



Como Purificar PROTEÍNAS?

O exemplo das defensinas antifúngicas de ervilha

Marcus S. Almeida

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ,
msalmeida@bioqmed.ufrj.br

Eleonora Kurtenbach

Departamento de Bioquímica Médica,
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ,

Várias doenças decorrem da modificação da estrutura e/ou da atividade de diferentes proteínas. Atualmente, o tratamento dessas doenças é baseado na inibição ou na ativação da(s) enzima(s) em questão ou de receptor(es), através da interação destas com o princípio ativo presente nos medicamentos.

Em muitos casos, as preparações protéicas são usadas diretamente na terapêutica. Essas proteínas podem ser obtidas a partir de sua fonte natural, como é o caso da albumina, obtida a partir do plasma humano, ou a partir de sua produção em organismos geneticamente modificados, sendo rotuladas genericamente de proteínas recombinantes.

Tanto para o estudo da atividade de uma enzima frente a substâncias passíveis de ser usadas em formulações terapêuticas, como para o uso direto como medicamento, existe a necessidade de purificação da proteína de interesse, uma vez que qualquer célula contém milhares de proteínas diferentes, que apresentam uma ampla faixa de atividade biológica.

Atualmente, o meio científico vive a denominada Era Pós-Genômica. Após o seqüenciamento de diversos genes de diferentes organismos, incluído o genoma humano completo (Lander e cols., 2001), começa uma busca frenética, para a determinação da atividade das proteínas codificadas para cada um dos genes descritos, a fim de inferir sua função biológica e, finalmente, correlacioná-las com diversas doenças. Esse grande desafio para a ciência é denominado de proteoma, quando o objetivo é a análise e posterior caracterização das proteínas expressas em uma determinada situação de um grupo de células ou de genoma estrutural; quando o enfoque é a análise da estrutura tridimensional de diferentes proteínas, com a finalidade de se inferir sua atividade biológica através de análises de homologia estrutural. Para ambos os casos, é necessária a obtenção das proteínas de interesse com alto grau de pureza.

Tipicamente, o processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas, que têm como fundamento a

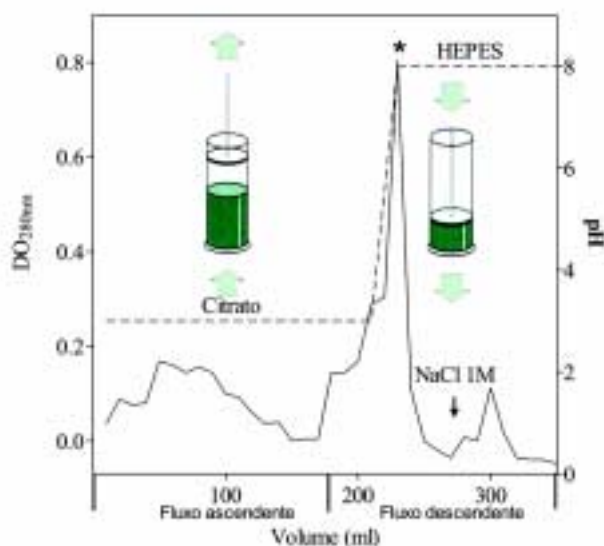


Figura 1 – Coluna de troca catiônica em sistema de leito expandido utilizada para clarificação de meio de cultura contendo uma defensina recombinante de ervilha que possui atividade antifúngica, expressa heterologicamente em *P.pastoris* (Almeida e cols., 2001). O meio de cultura (50 ml) é diluído 2x; o pH ajustado para 3,0 (a maioria das proteínas assumirão carga líquida positiva, pois possuem pI maior do que 3,0) e aplicado, com fluxo ascendente, em uma coluna contendo 95 mL de resina Toyopearl SP-650 M, previamente equilibrada com citrato de sódio 20 mM, pH 3,0. O material não ligado, como sais e leveduras é eluído com o mesmo tampão e, finalmente, as proteínas ligadas são eluídas com fluxo descendente de tampão HEPES 50 mM pH 8,0. A absorbância do eluído é monitorada a 280 nm (linha cheia) e o pH de cada fração verificado com tiras de indicador de pH (linha pontilhada). A seta indica a regeneração da coluna através da passagem de NaCl 1 M. O pico que possui a atividade antifúngica (que contém a defensina recombinante) é marcado com um asterisco. No gráfico, também é apresentada esquematicamente, a coluna utilizada nesse sistema

