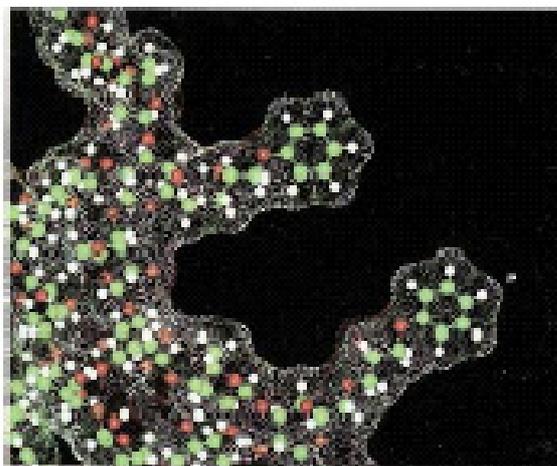




UNIVERSIDADE  
DA  
BEIRA INTERIOR

Estudo da adsorção de péptidos a  
suportes de interacção hidrofóbica sob  
condições cromatográficas de não  
sobrecarga



Catherine Augusta Nunes

**Covilhã, Setembro de 2008**

**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Estudo da adsorção de péptidos a  
suportes de interacção hidrofóbica sob  
condições cromatográficas de não  
sobrecarga

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior  
para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica sob a  
orientação da Professora Dra. Ana Cristina Mendes Dias  
Cabral

Catherine Augusta Nunes

Covilhã, Setembro de 2008

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Cristina Mendes Dias Cabral, do CICS e Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pelo apoio científico, disponibilidade e incentivo na execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Queiroz, uma vez que sem o seu apoio e conhecimento científico este trabalho não era possível de ser executado.

À Dr.<sup>a</sup> Fani e ao Prof. Dr. Luís pela disponibilidade, ajuda, boa disposição e amizade durante a realização deste trabalho experimental.

A todos os meus colegas de laboratório e principalmente às minhas amigas Ângela, Filomena, Sandra e também a Susana, Ana, Sara, Joana e Cristina e aos meus amigos Bruno, César e Tiago que me apoiaram, incentivaram e me ajudaram durante a execução deste trabalho experimental. Agradeço por toda a amizade durante estes anos, e pelos momentos bons e difíceis no laboratório.

Aos meus pais, irmãos, família e namorado que nunca deixaram de acreditar em mim, e pelo amor que me transmitiram durante estes anos.

Por último agradeço à Universidade da Beira Interior e ao CICS (Centro de Investigação em Ciências da Saúde).

## Resumo

Para explicar o mecanismo de adsorção subjacente à HIC da Angiotensina I foi efectuada a técnica sob condições lineares. As medidas experimentais foram realizadas em função do tipo de sal e sua concentração, da temperatura e do tipo de ligando no adsorvente para a Angiotensina I e seus derivados.

Sob condições isocráticas e a elevadas concentrações de sal, uma característica da performance da Angiotensina I foi o “broadening” do pico e em muitos dos casos o aparecimento de dois picos. Estes resultados foram interpretados em termos da isomerização cis-trans da Angiotensina I (polipéptido com um resíduo de prolina) na coluna seguida de uma “re-conformação” após interacção com o suporte. Foi proposto que o fenómeno de pico “splitting”, o efeito combinado entre a temperatura, concentração de sal na fase móvel e o ligando na fase estacionária é causado por cinética de isomerização lenta que se encontram na mesma escala de tempo que a separação cromatográfica. A concentração de sal e a temperatura promovem a conversão da forma trans da Angiotensina I na forma cis, que tem uma maior área superficial hidrofóbica, em presença do suporte. A retenção da forma trans da Angiotensina I aumenta de uma força geral com o aumento da concentração de sal na fase móvel e é afectada ligeiramente pelo efeito da temperatura.

Para além do suporte Butyl-Sepharose referido acima também foram examinados mais dois suportes hidrofóbicos (Phenyl-Sepharose e Octyl-Sepharose). O estudo do comportamento da Angiotensina I com os vários suportes indicou um aumento de retenção com o aumento do comprimento da cadeia n-alquila do ligando, observando-se que o ligando aromático phenyl promove a alteração de conformação (isomerização cis-trans) da Angiotensina I a concentrações salinas mais baixas que nos outros suportes. Os suportes foram considerados como catalisadores do processo de isomerização cis-trans.

Outro factor também estudado foi a substituição de aminoácidos em posições distintas da Angiotensina I para utilização em HIC usando a Butyl-Sepharose e tendo em conta o efeito da concentração de sulfato de amónio. Estes resultados demonstraram que tanto os aminoácidos da posição 5 como da posição 10 da Angiotensina I se encontram envolvidos na interacção hidrofóbica.

Com base neste trabalho consideramos que a Angiotensina I pode ser um péptido modelo para estudos posteriores em HIC.

## Abstract

In order to explain the mechanism underlying the HIC adsorption of Angiotensin I the technique was run under linear conditions. The experimental measures were done as function of salt type, its concentration, temperature and type of adsorbent ligand using as probe peptide Angiotensin I and its derivatives.

Under isocratic elution conditions and at the higher salt concentrations, a characteristic of the chromatographic performance of Angiotensin I was the broadness of the corresponding peak and in most of the cases the appearance of two peaks. These results have been interpreted in terms of on-column *cis-trans* isomerization of Angiotensin I (a proline containing polypeptide) followed by its “re-conformation” after the interaction with the support. It has been proposed that the peak splitting phenomenon, a combined effect between temperature, salt concentration in the mobile phase and the ligand, is caused by slow kinetics of isomerization that is on the same time scale as the chromatographic separation. Salt concentration and temperature promotes the conversion of the *trans* form of Angiotensin I into its *cis* form, which has a bigger hydrophobic surface area, in presence of Butyl- Sepharose. The retention of the *cis* form of Angiotensin I increase with the increase of salt concentration in the mobile phase and seem not to be affected by temperature. It was further proved that Angiotensin I is only retarded on the column and not retained.

Besides the Butyl-Sepharose support above mentioned two more hydrophobic supports (Phenyl-Sepharose and Octyl-Sepharose) were also examined. The study of the behaviour of Angiotensin I with the various supports indicated an increase of retention with the increase of the n-alkyl chain length. It was observed the phenyl aromatic ligand promotes Angiotensin I conformation alteration at lower salt concentration than the other supports. The supports were considered as catalyst for the isomerization process.

Another factor, also studied was the amino acids replacement in different positions of Angiotensin I. These results of the adsorption of these peptides in a Butyl-Sepharose column as function of ammonium sulphate concentrations demonstrated that both, the amino acids in position 5 and 10 of Angiotensin I, are involved in the hydrophobic interaction.

Based on this work it can be considered that the Angiotensin I is a good peptide model for further studies in HIC.

## **Palavras-Chave / Keywords**

Cromatografia de interacção hidrofóbica / Hydrophobic Interaction Chromatography

Condições cromatográficas lineares/ Linear chromatographic conditions

Alteração de conformação/ Conformational changes

Phenil-Sepharose / Phenyl-Sepharose

Butil-Sepharose/ Butyl-Sepharose

Octil-Sepharose/ Octyl-Sepharose

Adsorção / Adsorption

Angiotensina I Humana / Human Angiotensin I

## Nomenclatura

- ADH – Hormona anti-diurética
- $A_S$  – Área à superfície da fase estacionária
- CD – Dicroísmo circular
- $C_M$  – Concentração de um componente na fase móvel
- $C_S$  – Concentração de um componente na fase estacionária
- $d_c$  – Diâmetro da coluna
- $d_p$  – Diâmetro da partícula
- $D_f$  – Espessura da fase estacionária
- $D_M$  – Coeficiente de difusão das moléculas de soluto na fase móvel
- $D_S$  – Taxa de difusão do soluto na fase estacionária
- DSC – Calorimetria diferencial de varrimento
- FT-IR – Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier
- $h$  – Altura do pico
- H – Cavidade hidrofóbica na superfície da molécula de soluto
- HIC – Cromatografia de interacção hidrofóbica
- His – Histidina
- HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão
- Ile – Isoleucina
- $k$  – Constante de Boltzman
- $k'$  – Factor de capacidade ou de retenção
- K – Kelvin
- $K_A$  – Coeficiente de adsorção
- $K_C$  – coeficiente de distribuição
- L – Ligando da matriz polimérica ou comprimento da coluna
- Leu – Leucina
- $n_M$  – Número de moles de um componente na fase móvel
- $n_S$  – Número de moles de um componente na fase estacionária
- N – Número de pratos teóricos
- NMR – Ressonância magnética nuclear
- Phe – Fenilalanina
- Pro – Prolina
- R – Constante dos gases ideais ou factor de retardamento

RPC – Cromatografia líquida de fase reversa

$R_s$  – Resolução

S – Molécula de soluto

$t_0$  – Tempo de eluição do traço “inerte” ,  $t_s$  – Tempo de retenção de componentes não retidos na coluna ou na fase estacionária

$t_M$  – Tempo de retenção de componentes não retidos na coluna ou na fase móvel

$t_r$  – Tempo de retenção

$t'_R$  – Tempo de retenção ajustado

T – Temperatura

Thr – Treonina

Tyr – Tirosina

$\bar{u}$  – Taxa de fluxo linear da fase móvel.

