

CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC) DE BIOMOLÉCULAS: ASPECTOS FUNDAMENTAIS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin, Everson Alves Miranda e Sônia Maria Alves Bueno*

Departamento de Processos Biotecnológicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6066, 13083-970 Campinas - SP, Brasil

Recebido em 16/7/08; aceito em 16/12/08; publicado na web em 11/5/09

IMMOBILIZED METAL-ION AFFINITY CHROMATOGRAPHY (IMAC) OF BIOMOLECULES: FUNDAMENTAL ASPECTS AND TECHNOLOGICAL APPLICATIONS. Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography – IMAC – is a group-specific based adsorption applied to the purification and structure-function studies of proteins and nucleic acids. The adsorption is based on coordination between a metal ion chelated on the surface of a solid matrix and electron donor groups at the surface of the biomolecule. IMAC is a highly selective, low cost, and easily scaled-up technique being used in research and commercial operations. A separation process can be designed for a specific molecule by just selecting an appropriate metal ion, chelating agent, and operational conditions such as pH, ionic strength, and buffer type.

Keywords: immobilized metal-ion affinity chromatography; purification; biomolecules.

INTRODUÇÃO

Os princípios fundamentais da afinidade de biomoléculas por íons metálicos são conhecidos desde o início do século passado. Em 1974, Everson e Parker demonstraram que íons metálicos presentes em metaloproteínas são os principais responsáveis pela adsorção dessas em resinas contendo quelantes imobilizados e exploraram esta afinidade na separação deste tipo de proteínas.¹ A técnica proposta por Everson e Parker popularizou-se com o trabalho publicado por Porath e colaboradores em 1975, quando os autores introduziram o termo cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography* – IMAC).² IMAC explora a interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelatados imobilizados em um suporte sólido. Inúmeras são as aplicações analíticas, preparativas e industriais de IMAC, como a separação e purificação de diferentes biomoléculas (peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos), a separação de células a partir de extratos biológicos e estudos de estrutura-função de proteínas.

Inicialmente a técnica de IMAC foi extensamente utilizada para purificação de biomoléculas contendo naturalmente grupos doadores de elétrons em resíduos de aminoácidos expostos na superfície (tais como o anel imidazol de histidina), os quais são primariamente responsáveis pela interação biomolécula-íon metálico. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível a incorporação de caudas (*tag*) em proteínas que não contêm naturalmente espécies doadoras de elétrons, tal como a fusão de sequência de seis histidinas na porção C ou N-terminal da proteína alvo, conferindo à mesma a possibilidade de purificação por IMAC.^{3,4}

Apesar de na literatura existirem excelentes artigos de revisão em inglês sobre IMAC⁵⁻¹⁴, nesta revisão, devido à intensa atividade neste campo, pretende-se abordar aspectos fundamentais, aplicações tecnológicas (escala de laboratório e industrial) e científicas com ênfase na purificação de proteínas nativas e recombinantes (com cauda de poli(histidina)). Dentre os aspectos fundamentais do método, serão destacados a seleção de íons metálicos, de agentes quelantes, de matrizes cromatográficas utilizadas como fase estacionária (desde partí-

culas porosas a membranas), a química de ativação e de imobilização e as condições operacionais (pH e força iônica da fase líquida, tipo ou composição da solução tamponante, etc). As vantagens da técnica de IMAC serão discutidas, bem como problemas que eventualmente surgem quando esta técnica é utilizada no processo de produção de proteínas de interesse farmacêutico.

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE IMAC PARA PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A técnica de IMAC baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida apresentam por certos grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado (o centro de adsorção) e certos resíduos de aminoácidos, tais como imidazol da histidina, tiol da cisteína e indol do triptofano, os quais doam elétrons para o íon metálico, ou seja, atuam como base de Lewis.^{5-7,11} O agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante.^{2,6,10}

Proteínas ou outros solutos introduzidos na fase móvel são adsorvidos principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados, havendo também a possibilidade de outras forças envolvidas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, sendo que nem sempre é possível determinar suas contribuições relativas.^{13,15} As moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies doadoras de elétrons (por exemplo, com imidazol ou com um agente quelante solúvel) ou por protonação de grupos doadores de elétrons presentes na proteína adsorvida (redução de pH).^{2,6,10} De forma geral, íons metálicos imobilizados em uma matriz podem ser removidos pela adição de agentes competidores fortes, como o EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético), sem que haja perda da capacidade da matriz, ou seja, ela pode ser carregada novamente (com o mesmo íon metálico ou um outro).

Métodos de separação específicos podem ser desenvolvidos para cada proteína alvo, com a escolha adequada do íon metálico, do

*e-mail: sonia@feq.unicamp.br

agente quelante e das condições cromatográficas tais como pH, força iônica, tipo de tampão, velocidade superficial etc.^{5,7,11} A estabilidade dos quelatos em uma ampla faixa de temperatura e condições da fase líquida é uma vantagem da técnica, pois, além de significar estabilidade operacional desejada em aplicações rotineiras (analítica e larga escala comercial), propicia também a reutilização dos mesmos, sem que haja perda de desempenho.¹⁶

A seguir serão discutidos os cinco principais aspectos envolvidos em IMAC, a química de coordenação, os íons metálicos, os agentes quelantes, as matrizes cromatográficas usadas para imobilização dos agentes quelantes e as condições de adsorção, eluição e regeneração em processos de purificação e estudos de estrutura-função de biomoléculas.

Química de coordenação em IMAC

Em meio aquoso, os íons metálicos são solvatados por moléculas de água, atuando como ácido de Lewis (aceptor de pares de elétrons) e a água como base de Lewis (doadora de pares de elétrons).¹⁷ Contudo, quando a molécula de água é substituída por uma base mais forte, forma-se um complexo de coordenação. Quando esta base contiver um único par doador de elétrons, ou seja, for um ligante monodentado, esta coordenação resultará na formação de um complexo metálico. Por outro lado, se a base contiver dois ou mais átomos doadores de pares de elétrons, haverá a formação de um quelato metálico.^{5-7,11,12,16} O termo quelato tem origem do latim *chela* ou do grego *khêlê*, que significa “pinça”. Neste caso, a molécula doadora de elétrons passa a ser chamada de agente quelante.

Quando um agente quelante é imobilizado em uma matriz sólida por ligações covalentes, um íon metálico que venha a ser quelatado origina um centro de adsorção, apresentando sítios livres para interação com biomoléculas.² De acordo com Wong e colaboradores,⁷ estas interações ocorrem devido à polarizabilidade das espécies envolvidas, eletronegatividade, estado de oxidação, tamanho, tipos de ligações (iônica ou covalente) e disponibilidade do doador de elétrons.

A reversibilidade da interação da biomolécula em questão com o íon metálico imobilizado é fruto do caráter ácido-básico dos íons metálicos utilizados em IMAC e, nas proteínas e peptídeos, principalmente dos átomos de nitrogênio aromático.

Estudos desenvolvidos sobre complexos de coordenação mostraram que a associação de um ácido e de uma base de mesmo caráter, segundo o princípio dos ácidos e bases duros e moles (HSAB – *Hard and Soft Acids and Bases*), resulta em compostos estáveis.¹⁸ O princípio HSAB assume que há três tipos principais de ácidos e de bases: duros, intermediários e moles. Íons metálicos tais como K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{3+} são classificados como ácidos duros e coordenam estavelmente bases duras (principalmente átomos de oxigênio, nitrogênio alifático e fósforo), enquanto que os íons metálicos Ag^+ e Cu^+ são classificados como ácidos moles e coordenam de maneira estável bases moles (principalmente átomos de enxofre). Por sua vez, íons metálicos de transição (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}) são classificados como ácidos intermediários e formam ligações de coordenação estáveis com bases intermediárias (principalmente átomos de nitrogênio aromático) e moles (principalmente átomos de enxofre).^{7,13}

Quando quelatados, os íons metálicos apresentam variações na afinidade por biomoléculas, resultante de diferenças de interação que ocorrem entre quelatos metálicos e espécies doadoras de elétrons expostas na superfície dessas (interações que podem ser previstas pelo princípio de HSAB). A escolha adequada do íon metálico a ser utilizado é de fundamental importância no processo de purificação de biomoléculas por IMAC.