distinção das proteínas com base na seqüência de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e de lipídeos-estrutura tridimensional, e na sua atividade biológica, entre outras características dessas macromoléculas. Esse processo deve ser associado com o acompanhamento de alguma característica marcante da proteína como, por exemplo, sua atividade (atividade proteolítica da trombina) ou sua coloração (citocromo C que possui coloração vermelha). As cromatografias em coluna de gel, filtração ou adsorção (Deutscher, 1990), são os sistemas mais utilizados para a distinção entre proteínas e, apesar de existir uma lógica no emprego desses métodos, geralmente a otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, especialmente pelo fato de que mesmo quando se conhece as características físico-químicas das proteínas a serem purificadas, é muitas vezes imprevisível o comportamento delas no decorrer do processo de purificação. Nesse caso, durante a purificação, não raramente ocorrem mudanças na estrutura das proteínas, que podem provocar desde pequenas alterações nas suas características físico-químicas até modificação ou perda de sua atividade biológica.

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho para se encontrarem as melhores estratégias, e, se for o caso, a adequação da metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para seu uso, seja em humanos, ou para diagnóstico, ou uso veterinário ou para processos analíticos de interesse para a pesquisa básica, como o estudo da estrutura tridimensional da proteína por ressonância magnética nuclear de alta resolução ou cristalografia por Raios-X. Tudo isso se

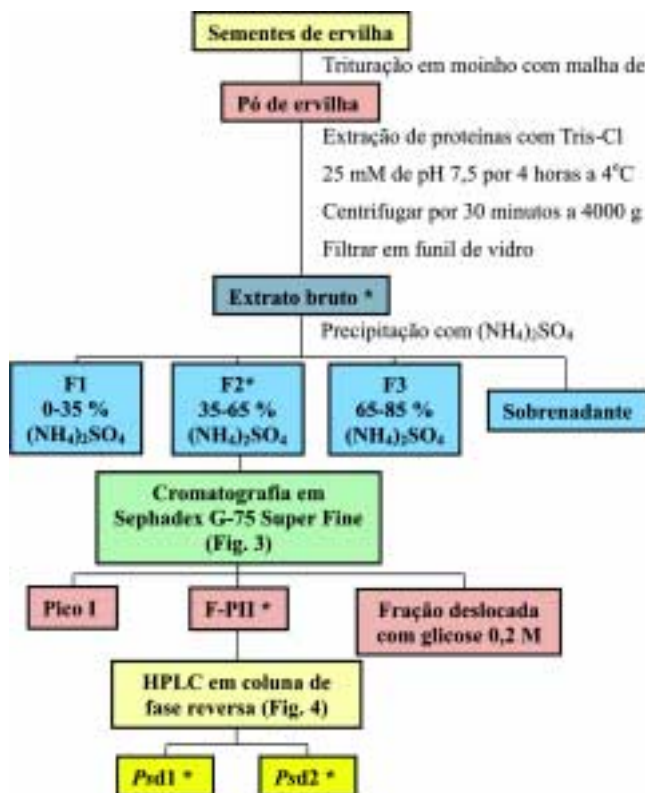


Figura 2 – Esquema geral da purificação de duas defensinas (*Psd1* e *Psd2*) de sementes de ervilha que possuem atividade antifúngica (Almeida e cols., 2000). Em cada fração é verificada a presença de atividade antifúngica. Uma fração contendo Lectinas (proteínas com afinidade por açúcares) se liga à resina Sephadex G-75 (composta de um polímero glicídico) e é deslocada somente após a lavagem com solução de glicose. Os asteriscos indicam as frações com atividade antifúngica. A purificação das defensinas é acompanhada por eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 5)

passa, muitas vezes, no decorrer de anos e o protocolo final deverá ser resultado dos seguintes compromissos, definidos no desenho do processo: custo, velocidade e pureza.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

É essencial considerar que, na maioria dos casos, as proteínas são macromoléculas muito frágeis, ou seja, sofrem facilmente alterações físico-químicas que levam a modificação ou perda de sua atividade. Até mesmo a exposição a temperaturas moderadas (como 37°C) pode causar lenta e gradativa desnaturação de algumas proteínas. As proteínas também são sensíveis à oxidação, especialmente as citoplasmáticas, que se encontram, naturalmente, em um meio com potencial redutor relativamente alto e que possuam resíduos de cisteína passíveis de ser oxidados. Dessa

forma, é razoável minimizar as condições oxidantes do meio, por exemplo, através da adição de agentes redutores, como o β -mercaptoetanol, ou, simplesmente, se evitando a formação excessiva de bolhas. Muitas vezes as proteínas são instáveis quando estão em solução muito diluídas ou muito concentradas, por exemplo, abaixo de 10 μ M ou acima de 1 mM, respectivamente (Deutscher, 1990).

