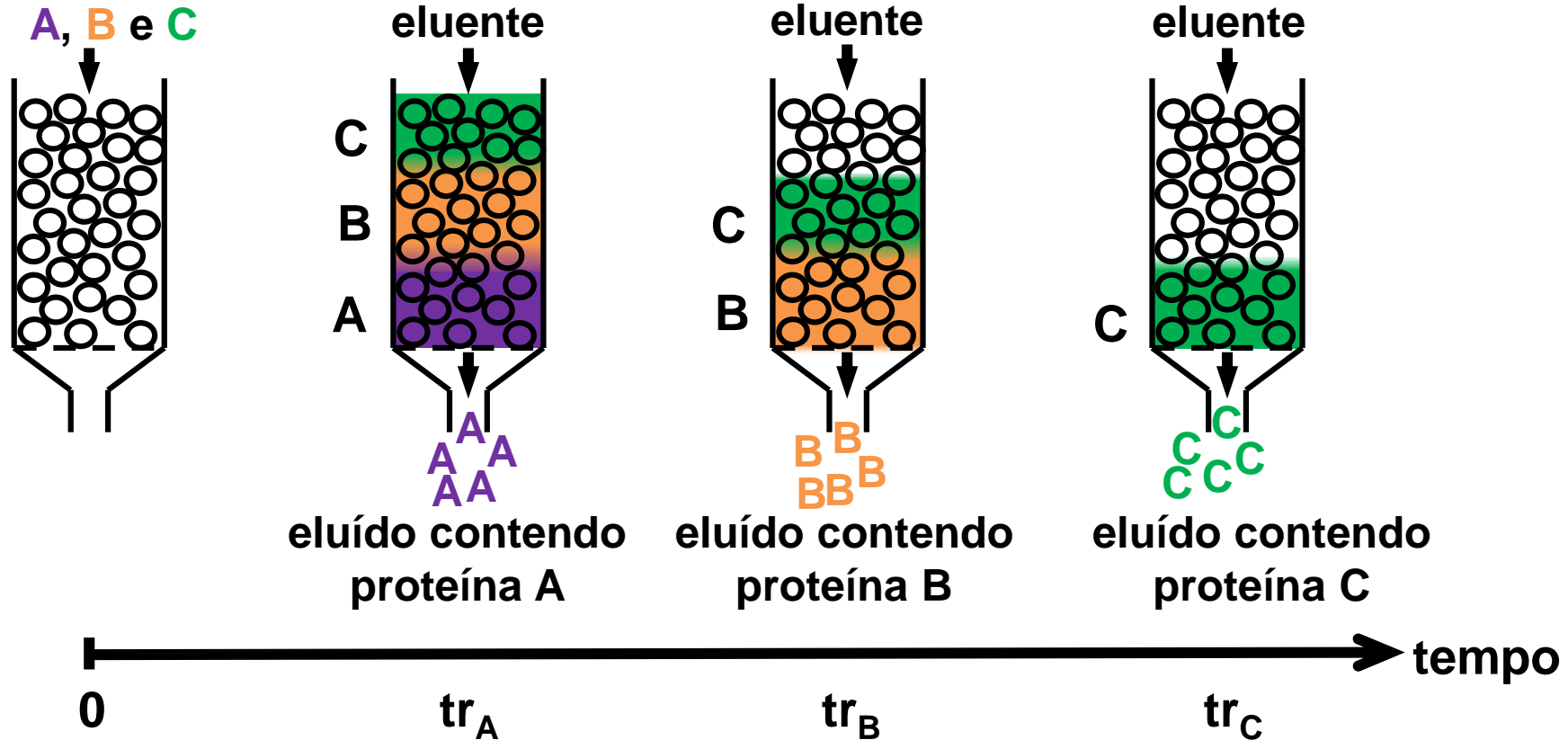
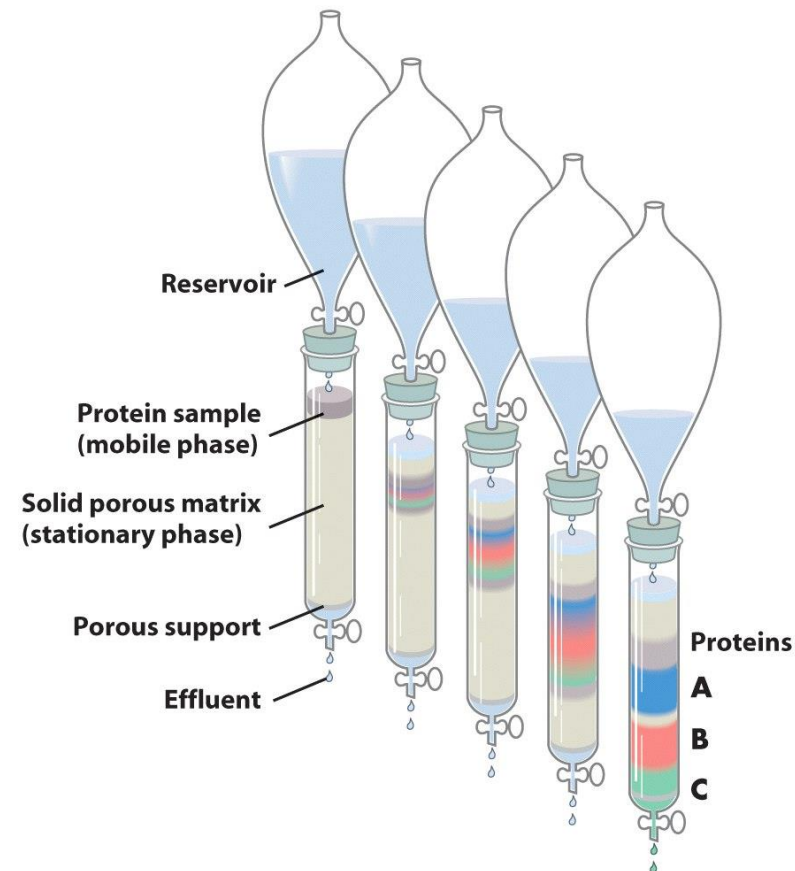


Ilustração de um processo cromatográfico genérico em que t_{rA} , t_{rB} e t_{rC} representam os tempos de retenção das moléculas A, B e C, respectivamente.

Alternativamente ao tempo de retenção, utiliza-se o volume de retenção → volume que passa na coluna até a saída da molécula-alvo.

Fatores que devem ser considerados na escolha de uma resina

- **Resolução: Seletividade e Eficiência**
 - **Recuperação**
 - **Reprodutibilidade**
- **Estabilidade (tempo de vida útil)**
 - **Higienização/Sanitização**
- **Custos**



➤ RESOLUÇÃO:

- É a distância que separa os picos de eluição, ou seja, significa quão bem um pico separa-se do outro.

➤ SELETIVIDADE:

- Descreve como a cromatografia é capaz de distinguir duas diferentes substâncias, ou seja, pode ser observada pela distância entre os picos no cromatograma.

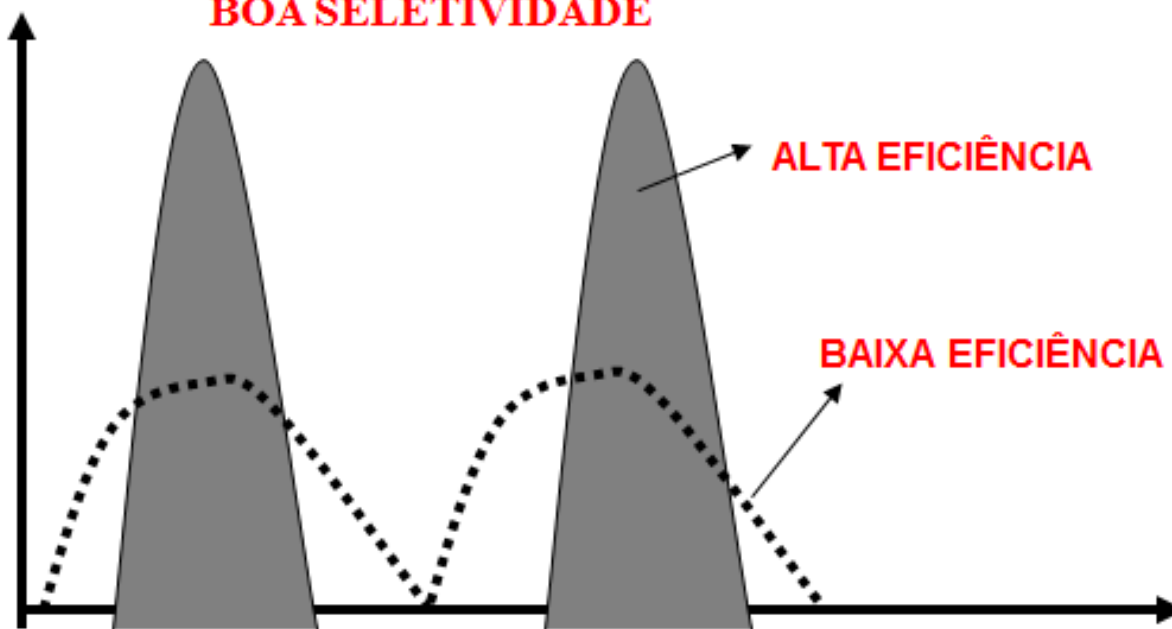
➤ CAPACIDADE:

- É a quantidade de amostra ($g_{\text{proteína}}/\text{litro}_{\text{resina}}$) que se pode processar sem a perda de resolução ou esgotamento da capacidade de ligação entre soluto e ligante.

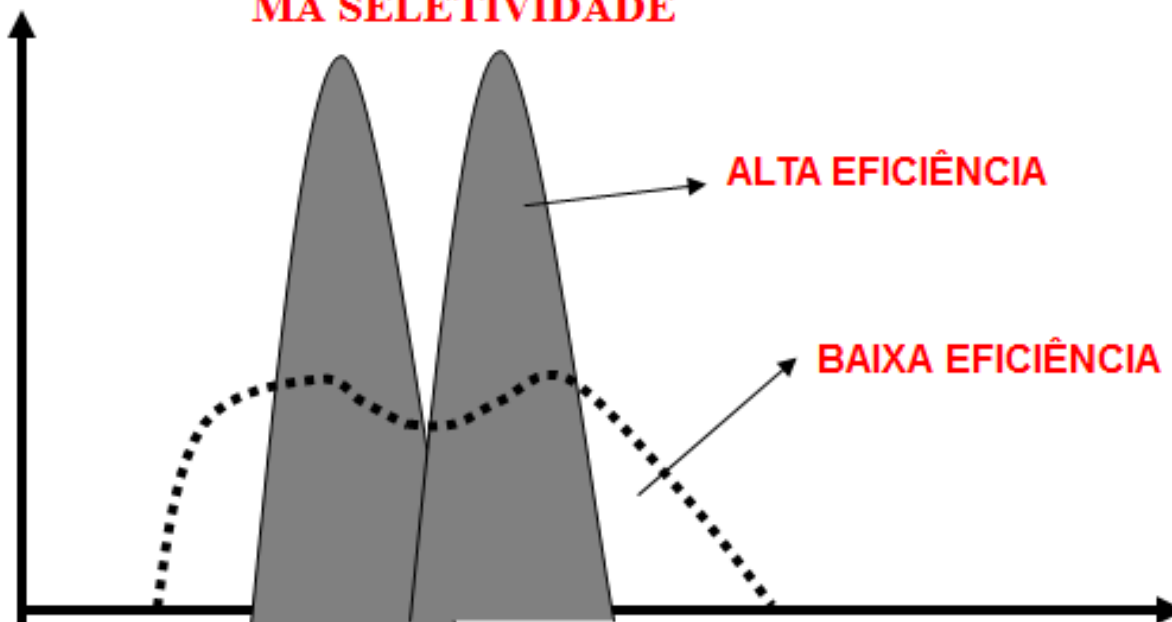
➤ RECUPERAÇÃO:

- É a quantidade de produto final obtido em relação à quantidade do produto no material inicial.