Íons metálicos utilizados em IMAC

De modo geral, qualquer íon metálico que apresente a capacidade de interagir com proteínas pode ser utilizado em IMAC, porém, Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} são os íons metálicos mais comumente empregados devido ao caráter ácido intermediário discutido anteriormente. Os íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} são utilizados na purificação de proteínas que possuam resíduos de histidina, triptofano e cisteína, em que os íons metálicos interagem com o nitrogênio aromático dos grupamentos imidazol, indol e com o enxofre do grupamento tiol, respectivamente, de cada aminoácido.⁶ Os íons metálicos Fe^{3+} e Al^{3+} ligam-se a fosfato e fosfoésteres primários, podendo ser utilizados para separar fosfoproteínas,^{19,20} e o íon Ca^{2+} coordena de maneira estável o átomo de oxigênio presente em grupos carboxílicos dos resíduos dos aminoácidos ácidos aspártico e glutâmico, podendo ser utilizado para purificação de proteínas ricas em grupamentos carboxílicos, tais como fibrinogênio e calmodulina.²¹

Sulkowski⁶ demonstrou que o par de elétrons presente no nitrogênio do anel imidazol da histidina é o principal contribuinte na interação entre a proteína e íons metálicos de transição (quando quelatados ao ácido iminodiacético, IDA) e que a presença de múltiplas histidinas expostas na superfície da proteína a ser separada aumenta o grau desta interação. Aminoácidos aromáticos, como o triptofano, também são importantes na retenção de proteínas. Contudo, a contribuição de um resíduo de triptofano pode ser considerada pequena quando comparado ao efeito que a histidina apresenta na retenção de proteínas em IMAC (Tabela 1).^{6,13,22} A cisteína também afeta a retenção de proteínas em IMAC, no entanto, este resíduo será ligado somente se estiver na forma reduzida (Tabela 2).

Tabela 1. Predição da afinidade proteína-IDA- Me^{2+} (onde Me^{2+} vem a ser Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+}) baseado em resíduos de histidina e triptofano acessíveis na superfície de proteínas

Ocorrência de resíduos His ou Trp na superfície de proteínas	Retenção de proteínas nos quelatos IDA- Me^{2+}
Ausência de His ou Trp	não há
1 His	Cu^{2+}
> 1 His	Cu^{2+} , Ni^{2+}
Cluster de His	Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}
Vários Trp, ausência de His	Cu^{2+}

A acessibilidade dos resíduos de histidina e a sequência de resíduos adjacentes de aminoácidos podem alterar significativamente a retenção de proteínas em IMAC. Resíduos que não se ligam a íons metálicos podem contribuir indiretamente para a coordenação, por proporcionarem uma geometria local adequada (Tabela 2).^{16,22} Esses fatores em conjunto podem influenciar nas ligações de coordenação formadas, ou seja, dois ou mais resíduos de aminoácidos podem se ligar a um único íon metálico (coordenação polidentada) ou pode ocorrer interação multipontos, onde uma única proteína contendo vários resíduos de aminoácidos pode se ligar a vários íons metálicos.^{16,23} Além dos resíduos de aminoácidos, o grupo NH_2 da extremidade N-terminal das proteínas também participa diretamente na interação com o íon metálico imobilizado, no entanto, essa contribuição é significativa somente a valores de pH acima de 8,0, quando o nitrogênio do grupo amino se encontra desprotonado (Tabela 2).

Poucas são as proteínas que naturalmente contêm resíduos de histidina localizados na superfície, uma vez que estes resíduos possuem um caráter ligeiramente hidrofóbico e se localizam, mais frequentemente, no interior da molécula. As interações em IMAC podem ser mais eficientes quando proteínas são geneticamente modificadas para conter caudas (*tag*) de resíduos de histidinas consecutivas (normal-

mente 6 resíduos) ou separadas por alguns aminoácidos (His-X-His) na porção N- ou C- terminal ou contiverem histaminilpurina, no caso de DNA.^{3,4,12,23} Esta cauda confere à proteína a possibilidade de interação multipontos com os íons metálicos Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Co^{2+} imobilizados, facilitando a purificação da proteína alvo, tendo sido relatados muitos processos de purificação em uma única etapa.^{12-14,24} Além disso, a cauda é pouco imunogênica, não carregada em pH fisiológico e raramente interfere na estrutura ou função da proteína alvo.^{3,4,25,26} Finalizada a etapa de purificação, caso seja necessário, a ligação entre a cauda e a proteína alvo pode ser rompida empregando-se métodos químicos ou enzimáticos que preservem a estrutura e a atividade da proteína de interesse.

Tabela 2. Contribuição de resíduos de aminoácidos na retenção de proteínas em IMAC

Ocorrência de resíduos de aminoácidos na superfície de proteínas	Retenção de proteínas nos quelatos	Mecanismo de interação
His	++++	Direta
Cys*	++++	Direta
Asp, Glu	-	Indireta
Lys, Arg	+	Indireta**
Trp, Tyr, Phe	+	Indireta
NH_2 terminal	++	Direta

* Cys liga-se somente se estiver na forma reduzida.

** Torna-se direta em pH alcalino.

Agentes quelantes em IMAC

As propriedades do centro de adsorção dependem fortemente do agente quelante utilizado. De modo geral, quanto mais polidentado for o agente quelante, mais estáveis são os complexos formados com os íons metálicos, porém menor quantidade de sítios permanece disponível para a ligação com a biomolécula e, conseqüentemente, a mesma é mais fracamente adsorvida.^{5,27}

Muitos compostos são empregados como agentes quelantes em IMAC, sendo que o mais utilizado é o ácido iminodiacético (IDA, Figura 1). O IDA é um agente quelante tridentado (possui um átomo de nitrogênio e dois átomos de oxigênio para a coordenação), isto é, quelata o íon metálico ocupando três sítios de coordenação. No caso de íons metálicos hexacoordenados, com três sítios ocupados, há disponibilidade para a biomolécula interagir com os outros três sítios remanescentes. As constantes de dissociação do IDA, pK_1 e pK_2 , são 1,73 e 2,73, respectivamente²⁸ e, de acordo com dados da *Sigma-Aldrich Technical Service*, apresenta ponto isoelétrico entre valores de pH 2,0 e 3,0. A baixos valores de pH, a protonação do nitrogênio do IDA torna esse átomo menos disponível para coordenação, enquanto que a capacidade de coordenação do oxigênio é menos afetada.¹¹ De acordo com Porath,⁵ a estabilidade dos quelatos formados entre IDA com alguns íons metálicos decresce na seguinte ordem: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} \gg \text{Ca}^{2+} \cong \text{Mg}^{2+}$.

Agentes quelantes tetradentados como, por exemplo, o ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), o tris-(aminoetil)amina (TREN) e o ácido nitrilotriacético (NTA) ocupam quatro sítios de coordenação, quando quelatam íons metálicos hexacoordenados, deixando apenas dois sítios livres para a ocorrência da ligação com a biomolécula (Figura 1). Uma diferença entre eles é que o CM-Asp e o NTA possuem um átomo de nitrogênio e três átomos de oxigênio para a coordenação, enquanto o TREN possui quatro átomos de nitrogênio disponíveis para a ligação com o metal, dois dos quais são primários, e um é secundário

e o quarto é terciário.¹⁵ De acordo com a *Sigma-Aldrich Technical Service*, a diferença de ponto isoelétrico é também significativa: 10,5 para o TREN e entre 2,0 e 4,0 para o CM-Asp e o NTA.