O requerimento inicial para a purificação de uma proteína é a liberação da mesma de sua fonte natural, como, por exemplo, do endosperma de sementes ou de células que a expressam heterologamente. Essa fração é denominada de extrato bruto. Os tecidos são geralmente triturados ou moídos e as bactérias, as leveduras ou as células animais provenientes de cultura são lisadas por sonicação, variações repentinas de pressão e osmolaridade, forte agitação na presença de esferas de vidro ou por enzimas citolíticas. Se a proteína desejada está restrita a uma organela em particular, como núcleo, mitocôndria ou até ligada a membrana plasmática, uma

purificação substancial é obtida a partir do isolamento dessas estruturas celulares, geralmente por centrifugação diferencial em gradiente de sacarose, percoll, etc. O uso de detergentes não iônicos (triton X, tween, etc.) facilita a liberação das proteínas, especialmente quando estas se encontram no interior de organelas. Muito freqüentemente, são incluídos diversos aditivos durante a obtenção do extrato bruto, com o intuito de evitar a degradação química ou enzimática da proteína de interesse, uma vez que, no ato da destruição celular, são liberados vários compostos altamente oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou enzimas proteolíticas. Aditivos comumente utilizados são os agentes redutores como o β -mercaptoetanol, estabilizantes como o glicerol e inibidores de proteases como o ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), um inibidor de enzimas dependentes de

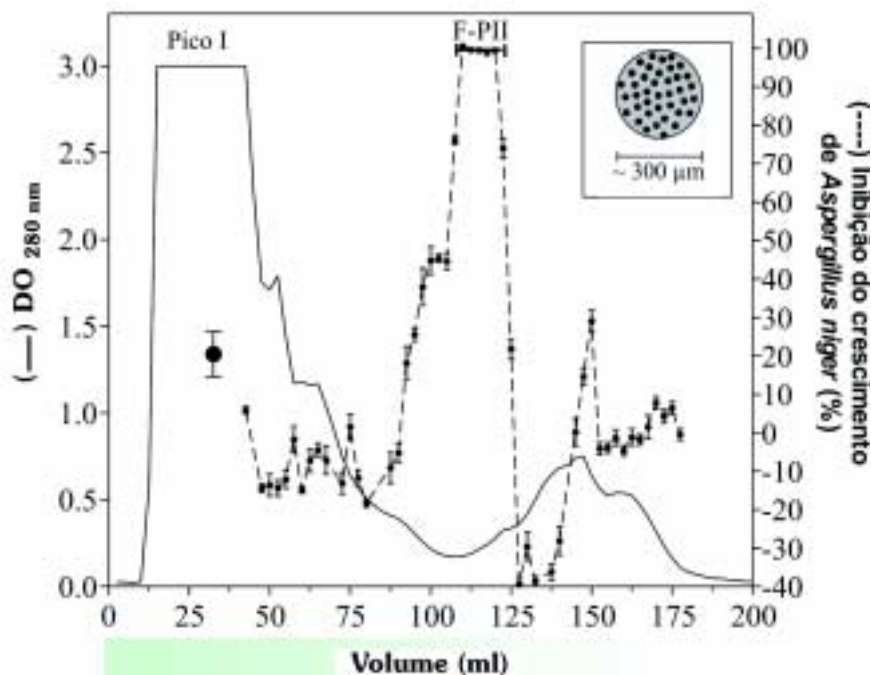


Figura 3 – Cromatograma de filtração em gel usada num dos passos intermediários da purificação das defensinas de semente de ervilha (Almeida e cols., 2000). O precipitado protéico F2 (600 mg) é dissolvido em água destilada (para 8 ml finais), filtrado e aplicado em uma coluna (1,6 x 100 cm) empacotada com gel Sephadex G-75 Superfine. As amostras são eluídas com tampão Tris-Cl 25 mM pH 7,5 a um fluxo de 0,7 ml/min. A absorbância a 280 nm (linha sólida) e a atividade antifúngica (linha pontilhada) das frações coletadas são monitoradas. Frações contendo proteínas de baixo peso molecular e alta atividade antifúngica são agrupadas (F-II) para posterior purificação por HPLC. No gráfico, é representada uma partícula de gel usada nesse tipo de cromatografia, onde os poros são indicados em preto

íons metálicos divalentes.