BOA SELETIVIDADE

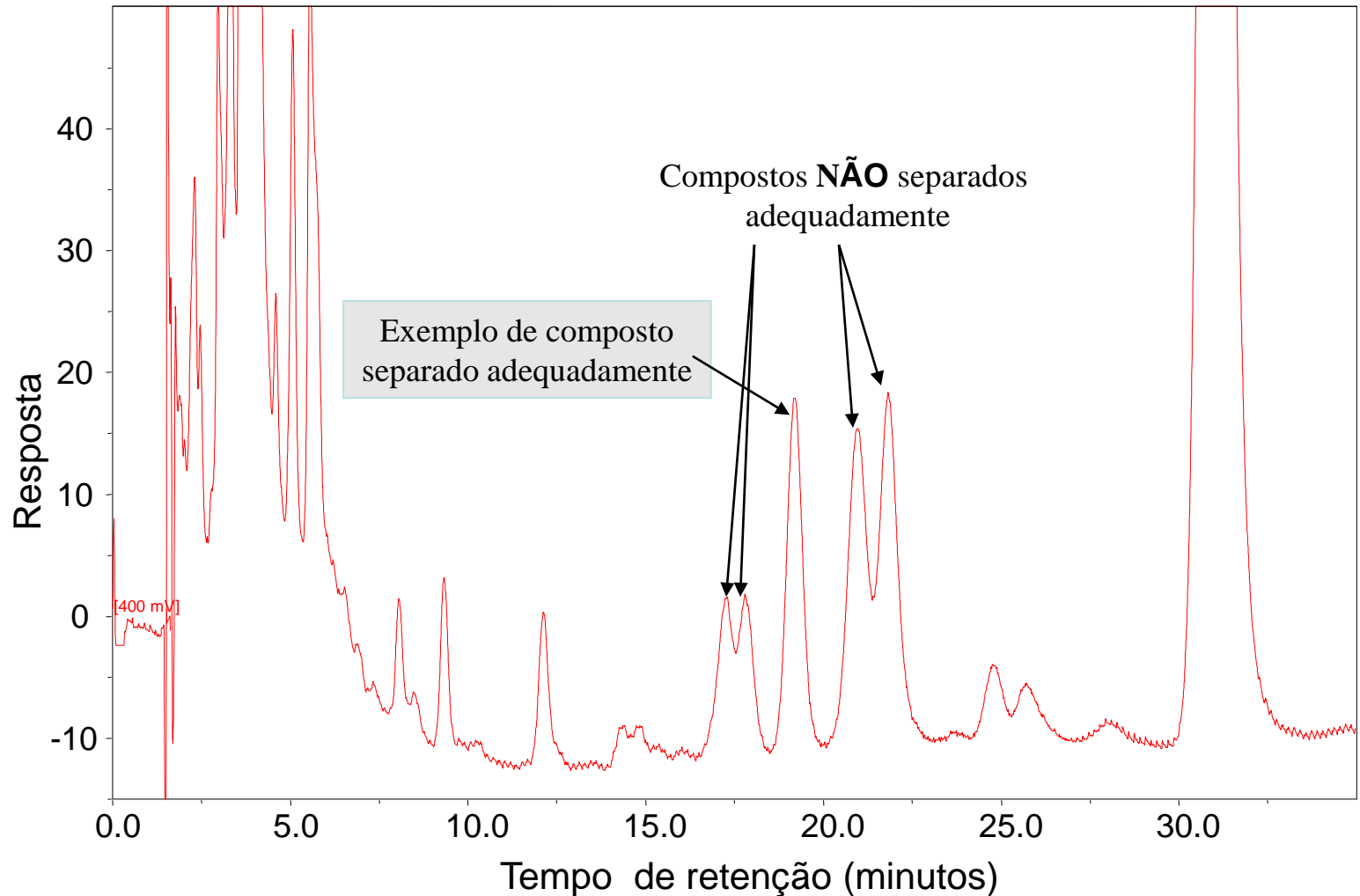


MÁ SELETIVIDADE

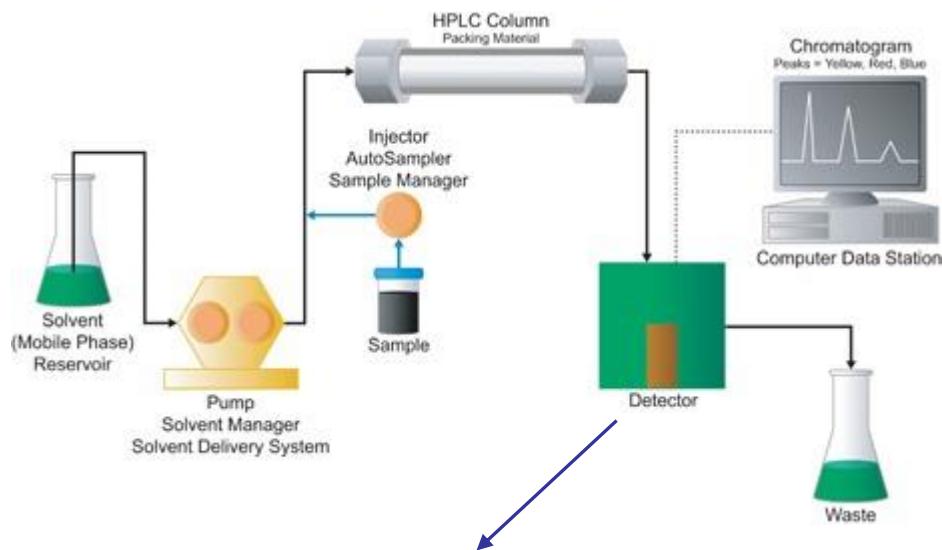


Cromatograma

Gráfico de concentração da biomolécula de interesse versus o tempo de eluição



CROMATOGRAFIA → INSTALAÇÃO



DETECÇÃO

- ESPECTROFOTOMÉTRICA → 280 aa aromáticos
- ESPECTROFLUORIMÉTRICA
- ELETROQUÍMICA
- RADIOATIVIDADE
- ESPECTROMETRIA DE MASSAS
- ÍNDICE DE REFRAÇÃO → açúcares e ácidos orgânicos

FASE ESTACIONÁRIA

Leito altamente empacotado

Elevada resolução

Alta Pressão

PRESSÕES:

Baixas pressões → 5 atm

Cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC)

Baixas pressões → 6-45 atm

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Baixas pressões → ↑50 atm

Cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)

CROMATOGRAFIA → INSTALAÇÃO

Características fundamentais de um sistema cromatográfico:

- Versátil e Flexível.
- Simples e fácil de operar.
- Compatível com a amostra e os solventes.



ÄKTAexplorer



ÄKTAprime



ÄKTApurifier



ÄKTAFFLC



Cromatografia é um método de separação de solutos do solvente baseado na diferença de migração desses componentes entre duas fases:

*** Realizada em condições brandas, sem geração de calor ou forças de atrito.**

Cromatografia Gasosa: fase móvel é um gás

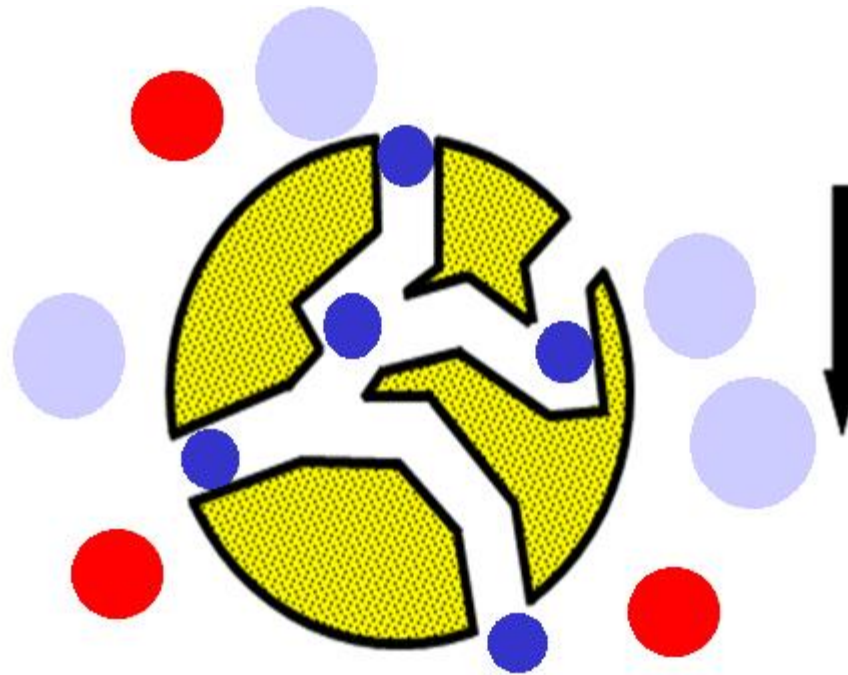
Cromatografia Líquida: fase móvel é um líquido

Cromatografia supercrítica: fase móvel é um vapor pressurizado ($T > T_c$)

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CLÁSSICA:

- **Exclusão Molecular (ou Gel Filtração)**
- **Troca Iônica: catiônica e aniônica**
 - **Interação Hidrofóbica**
 - **Bioafinidade**

Cromatografia por Exclusão Molecular (Permeação em Gel)



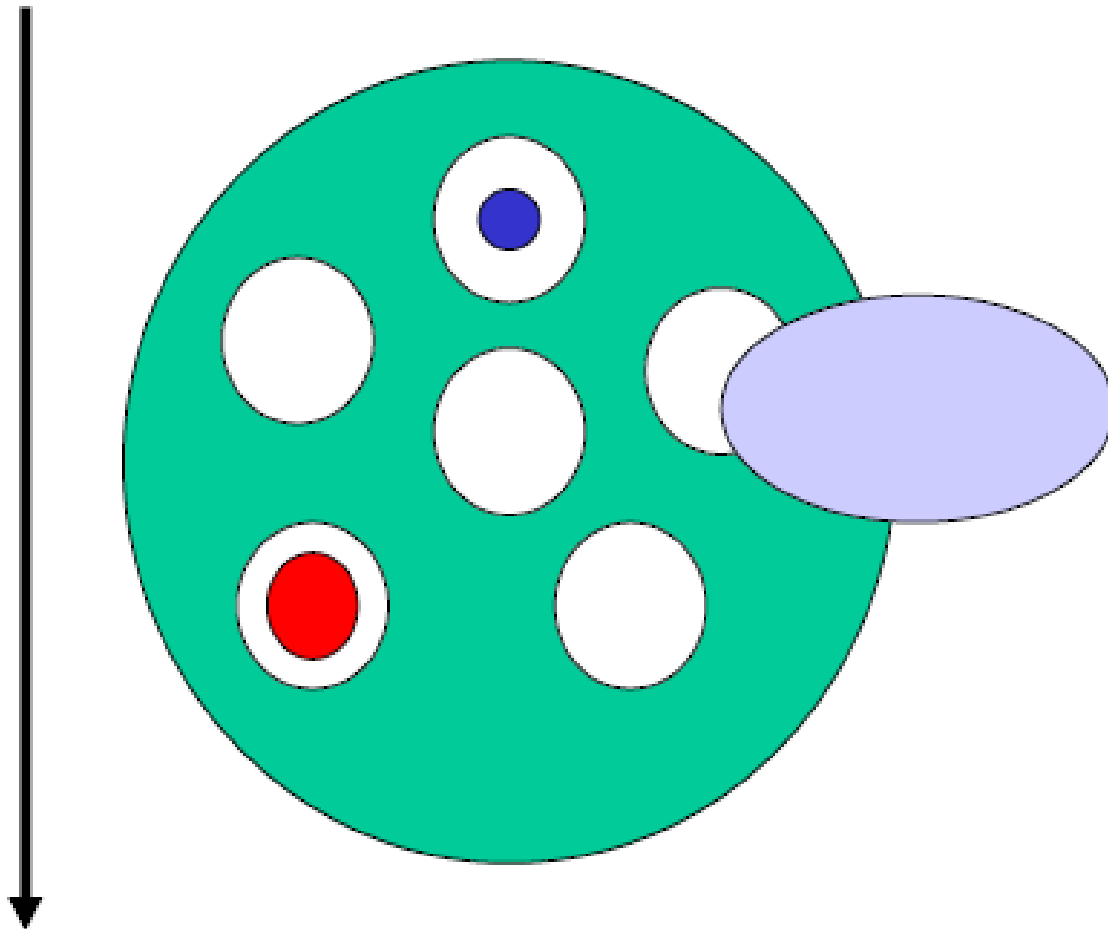
Representação esquemática do princípio da cromatografia de permeação em gel.

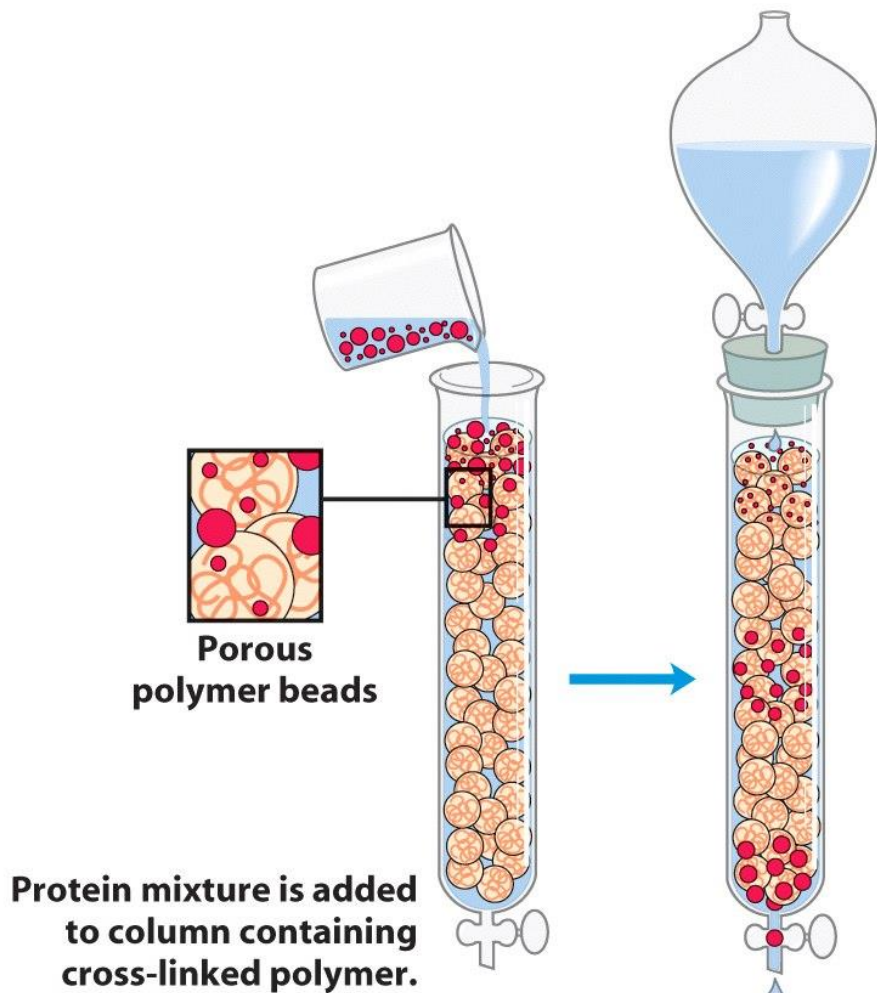
**As moléculas menores que os poros da matriz podem penetrar em todos os poros
→ azul escuro**

**As de tamanho intermediário entram apenas nos poros de maior dimensão →
Vermelha**

As moléculas maiores limitam-se à passagem pela região externa (Azul claro).

fluxo

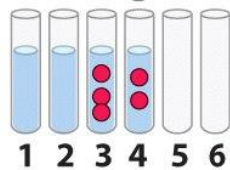




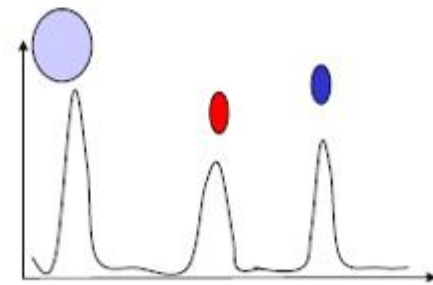
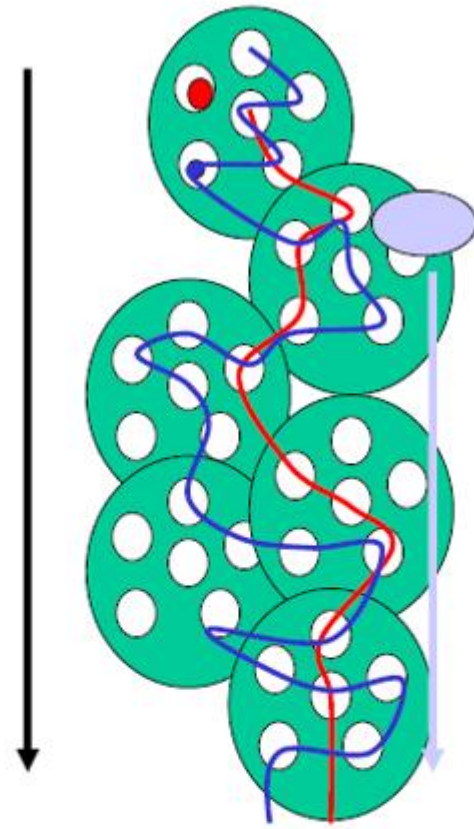
Porous polymer beads

Protein mixture is added to column containing cross-linked polymer.