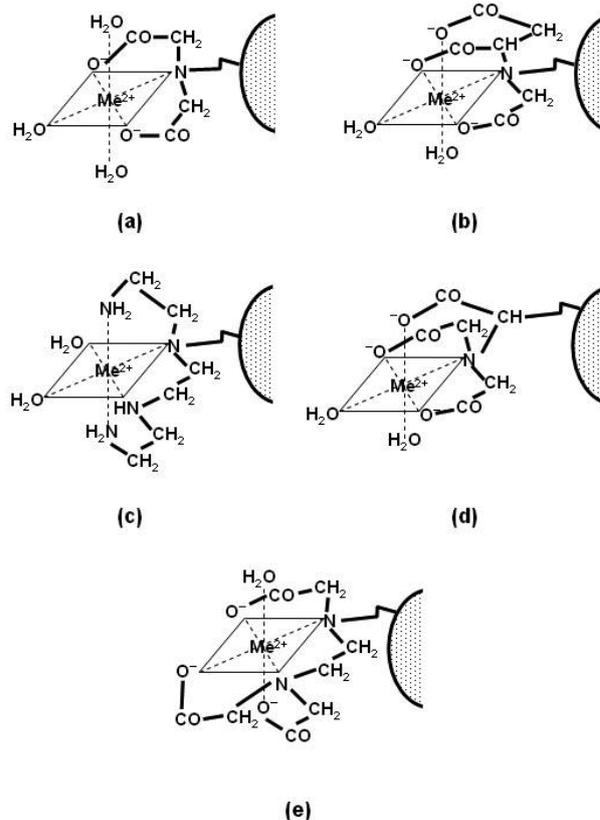


Figura 1. Estrutura proposta de alguns agentes quelantes polidentados complexados com íons metálicos: (a) IDA; (b) CM-Asp; (c) TREN; (d) NTA; (e) TED. Adaptado das refs. 12 e 29

O agente quelante tris(carboximetil)etilenodiamina (TED, Figura 1), por ser pentadentado, apresenta uma elevada estabilidade nas ligações de coordenação, principalmente quando quelatando os íons Ni^{2+} e Fe^{3+} .²⁹ Porém, como este agente quelante disponibiliza apenas um único sítio de coordenação do íon metálico com a biomolécula, a capacidade de adsorção do complexo TED- Me^{2+} é bastante reduzida. Recomenda-se o uso deste agente quelante em situações em que biomoléculas apresentem tendência de retirar o íon metálico da coluna.³⁰

Estudos indicaram que as constantes de formação de quelatos metálicos, quando os agentes quelantes estão imobilizados em suportes sólidos, são da mesma ordem de grandeza das constantes obtidas para compostos análogos em solução.¹¹

Porath e Olin²⁹ apresentaram uma representação da capacidade de adsorção e seletividade para alguns agentes quelantes e íons metálicos imobilizados (Figura 2). Chaga¹¹ mostrou que cerca de 50% das proteínas oriundas de fontes biológicas poderiam ser retidas em Cu^{2+} imobilizado, ao passo que esse número tende a cair significativamente se Ni^{2+} , Co^{2+} ou Zn^{2+} são utilizados.

Sharma e Agarwal¹⁵ apresentaram um estudo comparativo das características de coordenação de íon metálicos Cu^{2+} e Ni^{2+} nos agentes quelantes IDA (tridentado) e TREN (tetradentado) imobilizados em géis de agarose. Estes autores observaram que as capacidades de quelação para os íons metálicos Cu^{2+} foram maiores que para os íons metálicos Ni^{2+} , para ambos os agentes quelantes estudados. Porém, partindo-se do pressuposto de que quanto mais polidentado for o agente quelante, maior

é a estabilidade do quelato, pode-se inferir que os quelatos TREN-Me²⁺ poderiam ser mais estáveis se comparados aos quelatos IDA-Me²⁺. Contudo, os autores mostraram que esta afirmação não é válida para todas as condições, uma vez que parâmetros como natureza do tampão, pH, força iônica e concentração do metal na solução alimentada na coluna, além de características intrínsecas dos átomos doadores de elétrons nos agentes quelantes, desempenham um importante papel no que diz respeito à estabilidade dos quelatos metálicos e capacidade máxima de adsorção.

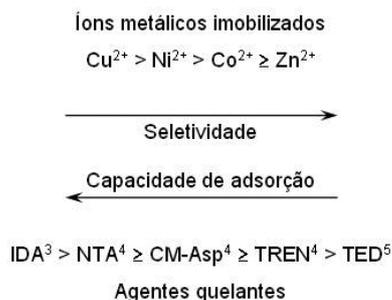


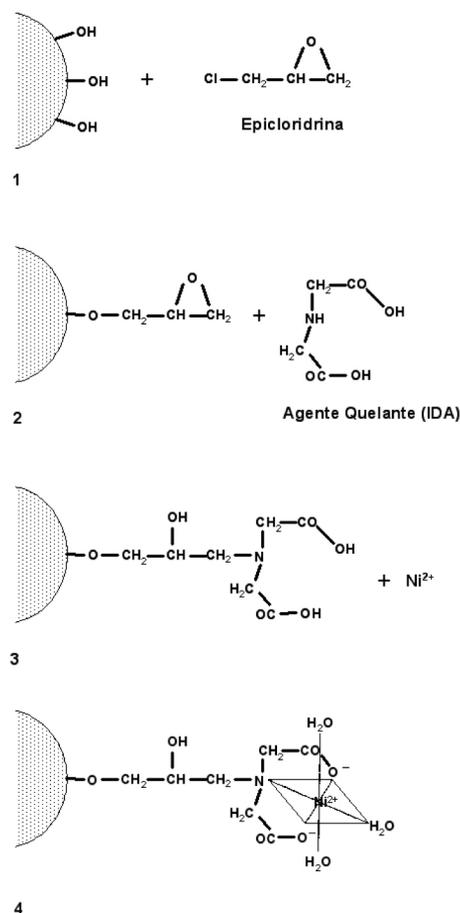
Figura 2. Agentes quelantes e íons metálicos: especificidade em função da capacidade de adsorção. Adaptado da ref. 11 e modificado por Bresolin³¹ e Ribeiro³². Os sobrescritos referem-se à polidentação dos agentes quelantes: tridentado (3), tetradentado (4) e pentadentado (5)

Matrizes cromatográficas utilizadas em IMAC e química de ativação e imobilização de agentes quelantes

Matrizes cromatográficas a serem utilizadas em IMAC devem apresentar as mesmas características requeridas que aquelas empregadas em técnicas cromatográficas para purificação de proteínas. A principal exigência é que a matriz seja hidrofílica, visando não favorecer a adsorção não-específica de biomoléculas.¹²⁻¹⁴ Além disto, é essencial a presença de grupos funcionais que possibilitem a modificação química (ativação) do material para imobilização de ligantes. É aconselhável que a matriz apresente também as seguintes características: alta resistência mecânica, área superficial e porosidade elevadas, estabilidade em uma ampla faixa de pH e na presença de sais e solventes orgânicos.^{5,11,13,14,29,31-33}

Nas técnicas cromatográficas de baixa pressão, que vêm a ser a maioria dos casos de IMAC, as matrizes mais comumente utilizadas são géis de agarose, celulose ou dextrana reticulada. Estes géis são compressíveis e seu emprego é restrito a operações que requerem baixo fluxo, sendo pouco utilizados em nível industrial, devido à baixa produtividade.^{12,14} Na maioria dos trabalhos publicados de IMAC, a ativação destas matrizes foi realizada com epícloridrina ou bisoxiranos (por exemplo, 1,4 butanodiol diglicidil éter), produzindo suportes com grupos epóxido (Figura 3). Quando necessário, braços espaçadores, ou seja, moléculas acopladas covalentemente à fase estacionária com objetivo de distanciar o ligante da matriz (por exemplo, amino-hexil), podem ser utilizados para evitar que ocorram problemas de impedimento estérico durante a adsorção da biomolécula alvo. Os agentes quelantes são ligados covalentemente à fase estacionária ativada ou ao braço espaçador através de seu grupo amino (Figura 3).

Quando o processo requer alto fluxo e alta produtividade, podem ser empregados adsorventes inorgânicos, como sílica, pois apresentam excelentes propriedades mecânicas. As desvantagens da sílica residem na adsorção não específica de proteínas, no requerimento de equipamentos de alta pressão e na sua instabilidade em meio alcalino (pH > 8,0), limitando, assim, seu uso em IMAC para purificação de proteínas.¹²⁻¹⁴ Quando empregados em IMAC, estes suportes são, na maioria dos casos, ativados com epoxissilanos e a ligação do agente quelante é realizada pelo terminal amino.^{21,29}



Se necessário, pode-se acoplar um braço espaçador, por exemplo, amino-hexil, entre as etapas 2 e 3.