$V'_R$  – Volume de retenção exacto

Val – Valina

$V_M$  – Volume de retenção da biomolécula não retida na coluna ou volume da fase móvel

$V_R$  – Volume de retenção

$V_S$  – Volume de um componente na fase estacionária

$w$  – Largura do pico

$w_h$  – Meia altura do pico

W – Molécula de água

Z – Número de moléculas de água libertadas por biomolécula adsorvida

### **Símbolos gregos**

$\alpha$  – Retenção relativa

$\Delta G$  – Variação da energia de Gibbs

$\Delta G^\circ$  – Variação da energia de Gibbs padrão

$\Delta H$  – Variação de entalpia

$\Delta S$  – Variação de entropia

$\lambda$  – Constante de empacotamento

$\sigma$  – Desvio padrão do pico Gaussiano

$\sigma^2$  – Variância do pico Gaussiano

$\phi$  – Razão de fases na coluna

$\Psi$  – Factor de obstrução

## Índice

Agradecimentos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ii
Resumo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	iii
Abstract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v
Palavras-Chave/Keywords	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	vi
Nomenclatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	vii
Índice	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ix
Índice de figuras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	xi
Índice de tabelas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	xvi
1. Introdução	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
1.1. Princípios sobre a cromatografia de interacção hidrofóbica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
1.1.1. Hidrofobicidade das biomoléculas e interacções hidrofóbicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
1.1.2. Exemplos de alguns factores que afectam o comportamento cromatográfico das biomoléculas em cromatografia de interacção hidrofóbica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
i) Efeito do tipo e concentração de sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
ii) Efeito da temperatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
iii) Efeito do ligando	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
1.2. Princípios teóricos de cromatografia líquida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
1.2.1. O problema geral de eluição	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
1.2.2. Retenção cromatográfica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
1.2.3. A forma do pico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
i) Difusão turbulenta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
ii) Difusão longitudinal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
iii) Transferência de massa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
iv) Dispersão extra-coluna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
1.2.4. Resolução	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
1.3. O papel da estrutura das biomoléculas no comportamento cromatográfico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
1.3.1. Resíduos que controlam a retenção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
1.3.2. Região de contacto cromatográfica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
1.3.3. Comportamento cromatográfico e alterações de conformação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24

1.3.4. Exemplos de algumas técnicas usadas para caracterizar a estrutura das proteínas em cromatografia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
1.4. Métodos para medição da hidrofobicidade dos aminoácidos e a sua interacção										29
1.4.1. Tipos de escalas de hidrofobicidade dos aminoácidos										29
1.4.2. Métodos para o estudo das interacções										34
1.5. Aspectos gerais dos péptidos utilizados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35
1.5.1. Angiotensina I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36
1.5.2. Péptidos derivados da Angiotensina I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
1.6. Aspectos gerais dos suportes utilizados em HIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39
2. Objectivos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41
3. Procedimento Experimental	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42
3.1. Reagentes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42
3.1.1. Fase estacionária	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42
3.1.2. Péptidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43
3.1.3. Outros reagentes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45
3.2. Instrumentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46
3.2.1. Equipamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46
3.2.2. Eluição isocrática	-	-	-	-	-	-	-	-	-	47
4. Resultados e Discussão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
4.1. Adsorção da Angiotensina I em Butyl-Sepharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
4.1.1. Interpretação das curvas cromatográficas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48
4.1.2. Efeito do tipo e concentração de sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
4.1.3. Efeito da temperatura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62
4.2. Efeito do tipo de ligando na adsorção da Angiotensina I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66
4.3. Adsorção de péptidos derivados da Angiotensina I em Butyl-Sepharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	74
5. Conclusões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	79
6. Perspectivas futuras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	81
7. Bibliografia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	82
Anexos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94

## Índice de figuras

- Figura 1.1: Representação esquemática do processo de HIC. L – Ligando da matriz polimérica, H – Cavidade hidrofóbica na superfície da molécula de soluto, S – Molécula de soluto, W – molécula de água. ----- 4
- Figura 1.2: Série de Hofmeister e efeitos de alguns aniões e catiões na precipitação das proteínas. ----- 5
- Figura 1.3: Representação esquemática do processo de adsorção e desorção em HIC.  Ligando hidrofóbico,  Molécula de proteína. ----- 7
- Figura 1.4: Representação esquemática do problema geral de eluição em cromatografia líquida.  $k$  - factor de retenção.-----10
- Figura 1.5: Figura representativa da separação de uma mistura de componentes evidenciando diferentes parâmetros de retenção.  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  - tempo de retenção da mistura de dois componentes,  $t_M$  - tempo de retenção de um composto não retido,  $h$  - altura do pico e  $w_h$  – meia altura do pico. -----12
- Figura 1.6: Figura representativa da forma da isotérmica de adsorção e os efeitos na forma do pico e tempos de retenção ( $t_R$ ). (A) Linear; (B) Langmuir; (C) Anti-Langmuir; (D) Gaussian; (E) tailing; (F) Frente. -----16
- Figura 1.7: Representação de Van Deemter para cromatografia líquida. Variação dos termos  $A$ ,  $B$ ,  $C_S$  e  $C_M$  com a taxa de fluxo.-----17
- Figura 1.8: Estrutura da Angiotensina I. Os potenciais electrostáticos à superfície molecular estão codificados por cores: potenciais menores que  $-10$  kT estão ilustrados a vermelho, potenciais superiores a  $10$  kT estão a azul e potenciais neutros ( $0$  kT ) estão a branco ( $k$  é a constante de Boltzmann,  $1,380622 \times 10^{-23}$  J/K e  $T$  é a temperatura absoluta).-----37

Figura 1.9: Estrutura da Phenyl-Sepharose High Performance, Butyl-Sepharose 4 Fast Flow, e Octyl-Sepharose CL-4B respectivamente. -----	40
Figura 3.1: Figura representativa do sistema cromatográfico AKTA PURIFIER. -----	46
Figura 4.1: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.-----	48
Figura 4.2: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.-----	49
Figura 4.3.A: Cromatografia de interacção hidrofóbica (0,5ml/min) da Angiotensina I (0,075 mg/ml) numa coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 1,2 M de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	49
Figura 4.3.B: Reinjecção (0,5 ml/min) das fracções colectadas da adsorção de Angiotensina I (0,075 mg/ml) numa coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 1,2 M de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 — Reinjecção do pico I; — Reinjecção do pico II. o fosfato, pH 7.. -----	50
Figura 4.4: Perfil da eluição (1ml/min) de diferentes concentrações de Angiotensina I numa coluna Butyl-Sepharose a 298.15 K com 1,2 M de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	52
Figura 4.5: Efeito da taxa de fluxo na forma dos picos resultantes da adsorção da Angiotensina I a uma coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K em presença de 1,2 M de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	53
Figura 4.6.A: Cromatografia da interacção hidrofóbica (1 ml/min) da [Valina 7] – Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a 298 K em presença de 1,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	55

Figura 4.6.B: Regeneração da coluna (1 ml/min) após eluição da [Valina 7] – Angiotensina I (0,025 mg/ml) de uma coluna de Butyl-Sepharose a 298 K com 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	56
Figura 4.7: Cromatografia de interação hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) em 10mM de tampão fosfato, pH 7. -----	57
Figura 4.8: Deconvolução do cromatograma de interação hidrofóbica da Angiotensina I numa coluna Butyl-Sepharose, 298.15 K a 1,2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de fosfato, pH 7. — Cromatograma real; — Picos individuais depois da deconvolução; — Cromatograma soma de picos após deconvolução. -----	58
Figura 4.9: Regeneração da coluna (1ml/min) após eluição da Angiotensina I (0,025 mg/ml) de uma coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K e diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 7. -----	61
Figura 4.10: Regeneração da coluna (1ml/min) após equilíbrio da coluna de Butyl-Sepharose a 298. 15 K com diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 7. -----	62
Figura 4.11: Cromatografia de interação hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	63
Figura 4.12: Cromatografia de interação hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	64
Figura 4.13: Cromatografia de interação hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Phenyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----	67

Figura 4.14: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----67

Figura 4.15: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Phenyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 0,9 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----68

Figura 4.16: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Octyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----68

Figura 4.17: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna de Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7. -----72

Figura 4.18: Efeito da substituição da leucina 10 pela isoleucina, alanina e valina e substituição da isoleucina 5 pela valina na Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose usando como modelador 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----75

Figura 4.19: Efeito da substituição da leucina 10 pela isoleucina, alanina e valina e substituição da isoleucina 5 pela valina na Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose usando como modelador 1,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----76

Figura A1: Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna de Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 0,7 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----94

Figura A2: Cromatografia de interação hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna de Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 0,9 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K. ----- 94

## Índice de tabelas

Tabela 3.1: Características da Phenyl-Sepharose High Performance. -----	42
Tabela 3.2: Características da Butyl-Sepharose 4 Fast Flow. -----	42
Tabela 3.3: Características da Octyl-Sepharose CL-4B. -----	43
Tabela 3.4: Características dos péptidos usados. -----	44
Tabela 3.5: Apresentação dos valores de hidrofobicidade a pH 6.8 dos vários péptidos estudados. -----	44
Tabela 3.6: Reagentes utilizados na técnica de cromatografia de interação hidrofóbica. ---	45
Tabela 4.1: Valores de $k'$ obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ preparadas em tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----	59
Tabela 4.2: Valores de $k'$ obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ preparadas em tampão fosfato, pH 7, a 298 K. -----	59
Tabela 4.3: Valores de $k'$ obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,2 M de $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em tampão fosfato, pH 7. -----	64
Tabela 4.4: Valores de $k'$ obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M de $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em tampão fosfato, pH 7. -----	65

Tabela 4.5: Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M de  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7. -----65

Tabela 4.6: Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Phenyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----69

Tabela 4.7: Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Octyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----70

Tabela 4.8: Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Phenyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 0,9 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7. -----71

Tabela 4.9: Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Octyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1.4 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7. -----71

Tabela 4.10: Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Phenyl, Butyl e Octyl-Sepharose a diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----73

Tabela 4.11: Valores de  $k'$  da retenção dos péptidos derivados da Angiotensina I, numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador 1,2 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----77

Tabela 4.12: Valores de  $k'$  da retenção dos péptidos derivados da Angiotensina I, numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador 1,5 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7 a 298 K. -----78

## **1. Introdução**

O desenvolvimento de técnicas e métodos de separação e purificação de biomoléculas tem sido considerado bastante essencial para os avanços recentes da investigação em biotecnologia.

O objectivo principal do processo de purificação de biomoléculas não inclui somente a remoção de contaminantes indesejados mas também a concentração da biomolécula desejada, na sua forma final para a aplicação pretendida, e a sua transferência para um ambiente onde é estável.

A pureza das biomoléculas é um pré-requisito para os estudos acerca da sua estrutura e função ou da sua aplicação. O grau de pureza requerido depende do seu uso final.