Protein molecules separate by size; larger molecules pass more freely, appearing in the earlier fractions.



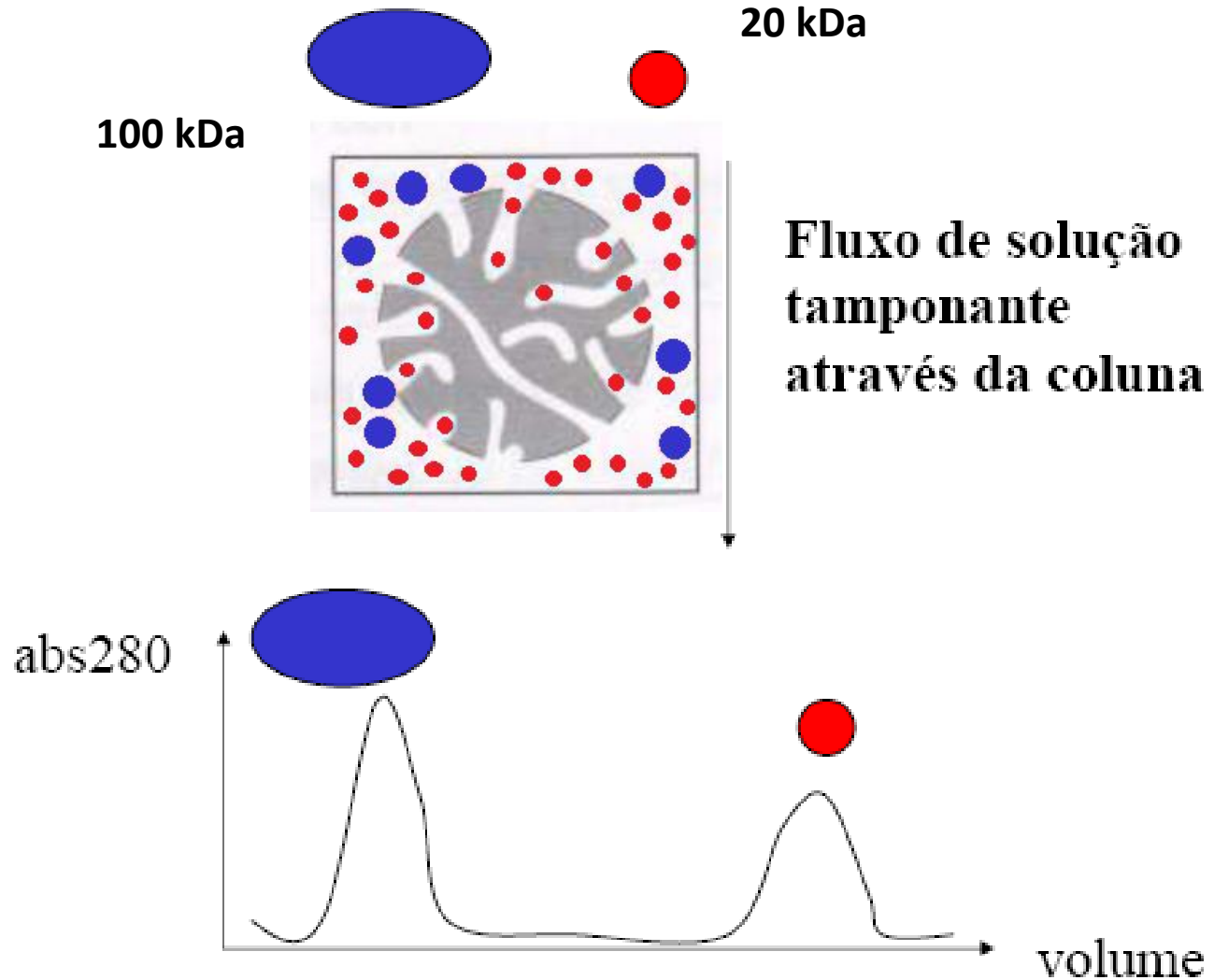
fluxo



volume

Filtração em Gel ou Cromatografia de Exclusão Molecular

Tamanho:





Resinas para Gel-Filtração

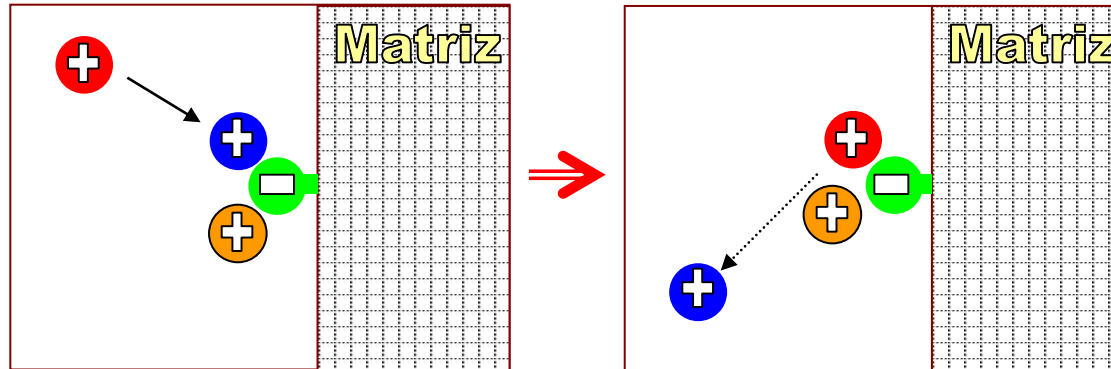
NOME	TIPO	FAIXA DE RESOLUÇÃO (kD)	
Sephadex G-10	Dextrana	0.05 - 0.7	
Sephadex G-25	Dextrana	1 - 5	
Sephadex G-50	Dextrana	1 - 30	
Sephadex G-100	Dextrana	4 - 150	
Sephadex G-200	Dextrana	5 - 600	
Bio-Gel P- 2	Policrilamida	0.1 - 1.8	
Bio-Gel P- 6	Policrilamida	1 - 6	
Bio-Gel P- 10	Policrilamida	1.5 - 20	
Bio-Gel P- 30	Policrilamida	2.4 - 40	
Bio-Gel P-100	Policrilamida	5 - 100	
Bio-Gel P-300	Policrilamida	60 - 400	
Sepharose 6B	Agarose	10 - 4.000	
Sepharose 4B	Agarose	60 - 20.000	
Sepharose 2B	Agarose	70 - 40.000	

*Sephadex e Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech; Bio -Gel: Bio-Rad Laboratories

- **Utilizada na troca de tampões, remoção de sais e pequenas moléculas não incorporadas em lipossomas.**
- **Utilizada para separar oligômeros → proteínas de uso clínico**

TROCA-IÔNICA

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

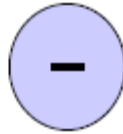


ADSORÇÃO REVERSÍVEL das moléculas carregadas do soluto ao grupo trocador imobilizado de carga oposta.

A **SELETIVIDADE** da ligação é controlada pelo pH e força iônica inicial.

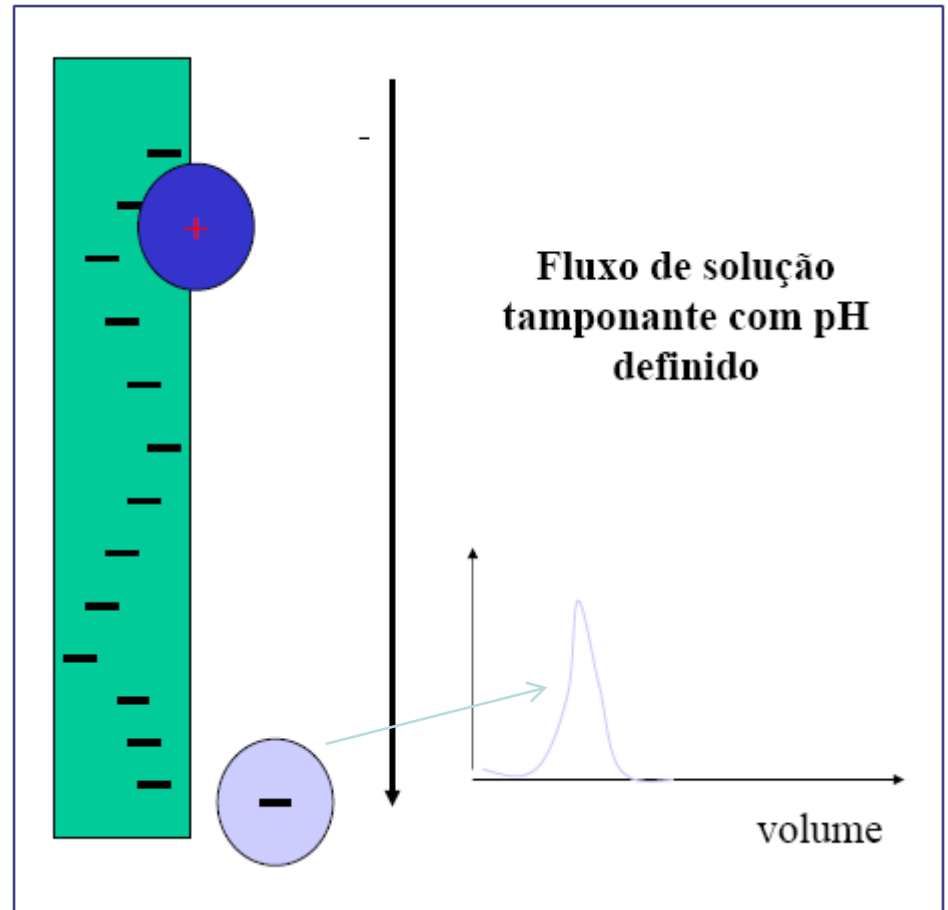
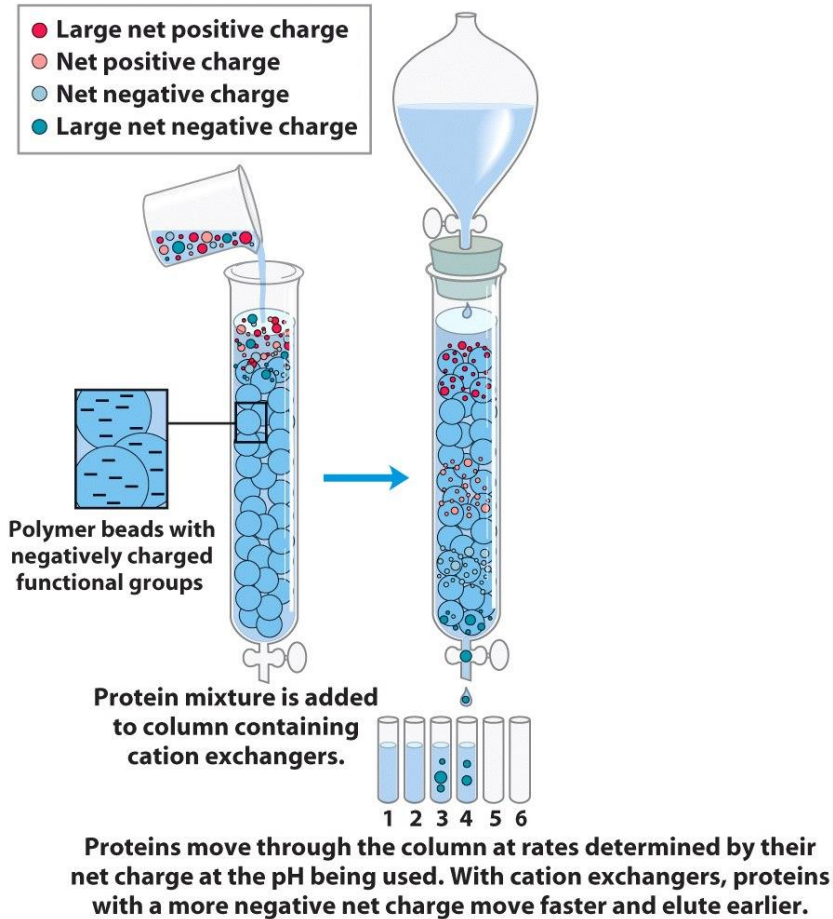
A **ELUIÇÃO** ocorre com aumento da força iônica e mudança do pH.