Em alguns casos, esse passo inicial não é necessário, como, por exemplo, quando proteínas recombinantes expressas na levedura *Pichia pastoris* são secretadas para o meio de cultura, um sistema cada vez mais usado para se obter grande quantidade de proteínas já em solução aquosa (Almeida e cols., 2001).

O passo seguinte consiste na clarificação da amostra. Essa etapa representa um grande problema a ser solucionado especialmente em purificações de grande escala ou em escala industrial. Na maioria das vezes, utilizam-se técnicas de centrifugação ou de filtração. Ainda assim, tais técnicas podem não resolver o problema de clarificação da sua amostra, trazendo uma série de transtornos

como a obtenção de uma solução ainda particulada, entupimento das membranas de filtração, manipulação de um grande volume num tempo excessivamente longo e custo elevado. Pensando nesses transtornos, foram desenvolvidas resinas cromatográficas que, ao contrário das convencionais, permitem a adsorção de amostras contendo materiais particulados e/ou células. Esse novo conceito é conhecido como sistema de leito expandido (Janson e Rydén, 1998) e, como ilustrado na Figura 1, consiste basicamente em: 1 - equilibrar a fase estacionária (resina adsorvente) na forma expandida, com o tampão de equilíbrio; 2 - aplicar a amostra contendo as células, no sentido de baixo para cima, no leito estabilizado. Dessa forma, a proteína de interesse e alguns contami-

nantes adsorvem na resina, enquanto as células saem pela parte superior da coluna, uma vez que a tela existente na parte superior da coluna é aberta o suficiente para permitir a saída dos restos celulares e de outras partículas que estiverem presentes; 3 - lavar a resina de baixo para cima, com o tampão de lavagem, para remoção dos restos celulares e das proteínas que não se adsorveram na resina; 4 - eluir a proteína de interesse invertendo-se o fluxo pela coluna, ou seja, com o leito sedimentado, como em uma cromatografia convencional; 5 - por fim, a coluna é limpa e regenerada para um novo uso.

A ESCOLHA DOS MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

Antes de dar prosseguimento à purificação da proteína a partir do extrato bruto definido acima, deve-se planejar a estratégia a ser utilizada, onde, além da estabilidade da proteína, devemos também considerar os seguintes itens (Ho, e cols., 2000):

- aplicação final do produto: humano, veterinário, diagnóstico, etc.
- escala de manufatura necessária à demanda do produto purificado.
- eficiência do processo, geralmente expresso em termos de enriquecimento e recuperação da proteína de interesse¹.
- viabilidade econômica, levando-se em conta o gasto envolvido em cada técnica de purificação.
- existência de facilidades de produção, devendo ser considerada, a preexistência de material necessário à terciarização da produção, etc.
- adequação às especificações determinadas pela farmacopéia de referência, Ministério da Saúde e órgãos reguladores.

O esquema ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, como já citado antes, mas também das características dos contaminantes presentes no extrato bruto. A linha geral a se seguir em um

¹ O enriquecimento (E) é dado pela equação $E = AEF/AEB$, onde AEF é a atividade específica da fração e AEO é a atividade específica no extrato bruto de proteínas, ambos expressos em Unidades/mg proteína total. A recuperação (Rec) é dada pela equação $Rec(\%) = [EnzF]/[EnzB] \times 100$, onde EnzF se refere à quantidade de enzima obtida em cada passo de purificação e EnzB à quantidade de enzima encontrada no extrato bruto, geralmente expressas em Unidades ou mg de enzima. Um passo de purificação eficiente proporciona um aumento no enriquecimento da enzima sem diminuir muito sua recuperação. Uma Unidade de enzima representa a conversão de 1 μM de substrato por minuto (Deutscher, 1990).

processo de purificação pode ser dividida em três fases indicadas abaixo (Janson e Rydén, 1998; Deutscher, 1990). Neste artigo, usaremos como exemplo a purificação de duas defensas antifúngicas purificadas a partir de semente de ervilhas. A Figura 2 apresenta o esquema de purificação utilizado (Almeida e cols., 2000).