Existem variadas técnicas de purificação de biomoléculas, contudo diferentes tipos de cromatografia têm-se tornado dominantes devido ao seu poder de resolução (Queiroz *et al.*, 2001). A popularidade das técnicas cromatográficas pode ser atribuída à sua versatilidade. Várias fases estacionárias podem ser obtidas comercialmente. Cada fase estacionária tem a habilidade de separar analitos explorando a afinidade que cada analito tem para com os diferentes ligandos imobilizados à superfície da fase estacionária. Por outro lado, a composição da fase móvel e/ou pH são variáveis chave que também podem ser exploradas de modo a obter a purificação do produto pretendido (Thrash e Pinto, 2000)

Diferentes mecanismos de adsorção estão na base da separação de solutos por uma variedade de processos de interacção cromatográfica. Na cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iónica, cromatografia de afinidade e cromatografia de interacção hidrofóbica, a separação das biomoléculas é feita com base nas suas propriedades biológicas e físico-químicas como é o caso respectivamente do tamanho molecular, das suas cargas, das suas características bioespecíficas e da sua hidrofobicidade (Kennedy, 1990; Garcia e Pires, 1993).

Durante os últimos anos, a cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC) tem sido desenvolvida por muitos investigadores e hoje em dia encontra-se estabelecida como uma poderosa técnica de bioseparação, tanto à escala laboratorial como à escala industrial, para a purificação de biomoléculas (Wu e Karger, 1996; Sofer e Hagel, 1997;

Grund, 1998). Este método é bastante eficaz na remoção de vírus de plasma humano, no isolamento de enzimas bacterianas, na purificação de proteínas e de anticorpos monoclonais (Einarsson *et al.*, 1981; Gagnon *et al.*, 1995; Pfeiffer, 1995; Diogo *et al.*, 2000; Thrash e Pinto, 2000; Queiroz *et al.*, 2001) e plasmídeos para aplicações terapêuticas (Diogo *et al.*, 2000).

### **1.1. Princípios sobre a cromatografia de interacção hidrofóbica**

A HIC promove a separação de biomoléculas com base na interacção hidrofóbica entre ligandos hidrofóbicos immobilizados no suporte e regiões apolares existentes à superfície das biomoléculas (Queiroz *et al.*, 2001).

Os diferentes tipos de condições para que a eluição ocorra podem ser usados para a purificação de misturas complexas de biomoléculas que poderão ser bastante difíceis de separar aplicando outra técnica cromatográfica (Queiroz *et al.*, 2001). De facto, a HIC tem sido usada com a finalidade de separar as biomoléculas e exhibe características de ligação complementares a outras técnicas cromatográficas (Janson e Rydén, 1993). Van Oss *et al.*, (1986) propuseram que as forças de Van der Waals são o factor que mais contribui para as interacções hidrofóbicas apesar do mecanismo complexo que as envolve. Nesta técnica os danos estruturais das biomoléculas são mínimos e a sua actividade biológica é mantida devido às suas interacções fracas o que não se verifica noutras técnicas tais como a cromatografia de afinidade, troca iónica ou cromatografia de fase reversa (Fausnaugh *et al.*, 1984; Regnier, 1987). A HIC é uma técnica muito popular na medição da hidrofobicidade do soluto uma vez, que explora as propriedades hidrofóbicas das biomoléculas, trabalhando num ambiente mais polar e menos desnaturante do que a cromatografia de fase reversa (RPC), dado que esta requer o uso de solventes apolares para eluir a proteína devido à sua forte ligação ao adsorvente (El Rassi, 1996).

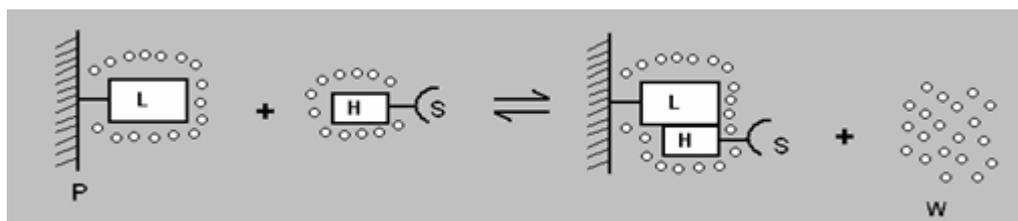
### **1.1.1. Hidrofobicidade das biomoléculas e interações hidrofóbicas**

A hidrofobicidade é a repulsão entre os compostos apolares e o ambiente polar como é o caso da água (Queiroz *et al.*, 2001). Este termo é também usado para referir os modelos moleculares, geralmente envolvendo a ordem das moléculas de água que rodeiam os solutos apolares (Dill, 1990a). Quando um composto apolar é inserido em água, ocorre um aumento da ordem das moléculas de água que se encontram à volta dos seus grupos hidrofóbicos levando a uma diminuição de entropia ( $\Delta S < 0$ ). Se a alteração da entalpia ( $\Delta H$ ) é pequena em relação ao valor de  $T\Delta S$ , resulta numa mudança positiva do valor da energia de Gibbs ( $\Delta G > 0$ ) de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

onde  $\Delta H$  e  $\Delta S$  é a variação de entalpia e entropia, respectivamente, e  $T$  é a temperatura absoluta. Este processo não ocorre de forma espontânea, pois seria termodinamicamente desfavorável (Queiroz *et al.*, 2001).

Quando vários compostos apolares são colocados em água, estes associam-se espontaneamente devido às interações hidrofóbicas levando a um aumento de entropia ( $\Delta S > 0$ ), o qual resulta da diminuição do número de moléculas de água ordenadas em torno dos grupos hidrofóbicos devido à diminuição da exposição destes grupos à água (Queiroz *et al.*, 2001). (figura 1.1). A associação intermolecular de grupos hidrofóbicos minimiza o aumento da energia de Gibbs por diminuição da área de contacto das proteínas com solventes polares (Queiroz *et al.*, 2001).



**Figura 1.1.** Representação esquemática do processo de HIC. L – Ligando da matriz polimérica, H – Cavidade hidrofóbica na superfície da molécula de soluto, S – Molécula de soluto, W – molécula de água. (Representação esquemática adaptado de “Hydrophobic Interaction Chromatography”. Principles and Methods” Amersham Bioscience (Uppsala Sweden)).

### **1.1.2. Exemplos de alguns factores que afectam o comportamento cromatográfico das biomoléculas em cromatografia de interacção hidrofóbica**

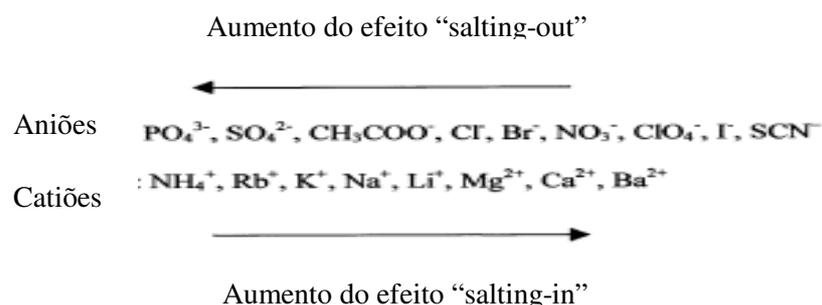
Na HIC, a retenção das proteínas é principalmente afectada pela hidrofobicidade das biomoléculas (Fausnaugh *et al.*, 1984; Lienqueo *et al.*, 2002; Queiroz *et al.*, 2001) e especialmente pela distribuição de hidrofobicidade à sua superfície (Mahn *et al.*, 2005; Mahn *et al.*, 2004). No entanto, as condições de funcionalidade obviamente também afectam o comportamento cromatográfico das proteínas na HIC (Jennissen, 2005; Ladiwala *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2001) numa grande extensão. As propriedades da fase móvel (tipo de sal, força iónica, pH), as características da fase estacionária (natureza química do suporte, tipo de ligando hidrofóbico, comprimento da cadeia e grau de substituição do ligando) e a temperatura são factores que afectam geralmente o comportamento cromatográfico das biomoléculas em HIC.

Neste ponto vamo-nos debruçar apenas sobre alguns factores, nomeadamente o efeito do tipo e concentração de sal, o efeito da temperatura e o efeito do ligando.

### i) Efeito do tipo e concentração de sal

Tiselius (1948) foi o primeiro investigador a aplicar o termo “ cromatografia por salting-out”. Este autor demonstrou que os aminoácidos e as proteínas ligam-se a suportes sólidos neutros com concentrações elevadas de fosfatos alcalinos. A denominação de HIC foi introduzida por Hjertén (1973) para descrever a separação de biomoléculas tendo em conta o efeito do sal numa matriz hidrofóbica. Porath *et al.*, (1973) provou que a adsorção hidrofóbica é reforçada pela adição de cloreto de sódio ou fosfato de sódio numa solução tampão.

O efeito do tipo de sal na retenção das proteínas tem sido fortemente investigado, e foi demonstrado que segue a série de Hofmeister (figura 1.2) para a precipitação das proteínas em soluções aquosas (Jennissen 2005; Melander e Horvath, 1977; Jennissen, 1986).



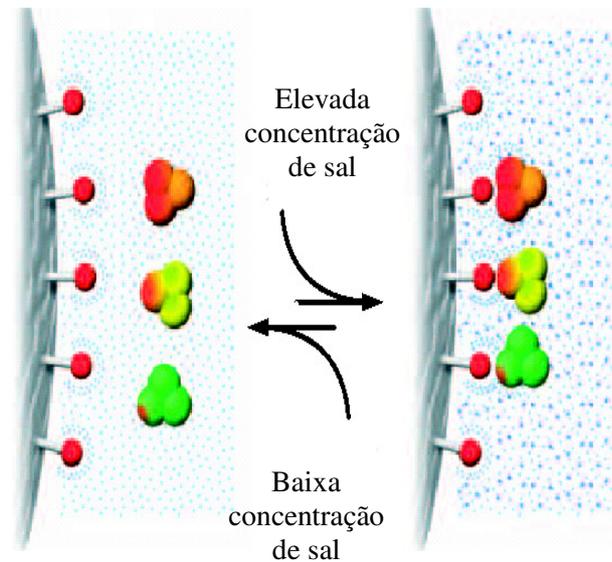
**Figura 1.2.** Série de Hofmeister e efeitos de alguns aniões e catiões na precipitação das proteínas (Pombeiro, 1998).