Trocadores Aniônicos: são Carregados Positivamente - adsorvem proteínas -
Trocadores Catiônicos: são Carregados Negativamente - adsorvem proteínas +

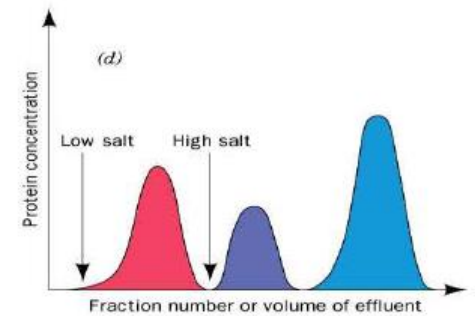
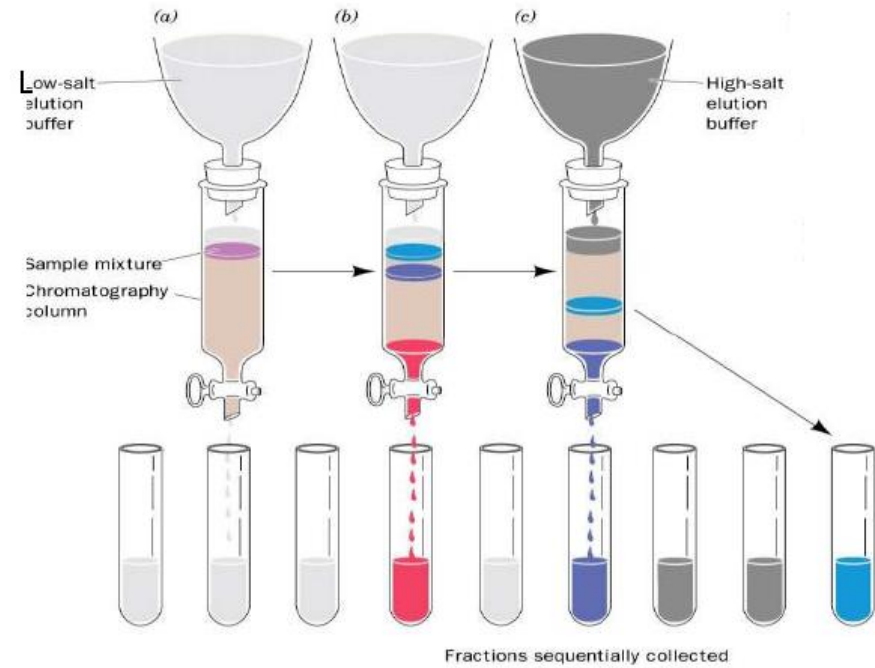
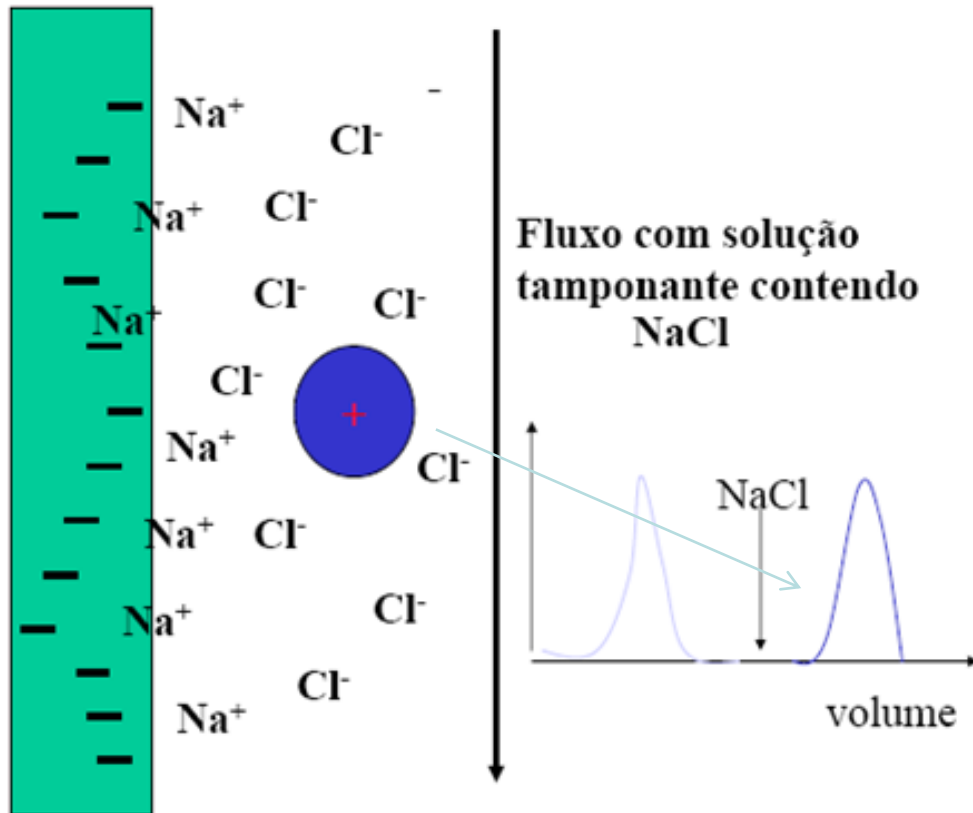


**Fluxo de solução
tamponante com pH
definido**

ADSORÇÃO



ELUIÇÃO



MATRIZES – FASE SÓLIDA OU ESTACIONÁRIA

Influenciam a resolução da purificação e o custo do processo.

ESCOLHA DA MATRIZ:

➤ **Estabilidade mecânica → fluxo de alimentação X deformação da matriz;**

➤ **Estabilidade química → amostras, esterilização e sanitização;**

➤ **Capacidade de adsorção → quanto maior: ↑ velocidade e ↓ volume do leito;**

➤ **Tamanho e forma dos poros → permitir acesso da molécula-alvo aos sítios de adsorção;**

➤ **Superfície da matriz → deve amenizar adsorções não específicas (entupimento da matriz).**

PROCESSOS DE ELUIÇÃO:

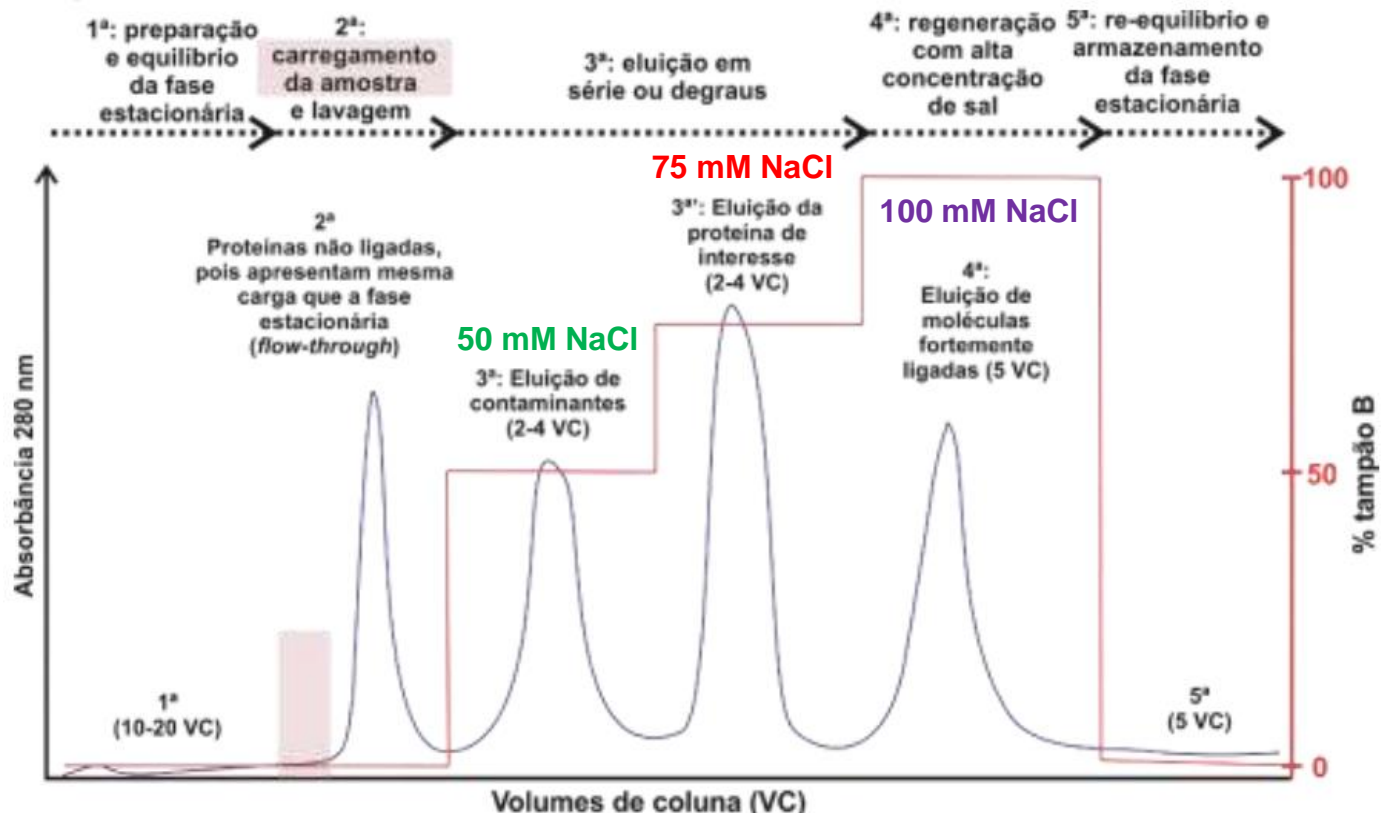
- A eluição pode ocorrer por aumento da força iônica ou mudança de pH.

ELUIÇÃO POR ETAPAS OU ISOCRÁTICA:

- É usada, simultaneamente, para purificar e concentrar biomoléculas.

Nesse caso ocorre a introdução na coluna de concentrações fixas de sais →

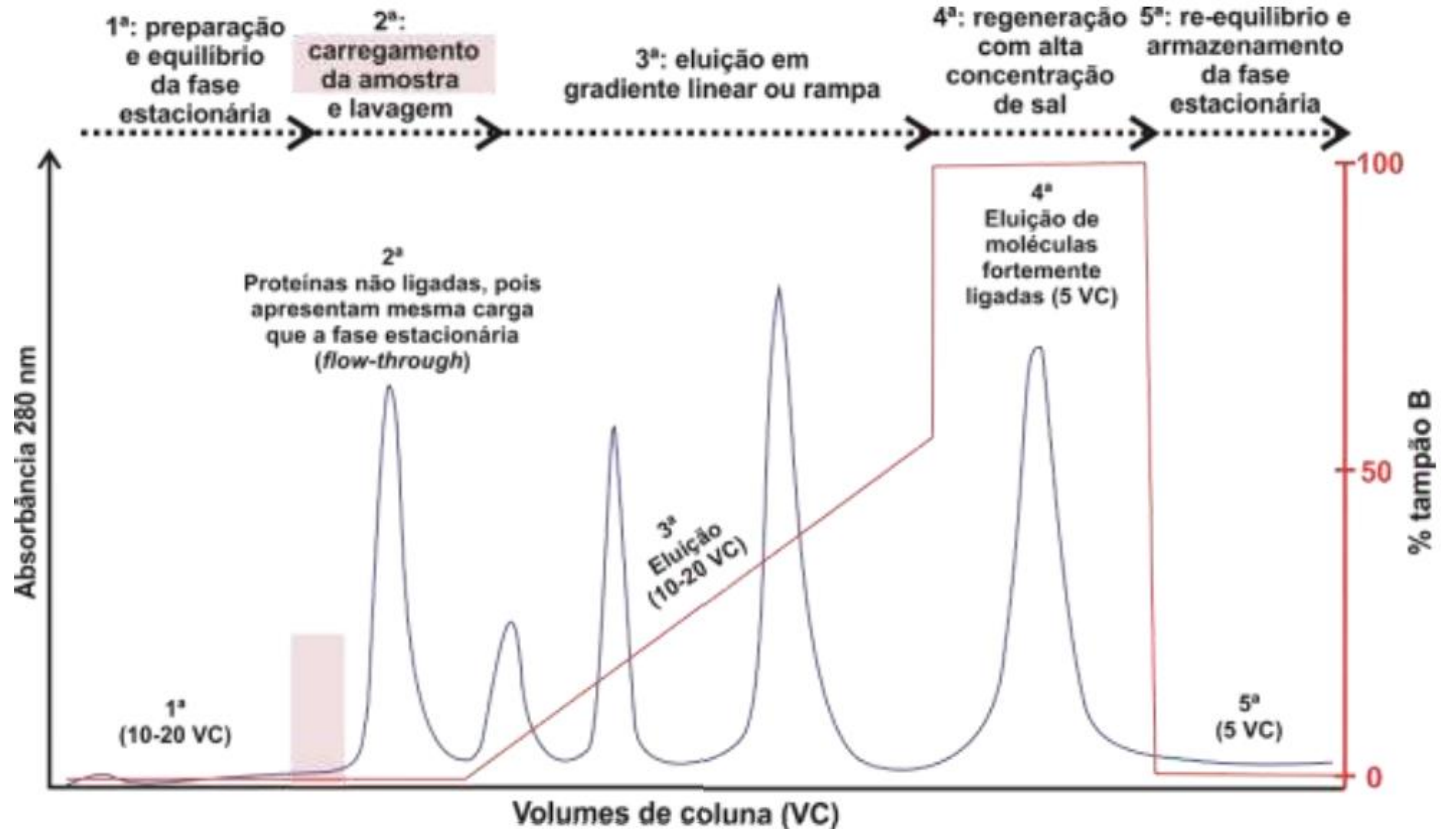
Corte 1: 50mM NaCl / Corte 2: 75mM NaCl / Corte 3: 100 MM NaCl.



PROCESSO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE:

Nesse caso promove-se uma variação contínua da força iônica ou do pH do eluente → **Eluição sequencial das proteínas em função da força de interação na matriz.**

- Os gradientes são obtidos por misturas de diferentes tampões de tal forma que a concentração de sal no eluente seja crescente.



