

## QUESTIONÁRIO

### “Técnicas de Purificação de Proteínas”

#### AVISOS:

- O questionário não vale nota.
- Não é necessário entregá-lo, ele tem o objetivo de ajudá-los a estudar os novos conceitos.

#### **1) Explique como ocorre o processo de separação por cromatografia de troca iônica.**

A cromatografia de troca iônica realiza o processo de separação baseando-se nas diferenças de carga elétrica de proteínas em um dado pH. Este processo ocorre devido à presença de íons ligados eletrostaticamente à matriz insolúvel das colunas, assim, esta irá reter apenas proteínas de carga oposta ao seu ligante. Ou seja, caso a proteína de interesse possua carga positiva a matriz estará ligada a ânions, sendo chamada de Trocadora de Cátions. Mas caso esta possua carga negativa a matriz encontrará-se ligada a cátions, sendo chamada de Trocadora de Ânions.

A cromatografia de troca iônica utiliza uma fase estacionária contendo beads (grânulos) que apresentam carga eletrostática a partir de materiais específicos (como determinadas resinas): se apresentarem carga positiva, são denominados “trocadores de ânions” e se apresentarem carga negativa, são denominados “trocadores de cátions”. Dessa maneira, as proteínas presentes em uma solução tampão (que irá manter o pH desejável) são colocadas na coluna cromatográfica e as que apresentarem carga semelhante à da fase estacionária irão ser repelidas e sairão primeiro durante a separação; já as proteínas que apresentem carga oposta à da coluna, se manterão ligadas através da atração eletrostática (atração entre cargas opostas), promovendo a adsorção das proteínas pelos grânulos de resina. A ordem da saída das proteínas depende exclusivamente da carga líquida em que a proteína ou o aminoácido, por exemplo, se encontra: quanto maior a carga oposta, mais fortemente atraído eletrostaticamente a molécula estará; quanto maior a carga similar, mais fortemente repelida a molécula será.

Para remover as proteínas adsorvidas na coluna, soluções salinas podem ser utilizadas na eluição da coluna promovendo uma competição entre os íons da solução, e as moléculas adsorvidas. Dessa maneira, é possível promover a separação das proteínas em uma dada solução, e realizar a caracterização.

#### **2) Quais são as características das proteínas e outras biomoléculas que são utilizadas nos vários procedimentos de separação?**

As características das proteínas e outras biomoléculas que são utilizadas nos vários procedimentos de separação consistem em: Solubilidade ( cujas técnicas são o salting-in e salting-out), carga iônica (cujas técnicas são a cromatografia de troca iônica, eletroforese e focalização isoelétrica ), tamanho molecular (cujas técnicas são diálise, ultracentrifugação, eletroforese em gel e cromatografia de gel filtração), polaridade (cujas técnicas são cromatografias de adsorção, em papel, de fase reversa e de interação hidrofóbica) e a especificidade de ligação (cuja técnica de separação é a cromatografia de afinidade).

### **3) Qual é o princípio da cromatografia de afinidade?**

Algumas proteínas possuem uma grande capacidade de se ligarem fortemente e de forma não covalente a moléculas específicas. Por meio da cromatografia de afinidade essas proteínas podem ser purificadas, isto é, estarem livres de contaminantes para que possam ser estudadas.

Esse processo é o mais seletivo e específico de todos os tipos de cromatografia devido ao fato de que em suas colunas encontram-se acoplados covalentemente à matriz ou resina um tipo específico de ligante (ao qual apenas a proteína de interesse irá se ligar), ocorrendo uma ligação reversível, podendo ser, por exemplo, um antígeno e anticorpo, ou uma enzima e o seu substrato. Assim, uma mistura proteica é despejada e passada através da coluna, a qual é lavada com uma solução tampão que “empurra” os tipos protéicos que não se ligaram ao ligante. Após ter em solução apenas a proteína de interesse a coluna é novamente lavada com uma solução do próprio ligante, mas agora livres, que irão se ligar às proteínas “presas” na coluna, desfazendo essa ligação e levando as proteínas de interesse aos tubos fracionários.

### **4) Explique os efeitos da concentração salina na solubilidade de uma proteína.**

A solubilidade das proteínas varia de acordo com a concentração de sal na solução e quanto maior a força iônica desse sal maior a solubilidade delas, ou seja, a solubilidade das proteínas é sensível à concentração de sais dissolvidos.

De acordo com a concentração salina em soluções proteicas a separação de proteínas pode ocorrer através de dois processos:

**Salting-in:** Ocorre quando baixas concentrações de sais são utilizados como auxílio à solubilização de proteínas. As proteínas encontram-se agregadas umas às outras, então adiciona-se baixas concentrações de sal à solução de proteínas, e estas são cercadas por carga líquida oposta, acarretando diminuição da energia eletrostática livre, e aumento da atividade do solvente, e conseqüentemente, aumentando a solubilidade proteica.

Resumidamente, esse processo faz com que a água passe a interagir com as proteínas.

**Salting-out:** Ocorre quando elevada concentração de determinado sal é adicionado à solução para que ocorra a separação proteica através de sua precipitação, pois cada uma possui uma concentração salina específica para que possa precipitar.

Resumidamente, esse processo faz com que a água passe a interagir com o sal, deixando as proteínas novamente agregadas, logo, insolúveis.

### **5) Explique o que é a eletroforese e qual é o seu princípio.**

A eletroforese consiste em um processo que utiliza um gel poroso ao qual um campo elétrico é aplicado para separar proteínas de acordo com seu tamanho, através da migração para pólos opostos do campo elétrico. Para isso, as amostras proteicas recebem um tratamento com SDS (detergente de carga negativa) que se liga a toda e qualquer proteína, fazendo com que todo o material fique carregado negativamente. Assim, após esse tratamento as amostras são adicionadas ao gel onde irão migrar para o pólo positivo com velocidade dependente de suas massas, isto é, proteínas de menor peso molecular migrarão mais rápido, enquanto as de maior peso molecular migrarão mais lentamente, ficando mais próximas ao pólo negativo.

Contudo, apesar de ser uma técnica rápida e barata, que permite a estimativa da quantidade de proteínas presentes na amostra imediatamente, e também a identificação de seus respectivos pesos moleculares, esta técnica possui caráter mais qualitativo, e pode acabar por desnaturar algumas proteínas devido ao uso do detergente.