Na série de Hofmeister (figura 1.2), os sais caotrópicos (cloreto de magnésio e sulfato de magnésio) promovem a solubilidade das biomoléculas e assim tendem a diminuir a força da interação hidrofóbica e conseqüentemente a ligação das biomoléculas à fase estacionária (Porath, 1986). Os sais caotrópicos podem alterar a estabilidade das biomoléculas quer pela sua ligação directa ou pela modificação das propriedades do solvente. No último caso, a presença das moléculas caotrópicas cria uma perturbação na rede das ligações de hidrogénio entre as moléculas de água que

pode resultar no enfraquecimento do efeito hidrofóbico. Por outro lado a ligação destes sais às biomoléculas pode resultar num enfraquecimento das interações hidrofóbicas entre os aminoácidos apolares que estabilizam o estado nativo das biomoléculas (Salvi *et al.*, 2005). Salvi *et al.*, (2005) observaram que a redução do número de estados ordenados no seio da solução devido à presença dos sais caotrópicos cria uma interação efectiva entre as moléculas destes sais e as proteínas. Como resultado deste facto, as moléculas caotrópicas acumulam-se próximo da superfície das proteínas. Este efeito deve-se à existência de uma vantagem em termos da energia de Gibbs quando as moléculas caotrópicas se encontram junto à superfície das proteínas porque a redução dos estados ordenados à superfície é menor que no seio da solução. Em contraste, os sais cosmotrópicos (sulfato de sódio, potássio ou amónio) promovem interações hidrofóbicas e precipitação das proteínas, devido a elevado “salting-out” ou efeitos de incremento da tensão superficial molal (Porath, 1986). A presença de sal aumenta a energia livre das biomoléculas e este aumento de energia livre é proporcional à área superficial hidrofóbica das biomoléculas. A associação intermolecular dos grupos hidrofóbicos minimiza o aumento da energia livre pela diminuição da área de contacto das biomoléculas com o meio polar (Queiroz *et al.*, 2001). Por esta razão, quando a fase estacionária hidrofóbica é introduzida no sistema, as biomoléculas ligam-se a esta de forma a minimizar a sua área de contacto e a do adsorvente com a solução salina de modo a produzir um aumento mínimo em energia livre. Por conseguinte, num meio com elevada concentração de sal a forma ligada das biomoléculas é termodinamicamente mais estável do que a sua forma não ligada. Este facto explica a ligação das biomoléculas à fase estacionária hidrofóbica quando existe uma elevada concentração de sal. A adsorção aumenta com elevada concentração de sal na fase móvel e a eluição é obtida pela diminuição da concentração de sal no eluente (figura 1.3) (Melander e Horváth, 1977; Fausnaugh e Regnier, 1986; Roe, 1989).

A selecção adequada do tipo de sal no eluente resulta em alterações significativas não só na retenção da proteína total, mas também na selectividade da separação (Rippel e Szepesy, 1994). Diferentes autores (Perkins *et al.*, 1997; Roettger *et al.*, 1989) demonstraram que existe alteração de selectividade quando se aplica diferentes tipos de sal na fase móvel. Para sais neutros e cosmotrópicos, como é o caso do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaCl}$ , a retenção da proteína aumenta com o aumento da concentração do sal, mas para sais caotrópicos, como o  $\text{NaSCN}$ , diminui a retenção da proteína em estudo com o aumento da concentração do sal (Xia *et al.*, 2004; Roettger *et al.*, 1989;

Perkins *et al.*, 1997).O efeito dos sais na retenção das proteínas foi explicado pelo número de moléculas de água libertadas induzido por diferentes tipos de sal. Assim, a selectividade de certos tipos de sal em HIC, pode ser interpretada como a capacidade para excluir as moléculas de água da superfície das proteínas e da superfície do ligando.



**Figura 1.3.** Representação esquemática do processo de adsorção e desorção em HIC.  Ligando hidrofóbico,  Molécula de proteína (Amersham Biosciences, 2002).

A teoria solvofóbica e o modelo de interação preferencial têm sido aplicados de forma a interpretar o efeito do sal na ligação das biomoléculas em sistemas de HIC. A teoria solvofóbica baseia-se na associação e solvatação das espécies e esta teoria assume que o incremento da tensão superficial molal do sal determina a retenção (Melander e Horvath, 1977; Melander *et al.*, 1984). De acordo com a teoria solvofóbica uma cavidade é formada e depois encerrada em ambas as fases, estacionária e móvel. Esta teoria nem sempre é válida se o sal interagir fortemente com as biomoléculas, Fausnaugh e Regnier (1986) estudaram a adsorção de várias proteínas na presença de diferentes tipos de sal e observaram que a teoria solvofóbica poderá não explicar adequadamente as diferenças na retenção das biomoléculas em presença de vários tipos de sal em HIC. Outra alternativa à teoria solvofóbica é fornecida pela análise de

interacção preferencial a qual se foca na interacção dos solutos com as proteínas. O efeito do sal na adsorção de proteínas em HIC foi investigado por análise de interacção preferencial por Perkins *et al.*, (1997). Estes autores com base nesta teoria desenvolveram uma correlação entre o factor de capacidade do soluto e a concentração do sal em HIC.

## ii) Efeito da temperatura

De uma forma geral, a temperatura também afecta a HIC. Mas este efeito tem recebido menos atenção do que o efeito do sal.

Hjertén *et al.*, (1974) estabeleceram, (sob condições de não sobrecarga, quando a superfície cromatográfica, as propriedades da fase móvel, a solubilidade da proteína em solução aquosa e o estado conformacional da biomolécula não varia com a temperatura) uma correlação entre a temperatura e a retenção das biomoléculas, o aumento da temperatura leva ao aumento da retenção das biomoléculas e a diminuição da temperatura geralmente provoca a sua diminuição promovendo assim a sua eluição. Este comportamento é explicado pelo facto de a retenção das biomoléculas em HIC ser um processo conduzido entropicamente (Energia de Gibbs ( $\Delta G$ ) dada por  $\ln k' = \ln \phi - (\Delta G^\circ/RT)$ ). Contudo, a temperatura também pode afectar o estado conformacional das biomoléculas e a sua solubilidade. Este fenómeno explica a relação inversa entre a retenção da biomolécula e a temperatura, observada em alguns casos.

Vailaya e Horvath (1996) estabeleceram a existência de relações exotermodinâmicas (compensação entalpia-entropia) em processos de HIC. Valores de entalpia positivos e alterações de entropia podem ser observados a baixas temperaturas.

Haidacher *et al.*, (1996) investigaram o efeito da temperatura na retenção de alguns derivados de aminoácidos em HIC, num intervalo de temperatura de 5 a 50°C. Estes investigadores aplicaram a equação de Van't Hoff para os diferentes sistemas cromatográficos e demonstraram um máximo no intervalo de temperatura usado. Este comportamento foi atribuído à variação de capacidade calorífica negativa associada com a retenção das biomoléculas. A variação da capacidade calorífica aumentou com a temperatura enquanto que a variação de entalpia e entropia foi positiva a baixas temperaturas, mas negativa a elevadas temperaturas. Por outras palavras, os autores

demonstraram que a retenção é um processo conduzido entropicamente a baixas temperaturas e um processo conduzido entalpicamente a elevadas temperaturas.

### iii) Efeito do ligando

Os vários tipos de fases estacionárias podem diferir no tipo de ligando, no comprimento da cadeia do ligando e na densidade do ligando.

Ligandos com carácter hidrofóbico intermédio, são mais eficientes que ligandos que promovem fortes interações hidrofóbicas, uma vez que exercem forças moderadas e a eluição de biomoléculas é conseguida por uma simples diminuição da concentração de sal, evitando-se assim o uso de solventes orgânicos, agentes caotrópicos ou detergentes (Queiroz *et al.*, 2001).

Os ligandos mais usados em HIC são os alcanos de cadeia linear (como o butil, octil) e alguns grupos aromáticos (como o phenyl). A phenyl e outros grupos aromáticos são aplicados como ligandos com óptimos resultados devido à mistura de interações tanto hidrofóbicas como aromáticas (II-II).

A um grau de substituição constante na matriz os ligandos n-alcanos constituem uma série homóloga na escala de hidrofobicidade (Tanford, 1972):

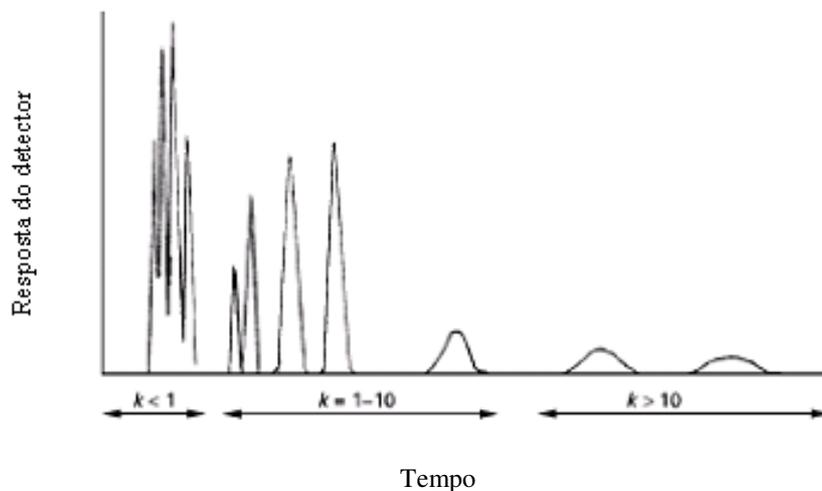
metyl<ethyl<propyl< butyl<l pentyl< hexyl< heptyl <octyl

A hidrofobicidade e a força da interação aumentam com o aumento do comprimento da cadeia n-alquilo mas a selectividade da adsorção pode diminuir. Por outro lado, o aumento no grau de substituição do suporte leva ao aumento na capacidade da ligação à fase estacionária, devido à elevada probabilidade de se formar ligações por multi-ponto, e por vezes, torna-se difícil eluir a proteína sem ocorrer desnaturação (Hjertén *et al.*, 1974). Aplicando o mesmo tipo de ligando e o mesmo tipo de suporte base, a selectividade do gel em HIC pode ser manipulada alterando a densidade de ligandos (Lin *et al.*, 2000). A relação entre a densidade de ligandos e a retenção das biomoléculas depende aparentemente do tamanho desta, no entanto a hidrofobicidade superficial das biomoléculas deverá ser considerado o factor que mais afecta a retenção (Fausnaugh *et al.*, 1984).