Interação Hidrofóbica

É BASEADA NA HIDROFOBICIDADE DA PROTEÍNA

Altas concentrações de sal neutralizam as cargas das regiões ionizadas, possibilitando a interação da região hidrofóbica da proteína com o ligante hidrofóbico da resina

Idealmente, aplica-se a cromatografia de interação hidrofóbica após o processo de precipitação com sal → elevada força iônica

ESTRATÉGIAS PARA ELUIÇÃO:

- 1. diminuir a concentração de sal**
- 2. diminuir a polaridade da fase móvel**
- 3. adicionar detergente**

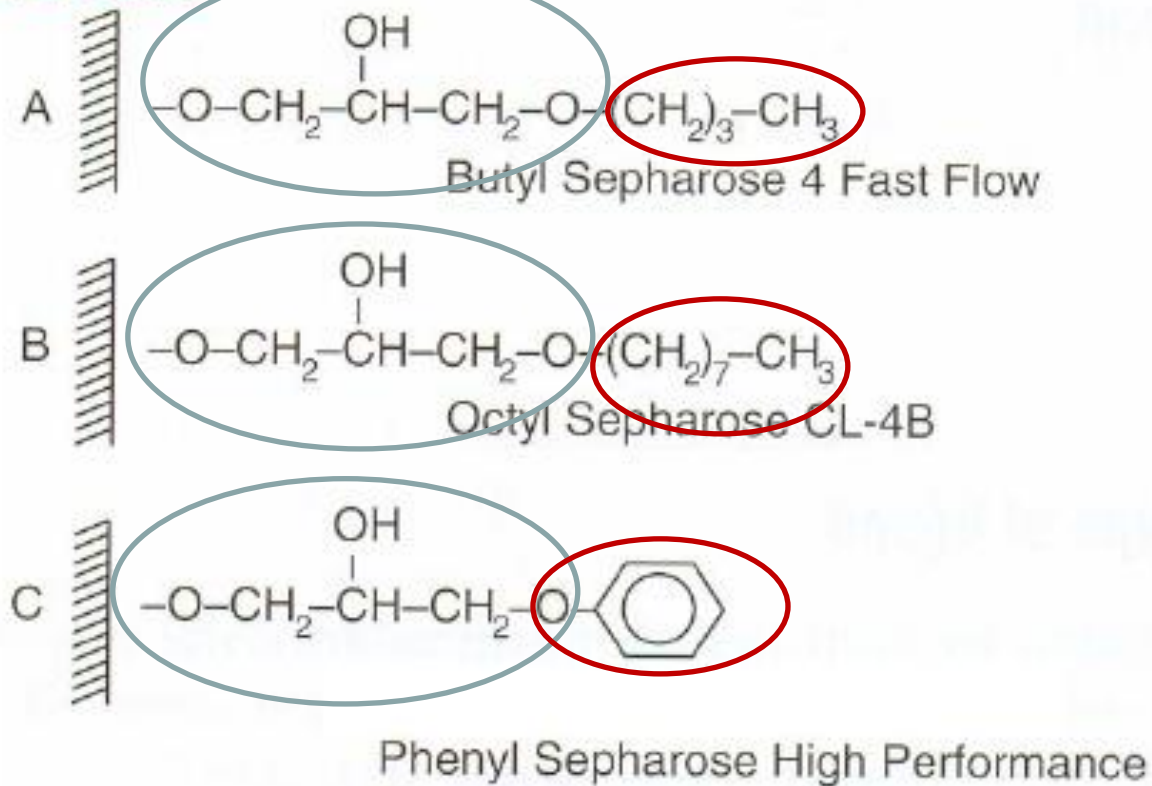
A cromatografia de Interação Hidrofóbica é afetada por:

- pH
- Concentração do sal
 - Tipo de sal
 - Temperatura
 - Tipo de ligante

LIGANTES IMOBILIZADOS:

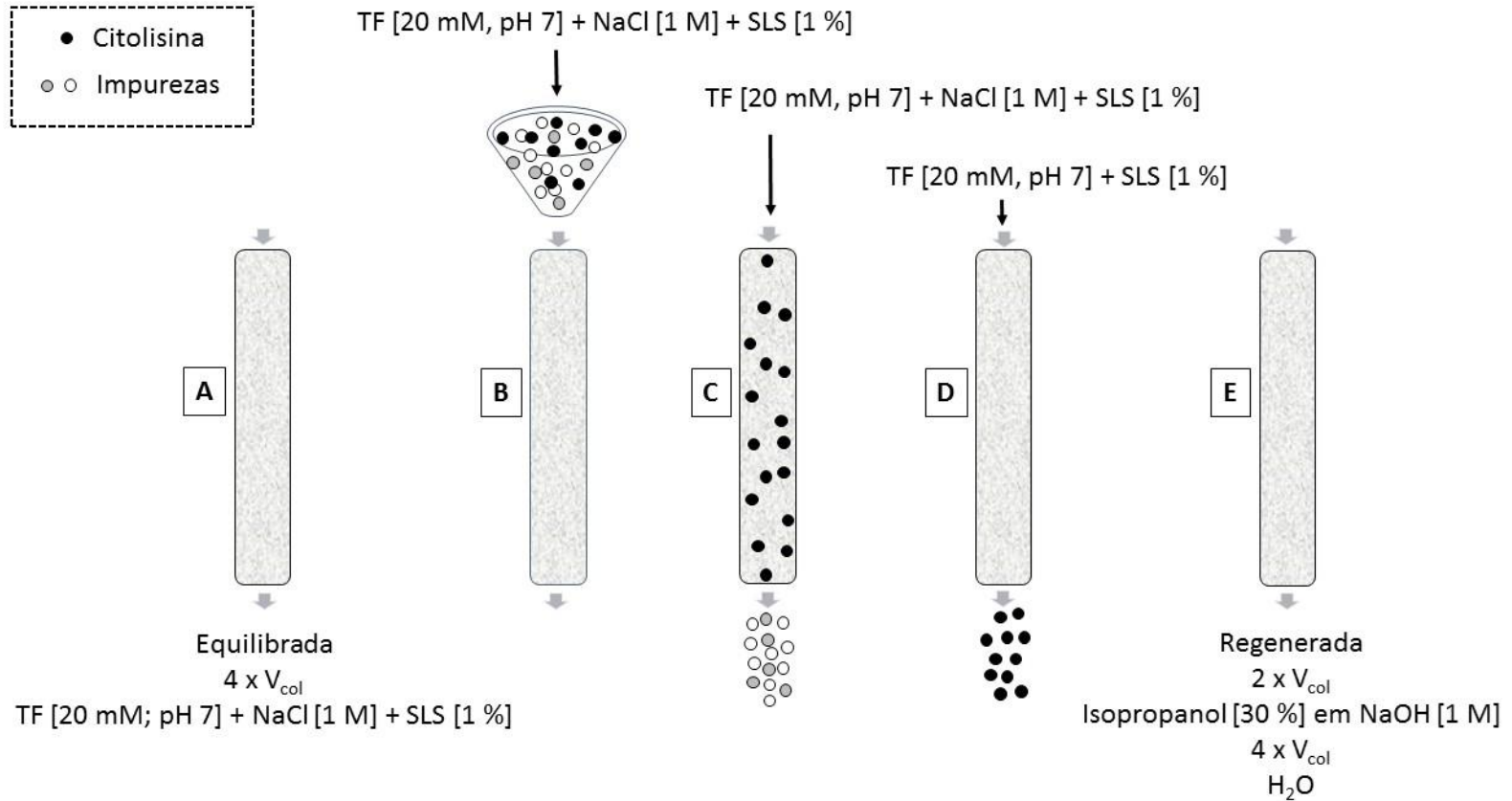
- Fenil
- Butil
- Octil

Tipos de resina



Força da interação hidrofóbica aumenta com o tamanho da cadeia de C na resina:

Fenil (C6-OH) > Butil (C4) > Octil (C8)



Estágios da CIH com coluna de HP Phenyl-Sepharose® para separação de citolisina a partir do cultivo de *Escherichia coli*.

- [A] = Estabilização;
 [B] = Injeção da amostra (adsorção);
 [C] = Lavagem da coluna;
 [D] = Eluição da biomolécula (dessorção);
 [E] = Regeneração da coluna.

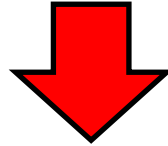
V_{col} : volume da coluna (leito); TF: tampão fosfato; SLS: lauroil sarcosinato de sódio.



Cromatografia por

AFINIDADE

MECANISMO DE SEPARAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS



Afinidade biológica

CARACTERÍSTICAS DA TÉCNICA

Explora a especificidade de ligação das biomoléculas

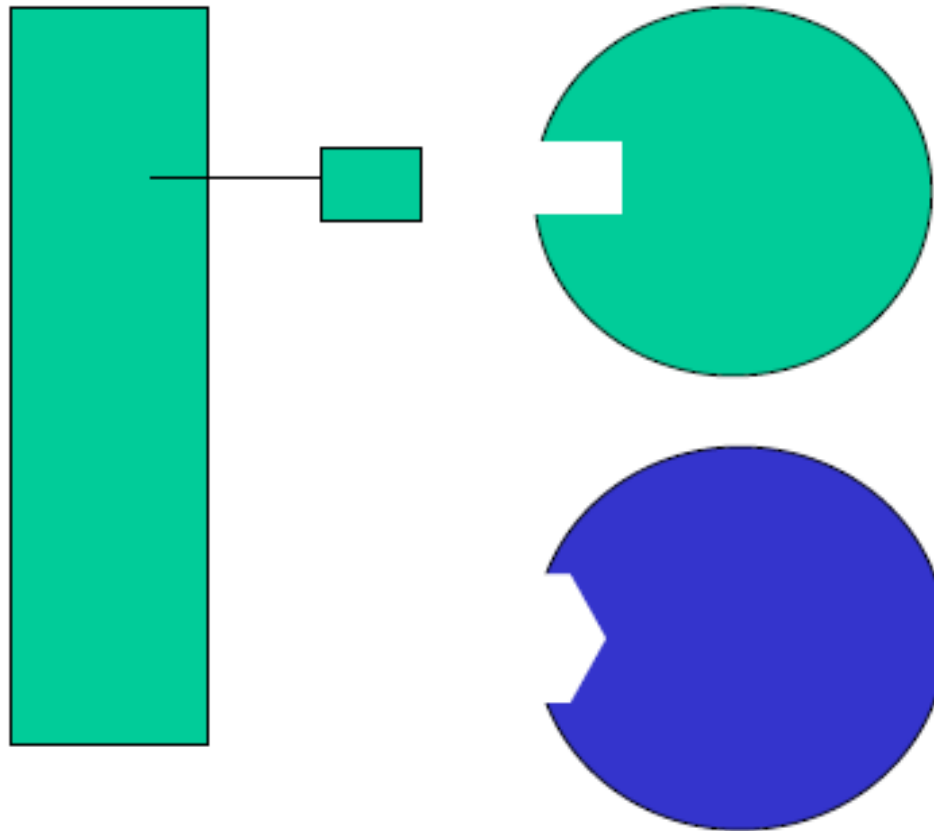
Ligante deve estar ligado covalentemente ao suporte

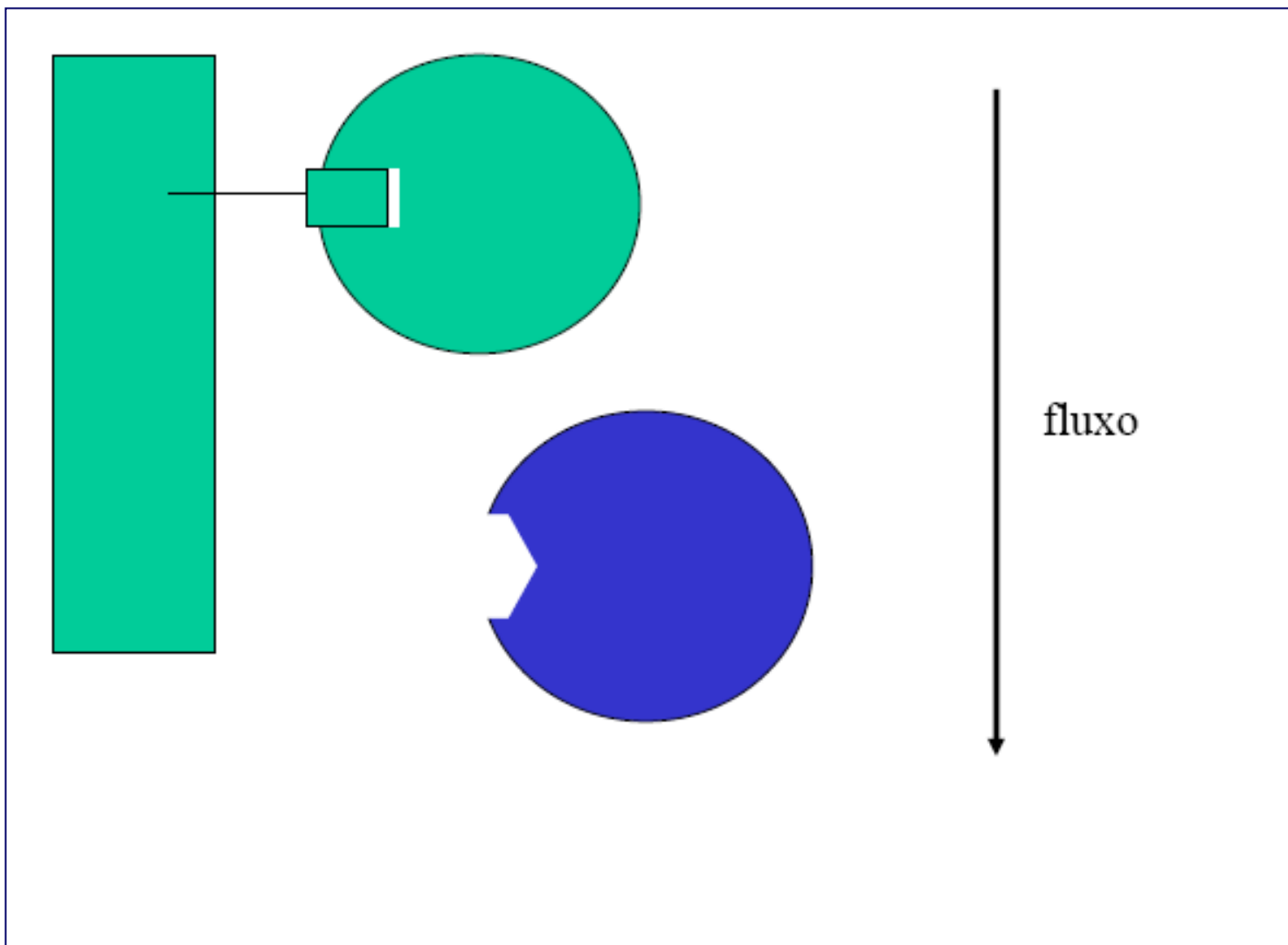
Alta seletividade e fácil aplicabilidade