(I) Os primeiros passos de purificação geralmente são aqueles que possuem um menor poder de resolução, porém que permitem o tratamento de grande quantidade de material como a diálise, através de membrana com porosidade inferior ao tamanho da proteína de interesse; a desnaturação por calor, quando a enzima de interesse é estável a alta temperatura (geralmente acima de 70°C), ou a precipitação com grande concentração de etanol, acetona, sais inorgânicos, etc., que perturbam a distribuição de cargas e grupamentos hidrofóbicos das proteínas, aumentando a constante dielétrica da água e/ou diminuindo a quantidade efetiva de moléculas de solvente disponíveis devido à mobilização deste em suas camadas de solvatação. Pode-se, inclusive, induzir uma precipitação fracionada das proteínas presentes no extrato bruto adicionando-se sais para concentrações finais definidas e, posteriormente, separando-se o precipitado protéico formado em cada concentração de sal do sobrenadante que contém aquelas com maior capacidade de solvatação. O sulfato de amônio é um dos agentes precipitantes amplamente usados nessa etapa. Apresenta como características a capacidade de precipitar irreversivelmente as proteínas sem

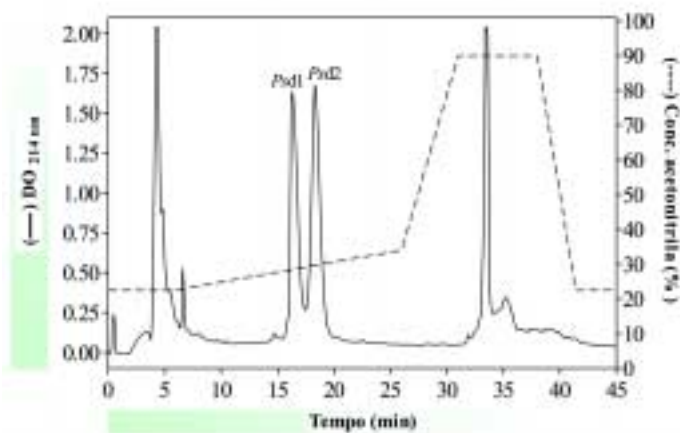


Figura 4 – Cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC para purificar duas defensas antifúngicas de sementes de ervilha (*Psd1* e *Psd2*) (Almeida e cols., 2000). A fração F-P II (280 µg) obtida da cromatografia de filtração em gel é aplicada em uma coluna de fase reversa semipreparativa C8-VYDAK, previamente equilibrada com 0,1% (v/v) de TFA e 22,5% (v/v) de acetonitrila. As proteínas retidas são eluídas com um gradiente linear crescente de concentração de acetonitrila (22,5 – 35 % (v/v)) e, finalmente, liofilizadas

aumento considerável de temperatura. Além disso, a solução final não apresenta alta densidade, facilitando a obtenção do precipitado protéico após centrifugação. Esse primeiro passo na purificação de proteínas tem como vantagem aumentar a concentração de proteína na amostra e/ou preparar a amostra para ser aplicada em uma cromatografia.

(II) Esta é a fase mais eficiente da purificação de proteínas, uma vez que se exploram diferentes características físico-químicas das proteínas. Muito freqüentemente compreende o uso de diferentes técnicas de cromatografia em coluna que são classificadas de acordo com a característica protéica selecionada (Tabela I). A filtração em gel consiste na passagem de uma solução protéica em uma coluna preenchida com uma resina (o tipo de resina específica a resolução², a velocidade do processo e, princi-

palmente, a faixa de peso molecular a ser separado) que apresenta poros de uma determinada faixa de tamanho. Moléculas com diâmetro molecular³ menor do que o do poro serão capazes de penetrar na resina, percorrendo então um caminho mais sinuoso e maior do que as moléculas que apresentam diâmetro molecular superior ao do poro, que não seriam retidas (Figura 3). No caso do exemplo escolhido neste artigo foi possível separar basicamente uma fração contendo proteínas de alto peso molecular (Pico I) de uma fração contendo proteínas com baixo peso molecular (Pico II) utilizando-se uma coluna de gel filtração Sephadex G-75. Como observado na Figura 3, proteínas apresentando atividade antifúngica são eluídas junto ao Pico