## 1.2. Princípios teóricos de cromatografia líquida

### 1.2.1. O problema geral de eluição

Um cromatograma típico da separação de uma mistura de componentes, o qual ilustra as características da cromatografia, e é frequentemente referido como problema de eluição geral pode observar-se na figura 1.4.



**Figura 1.4.** Representação esquemática do problema geral de eluição em cromatografia líquida.  $k$  - factor de retenção (Sewell, 2000).

As propriedades que o cromatograma ilustra e que devem ser explicadas pela teoria de cromatografia são (Sewell, 2000):

- Os componentes da mistura são eluídos da coluna a diferentes tempos de retenção.
- A largura do pico aumenta com o tempo de retenção (forma do pico e “broadening”).
- A separação dos pares de picos não é constante (resolução da coluna).

### **1.2.2. Retenção cromatográfica**

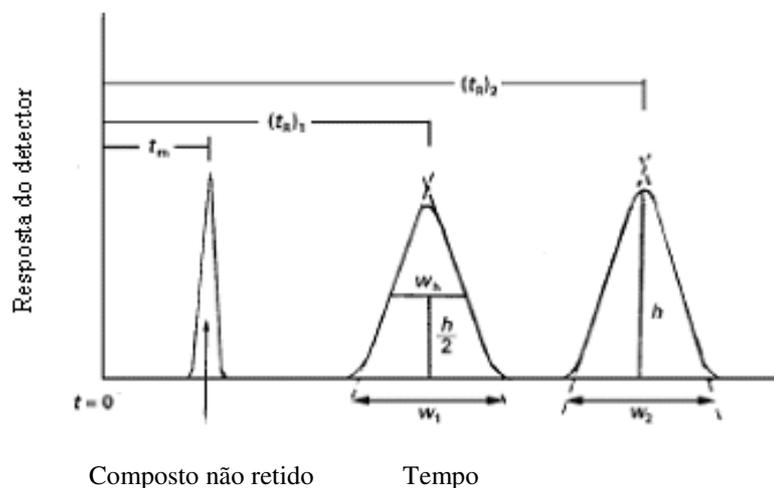
Os parâmetros relativos à retenção são determinados em termos do tempo, volumes da fase móvel ou factores de retenção ( $k$ ) (previamente referidos como factores de capacidade). Se a taxa de fluxo é constante, os volumes são proporcionais ao tempo, isto é, o tempo de retenção ( $t_R$ ) é análogo ao volume de retenção ( $V_R$ ) (Sewell, 2000).

Se a mistura é submetida à técnica de cromatografia, o tempo necessário para o componente ser eluído da coluna, o tempo de retenção (total) ( $t_R$ ) é calculado desde o momento da injeção até ao aparecimento da altura máxima do pico. Todos estes parâmetros incluindo a largura do pico analisado na linha base ( $w$ ) ou a meia altura do pico ( $w_h$ ), e a eluição da biomolécula não retida na coluna, são essenciais em cromatografia e estão ilustrados na (figura 1.5). Esta figura evidencia a separação de dois componentes da mistura eluídos com tempos de retenção ( $t_R$ )<sub>1</sub> e ( $t_R$ )<sub>2</sub>, e o componente não retido na coluna a tempo de retenção, ( $t_M$ ) (Sewell, 2000).

O volume de retenção ( $V_M$ ) da biomolécula não retida na coluna é também denominado de volume da fase móvel e iguala o volume (ambos inter e intra-partículas) à disposição da fase móvel na coluna (Sewell, 2000).

O tempo/volume de retenção ajustado ( $t'_R / V'_R$ ) é o tempo/volume de eluição total menos o tempo/volume de retenção da fase móvel:

$$t'_R = t_R - t_M; V'_R = V_R - V_M \quad (2)$$



**Figura 1.5.** Figura representativa da separação de uma mistura de componentes evidenciando diferentes parâmetros de retenção.  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  - tempo de retenção da mistura de dois componentes,  $t_M$  - tempo de retenção de um composto não retido,  $h$  - altura do pico e  $w_h$  - espessura a meia altura do pico (Sewell, 2000).

A biomolécula não retida na coluna, que não tem qualquer afinidade com a fase estacionária, e não exhibe exclusão passa pela coluna à mesma velocidade que a fase móvel. A substância com afinidade à fase estacionária move-se através da coluna mais lentamente do que a fase móvel. A razão destas duas velocidades é conhecida como factor de retardamento ( $R$ ):

$$R = \frac{\text{velocidade de movimentação do pico retido}}{\text{velocidade de movimentação da fase móvel}} \quad (3)$$

O componente passa algum tempo tanto na fase móvel ( $t_M$ ) como na fase estacionária ( $t_S$ ), então o tempo de retenção ( $t_R$ ) é dado pela seguinte equação:

$$t_R = t_M + t_S \quad (4)$$

O tempo dispendido na fase estacionária depende do coeficiente de distribuição ( $K_C$ ) tal que  $t_R = K_C V_S$  onde  $V_S$  é o volume na fase estacionária. Se  $C_S$  e  $C_M$  são concentrações de componente na fase estacionária e fase móvel respectivamente, a constante de distribuição é dada por:

$$K_C = C_S / C_M \quad (5)$$

A velocidade de movimentação dos componentes ao longo da coluna é inversamente proporcional à constante de distribuição, isto é, a substância com uma concentração elevada na fase estacionária (com um coeficiente de distribuição elevado) move-se lentamente através da coluna. Os componentes da mistura são, portanto, separados se os seus coeficientes de distribuição diferirem. Aplicando como variável o volume em vez da variável tempo obtém-se a expressão seguinte:

$$V_R = V_M + K_C V_S \text{ ou } V'_R = K_C V_S \quad (6)$$

sendo esta a equação fundamental em cromatografia, mas que ignora os efeitos de não linearidade da isotérmica de adsorção e de “broadening”.

Em cromatografia de adsorção o volume da fase estacionária é substituído pela área à superfície ( $A_S$ ) da fase estacionária, e o coeficiente de distribuição é substituído pelo coeficiente de adsorção ( $K_A$ ) (Sewell, 2000).

Uma expressão alternativa (factor de retenção:  $k$ ) para a distribuição do componente da amostra em termos do número relativo de moles ( $n$ ) do componente na fase estacionária e na fase móvel, é:

$$k = n_S / n_M = K_C \cdot (V_S / V_M) \quad (7)$$

$$R = \frac{\text{quantidade de soluto na fase móvel}}{\text{quantidade de soluto na fase móvel} + \text{fase estacionária}} \quad (8)$$

$$\text{ou} \quad R = n_M / (n_M + n_S) = 1 / (1 + k) \quad (9)$$

Substituindo o factor de retenção na equação (6):

$$V_R = V_M + K_C V_S \text{ dá } V_R = V_M(1+k) \quad (10)$$

ou aplicando tempos de retenção:

$$t_R = t_M(1+k) \Leftrightarrow k = (t_R - t_M)/t_M \quad (11)$$

Esta expressão é muitas vezes aplicada como forma de expressar a retenção a partir de valores facilmente mensuráveis e sem a necessidade de recorrer a medições de taxas de fluxo.

Uma vez que:

$$t_M = L/ \bar{u} \quad (12)$$

A equação (11) pode ser reescrita como:

$$t_R = L/ \bar{u} (1+k) \quad (13)$$

onde L é o comprimento da coluna e  $\bar{u}$  é a taxa de fluxo linear da fase móvel.

Desta forma o tempo de retenção é directamente proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional à taxa de fluxo linear da fase móvel (Sewell, 2000).

### 1.2.3. A forma do pico

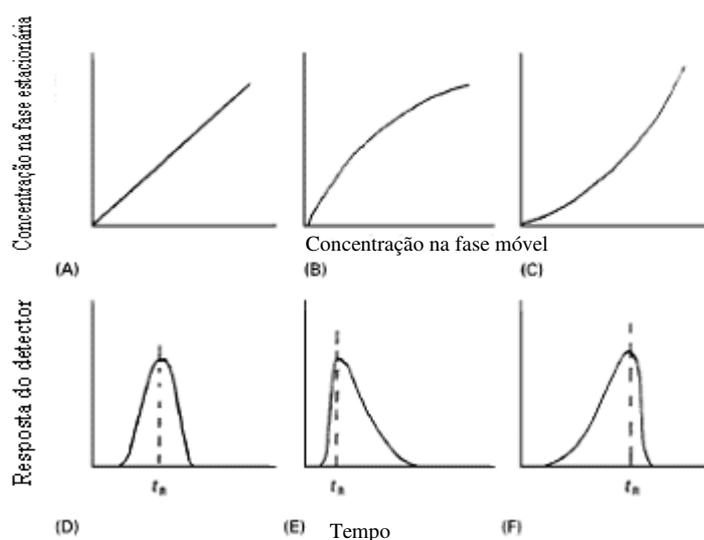
A variação da concentração do soluto na fase estacionária com a concentração do soluto na fase móvel, a temperatura constante, é designada como isotérmica de adsorção. A teoria cromatográfica simples assume uma isotérmica linear, isto é, o coeficiente de distribuição é constante. Nestas condições o tempo de retenção é independente da concentração da amostra e o pico move-se a uma velocidade constante. Devido a difusão longitudinal na direcção do fluxo, o perfil do pico apresenta uma distribuição Gaussiana. Se a isotérmica é não linear (Langmuir ou anti-Langmuir), o coeficiente de distribuição não é constante varia com a concentração do soluto e existe uma distribuição de velocidades ao longo do pico a qual é descrita como um “tailing” ou “fronting” (Sewell, 2000). Esta relação entre a forma da isotérmica e a forma do pico é ilustrada na figura 1.6.