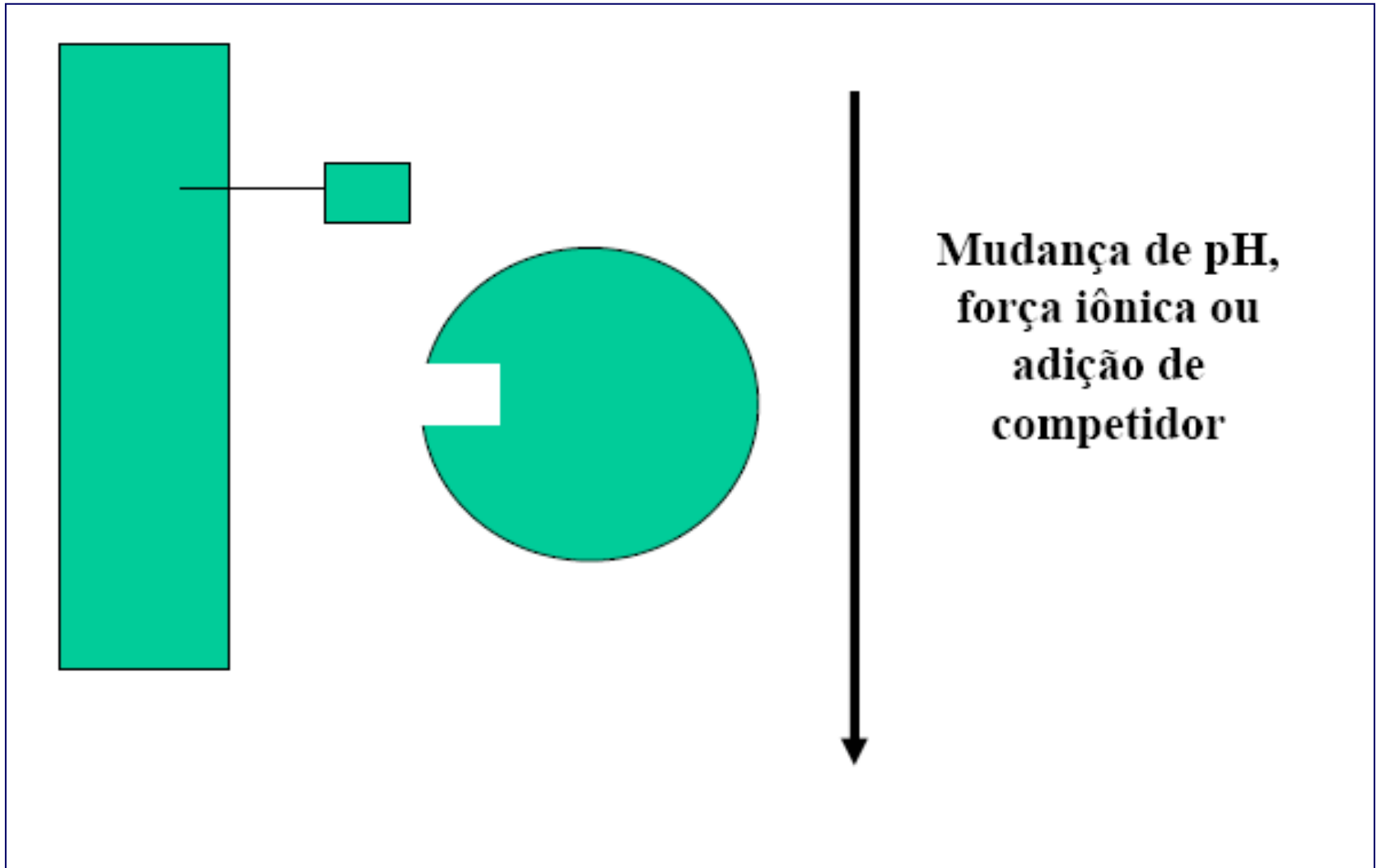
Alta capacidade e velocidade

Cromatografia de Afinidade

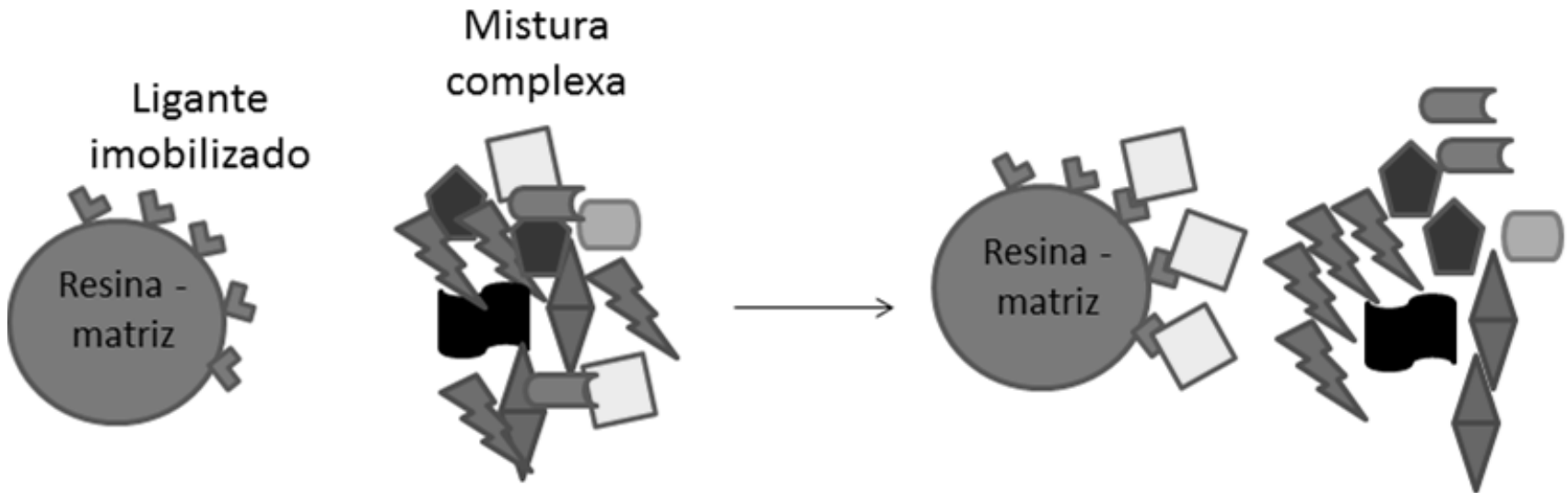
Afinidade biológica



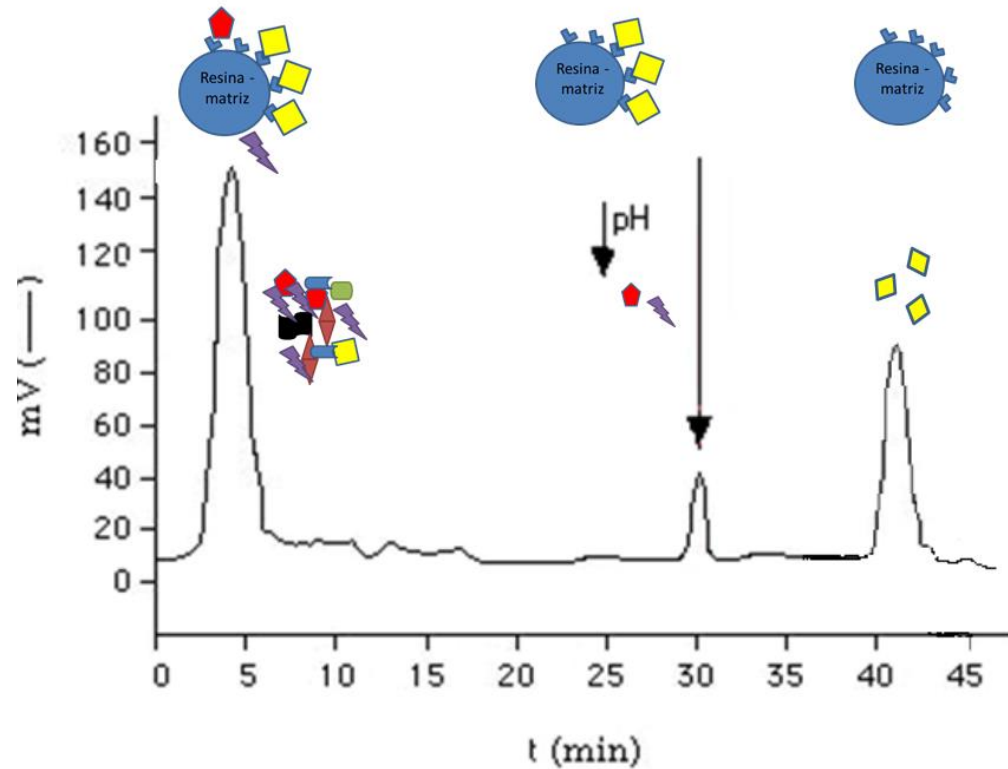
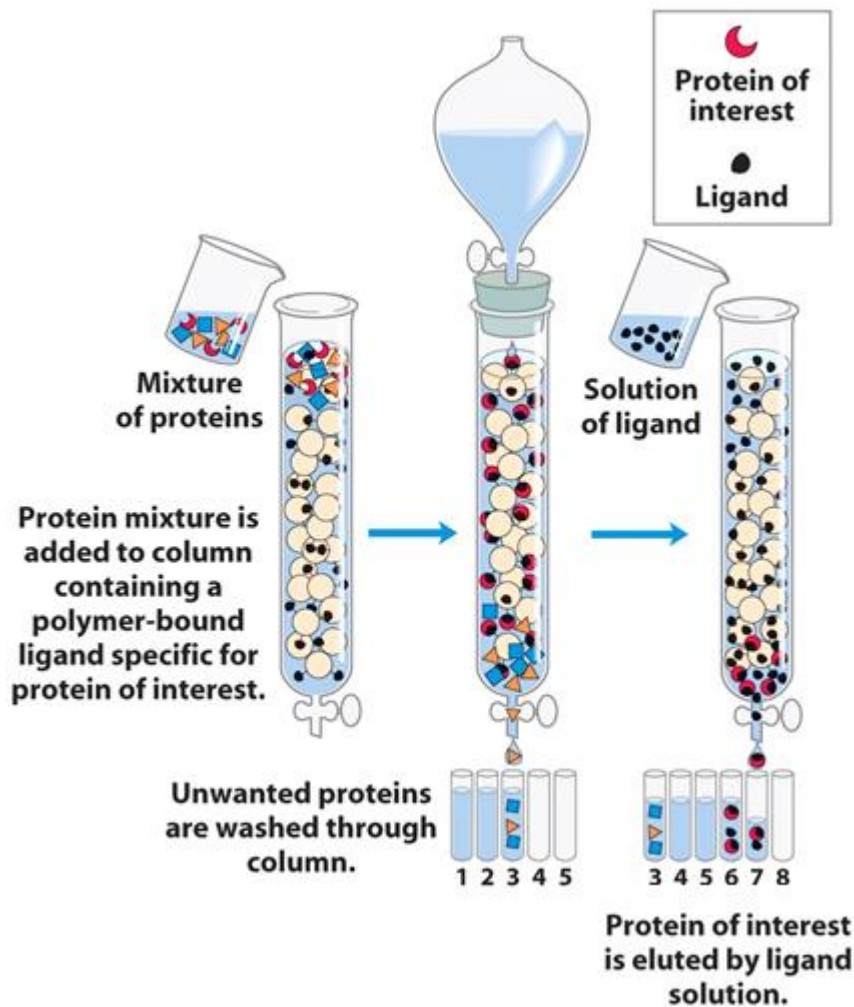




Esquema geral do princípio de cromatografia de afinidade:



Somente um tipo de proteína da mistura complexa fica adsorvida na matriz, que possui um ligante covalentemente ligado à fase estacionária enquanto outras proteínas são eluídas na etapa da lavagem



Cromatograma de uma eluição promovida por meio de mudança de pH, numa cromatografia de afinidade: intensidade dos picos (mV) em função do tempo (min) de eluição e do instante de alteração do pH.