II, aqui denominada F-P II. As colunas de adsorção possuem, em suas matrizes, grupamentos químicos responsáveis pela interação com a proteína. Incluem-se nesse caso as matrizes que possuem grupamentos ionizados (carregados positivamente ou negativamente) nas cromatografias de troca iônica; que apresentam grupamentos hidrofóbicos (geralmente hidrocarbonetos lineares) nas cromatografias de fase reversa ou interação hidrofóbica e que possuem ligantes específicos (como Ni²⁺, heparina, glutationa) nas chamadas cromatografias de afinidade. As proteínas retidas na coluna são eluídas gradualmente e, o que é mais importante, seletivamente, através da passagem de um gradiente de concentração de uma substância que compete pela ligação da proteína com os grupamentos químicos da resina (por

² A resolução (R) de uma coluna cromatográfica está diretamente relacionada com a separação obtida (S - determinada em unidades de volume ou tempo) entre dois picos de amostra eluídas de uma coluna cromatográfica e inversamente proporcional à largura de cada pico (L - determinada em unidades de volume ou tempo). Dessa forma: $R = S/L$. Quando $R > 1,2$, diz-se que se obteve uma separação com resolução a nível da linha de base (Janson e Rydén, 1998).

³ O diâmetro molecular está diretamente relacionado com o peso molecular das substâncias, incluídas as proteínas. Para uma proteína globular (formato mais próximo de uma esfera do que um bastão, por exemplo) de 5.5 kDa, seu diâmetro molecular é de, aproximadamente, 30 Å.

exemplo: sais para as resinas de troca iônica, solventes orgânicos para fase reversa e solução contendo ligante específico para as de afinidade). Na Figura 4, apresentamos, como exemplo, o último passo cromatográfico aplicado na purificação das defensinas de ervilha. Nesse caso, as defensinas (*Psd1* e *Psd2*) são eluídas separadamente de uma coluna de fase reversa por meio de um gradiente com concentrações crescentes de um solvente orgânico (Acetonitrila).

(III) A fase final inclui, geralmente, um único passo, que retira quaisquer contaminantes que porventura ainda estejam presentes na amostra. Pode ser uma liofilização que permita a retirada de contaminantes voláteis sob baixas pressões (em torno de 15 bar); uma diálise para excluir sais ou outras moléculas não voláteis da solução protéica, ultrafiltração, que encerra o mesmo propósito que a diálise, porém tem como princípio a filtração da solução de proteína por uma membrana com poros de

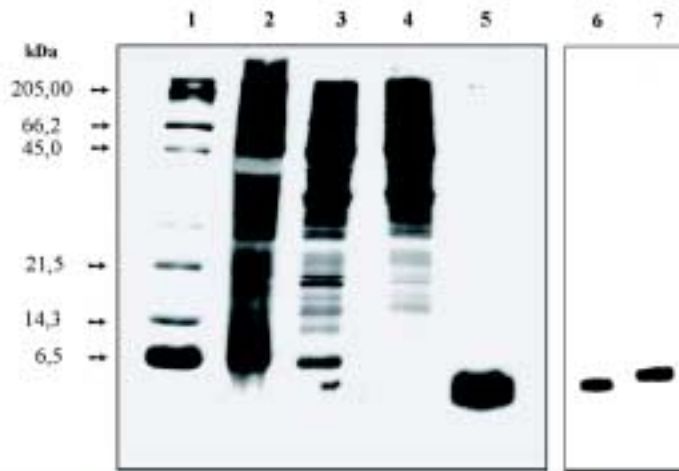


Figura 5 – Análise do conteúdo protéico dos passos de purificação de duas defensinas de ervilha (*Psd1* – 5,5 kDa e *Psd2* – 5,9 kDa) por eletroforese em gel de poliacrilamida 18 %, na presença de SDS e β -mercaptoetanol (Almeida e cols., 2000). As proteínas são visualizadas por incorporação de prata. Amostra 1, padrão de peso molecular; amostra 2, extrato bruto; amostra 3, fração precipitada com sulfato de amônio F2; amostras 4 e 5, frações de proteínas de alto peso molecular (PI) e, de baixo peso molecular (F-P II), respectivamente eluídas da cromatografia de filtração em gel Sephadex G75 SF; amostras 6 e 7, *Psd1* e *Psd2* eluídas da cromatografia de fase reversa C8 em sistema de HPLC, último passo de purificação dessas defensinas

pequeno diâmetro (por exemplo, 20 Å), forçada por pressão, entre outras técnicas. No exemplo adotado as defensinas *Psd1* e *Psd2* eluídas da coluna de fase-reversa são liofilizadas com vistas a eliminar a acetonitrila e o ácido trifluoracético (TFA) usado no processo cromatográfico.