A largura do pico cromatográfico é influenciada pela eficiência da coluna e pode ser expressa em termos do número de pratos (N), e é calculada a partir das seguintes equações que dependem dos valores usados para a largura do pico (figura 1.5):

$$N = (V_R / \sigma)^2 = (t_R / \sigma)^2 = 16 (t_R / w_b)^2 = 5.545 (t_R / w_h)^2 \quad (14)$$

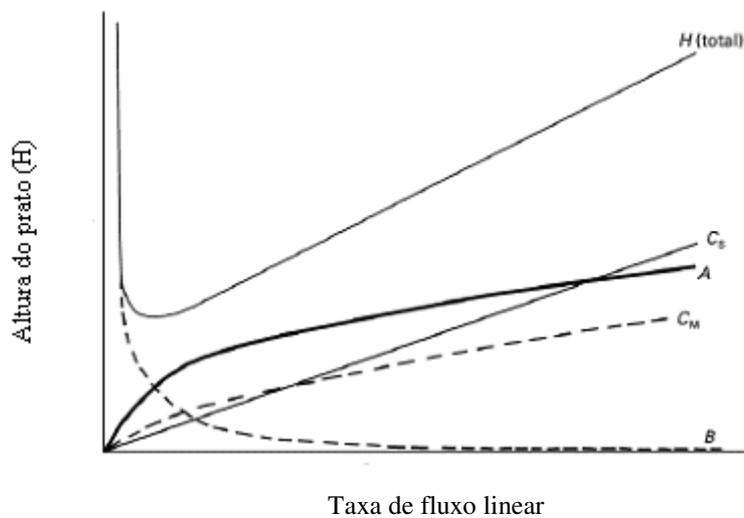
onde  $\sigma$  é o desvio padrão do pico Gaussiano.

O comprimento da coluna dividido pelo número de pratos é igual à altura dos pratos ou à altura equivalente aos pratos teóricos (H) e regulariza o número de pratos por comprimento da coluna:  $H=L/N$ . O conceito de pratos em cromatografia representa o comprimento da coluna em que as moléculas de soluto atingem o equilíbrio de distribuição. Deste modo, um número elevado de pratos teóricos corresponde a uma coluna com uma boa eficiência (Sewell, 2000).



**Figura 1.6.** Figura representativa da forma da isotérmica de adsorção e os efeitos na forma do pico e tempos de retenção ( $t_R$ ). (A) Linear; (B) Langmuir; (C) Anti-Langmuir; (D) Gaussian; (E) tailing; (F) Frente (Sewell, 2000).

Considerar os processos cromatográficos controlados apenas pelo equilíbrio proporcionam uma explicação satisfatória da retenção em termos dos coeficientes de distribuição, mas se for considerado “broadening” da banda é necessária uma aproximação diferente – a teoria de velocidade para cromatografia. Esta teoria foi primeiramente aplicada por Van Deemter (1995) (Sewell, 2000) à cromatografia gasosa, mas mais tarde estendeu-se à cromatografia líquida. À medida que a banda de soluto passa na coluna a largura da banda aumenta e o soluto é diluído pela fase móvel. Apesar do processo de fluxo do fluído ser complexo, podem considerar-se três principais factores que contribuem para um “broadening” da banda (isto é, a variância ( $\sigma^2$ ) do pico Gaussiano): difusão turbulenta, difusão longitudinal e transferência de massa (figura 1.7).



**Figura 1.7.** Representação de Van Deemter para cromatografia líquida. Variação dos termos A, B,  $C_S$  e  $C_M$  com a taxa de fluxo (Sewell, 2000).

### i) Difusão turbulenta

As moléculas que fluem pela fase estacionária poderão percorrer vias de diferentes comprimentos provocando pequenas variações nos tempos de retenção. Isto tem o efeito de “broadening” na banda de uma quantidade que depende do diâmetro da partícula ( $d_p$ ),

$$A = 2\lambda d_p \quad (15)$$

A constante de empacotamento ( $\lambda$ ) é um termo empírico que depende da forma (esférica ou irregular) do material empacotado e da eficiência do empacotamento, e atinge um valor mínimo de  $\cong 0.5$ . Para colunas tubulares abertas não existe este termo (Sewell, 2000).

## ii) Difusão longitudinal

As moléculas de soluto sofrem difusão na direcção longitudinal (isto é, ao longo do perfil axial da coluna) de acordo com as leis de Fick. O “spreading” da banda é directamente proporcional ao coeficiente de difusão ( $D_M$ ) das moléculas de soluto na fase móvel, e inversamente proporcional à taxa de fluxo da fase móvel. É introduzido o factor de obstrução ( $\Psi$ ) de forma a ter em conta a difusão restrita na fase estacionária:

$$B = 2\Psi D_M / \bar{u} \quad (16)$$

A difusão molecular longitudinal só é significativa em cromatografia líquida se forem usadas pequenas partículas na fase estacionária (<10 $\mu$ m) a baixas velocidades da fase móvel e com um coeficiente de difusão do soluto relativamente elevado (Sewell, 2000).

## iii) Transferência de massa

Em cromatografia líquida, o “broadening” produzido pela transferência de massa envolve tanto a fase estacionária como a fase móvel. Existem 2 processos responsáveis pelo “broadening” na fase estacionária ( $C_S$ ). O primeiro processo envolve uma velocidade finita de transferência de massa na zona de interface fase estacionária/fase móvel no topo da coluna. O soluto é distribuído entre estas duas fases de acordo com os valores do coeficiente de distribuição. À medida que a banda se move pela coluna o soluto vai interagindo continuamente com a fase estacionária onde se dissolve. De forma a manter o equilíbrio, o soluto na parte superior da banda irá dissolver-se da fase estacionária para a fase móvel. Como este processo não é instantâneo o pico obtido do cromatograma sofrerá “broadening”. O segundo processo envolve uma distribuição estatística da velocidade de difusão das moléculas na fase estacionária, que resulta numa pequena variação do tempo que as moléculas passam na fase estacionária. Uma fase móvel que se movimenta rapidamente na coluna acentua o “broadening”. Uma taxa elevada de difusão do soluto na fase estacionária ( $D_S$ ) diminui o “broadening” (Sewell, 2000):

$$C_S = q \cdot \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2 \hat{u}}{D_S} \quad (17)$$

onde  $q$  é um factor de configuração, que depende da natureza da fase estacionária. Em cromatografia de adsorção, o termo  $C_S$  é expresso em termos de cinética de adsorção/desorção das moléculas de soluto na fase estacionária.

O “broadening” da fase móvel também resulta de dois tipos de processos. A transferência de massa na fase móvel ( $C_M$ ) resulta de forças de atrito que modificam o perfil do fluxo laminar ao longo do canal entre duas partículas, resultando numa velocidade de fluxo elevada no centro deste canal. A ausência da transferência de massa ( $C_M^*$ ) é o resultado da difusão lenta das moléculas de soluto dentro e fora dos poros da fase estacionária. A soma das transferências de massa na fase móvel pode ser representadas pela seguinte expressão:

$$C_M = f(d_p^2, d_c^2) \cdot \hat{u} / D_M \quad (18)$$

onde  $d_p$  é o diâmetro da partícula e  $d_c$  é o diâmetro da coluna,  $D_M$  o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel e  $\hat{u}$  a velocidade linear (Sewell, 2000).

Gidding (1965), reconhecendo que as moléculas são livres para se difundirem de um caminho para outro introduziu o termo “multipath” ( $A$ ) e o termo transferência de massa na fase móvel ( $C_M$ ) de modo que a variação da altura dos pratos teóricos com a taxa de fluxo linear  $\hat{u}$  é dada por:

$$H = B / \hat{u} + C_S \hat{u} + C_M \hat{u} \{1/A + 1/C_M \hat{u}\} \quad (19)$$

A contribuição dos vários termos para a altura dos pratos teóricos é ilustrada na figura 1.7.

#### iv) Dispersão extra-coluna

Até agora só analisamos “broadening” da banda devido a processos da coluna cromatográfica, mas a avaliação da performance do sistema, a avaliação do sistema como um todo é extremamente importante. Deste modo, o sistema de injeção, o detector e a tubagem do sistema todos contribuem para a forma do pico. O objectivo da injeção é colocar a amostra na coluna. A transferência lenta da amostra desde o injector até à coluna origina um “broadening” ou um pico “tailing”. Grandes volumes “mortos” no detector podem levar a uma mistura de componentes e deterioração da separação bem como à diluição dos picos da amostra, e redução dos limites de detecção (Sewell, 2000).

#### 1.2.4. Resolução

A separação cromatográfica é alcançada apenas quando existe diferença entre os coeficientes de distribuição de 2 componentes, isto é, quando as interacções moleculares (forças de dispersão, interacções dipolo e ligações de hidrogénio) entre as moléculas da amostra e a fase estacionária são suficientemente diferentes para cada componente, ou seja a energia livre de distribuição dos componentes da mistura pela fase estacionária é diferente.

Uma fase estacionária que produz um grau de separação elevado é dita uma coluna com uma elevada selectividade (Sewell, 2000).

Quando se pretende separar componentes de uma mistura é necessário prevenir que os compostos se voltem a misturar novamente e a forma de obter esta separação é uma função da eficiência da coluna, determinada pelo número de pratos teóricos. Os efeitos da selectividade da fase estacionária e eficiência da coluna são expressos em termos da resolução dos picos na coluna (Sewell, 2000):

$$R_s = \frac{(t_R)_2 - (t_R)_1}{(w_1 + w_2)/2} \quad (20)$$

Um valor de  $R_s = 1.5$  representa normalmente o valor base para a separação de picos Gaussianos. Para obter a resolução máxima de um pico, é necessário uma selectividade e eficiência elevada.

Uma resolução elevada pode ser obtida pelo aumento do comprimento da coluna desde que a separação dos picos seja proporcional à distância de migração na coluna, mas a largura dos picos só é proporcional à raiz quadrada da distância de migração (Sewell, 2000).

A equação de Purnell demonstra como a resolução do pico está relacionada com o factor de retenção ( $k$ ), com o número de pratos teóricos e com a retenção relativa ( $\alpha$ ) (Sewell, 2000):

$$R_s = \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (21)$$

onde o subscrito 2 refere-se ao segundo pico. Em cromatografia líquida a retenção relativa é determinada pela natureza da fase móvel bem como da fase estacionária. De forma a obter uma separação satisfatória deve ser realizada um balanço entre as interacções (forças de dispersão, interacções dipolo-dipolo, interacções dipolo-induzido-dipolo e ligações de hidrogénio).