1. Matriz "in natura"
2. Matriz ativada com epícloridrina
3. Acoplamento do agente quelante IDA
4. Imobilização do íon metálico Ni²⁺

Figura 3. Esquema de ativação por epícloridrina, acoplamento do agente quelante e imobilização de íon metálico em matrizes poliméricas

De modo a superar as desvantagens apresentadas pelos géis de polissacarídeos, cromatografia em leito expandido e cromatografia em membranas adsorptivas apresentam-se como uma alternativa, podendo ser empregadas em larga escala. Na cromatografia em leito expandido, um fluxo ascendente de fase móvel na coluna promove a expansão do leito - distanciamento das partículas de adsorvente (géis especiais, por exemplo, Streamline Chelating®, Amersham Pharmacia) de velocidade terminal diferente, devido à força de arraste - que, desta forma, pode receber alimentação com particulados sem que haja colmatação (entupimento) do leito.²⁵ Na cromatografia em membranas, o transporte das moléculas da solução até o interior dos poros é regido, sobretudo, pela convecção e não pela difusão (como ocorre nos géis). Este transporte convectivo facilita o acesso da biomolécula ao sítio de fixação do ligante. Além disso, altas vazões podem ser obtidas com pressões moderadas, sem necessidade de uso de equipamentos de alta pressão.³⁴ Membranas de diversos materiais

(por exemplo, celulose, álcool poli(etileno)vinílico (PEVA) e fibras de vidro) e diversas configurações (placas planas e fibras ocas) têm sido empregadas como matrizes para a imobilização de agentes quelantes para uso em IMAC, visando a purificação de biomoléculas.^{31,35-39} No caso de membranas e géis empregados em leito expandido, as técnicas de ativação e imobilização dos agentes quelantes são similares àquelas utilizadas para os géis cromatográficos tradicionais.

Pesquisas recentes vêm demonstrando que materiais à base de outros polímeros, naturais ou sintéticos, como quitosana, etileno-glicol, metacrilatos, além de minerais como hidroxiapatita e magnetita, podem ser utilizados como matrizes para imobilização de agentes quelantes, seja para uso em leito fixo ou expandido.⁴⁰⁻⁴⁶ Outros materiais, como capilares monolíticos de sílica, nanotubos de carbono e fulerenos também são utilizados para a imobilização de íons metálicos na presença ou ausência de agentes quelantes.⁴⁷

Adsorventes IMAC (matriz com agente quelante imobilizado) podem ser também adquiridos comercialmente. As empresas disponibilizam adsorventes para uso em equipamentos cromatográficos de baixa pressão como, por exemplo, géis de agarose com IDA ou NTA imobilizado (GE Healthcare®, Pierce®, Sigma-Aldrich® e Qiagen®) e, também, adsorventes para uso em equipamentos cromatográficos de média e alta pressão como, por exemplo, matrizes de sílica ou agarose altamente reticulada com IDA ou NTA imobilizados (GE Healthcare®, Qiagen® e Clontech Laboratoires®). A empresa Sartorius disponibiliza também membranas planas microporosas com o agente quelante IDA imobilizado, sendo que, assim, este adsorvente pode ser empregado em cromatografias cujas amostras de alimentação possuem material particulado.

Adsorção, dessorção e regeneração em IMAC

A seletividade e a capacidade de adsorção em IMAC dependem, não somente dos quelatos metálicos imobilizados na matriz cromatográfica, mas também da composição da fase móvel. Como mencionado, a retenção de proteínas em adsorventes IMAC ocorre devido à contribuição de diversas interações físico-químicas, que podem ser intensificadas ou minimizadas dependendo da composição da fase móvel. Quando IMAC é operado em alta concentração de sal (0,5 a 1,0 mol L⁻¹ de NaCl, por exemplo), predominam as ligações de coordenação entre íons metálicos imobilizados e resíduos de aminoácidos acessíveis na superfície das proteínas e, em menor intensidade, ocorrem interações eletrostáticas.^{5,10,13,14}

Os efeitos eletrostáticos são mais intensos quando se emprega uma fase móvel com baixa força iônica. Estes efeitos ocorrem entre proteínas carregadas e as cargas positivas dos íons metálicos ou as cargas negativas remanescentes na superfície da matriz (grupos funcionais não reagidos durante a ativação e o acoplamento do agente quelante ou grupo carboxílico residual de agentes quelantes, devido à quelação incompleta dos íons metálicos).^{10,13,14} As interações hidrofóbicas podem ocorrer entre proteínas e sítios hidrofóbicos presentes na superfície da matriz ou nos braços espaçadores.^{12,14}

Os efeitos do sistema tamponante, pH e força iônica nas etapas de adsorção e dessorção serão discutidos a seguir.

Condições de adsorção

Sistemas tamponantes e aditivos

Em princípio, todos os tampões tradicionais utilizados em cromatografia líquida para purificação de biomoléculas podem ser empregados como fase móvel em IMAC, devendo-se, no entanto, evitar aqueles que possuem alta afinidade por íons metálicos como, por exemplo, tricina e citrato, pois podem removê-los do suporte. Os tampões mais empregados em IMAC são fosfato de sódio, acetato de sódio e os zwitteriônicos (*Goods buffers*) tais como MOPS (ácido

3-[*N*-morfolino]propanossulfônico), MES (ácido 2-[*N*-morfolino]etanossulfônico) e HEPES (ácido *N*-[2-hidroxiethyl]piperazina-*N'*-[2-etanossulfônico]).¹⁰

Em menor extensão que a tricina e o citrato, os tampões preparados com sais de Tris (Tris [hidroximetil]aminometano) e fosfato competem fracamente com a biomolécula pelo sítio metálico, tornando, em alguns casos, a adsorção mais seletiva. Esta propriedade pode também ser empregada na etapa de eluição, onde o aumento de concentração de Tris ou fosfato pode favorecer a dessorção das proteínas.^{31,35,38,48,49}

Dependendo da situação, a fase móvel pode requerer a adição de outros componentes em sua constituição, que apresentem a função de manter a integridade de proteínas (inibidores de protease ou glicerol, por exemplo), de prevenir a agregação de proteínas (mercaptoetanol, por exemplo) ou meramente melhorar a resolução do processo.^{24,50} Vários autores mostraram que a presença de detergentes não-iônicos (como NP-40 e Tween 80), uréia, cloreto de guanidina 6 mol L⁻¹ e solventes orgânicos em baixa concentração não interfere nos processos de purificação por IMAC.^{4,24,29,36,51} Quando se visa o isolamento e a purificação de proteínas recombinantes presentes em corpos de inclusão, ao se utilizar IMAC há a possibilidade de separação eficiente de proteínas contendo cauda de histidina na presença de concentrações elevadas de agentes desnaturantes, como uréia e guanidina-HCl.¹²

Efeito do pH

Em IMAC, a ligação de coordenação é favorecida quando grupos ionizáveis doadores de elétrons presentes nos resíduos de aminoácidos da biomolécula estão parcialmente desprotonados, ou seja, quando estão em uma condição na qual o valor de pH é superior ao pKa dos grupos ionizáveis. Além disso, como as ligações de coordenação com os íons metálicos imobilizados podem ocorrer simultaneamente com interações eletrostáticas, a adsorção de proteínas em IMAC é dependente do pH.⁵²

De modo geral, o pH ótimo de adsorção depende do íon metálico e dos grupos doadores de elétrons envolvidos na interação. A adsorção é favorecida numa faixa de valores de pH entre 6,0 e 8,0 para proteínas que possuem resíduos de histidinas e cisteínas acessíveis quando se utiliza Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ ou Co²⁺ imobilizado, enquanto que, para proteínas ricas em ácidos carboxílicos ou grupos fosfato (fosfoproteínas), a adsorção ocorre a valores de pH mais baixos (pH 5,0), quando se utiliza Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺.^{12,27} A contribuição de grupos NH₂ terminais e resíduos de aminoácidos, como arginina e lisina, na adsorção em IMAC são significativos a valores de pH acima de 8,0, quando se utiliza Cu²⁺ ou Ni²⁺, por exemplo.⁵³