EXEMPLOS DE LIGANTES PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

ESPECÍFICOS

Anticorpos Monoclonais → Antígeno

Heparina → Fatores de crescimento

Arginina → Proteases

Substrato/inibidor → Enzimas

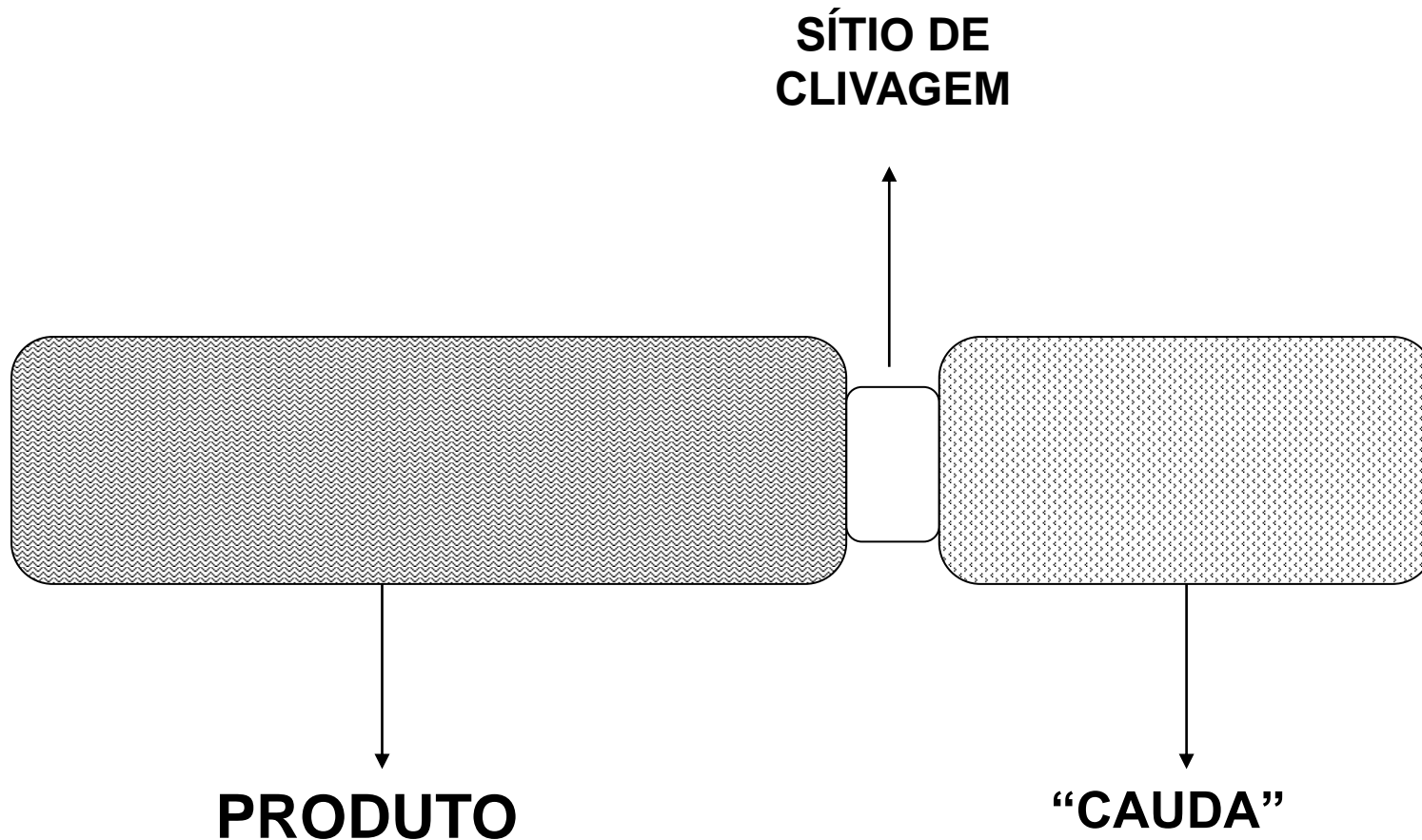
Afinidade a Metal → proteína com histidina, triptofano, cisteína

ARTIFICIAIS

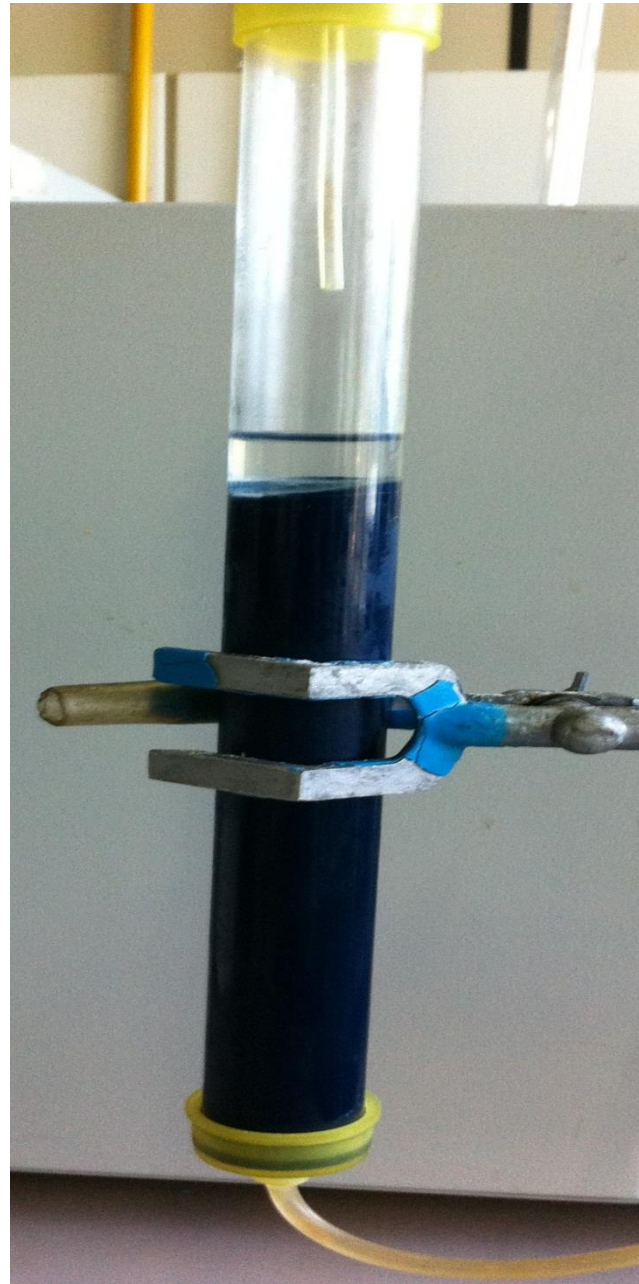
Cibacron Blue → Enzimas com cofatores como NAD⁺ e NADP⁺

Procion Red → Enzimas com cofatores como NAD⁺ e NADP⁺

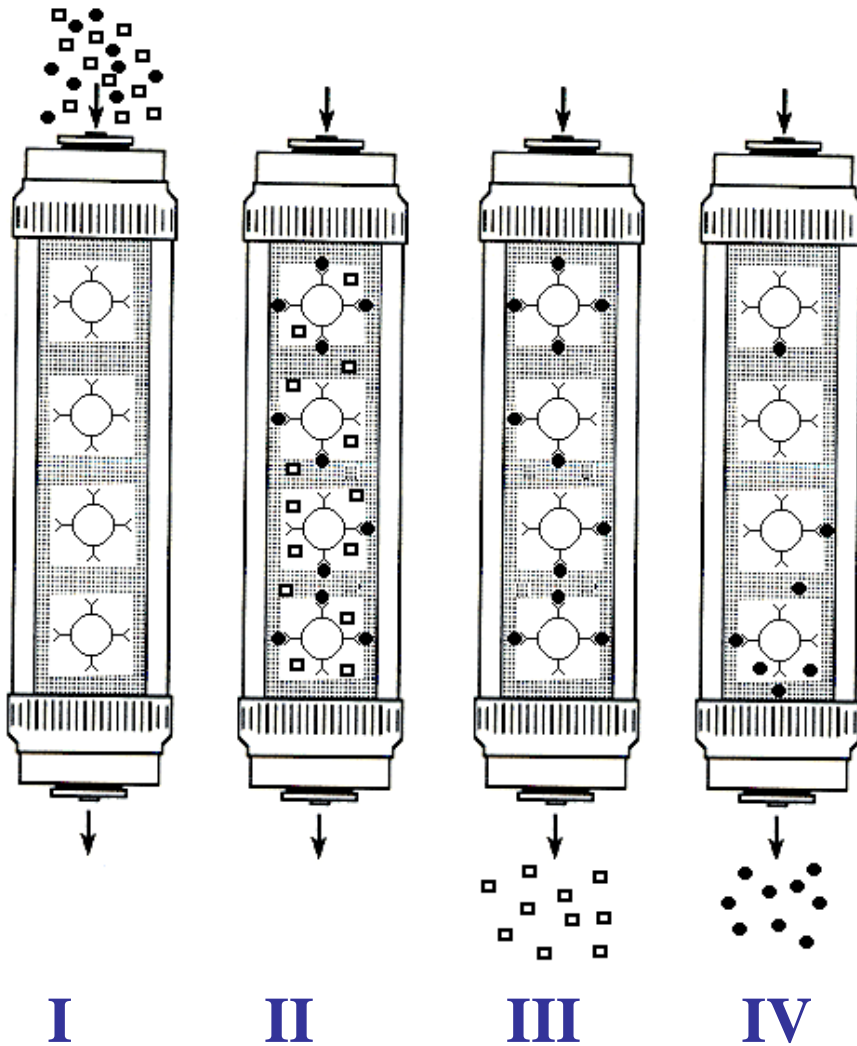
INTEGRAÇÃO DE ETAPAS NA
OBTENÇÃO DE PRODUTOS
BIOTECNOLÓGICOS



Proteína de fusão com propriedades que facilitam as etapas de purificação. A “cauda” pode apresentar propriedades analíticas e de separação



Cromatografia de Imunoafinidade

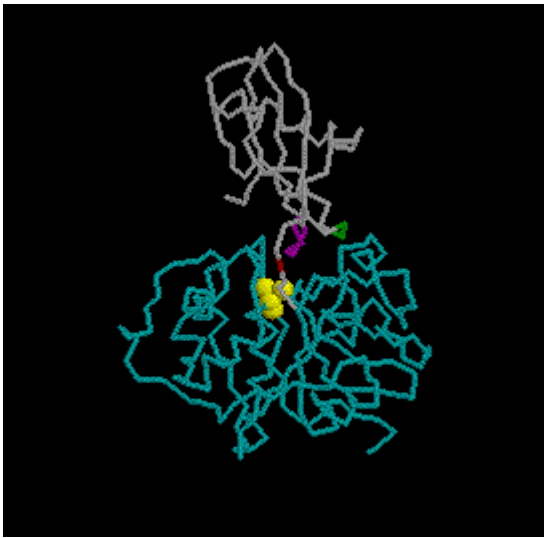


Eluição: condições que interferem na ligação da proteína ao ligante
pH, força iônica, ou competição com o ligante livre

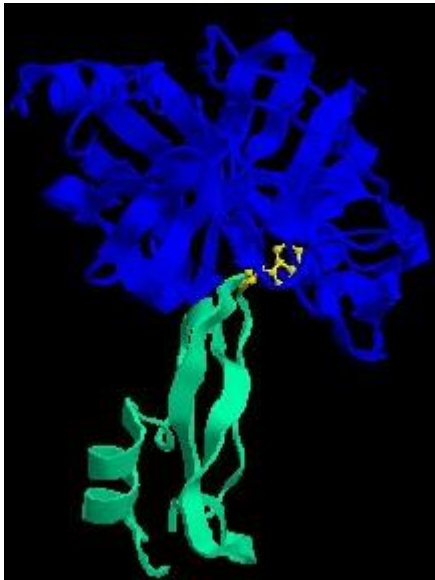
 Anticorpo imobilizado  Molécula alvo  Impurezas

ETAPAS:

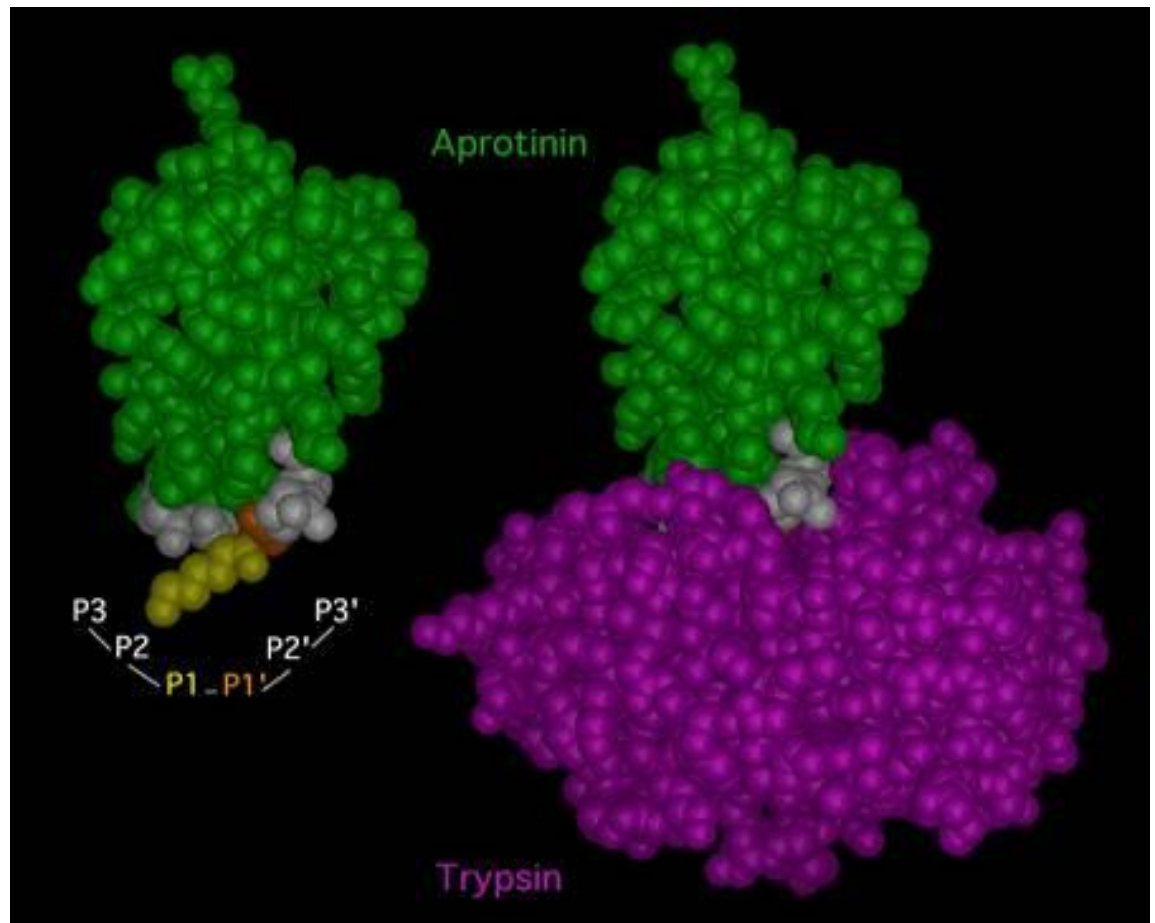
I - Entrada da amostra; II- Adsorção; III- Lavagem; IV- Eluição.