presente no Reagente de Lowry). Essas duas últimas são técnicas mais específicas, porém mais trabalhosas; 3 – a purificação também pode ser acompanhada usando-se anticorpos específicos, tanto por “Dot Blotting” como por “Western Blotting”⁵; especialmente no caso de proteínas cuja atividade não seja conhecida, 4 – o conteúdo protéico de

Durante a fase II de purificação, devem-se levar em conta os seguintes itens: 1 – para uma purificação mais eficiente, é aconselhável a escolha de técnicas que explorem seqüencialmente diferentes propriedades físico-químicas das proteínas; 2 – a atividade da proteína deve ser acompanhada em todos os passos de purificação, assim como a quantidade total de proteína, uma vez que esses parâmetros, em conjunto, são cruciais para a avaliação da eficiência da purificação. A atividade da proteína deve ser verificada pelo método mais simples e sensível possível. A quantificação protéica pode ser estimada pela absorção de luz na faixa do ultravioleta (209-295 nm)⁴ ou através do uso de substâncias que ou se ligam a proteínas (como o corante Azul de Coomassie) ou reagem com essas, resultando em um produto colorido (como o sulfato de cobre II

⁴ Proteínas absorvem luz na faixa do ultravioleta por duas vias principais: em torno de 280 nm, ocorre a absorção por grupamentos aromáticos presentes na cadeia lateral do triptofano, tirosina e fenilalanina e, em torno de 210 nm, ocorre a absorção de luz pelas ligações amídicas da proteína, conhecidas especificamente como ligações peptídicas (Deutscher, 1990).

⁵ Técnicas onde se avalia a presença de uma proteína por reconhecimento do anticorpo primário feito especificamente para tal proteína. A revelação é feita usando-se um anticorpo secundário que reconheça a porção F_{AB} do anticorpo primário e que esteja conjugado geralmente a uma enzima que participe de uma reação onde um de seus produtos apresente coloração. O “Dot Blotting” diferencia-se do “Western Blotting”, pois, no primeiro caso, a amostra a ser analisada é aplicada simplesmente em um suporte (geralmente membrana de nitrocelulose); já no segundo caso, a amostra provém de um gel de eletroforese, de onde as amostras são transferidas para o suporte por ação de um campo elétrico.

⁶ Na eletroforese sob condições desnaturantes, as proteínas inicialmente são tratadas com um detergente aniônico (SDS – dodecil-sulfato de sódio), que se liga não covalentemente às proteínas tornando-as espécies negativamente carregadas, além de desenovelá-las. Essas proteínas tratadas são então aplicadas no início de um gel (que funcionará como uma espécie de peneira molecular) e, finalmente, submetidas a um campo elétrico que impulsionará tais proteínas através do gel. Proteínas de grande peso molecular farão em percurso menor que proteínas de menor peso molecular. Na eletroforese bidimensional, as proteínas são aplicadas em um gel com formato bem alongado que possua um gradiente de pH (estabelecido por eletrólitos anfotéricos previamente submetidos à eletroforese) e submetidas a um campo elétrico que as impulsionará até a faixa do gel que possua o pH igual ao pI (ponto isoelétrico) de cada proteína. Nesse ponto, as proteínas pararão de migrar no gel, pois assumirão carga média nula. Finalmente, esse gel é colocado de lado no início de outro gel para separar por eletroforese as proteínas de diferentes pesos moleculares. Em ambas as técnicas, a proteína é evidenciada, na maioria dos casos, por coloração com Azul de Coomassie ou pela impregnação de Prata.