Efeito da força iônica

Quando as cromatografias são realizadas em condições recomendadas por Porath e colaboradores,² ou seja, elevada concentração de sal e condições de pH particulares (por exemplo, pH em que os resíduos de histidina se encontram desprotonados), há predominância das ligações de coordenação entre íons metálicos imobilizados e proteínas devido à diminuição ou supressão das interações eletrostáticas. Na maioria dos casos, a elevada concentração de sal aumenta a seletividade em IMAC, uma vez que a natureza do íon metálico será o principal elemento responsável pela adsorção. Além disso, as proteínas são estabilizadas e o processo de agregação tende a ser retardado.^{10,14,22,53} A utilização de uma fase móvel com baixa força iônica (ausência ou baixa concentração de sal) permite que ocorram, predominantemente, interações eletrostáticas, fazendo com que o comportamento do quelato se assemelhe ao de uma resina de troca iônica.^{13,14}

Não apenas a força iônica em si é importante, mas a adsorção de proteínas em IMAC pode ser também influenciada significativamente pelo tipo do sal utilizado. Porath e Olin²⁹ mostraram que

proteínas adsorvidas na presença de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio podem diferir daquelas adsorvidas a uma mesma força iônica, porém utilizando-se sulfato de sódio (concentração de $0,333 \text{ mol L}^{-1}$). Normalmente em IMAC, utiliza-se uma concentração acima de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio.

Condições de dessorção

A dessorção das biomoléculas adsorvidas na matriz cromatográfica em IMAC pode ser conduzida utilizando-se diferentes condições, entre elas: alteração dos valores de pH da fase móvel; aumento da força iônica da fase móvel; adição de agente competidor na fase móvel (por exemplo, imidazol), que possua capacidade de interagir com o íon metálico; deslocamento do complexo íon metálico-proteína utilizando um agente quelante mais forte (por exemplo, EDTA) e, eluição isocrática. Os métodos mais comumente empregados são a alteração de valores de pH e a adição de um agente competidor na fase móvel da cromatografia.^{7,10,13,14,27}

Como discutido anteriormente, o pH afeta o comportamento nucleofílico dos componentes do tampão, as propriedades dos solutos doadores e receptores de elétrons, bem como a estabilidade do quelato metálico.^{7,27} Eluição por diminuição do pH ocasiona a protonação das espécies doadoras de elétrons, podendo ser um método eficiente para dessorver proteínas que interagem com íons metálicos Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} imobilizados. Para cromatografias realizadas com íon metálico Fe^{3+} as proteínas podem ser eluídas por aumento do pH. Na eluição por alteração de pH da fase móvel recomenda-se utilizar valores de pH brandos, a fim de evitar a desnaturação e a desestabilização da biomolécula, que pode acarretar, por exemplo, perda irreversível da atividade. É importante, também, realizar o monitoramento do desprendimento do íon metálico do adsorvente, causado pelo enfraquecimento da interação entre o agente quelante e o íon metálico imobilizado.²⁷

A eluição por aumento da força iônica da fase móvel pode ser empregada quando interações hidrofóbicas e iônicas são significativas em relação às ligações de coordenação.¹⁰

No método de dessorção por agente competidor, os agentes competitivos mais utilizados são histidina, histamina, glicina, imidazol, fosfato e Tris. A característica fundamental para que um soluto seja considerado como um agente competidor é que possua maior afinidade pelo sítio de ligação que a molécula que está adsorvida. Isto faz com que a biomolécula seja dessorvida para o meio, enquanto o competidor permanece adsorvido na matriz.^{7,22} Apesar de evitar condições de baixos valores de pH, este método de eluição também requer a introdução de mais uma etapa de processo a fim de eliminar o agente competitivo do meio contendo a proteína eluída (por meio de ultrafiltração, permeação em gel ou diálise, por exemplo).

O modo de operação de eluição, seja por diminuição de pH, adição de agente competidor e aumento da força iônica ou a combinação destes métodos, é geralmente feito por gradientes linear ou degrau.¹⁰ Particularmente, o uso de gradiente linear é interessante em experimentos preliminares, em que não se conhece o comportamento do perfil de eluição de uma dada biomolécula para, posteriormente, se utilizar gradiente degrau, mais reprodutível e geralmente utilizado em processos de purificação em larga escala.

A eluição isocrática é eficiente para dessorção da biomolécula adsorvida quando a interação entre o íon metálico e a biomolécula é fraca e esta é de baixa massa molecular (menor que 30 kDa). Neste método a eluição é realizada em condições constantes (composição de tampão, pH e temperatura), nas mesmas condições utilizadas na etapa de aplicação da amostra.¹⁰ Neste caso, o pH e a concentração do tampão devem proporcionar interação incompleta entre a biomolécula e os íons metálicos imobilizados. As vantagens deste tipo de

eluição resultam em aumento da resolução da separação e na rápida regeneração da coluna, mas a proteína alvo é eluída em um *pool* com baixa concentração.

O deslocamento do complexo íon metálico-proteína utilizando um agente quelante mais forte como, por exemplo, o EDTA, é normalmente utilizado para a regeneração da coluna após o término da etapa de eluição. Entretanto, em muitos casos, a interação entre o íon metálico e a proteína de interesse é tão forte, que o único meio de retirá-la da coluna é proporcionando também o deslocamento do íon metálico. Este tipo de eluição não é adequado na maioria dos casos, principalmente se a proteína alvo tem finalidade terapêutica, pois é necessário, nestes casos, que o íon metálico seja removido da fração eluída contendo a proteína.^{7,22}

Regeneração do adsorvente IMAC

Após a etapa de eluição, normalmente se regenera o adsorvente para que este possa ser reutilizado em novos ciclos operacionais, após nova imobilização de íon metálico.^{7,22} Para tanto, utiliza-se um agente quelante forte como, por exemplo, o EDTA, que será o responsável por promover o enfraquecimento da interação íon metálico-agente quelante, permitindo que haja remoção dos íons metálicos.

Em alguns casos, quando soluções de EDTA não conseguem remover do adsorvente substâncias como proteínas desnaturadas ou lipídios, é necessária a realização de procedimentos de *cleaning-in-place* (CIP), envolvendo lavagem com $\text{NaCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$, para a remoção de proteínas fortemente adsorvidas ionicamente, $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$, para a remoção de proteínas precipitadas ou adsorvidas hidrofobicamente, ou solução 70% etanol:30% isopropanol, para remoção de lipoproteínas ou lipídeos.⁵⁴ Quando é necessária a realização de sanitização da coluna cromatográfica para redução de contaminação bacteriana, após a regeneração do adsorvente com EDTA procede-se à lavagem com NaOH , seguida de lavagem com água.^{55,56}

EXEMPLOS DE APLICAÇÕES DE IMAC

Peptídeos e proteínas nativas e recombinantes produzidas por bactérias, fungos, leveduras, células animais, células de inseto e em plantas, assim como ácidos nucleicos (DNA e RNA) vêm sendo purificados por IMAC usando os mais variados suportes, agentes quelantes e íons metálicos.^{37,49,57-63}

A literatura mostra que, além destas aplicações, IMAC foi utilizada para separação de diferentes tipos de células microbianas, uma vez que estas, quando possuam resíduos de histidina acessíveis, apresentavam a capacidade de serem adsorvidas em uma coluna monolítica de estrutura macroporosa composta por criogéis de poli(acrilamida) com IDA-Cu^{2+} imobilizado.⁶⁵

Proteínas que contêm naturalmente resíduos de histidinas acessíveis (recombinantes ou não) e apresentam importância comercial no campo terapêutico e diagnóstico, como proteínas do soro humano,²⁹ imunoglobulinas,^{31,35,38,66-71} interferon,⁷² proteína C humana,^{73,74} fator IX^{73,75} e hormônio de crescimento humano,⁷⁶ foram purificadas por IMAC utilizando os metais de transição Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Co^{2+} imobilizados. Outros íons metálicos, diferentes dos metais de transição, tais como Al^{3+} (metal representativo), Ca^{2+} (metal alcalino terroso) e Yb^{3+} (lantânido), foram empregados para purificação de transferrina, albumina, α_2 -macroglobulina e γ -globulinas, alcançando-se elevadas seletividades, mostrando-se uma alternativa atrativa para fracionamento seletivo de proteínas do soro humano.⁷⁷