A resolução do pico aumenta rapidamente com o aumento do  $k$ , mas valores superiores a 10 o termo  $\frac{k_2}{1 + k_2} \rightarrow 1$  já não faz parte da resolução (equação 21). Valores de  $k$  inferiores a 1 dão tempos de retenção e resoluções bastante baixas, logo valores de  $k$  óptimos devem situar-se entre 1 e 10. A equação de retenção  $t_R = L/\hat{u}(1 + k)$  demonstra que o tempo de retenção é função da velocidade da fase móvel ( $\bar{u}$ ) e do factor de retenção (Sewell, 2000).

### **1.3. O papel da estrutura das biomoléculas no comportamento cromatográfico**

Com base no conhecimento acerca das interacções proteína-proteína e o facto de que as proteínas são matrizes tridimensionais com uma grande diversidade na distribuição dos seus grupos funcionais à superfície, Regnier (1987) propôs que (i) é estericamente impossível que todos os aminoácidos entrem em contacto com a superfície do adsorvente cromatográfico em simultâneo, (ii) somente os resíduos que se encontram próximos ou na superfície exterior da proteína poderão desempenhar um maior impacto no comportamento cromatográfico, (iii) só uma fracção dos aminoácidos externos interagem com um tipo particular da matriz cromatográfica como é o caso da matriz por troca iónica ou afinidade (iv) a heterogeneidade na distribuição dos aminoácidos à superfície das proteínas pode permitir que as porções da superfície externa dominem o comportamento cromatográfico, (v) a região da superfície externa que determina o comportamento cromatográfico pode variar entre os vários modos cromatográficos, (vi) as variações estruturais que alteram a composição dos aminoácidos na região de contacto soluto-adsorvente irão modificar o comportamento cromatográfico e (vii) a matriz cromatográfica poderá alterar a estrutura da proteína adsorvida (Regnier, 1987).

A suportar o modelo proposto por Regnier (1987) encontram-se as evidências enumeradas a seguir.

#### **1.3.1. Resíduos que controlam a retenção**

O facto de que só os resíduos dos aminoácidos que se encontram na ou próximos da superfície externa das biomoléculas podem interagir com outras biomoléculas ou com a superfície, tem sido extensivamente documentados. Por outro lado, os aminoácidos que se encontram no interior da matriz das biomoléculas não desempenham um papel tão directo nas interacções com a superfície. Variantes de biomoléculas que resultam de mutações, erros de expressão, ou algum tipo de modificação translacional podem ser só diferenciadas das biomoléculas nativas por técnicas de separação mediadas pela superfície se a sua alteração estrutural modifica a estrutura das biomoléculas ou se surge sobre a superfície externa (Regnier, 1987).

### **1.3.2. Região de contacto cromatográfica**

Geralmente, a área superficial das biomoléculas envolvida no processo de adsorção não é mais do que uma pequena centena de angstroms ao quadrado. A alteração de um único aminoácido ou modificações mínimas na sua orientação espacial na região de interacção pode causar um grande impacto na adsorção.

Uma substituição num aminoácido de uma proteína ou péptido poderá influenciar o comportamento cromatográfico somente quando este se encontra na área do soluto que estabelece um contacto directo com o adsorvente cromatográfico ou quando altera a estrutura da biomolécula de forma a afectar a região de contacto cromatográfica. Com a disponibilidade de várias variantes naturais e a capacidade em produzir um número ilimitado de variantes sintéticas através da tecnologia de ADN recombinante, é possível por processos de mapeamento, localizar as regiões no exterior das biomoléculas que determinam o comportamento cromatográfico (Regnier, 1987).

Existem 7 variantes da “avian” lisozima, todas elas possuindo estruturas aproximadamente idênticas entre si, observadas por cristalografia de raio X (Bott e Sarma, 1976). Quando estas isoenzimas são examinadas por HIC, uma região particular da superfície molecular oposta à fenda catalítica domina a retenção cromatográfica (Fausnaugh e Regnier, 1986). Esta área vai do resíduo 41 ao 102 e do resíduo 75 à região de hélice  $\alpha$  que começa no resíduo 89. A substituição de aminoácidos nesta região altera o comportamento cromatográfico, enquanto que a substituição na outra face externa da biomolécula não desempenhou nenhum tipo de influência no que diz respeito à retenção. No entanto a região de contacto é suficientemente extensa em HIC de modo que 6 ou 7 variantes da lisozima podem ser separadas.

A retenção em outros modos cromatográficos pode também ser dominado por porções específicas à superfície das biomoléculas. Por exemplo, a cromatografia da “hen egg white” lisozima em colunas de afinidade por metal imobilizado é influenciada pela histidina, existindo apenas um resíduo de histidina na posição 15.

As hélices anfipáticas providenciam outro caso da distribuição assimétrica de aminoácidos que determinam uma região de contacto cromatográfica específica em polipéptidos (Regnier, 1987). Porque existe uma acumulação de aminoácidos hidrofóbicos numa zona da hélice anfipática, esta região da molécula dominará a retenção em HIC (Regnier, 1987).

Uma elevada distribuição assimétrica irá produzir uma região de contacto específica contrariamente a uma distribuição uniforme que leva a que todas as áreas da superfície da molécula estejam igualmente envolvidas no processo de adsorção. Por exemplo, aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos são segregados em proteínas anfipáticas. Estendendo esta lógica à comparação dos vários modos cromatográficos, espera-se que as regiões de contacto cromatográficas destas proteínas estejam localizadas em diferentes porções da sua superfície (Regnier, 1987).

### **1.3.3. Comportamento cromatográfico e alterações de conformação**

Geralmente as biomoléculas sob condições fisiológicas possuem um estado conformacional predilecto. Infelizmente condições não fisiológicas têm de ser usadas durante o processo de isolamento destas biomoléculas. Desta maneira, as biomoléculas de interesse podem ser desnaturadas sendo necessário o “refolding” destas de forma a recuperarem a sua estrutura nativa. Embora, o “refolding” de polipéptidos de cadeia pequena seja de fácil execução, já o mesmo não se pode dizer para proteínas de cadeia comprida e polipéptidos que sofreram uma modificação pós-translacional. Obviamente é melhor, se possível, prevenir a desnaturação durante as separações cromatográficas.

Ambas as forças hidrofóbicas e coulombicas são extremamente importantes na manutenção da estrutura das biomolécula. As mesmas forças são usadas para efectuar as separações cromatográficas. Na sua essência, a coluna compete na região de contacto com o resto da estrutura da biomolécula por grupos funcionais que se encontram na interface. Quando as forças hidrofóbicas e coulombianas na coluna são mais fortes do que aquelas que mantêm a estrutura das biomoléculas, a desnaturação pode ocorrer. A fase móvel pode também promover a desnaturação. Os solutos que se encontram fortemente retidos requerem a maior parte das vezes aditivos para serem eluídos, provocando a ruptura das forças hidrofóbicas e coulombianas intramoleculares para além da região de contacto hidrofóbico. A desnaturação pode ocorrer em todos os tipos de colunas de cromatografia líquida. Tais alterações de estrutura em sistemas cromatográficos possuem várias implicações. Em cromatografia de escala preparativa, se a biomolécula de interesse desnatura irreversivelmente o rendimento do processo diminuirá. Numa escala analítica, as alterações de estrutura poderão conduzir a erros na estimativa de parâmetros em modelos de adsorção/desorção e em análises de amostras

puras. Num nível mais fundamental, as mudanças de estrutura, se ignoradas, poderão levar a uma interpretação errada dos mecanismos de adsorção (Regnier, 1987). O problema da desnaturação é mais preocupante na RPC onde os solventes orgânicos e muitas fases móveis acídicas devem ser usados para eluir as biomoléculas. Uma vez que as forças hidrofóbicas desempenham um papel bastante relevante na organização e manutenção da estrutura tridimensional das biomoléculas, a presença de resíduos alquil silanos na coluna, solvente orgânicos na fase móvel e as condições muito acídicas podem levar à desnaturação das biomoléculas. As biomoléculas multiméricas com subunidades diferentes representam um segundo problema. A desnaturação de tais biomoléculas na coluna pode causar a dissociação e a separação de subunidades, que serão bastante difíceis de localizar e reunir novamente nas biomoléculas nativas. A desnaturação pode aumentar a complexidade da amostra ao ponto de ser impossível diferenciar entre os componentes da amostra e os artefactos (Regnier, 1987).

A hidrofobicidade externa das biomoléculas no estado nativo é bastante diferente da do estado “unfolded” porque as cadeias hidrofóbicas são expostas durante a desnaturação (Regnier, 1987). Medições espectroscópicas directas mostraram que quando a lisozima contacta com um adsorvente de RPC, ocorre uma alteração da conformação na área de contacto cromatográfica da biomolécula. À medida que a biomolécula é adsorvida à superfície, alguns triptofanos da lisozima são rapidamente expostos ao solvente. É ainda possível que em fases móveis desnaturante as biomoléculas possam sofrer “folding” e “unfolding” durante o processo cromatográfico. A velocidade deste processo determina o que se obterá predominantemente a biomolécula nativa, a biomolécula desnaturada ou a mistura de conformações. A interconversão das conformações no sistema cromatográfico pode também influenciar a forma do pico. Tanto em HIC (Wu *et al.*, 1996) como em RPC (Regnier, 1987) a tendência é passar de um pico no estado nativo, através de um pico extenso no sistema em equilíbrio para um pico no estado desnaturado (Regnier, 1987).

Melander *et al.*, (1982) nos seus estudos com dipéptidos que continham resíduos de L-prolina examinaram a presença de picos múltiplos no cromatograma. Através deste estudo, estes investigadores concluíram que os péptidos que continham resíduos de prolina podiam produzir múltiplos picos em HPLC se a prolina não se encontrasse no terminal N. Este fenómeno foi explicado como consequência da alteração de conformação cis-trans do péptido a uma taxa que é comensurável com o processo da distribuição cromatográfica entre a fase móvel e a fase estacionária.