serpina-tripsina



BPTI – tripsina

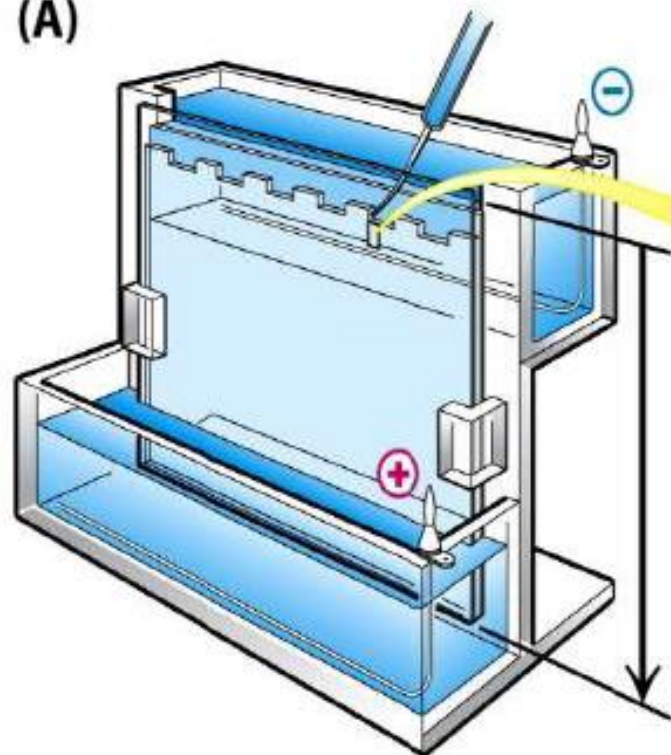
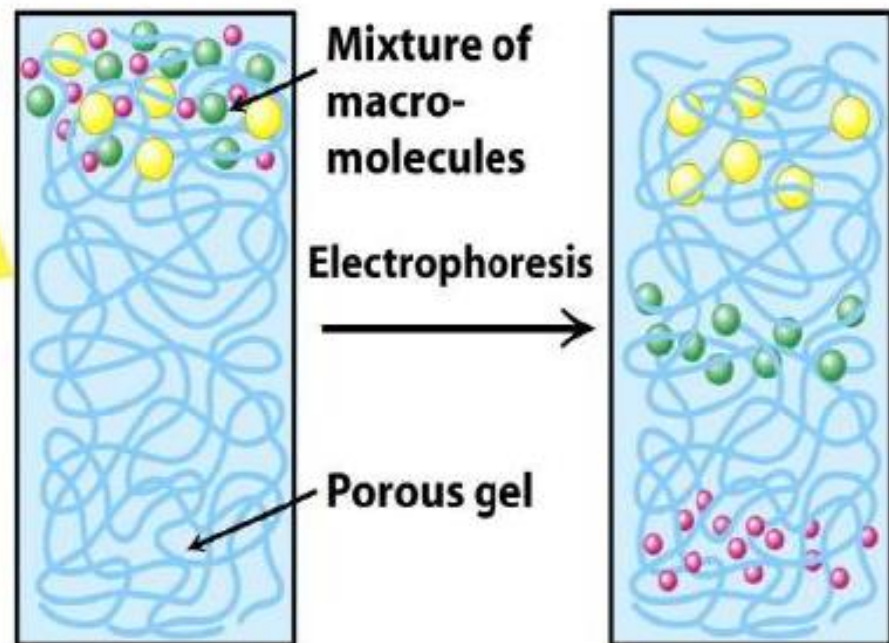


Cromatografia de afinidade para tripsina:



Imobilização de inibidores:

- | | | | |
|---|--------------|---|------------------|
| { | proteicos | → | BPTI, aprotinina |
| | não proteico | → | benzamidina |

(A)**(B)**

Adding sample

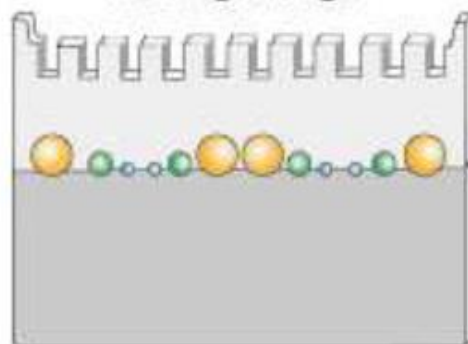
Stacking gel

Separating gel



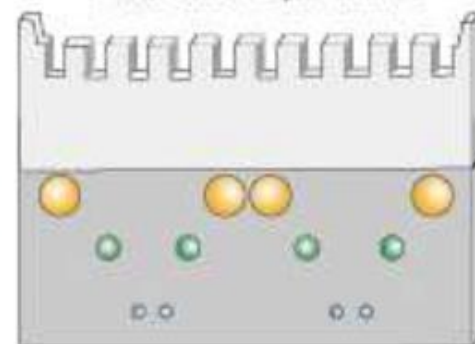
①

Adding voltage



②

After electrophoresis



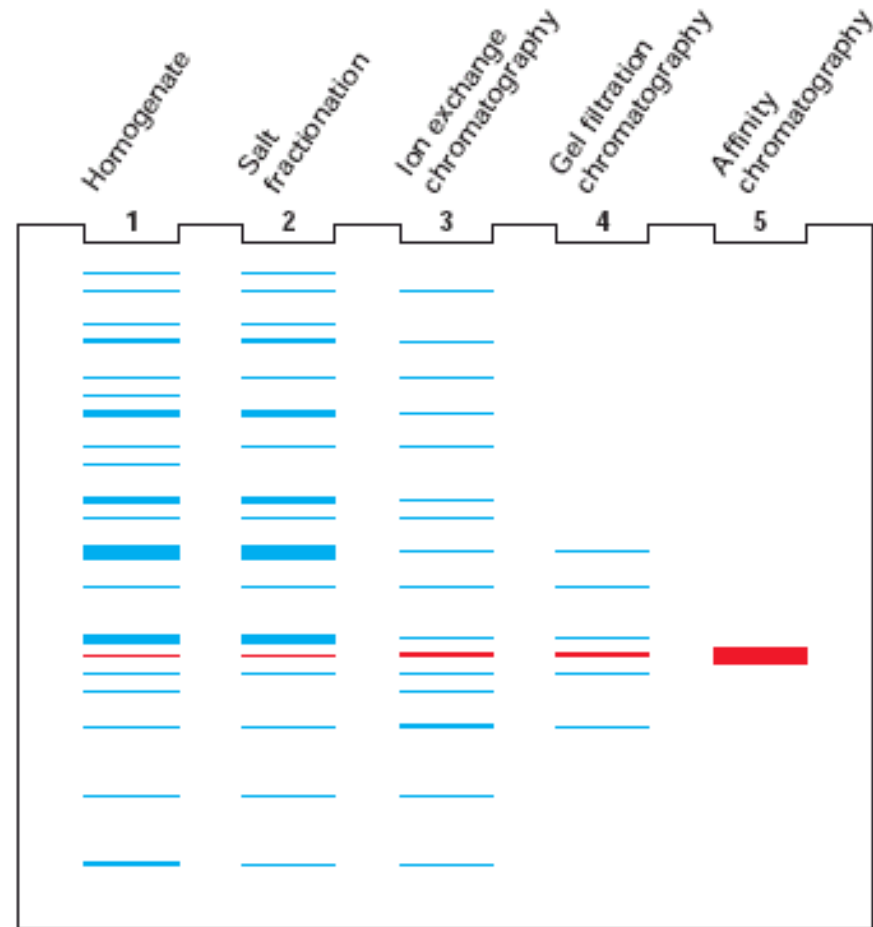
③

O perfil eletroforético em SDS-PAGE permite acompanhar a purificação de uma proteína.

Informações sobre:

-Número de proteínas presentes

- Distribuição de massas das proteínas presentes



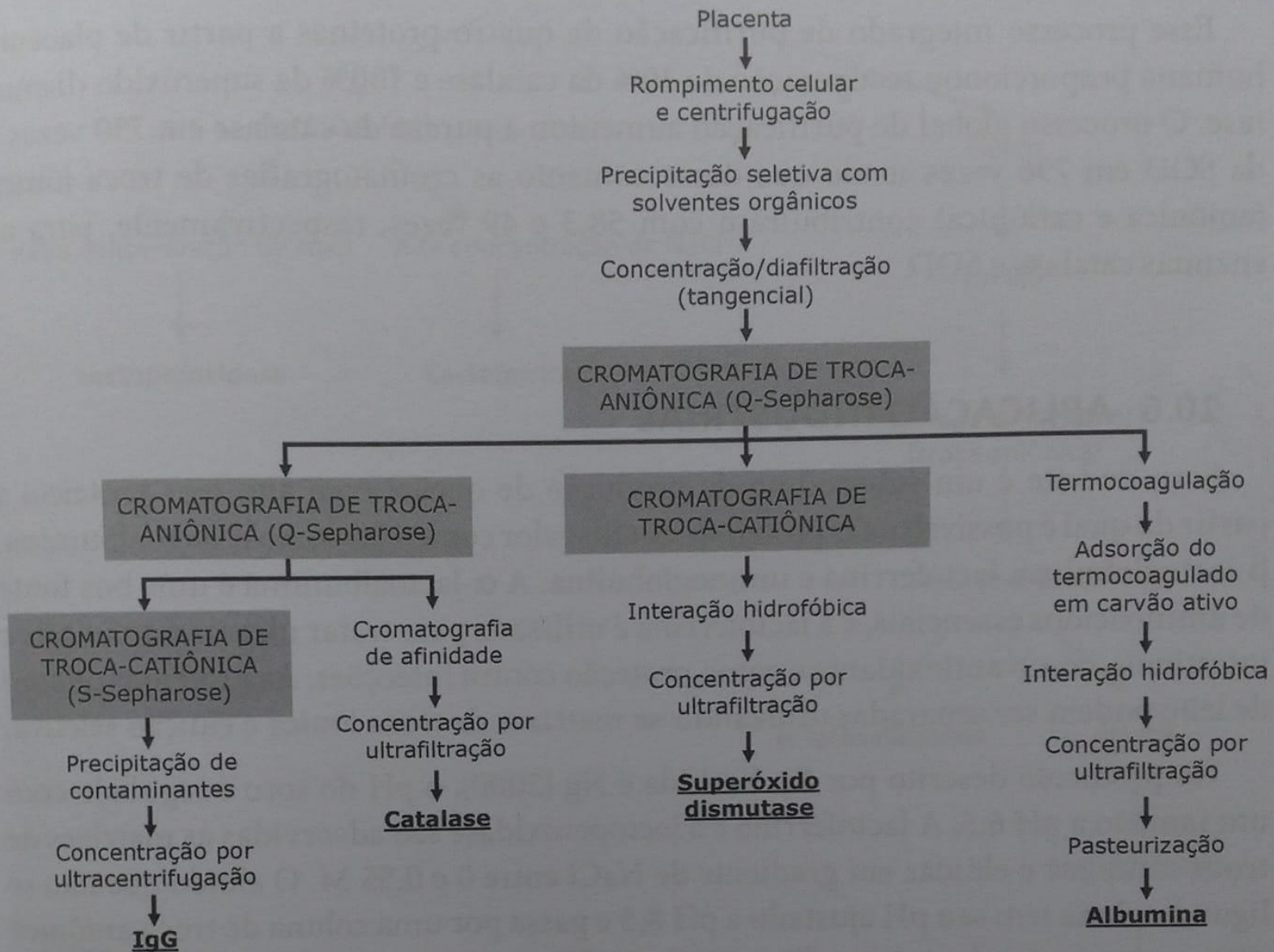


Figura 10.5 Processo de purificação de imunoglobulina G (IgG), catalase (cat), superóxido dismutase (SOD) e albumina (Alb), a partir de placenta humana, com destaque para as etapas de cromatografia de troca iônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **"Introdução a métodos cromatográficos"**. Campinas, Editora da Unicamp, 1990, 279p.
- DEUTSCHER, M. P. **Guide to protein purification**. San Diego: Academic Press, 1990, 894 p
- DOONAN, S. **Protein purification protocols**. Totowa: Humana Press, 1996. 405 p
- HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **"Protein purification applications: a practical approach"**. Oxford, IR Press, 1995, 179p.
- HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **"Protein purification methods: a practical approach"**. Oxford, IR Press, 1994, 317p.
- HARRISON, Roger G. **"Protein purification process"**. New York, Marcel Dekker, 1994, p.381.
- JANSON, J. C.; R. LARS. **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. New York: VCH, 1989, 502 p.
- JANSON, J.C; RYDÉN, L. **"Protein purification: principles, high resolution methods and applications**. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1998.
- KENNEY, A., FOWELL, S. **Practical protein chromatography** Totowa: Humana Press, 1992, 327 p.
- KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **"Purificação de Produtos Biotecnológicos"**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, 1a ed, São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda, 2001, pp. 493-520.
- LADISCH, M. et al. **Protein purification: from molecular mechanisms to large-scale processes**. Washington: American Chemical Society, 1990, 280 p
- MARSHAK D. R. et al. **Strategies for protein purification and characterization : a laboratory course manual**. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, 396 p.
- MULDER, M., **"Basic Principles of Membrane Technology"**, Kluwer Acad.Pub., 2a. Edition, 1996.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Ed. Manole:Barueri. 444p. 2005.
- PYLE, D. L. **"Separations for biotechnology"**. London, Elsevier Science Publishers Ltd, 1990, p.324.
- ROE, SIMON. **Protein purification techniques: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 2001, 262 p.
- SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. New York: Springer-Verlag, 1982, 282 p.
- WHEELWRIGHT, Scott M. **"Protein purification: design and scale up of downstream processing"**. 1st. Ed. New York, John Wiley & Sons, Inc, 1994.

Outras sugestões de Bibliografia

Banco de teses e dissertações da USP, UNICAMP e outras universidades

Sites de universidades brasileiras e estrangeiras – aulas disponibilizadas na internet; palestras; etc...