A técnica de IMAC tem sido utilizada para a purificação de anticorpos policlonais e monoclonais de diversas fontes, devido, principalmente, à presença de resíduos de histidina acessíveis na superfície da molécula. Hale e Beidler⁶⁶ descreveram uma região rica em resíduos de histidina localizada na porção Fc (próxima à extremidade C-terminal da cadeia

pesada) no anticorpo murino humanizado do isotipo IgG₁. Essa região, responsável pela interação proteína-metal, também ocorre em diversas outras sub-classes de IgG humana, além de IgG de coelho, carneiro, ovelha, entre outras. Todorova-Balvay e colaboradores,⁷¹ por cálculo computacional, determinaram que a retenção da IgG humana ocorre, principalmente, devido à presença de duas histidinas separadas somente por um aminoácido (His 433-X-His 435) que seriam as responsáveis pela sua retenção em IDA-Zn²⁺ e IDA-Co²⁺. Os resultados promissores, obtidos por diversos grupos de pesquisa, fazem de IMAC uma boa alternativa aos métodos já existentes para a purificação de IgG podendo atingir, em muitos casos, teor de pureza superior a 90%.^{38,66,67,71}

Outras proteínas sem modificação prévia, apresentando naturalmente afinidade por íons metálicos foram purificadas com êxito por IMAC, podendo-se citar a quimotripsina,⁴⁸ a catalase,⁷⁸ o glucagon⁷⁹ e a lisozima.⁸⁰

Caso a proteína alvo não apresente naturalmente resíduos de histidina acessíveis, a purificação pode ser executada por IMAC negativa. Na cromatografia negativa, a proteína alvo não interage com o ligante imobilizado e se as impurezas e contaminantes presentes na alimentação interagirem fortemente e em extensão com o ligante, sendo retidos na coluna cromatográfica, a proteína alvo pode ser obtida com alta pureza nas frações não retidas. Azzoni e colaboradores⁸¹ e Genaro e colaboradores⁸² purificaram, com sucesso, por IMAC negativa, aprotinina recombinante de proveniente semente de milho transgênico e aprotinina proveniente de sobrenadante de precipitação de processo de produção industrial de insulina bovina da Biobrás, MG, Brasil, respectivamente.

Como mencionado anteriormente, resíduos de histidina podem ser introduzidos artificialmente em proteínas que não os contêm naturalmente (ou os contêm, mas se encontram inacessíveis).³ A adição da cauda de histidina em proteínas recombinantes tem sido altamente efetiva, proporcionando a purificação da proteína alvo em uma única etapa com alto teor de pureza.²⁶ Como exemplos de proteínas recombinantes com cauda de histidina purificadas por IMAC em nível de bancada, podem-se citar pró-renina humana,⁸³ β-galactosidase e peroxidase de raiz forte^{84,85} e, em nível industrial, a pró-insulina humana.⁸⁶

Pró-renina humana produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO), tendo uma cauda de 10 histidinas, foi purificada por IMAC, fazendo-se uso de colunas comerciais Talon[®]-Co²⁺. Esta proteína, que é a precursora da renina, apresenta potenciais funções fisiológicas.⁸³ Enzimas recombinantes como β-galactosidase e peroxidase de raiz forte com cauda de poli-histidina foram purificadas usando-se, respectivamente, agarose-dextrana-IDA-Zn²⁺ e agarose-NTA-Ni²⁺, alcançando elevados níveis de pureza e recuperação.^{84,85}

A pró-insulina humana recombinante tendo uma cauda de histidina, produzida pela indústria brasileira BIOMM (Montes Claros, MG, Brasil) foi purificada por IMAC em géis de agarose-IDA-Ni²⁺, segundo procedimento descrito por Tikhonov e colaboradores.⁸⁶

Como os custos de recuperação e purificação de produtos chegam a representar uma porcentagem significativa do custo total, a minimização do número de etapas e do tempo do processo reduz enormemente o custo do produto. Com o intuito de reduzir o número de etapas do processo, Aquino e colaboradores propuseram a purificação de pró-insulina humana recombinante com cauda de histidina em membranas de fibras ocas de álcool (poli (etileno vinílico)) com o íon níquel quelatado ao IDA, devido à vantagem em relação aos géis tradicionais, de tratar grandes volumes por unidade de tempo e alimentar soluções contendo material particulado. A metodologia proposta foi equivalente em termos de seletividade, porém o adsorvente apresentou capacidade menor que agarose-IDA-Ni²⁺.³⁶

Uma das modificações pós-traducionais mais abundantes em proteínas é a fosforilação, que consiste na adição de um grupo fosfato (PO₄) a uma proteína ou biomolécula para desempenhar funções de

expressão gênica e regulação do crescimento, por exemplo.^{87,88} Neste contexto, a técnica de IMAC é utilizada para o enriquecimento seletivo de misturas que contenham componentes fosforilados e não-fosforilados.⁸⁹ Íons metálicos como Fe³⁺ e Ga³⁺, por exemplo, apresentam a habilidade de identificar tanto a proteína como o sítio fosforilado, podendo ser utilizados neste processo de separação.^{90,91}

Ácidos nucleicos (DNA e RNA) também vêm sendo isolados e purificados utilizando-se IMAC. O trabalho pioneiro de Min e Verdine⁹² mostrou que ácidos nucleicos com oligonucleotídeos *primers* contendo sequência de seis resíduos de histaminilpurina na sua estrutura molecular interagem seletivamente com o quelato NTA-Ni²⁺ (agarose-NTA-Ni²⁺) resultando num maior rendimento na purificação do produto da PCR, enquanto bases normais de DNA e RNA não participam da quelação com Ni²⁺. Em trabalhos mais recentes, pesquisadores mostraram que DNA plasmidial (pDNA) e genômico puderam ser separados por IMAC em agarose-IDA-Cu²⁺ e agarose NTA-Cu²⁺, bem como usando-se a coluna comercial Hi-Trap (GE Healthcare[®]) com Cu²⁺ e Ni²⁺ imobilizados, após etapas de desnaturação termoquímica seguida de renaturação, pois o DNA genômico parcialmente desnaturado é seletivamente ligado aos íons metálicos imobilizados, enquanto que o pDNA renaturado não apresenta afinidade.^{93,94} Por sua vez, Nastasijevic e colaboradores⁶³ mostraram que a presença de uma cauda de oligo-adenosina é suficiente para conferir a ambas moléculas de DNA e RNA uma afinidade mais intensa por NTA-Ni²⁺, permitindo sua captura e purificação por IMAC.

Tan e colaboradores,⁹⁵ por sua vez, utilizaram IMAC com vários íons metálicos de transição (Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ e Fe³⁺) imobilizados em resinas de IMAC comerciais (IDA-Chelating Sepharose Fast Flow, Ni²⁺-NTA Agarose e Talon Metal Affinity Resin) para purificação de pDNA a partir de lisado celular alcalino com a remoção simultânea de RNA e endotoxinas.

Além do seu uso em purificação, IMAC também pode ser utilizado no estudo estrutural de proteínas. O conhecimento das interações metal-proteína pode ser uma poderosa ferramenta no estudo da interação entre a proteína e outras moléculas, como a relação entre enzima-inibidor.^{7,13,14}

A afinidade entre proteínas e íons metálicos imobilizados pode ser também explorada em outras técnicas, diferentes da cromatografia. Dentre as várias técnicas utilizando quelatos metálicos imobilizados, pode-se citar, como exemplos de separação de células, proteínas e ácidos nucleicos, a partição em duas fases aquosas por afinidade,^{96,97} a precipitação por afinidade^{62,95,98} e a técnica de eletroforese de afinidade.^{99,100}

PRÓS E CONTRAS DA PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR IMAC

Como toda técnica cromatográfica de purificação de biomoléculas, a técnica de IMAC apresenta vantagens e desvantagens. Como já visto, IMAC tem sido uma técnica muito utilizada para a purificação de proteínas devido ao seu baixo custo, à especificidade (em muitos casos apresentando purificação em uma única etapa e grau de pureza acima de 90%), alta capacidade de adsorção e por apresentar condições brandas de eluição da proteína adsorvida. O adsorvente IMAC é de fácil regeneração e não apresenta degradação química ou microbiológica durante a estocagem.^{3,4,30,101} Além dessas vantagens, os adsorventes IMAC são muito versáteis, pois diferentes íons metálicos podem ser imobilizados usando o mesmo adsorvente, após a regeneração do mesmo com EDTA, podendo ser utilizados em mais de 100 ciclos, fato este que os tornam importantes sob o ponto de vista de aplicação industrial (ampliação de escala).