Tipo de Cromatografia	Característica da Proteína	Condição Inicial da Amostra	Eluentes	Condição Final da Amostra	Custo
Gel Filtração	Volume molecular	Volume da amostra <5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente	+
Troca Iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pHs distintos da condição inicial	Amostra concentrada em solução salina	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Não pode conter altas concentrações de sais	Solvente orgânico	Amostra sem sais em solventes voláteis	+++
Afinidade	Especificidade à ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligante ou sais	Amostra concentrada contendo ou não ligante	+++

Tabela I – Classificação das técnicas de cromatografia líquida de acordo com a característica físico-química que é explorada das proteínas. A condição inicial necessária para a realização da técnica, os eluentes mais comuns e as condições em que a solução de proteína ficará após sua eluição da coluna são citados. O custo geral do processo é classificado levando-se em conta os valores aproximados das colunas e dos acessórios geralmente empregados em cada técnica

todas as etapas deve ser avaliado por eletroforese unidimensional (Figura 5) ou bidimensional em gel de poliacrilamida ⁶. Através dessas análises é possível verificar se a amostra se encontra no grau de pureza desejado, ou se novos passos de purificação serão necessários; 5 - é comum sacrificar razoavelmente a recuperação da proteína em prol de um grande enriquecimento; desse modo, uma boa prática é iniciar a purificação com passos simples e com menor resolução, que geralmente são baratos e de maior capacidade, e, no decorrer do processo, ir aumentando a seletividade e a resolução dos passos de purificação, que são mais caros e possuem menor capacidade; 6 - procure manter o processo de purificação o mais simples possível, de maneira que barateiem e encurtem o processo, além de aumentarem a recuperação da proteína em questão.

QUALIFICAÇÃO DA PUREZA

Para se atestar a pureza final da proteína, podem ser usadas várias técnicas que apresentem sensibilidades variadas.

Uma das maiores provas de que a proteína está livre de contaminantes protéicos é obtida por seqüenciamento peptídico automático, onde se deve identificar apenas uma seqüência. Pode-se identificar outras impurezas além das de natureza protéica por espectrometria de massa, onde deve constar apenas um íon molecular (ou os derivados de sua clivagem), e/ou por ressonância magnética nuclear de alta resolução, onde

devem ser identificados apenas os sinais de ressonância da proteína.

Existem diversas outras técnicas analíticas bem mais simples e baratas para se atestar com boa certeza a pureza da amostra. O procedimento mais comum é a eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 5), que é um método rápido e sensível, especialmente se o gel for corado por impregnação de prata (sensibilidade de até 10 ng de proteína por banda), porém não tão confiável, pois separa as proteínas apenas por um tipo de característica físico-química (peso molecular). Outro procedimento muito empregado é a eletroforese bidimensional, que já é muito mais confiável, pois distingue as proteínas de duas maneiras diferentes (peso molecular e ponto isoeletrico).

Adicionalmente, a pureza da amostra pode ser indicada com ótima confiabilidade por algum tipo de cromatografia em coluna quando realizado em sistemas de HPLC, que dispõem de diversos detectores altamente sensíveis (como detectores tipo “diode array”, que determinam a absorvidade do eluído da coluna em todo espectro de luz visível e de ultravioleta). Esse último método carrega a vantagem de poder ser um passo final da purificação da amostra.

Em resumo, deve-se ter em mente que não existe um protocolo definido para purificação de proteínas. É necessário desenvolver um protocolo específico, utilizando-se os diversos métodos de purificação existentes de uma forma coerente com as características do material de onde se deseja purificar a

proteína de interesse, as propriedades da própria proteína e sua finalidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Katia S. Cabral, Luis E. Diaz, Melissa A.F. Silva e Roberto P. Campelo por valiosas sugestões e pela verificação ortográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Zingali, R.B., & Kurtenbach, E. (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch Biochem Biophys* 378, 278-286, doi: 10.1006/abbi.2000.1824.
- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Medeiros, L.N., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Kurtenbach, E. (2001). CDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein Psd1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 395, doi:10.1006/abbi.2001.2564.
- Deutscher, M.P. (1990). *Guide to Protein Purification*. Method. Enzymol. 182.
- Janson, J.C. and Rydén L. (1998). *Protein Purification* – Ed. Wiley-VCH. 2nd edition.
- Ho, P.L., Kitahara, E., Ogawa, D.M.O., Silva, A.R.B.P., Ramos, C.R.R., Nascimento, A.L.T.O. (2000). A arte de purificar proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. *Biotecnologia*, 13, 24-26.
- Lander E.S. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921. 