Como também já discutido, métodos de separação específicos podem ser empregados para cada tipo de biomolécula, apenas com a escolha adequada do íon metálico e das condições cromatográficas, tais como pH, força iônica, tipo de tampão, velocidade superficial etc.,^{7,11,13,14} pois IMAC é compatível com diferentes tampões e concentração de sais, não afetando a estrutura terciária das proteínas.^{5,11}

Como potenciais desvantagens da técnica, podem-se citar o fenômeno MIT (*Metal Ion Transfert*), as reações de oxidação catalisadas na presença de metais e o desprendimento de íons metálicos durante a cromatografia.

O fenômeno MIT ocorre quando a proteína alvo captura o íon metálico da coluna dentro de sua estrutura. Caso a proteína alvo purificada seja utilizada para fins terapêuticos, a presença de íon metálico pode ser problemática, pois muitos íons metálicos são cancerígenos.

Aminoácidos como histidina e cisteína são susceptíveis a reações de oxidação catalisadas na presença de metais (principalmente cobre) em meio contendo oxigênio dissolvido, o que produz compostos intermediários que podem alterar quimicamente a proteína. Neste caso, IMAC não é recomendado como método de purificação.¹²

Em alguns casos é possível a ocorrência de desprendimento de íons metálicos durante o processo de purificação, acarretando a necessidade de inclusão de uma etapa adicional para a remoção destes íons metálicos. No caso de se estar trabalhando com a purificação de proteínas para uso terapêutico, a contaminação por íons metálicos pode acarretar em sua retenção pelas células do organismo, principalmente quando terapias de longo tempo são empregadas.¹⁴ Pode-se remediar esta situação, por exemplo, acoplando-se a jusante da coluna IMAC uma coluna com gel contendo um agente quelante pentadentado não carregado com íon metálico (como TED) para captura dos íons metálicos desprendidos.^{12-14,30}

CONCLUSÃO

IMAC tem se mostrado uma excelente técnica para purificação, bem como para caracterização e estudos de estrutura-função de biomoléculas nativas, recombinantes e modificadas. IMAC possui vantagens em relação a outras técnicas em termos de seletividade, reprodutibilidade, custo e produtividade. O procedimento químico de preparação de adsorventes e os fenômenos de adsorção e dessorção em IMAC são, na maioria dos casos, relativamente simples e bem entendidos.

O domínio, pelos biólogos moleculares, da inserção de caudas de espécies doadoras de elétrons em proteínas e ácidos nucleicos e o desenvolvimento de novas matrizes, mais robustas do ponto de vista de aplicação em larga escala a altos fluxos, fazem de IMAC uma técnica aplicável em nível laboratorial e industrial. Crescentes combinações de IMAC com novas tecnologias aplicadas à metaloproteômica, proteômica e genômica contribuirão ainda mais para o sucesso de estudos de expressão, mapeamento de células, modificações pós-traducionais e proteômica estrutural.

REFERÊNCIAS

- Everson, R. J.; Parker, H. E.; *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 1966.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G.; *Nature* **1975**, *258*, 598.
- Hochuli, E.; *J. Chromatogr.* **1988**, *444*, 293.
- Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Dobeli, H.; Gentz, R.; Stuber, D.; *Bio-Technology* **1988**, *6*, 1321.
- Porath, J.; *Trends Anal. Chem.* **1988**, *7*, 254.
- Sulkowski, E.; *Bioessays* **1989**, *10*, 170.
- Wong, J.; Albrigh, R. L.; Wang, N. H. W.; *Sep. Purif. Methods* **1991**, *20*, 49.
- Porath, J. Em *Modern Methods in Protein Chemistry*; Tschesche, H., ed.; de Gruyter: New York, 1985, vol. 2.
- Porath, J.; *Protein Expression Purif.* **1992**, *3*, 263.
- Winzerling, J. J.; Berna, P.; Porath, J.; *Methods: a companion to Methods in Enzymology 4*, Academic Press: New York, 1992, p. 4-13.
- Chaga, G. S.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 313.
- Gaberc-Porekar, V.; Menart, V.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 335.
- Ueda, E. K. M.; Gout, P. W.; Morganti, L.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 1.
- Gutiérrez, R.; Martín del Valle, E. M.; Galán, M. A.; *Sep. Purif. Rev.* **2007**, *36*, 71.
- Sharma, S.; Agarwal, G. P.; *Sep. Sci. Technol.* **2002**, *37*, 3491.
- Arnold, F. H.; *Bio-Technology* **1991**, *9*, 151.
- Lewis, G. N.; *Valence and the Structure of Atoms and Molecules*, The Chemical Catalog Company, Inc.: New York, 1923.
- Pearson, R. G.; *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 581.
- Andersson, L.; Porath, J.; *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 250.
- Sulkowski, E.; *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1988**, *17*, 334.
- Mantovaara, T.; Pertoft, H.; Porath, J.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1991**, *13*, 371.
- Beitle, R. R.; Atai, M. M.; *AIChE Symp. Series* **1992**, *88*, 34.
- Johnson, R. D.; Arnold, F. H.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 437.
- Chaga, G.; Bochkariov, D. E.; Jokhadze, G. G.; Hopp, J.; Nelson, P.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *864*, 247.
- Clemmitt, R. H.; Chase, H. A.; *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 206.
- Gaberc-Porekar, V.; Menart, V.; *Chem. Eng. Technol.* **2005**, *28*, 1306.
- Sulkowski, E.; *Trends Biotechnol.* **1985**, *3*, 1.
- Bossi, A.; Righetti, P. G.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2012.
- Porath, J.; Olin, B.; *Biochemistry* **1983**, *22*, 1621.
- Oswald, T.; Hornbostel, G.; Rinas, U.; Anspach, F. B.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1997**, *25*, 109.
- Bresolin, I. T. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
- Ribeiro, M. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
- Steinmann, L.; Porath, J.; Hashemi, P.; Olin, A.; *Talanta* **1994**, *41*, 1707.
- Thömmes, J.; Kula, M. R.; *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*, 357.
- Serpa, G.; Augusto, E. F. P.; Tamashiro, W. M. S. C.; Ribeiro, M. B.; Miranda, E. A.; Bueno, S. M. A.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *816*, 259.
- Aquino, L. C. L.; Sousa, H. R. T.; Miranda, E. A.; Vilela, L.; Bueno, S. M. A.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *834*, 68.
- Mellado, M. C. M.; Curbelo, D.; Nóbrega, R.; Castilho, L. R.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 636.
- Ribeiro, M. B.; Vijayalakshmi, M.; Todorova-Balvay, D.; Bueno, S. M. A.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *861*, 64.
- Serafica, G. C.; Pimbley, J.; Belford, G.; *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 21.
- Xi, F.; Wu, J. M.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1057*, 41.
- Feng, S.; Pan, C. S.; Jiang, X. G.; Xu, S. Y.; Zhou, H. J.; Ye, M. L.; Zou, H. F.; *Proteomics* **2007**, *7*, 351.
- Akgöl, S.; Öztür, N.; Karagözler, A. A.; Uygün, D. A.; Uygün, M.; Denizli, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *51*, 36.
- McCarthy, P.; Chattopadhyay, M.; Millhauser, G. L.; Tsarevsky, N. V.; Bombalski, L.; Matyjaszewski, K.; Shimmin, D.; Avdalovic, N.; Pohl, C.; *Anal. Biochem.* **2007**, *366*, 1.
- Prikryl, P.; Horák, D.; Tichá, M.; Kuderová, Z.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2541.
- Nova, C. J. M.; Paolucci-Jeanjean, D.; Barboiu, M.; Belleville, M. P.; Rivallin, M.; Rios, G.; *Desalination* **2006**, *200*, 470.
- Farinas, C. S.; Reis, P. C.; Ferraz, H. C.; Salim, V. M. M.; Alves, T. L. M.; *Anais do 6º Encontro Brasileiro sobre Adsorção*, Maringá, Brasil, 2006.

47. Najam-Ul-Haq, M.; Rainer, M.; Heigl, N.; Szabo, Z.; Vallant, R.; Huck, C. W.; Engelhardt, H.; Bischoff, K. D.; Bonn, G. K.; *Amino Acids* **2008**, *34*, 279.
48. Berna, P. P.; Mrabet, N. T.; van Beeumen, J.; Devreese, B.; Porath, J.; Vijayalakshmi, M. A.; *Biochemistry* **1997**, *36*, 6896.
49. Silva, P. T.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
50. Chaga, G.; Hopp, J.; Nelson, P.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 19.
51. Ueda, E. K. M.; Gout, P. W.; Morganti, L.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *922*, 165.
52. Porath, J.; *J. Molec. Recogn.* **1990**, *3*, 123.
53. Belew, M.; Porath, J.; *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 333.
54. [http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/F2E6A89CDAEF5ACCC1256EB400417DE8/\\$file/71500187AD.pdf](http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/F2E6A89CDAEF5ACCC1256EB400417DE8/$file/71500187AD.pdf), acessada em Julho 2008.
55. Denizli, A.; Alkan, M.; Garipcan, B.; Özkara, S.; Pişkin, E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *795*, 93.
56. Jungbauer, A.; *J. Chromatogr., A* **2005**, *1065*, 3.
57. Gelunaitè, L.; Luksa, V.; Sudziuvienė, O.; Bumelis, V.; Pesliakas, H.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *904*, 131.
58. Pessela, B. C. C.; Torres, R.; Fuentes, M.; Mateo, C.; Munilla, R.; Vian, A.; Carrascosa, A. V.; García, J. L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1055*, 93.
59. Cass, B.; Pham, P. L.; Kamen, A.; Durocher, Y.; *Protein Expression Purif.* **2005**, *40*, 77.
60. Liu, D. Z.; Lu, Y. L.; Cheng, H. C.; Hou, W. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10219.
61. Murphy, J. C.; Jewell, D. L.; White, K. I.; Fox, G. E.; Willson, R. C.; *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 982.
62. Tan, L. H.; Kim, D. S.; Yoo, I. K.; Choe, W. S.; *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62*, 5809.
63. Nastasijevic, B.; Becker, N. A.; Wurster, S. E.; Maher III, L. J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 420.
64. Zhang, C. M.; Reslewic, S. A.; Glatz, C. E.; *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 52.
65. Dainiak, M. B.; Plieva, F. M.; Galaev, I. Y.; Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B.; *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 644.
66. Hale, J. E.; Beidler, D. E.; *Anal. Biochem.* **1994**, *222*, 29.
67. Boden, V.; Winzerling, J. J.; Vijayalakshmi, M.; Porath, J.; *J. Immunol. Methods* **1995**, *181*, 225.
68. Yoshida, S.; Ioka, D.; Matsuoka, H.; Endo, H.; Ishii, A.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *113*, 89.
69. Vançan, S.; Miranda, E. A.; Bueno, S. M. A.; *Process Biochem.* **2002**, *37*, 573.
70. Tishchenko, G.; Dybal, J.; Meszarosova, K.; Sedlakova, Z.; Bleha, M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *954*, 115.
71. Todorova-Balvay, D.; Pitiot, O.; Bourhim, M.; Srikrishnan, T.; Vijayalakshmi, M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *808*, 57.
72. Chadha, K. C.; Grob, P. M.; Mikulski, A. J.; Davis, L. R. J.; Sulkowski, E.; *J. Gen. Virol.* **1979**, *43*, 701.
73. Wu, H.; Bruley, D. F.; *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 928.
74. Thiessen, E. E.; Bruley, D. F.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **2003**, *540*, 183.
75. Chang, Y. K.; Horng, J.; Huang, R. Z.; Lin, S. Y.; *Biochem. Eng. J.* **2006**, *29*, 12.
76. Liesiene, J.; Racaityte, K.; Morkeviciene, M.; Valancius, P.; Bumelis, V.; *J. Chromatogr., A* **1997**, *764*, 27.
77. Zachariou, M.; Hearn, M. T. W.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *890*, 95.
78. Hidalgo, A.; Betancor, L.; Mateo, C.; Lopez-Gallego, F.; Moreno, R.; Berenguer, J.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1578.
79. Farinas, C. S.; Bueno, S. M. A.; Miranda, E. A.; *Adsorpt. Sci. Technol.* **2003**, *21*, 883.
80. Senel, S.; Elmas, B.; Camli, T.; Andac, M.; Denizli, A.; *Sep. Sci. Technol.* **2004**, *39*, 3783.
81. Azzoni, A. R.; Kusnadi, A. R.; Miranda, E. A.; Nikolov, Z. L.; *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 268.
82. Genaro, A. C. B.; Tamagawa, R. E.; Azzoni, A. R.; Bueno, S. M. A.; Miranda, E. A.; *Process Biochem.* **2002**, *37*, 1413.
83. Nakagawa, T.; Nishiuchi, K.; Akaki, J.; Iwata, H.; Satou, R.; Suzuki, F.; Nakamura, Y.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 256.
84. Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Pessela, B. C. C.; Vian, A.; Carrascosa, A. V.; Garcia, J. L.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *915*, 97.
85. Levin, G.; Mendive, F.; Targovnik, H. M.; Cascone, O.; Miranda, M. V.; *J. Biotechnol.* **2005**, *118*, 363.
86. Tikhonov, R. V.; Pechenov, S. E.; Belacheu, I. A.; Yakimov, S. A.; Klyushnichenko, V. E.; Boldireva, E. F.; Korobko, V. G.; Tunes, H.; Thiemann, J. E.; Vilela, L.; Wulfson, A. N.; *Protein Express. Purif.* **2001**, *21*, 176.
87. Schmidt, S. R.; Schweikart, F.; Andersson, M. E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *849*, 154.
88. Seeley, E. H.; Riggs, L. D.; Regnier, F. E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *817*, 81.
89. Ahn, Y. H.; Park, E. J.; Cho, K.; Kim, J. Y.; Hal, S. H.; Ryu, S. H.; Yoo, J. S.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2495.
90. Imanishi, S. Y.; Kochin, V.; Eriksson, J. E.; *Proteomics* **2007**, *7*, 174.
91. Wilson-Grady, J. T.; Villén, J.; Gygi, S. P.; *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1088.
92. Min, C. H.; Verdine, G. L.; *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3806.
93. Cano, T.; Murphy, J. C.; Fox, G. E.; Willson, R. C.; *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1472.
94. Potty, A. S. R.; Fu, J. Y.; Balan, S.; Haymore, B. L.; Hill, D. J.; Fox, G. E.; Willson, R. C.; *J. Chromatogr., A* **2006**, *1115*, 88.
95. Tan, L. H.; Lai, W. B.; Lee, C. T.; Kim, D. S.; Choe, W. S.; *J. Chromatogr., A* **2007**, *1141*, 226.
96. Laboureau, E.; Capiod, J. C.; Dessaint, C.; Prin, L.; Vijayalakshmi, M. A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1996**, *680*, 189.
97. Silva, M. E.; Franco, T. T.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2000**, *743*, 287.
98. Kumar, A.; Wahlund, P. O.; Kepka, C.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B.; *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *84*, 494.
99. Baek, W. O.; Vijayalakshmi, M. A.; *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1336*, 394.
100. Anissimova, M. V.; Baek, W. O.; Varlamov, V. P.; Mrabet, N. T.; Vijayalakshmi, M. A.; *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 287.
101. Vijayalakshmi, M. A.; *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 71.