Com base na teoria solvofóbica (Horváth *et al.*, 1976; Horváth e Melander, 1978; Horváth e Melander, 1980) estes autores justificaram o facto da retenção da conformação cis ser maior do que a trans, uma vez que a primeira possui uma área superficial de contacto mais elevada com os ligandos (Melander *et al.*, 1982).

Aumentando a temperatura da coluna foi mostrado com a ribonuclease A que o tamanho do pico da biomolécula desnaturada aumenta com o diminuição de um pico extenso. Em geral, a retenção cromatográfica aumenta com a desnaturação em RPC e HIC. Foi demonstrado por “diode-array spectroscopy” que nos picos extensos pode haver uma variação na composição da conformação (Wu *et al.*, 1996). É desejável escolher condições cromatográficas que seleccionam um único estado conformacional para a separação (Regnier, 1987).

Ainda que a estrutura da biomolécula possa ser alterada em RPC, a estrutura secundária e terciária pode ser retida. As provas desta conclusão foram baseadas em diversas observações que: (i) mais de um pico pode ser observado para uma única biomolécula, o que significa que existem múltiplos estados conformacionais durante a sua passagem através da coluna e estas conformações têm comportamentos de adsorção distintos que conduzem a picos extensos ou múltiplos no perfil de eluição e que diferem no grau de “unfolding”. Em 1989, Karger e Blanco (1989) descreveram o efeito das alterações estruturais das proteínas induzidas na coluna. Estes investigadores demonstraram o comportamento destas alterações por fluorescência intrínseca e demonstraram ainda fortes evidências de que a conformação das proteínas pode ser alterada durante o processo de adsorção ou no estado adsorvido, (ii) a retenção não pode ser calculada por um simples somatório do incremento de grupos de aminoácidos individuais em polipéptidos (Regnier, 1987), (iii) a contribuição para a retenção de um grupo funcional depende da sua posição no polipéptido, (iv) existe uma pequena relação entre o valor de Z (número de moléculas de água libertadas por biomolécula adsorvida) e o peso molecular em sistemas não desnaturantes, (v) o número Z aumenta em condições mais desnaturantes (Geng e Regnier, 1984), e (vi) as técnicas espectrofotométricas demonstram a retenção do conteúdo helicoidal das biomoléculas à superfície do adsorvente (Regnier, 1987).

Com ambos proteínas e péptidos, a adição de solventes orgânicos durante a RPC sob condições acídicas produz uma maior ruptura da estrutura terciária e quaternária do que da estrutura secundária. Este facto deve-se às forças hidrofóbicas que são consideradas como as maiores contribuidoras da estrutura terciária e quaternária e as

ligações de hidrogénio são mais estáveis em solventes orgânicos do que na água. A manutenção da estrutura terciária durante a RPC está geralmente associada com os polipéptidos ligados por pontes dissulfito.

A temperatura a que os polipéptidos sofrem desnaturação na coluna de HIC e RPC é quase sempre mais baixa do que em solução. Este comportamento tem sido atribuído à natureza das próprias fases estacionárias. Uma vez que a estrutura terciária e quaternária são estabilizadas por interações hidrofóbicas, a possibilidade de desnaturação deve ser sempre tomada em consideração quando se emprega uma coluna hidrofóbica (Regnier, 1987).

Deste modo é extremamente importante compreender como e porque é que a desnaturação ocorre e quais os efeitos que a desnaturação pode causar na performance cromatográfica (Sane *et al.*, 1999).

#### **1.3.4. Exemplos de algumas técnicas usadas para caracterizar a estrutura das proteínas em cromatografia**

O dicroísmo circular (CD) (Drake *et al.*, 1989; Kurosu *et al.*, 1990; Boulkanz *et al.*, 1997) e a espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FT-IR) (Turula e Haseth, 1996) são exemplos de algumas técnicas usadas para caracterizar as estruturas das proteínas em solução antes e depois da eluição da coluna cromatográfica. Todavia, o “refolding” espontâneo das proteínas após a desorção dificulta a interpretação dos resultados. A conformação após exposição pode ser considerada como uma representação inadequada do estado da proteína quando esta se encontra a interagir com o meio.

Vários investigadores têm tentado caracterizar as estruturas das proteínas no estado adsorvido (Sane *et al.*, 1999). Kondo e Mihara (1996) aplicaram o (CD) para estimar o conteúdo em estrutura secundária das proteínas adsorvidas em partículas constituídas por sílica. No entanto, para minimizar os efeitos da dispersão da luz, este estudo foi limitado aos materiais constituídos por nano partículas não funcionalizadas (Sane *et al.*, 1999).

Boulkanz *et al.*, (1997) usaram FT-IR para caracterizar a estrutura da albumina sérica humana adsorvida num suporte de fase reversa. No entanto as mudanças estruturais reportadas por estes autores encontravam-se dentro do erro característico das medidas em FT-IR. Por outro lado, a grande contribuição da água para o sinal de

infravermelho da amida I tornam a estimativa da estrutura da proteína no estado adsorvido difícil. Para ultrapassar este problema Katzenstein *et al.*, (1986) usaram fases móveis deuteradas durante a caracterização por espectroscopia FT-IR de proteínas ligadas a suportes de C<sub>8</sub>-sílica. Apesar de estes autores terem observado variações significativas no espectro de absorvância da amida I, não puderam quantificar a estrutura da proteína adsorvida.

A espectroscopia de fluorescência também tem sido aplicada para caracterizar a estrutura terciária de proteínas adsorvidas em superfícies planas (Asanov *et al.*, 1996; Robeson *et al.*, 1996), nano partículas (Maste *et al.*, 1996) e em suporte de HIC e RPC (Katzenstein *et al.*, 1986; Oroszlan *et al.*, 1990). Esta técnica, ainda que muito sensível, providencia informação somente acerca do microambiente dos resíduos de triptofano e tirosina na proteína. Também, no caso das proteínas que contêm múltiplos resíduos de triptofano e tirosina, a interpretação do espectro torna-se difícil (Sane *et al.*, 1999).

McNay e Fernandez (1999) usaram ressonância magnética nuclear (NMR) e técnicas de troca de protão por deutério na amida para estudar o desenrolamento da lisozima adsorvida a suportes de fase reversa. Com esta técnica resíduos que participam no processo de desenrolamento à superfície do suporte de RPC podem ser identificados, no entanto a estrutura da proteína no estado adsorvido continua por determinar.

Uma outra técnica alternativa e quantitativa para a caracterização das estruturas secundárias das proteínas é a espectroscopia de Raman. Algumas vantagens desta técnica incluem a conveniência de seleccionarem amostras de proteínas em estados sólidos, em solução, suspensão, imobilizadas e adsorvidas a suportes, sendo necessária uma preparação mínima. Sane *et al.*, (1999) demonstraram a utilidade da espectroscopia de Raman para a caracterização "in-situ" da estrutura secundária das proteínas e o seu uso na interpretação a nível molecular do comportamento de retenção das proteínas.

## **1.4. Métodos para medição da hidrofobicidade dos aminoácidos e a sua interacção**

### **1.4.1. Tipos de escalas de hidrofobicidade dos aminoácidos**

Um dos problemas em elucidar o mecanismo do “folding” das proteínas é determinar a natureza do “unfolded” inicial das proteínas sob condições que favorecem o estado nativo (Wu e Raleigh, 1998). O cerne deste problema decai nas interacções entre cada aminoácido que fazem a estrutura terciária. Estão envolvidas quatro tipos de interacções entre as quais: hidrofóbica, electrostática, ligações de hidrogénio e interacções Van der Waals (Biswas *et al.*, 2003). Pensa-se que as últimas interacções juntamente com as interacções hidrofóbicas predominem e que outros tipos de interacções tais como amina-aromático (Burley e Petsko, 1986) e aromático-aromático também (Burley e Petsko, 1985) desempenhem um papel crucial na estabilização da estrutura da proteína.

O carácter hidrofóbico de cada aminoácido em particular é uma propriedade significativa na compreensão da estrutura da proteína ou péptido porque nos mostra como é que se enrolam no seu estado nativo (Biswas *et al.*, 2003).

O efeito hidrofóbico é considerado como a força que conduz o processo de “folding” das proteínas (Honig e Yang, 1995).

O conceito de hidrofobicidade tem sido cuidadosamente examinado ao longo dos anos. As razões para tal interesse devem-se ao facto de que este conceito permite um melhor conhecimento de como os aminoácidos interagem nas proteínas e uma forma de prever as propriedades estruturais das proteínas, isto é, a capacidade das proteínas formarem uma hélice  $\alpha$  e o reconhecimento de cadeias  $\beta$ .

A hidrofobicidade é geralmente medida pela partição do soluto apolar entre uma fase lipídica e uma fase aquosa. À medida que o soluto é excluído da fase aquosa, as moléculas de água ordenam-se em redor da cavidade produzida pelo soluto apolar. Consequentemente, a entropia diminui durante este processo. Outro fenómeno termodinâmico que ocorre durante este processo é o aumento significativo da capacidade calorífica (Biswas *et al.*, 2003). Estes dois parâmetros termodinâmicos definem o efeito hidrofóbico (Tanford, 1980) que ocorre à temperatura ambiente (Biswas *et al.*, 2003).

O facto de as interacções hidrofóbicas serem dominantes no processo de “folding” das proteínas conduziu ao desenvolvimento das escalas de hidrofobicidade (Kauzmann, 1959). Diversas revisões têm sido apresentadas sobre este tópico (Rose *et al.*, 1985; Hopp, 1986; Cornette *et al.*, 1987; Esposito *et al.*, 1990). Biswas *et al.*, (2003) dividiu as escalas no que diz respeito à escolha do método usado para a sua obtenção. Segundo este autor os métodos podem ser divididos em 5 categorias diferentes: partição (particularmente líquido-líquido), cálculo da área superficial acessível, RPC e técnicas cromatográficas, mutagénese dirigida e medições das propriedades físicas (Biswas *et al.*, 2003).

A partição entre duas fases líquidas imiscíveis é considerada como o método mais comum da medição de hidrofobicidade. A maior parte dessas escalas envolvem o uso de diferentes tipos de solventes orgânicos. Os solventes usados no estudo de partição tentam retratar o interior da proteína. Contudo existe um problema que envolve o uso de solventes orgânicos, a sua miscibilidade com a água leva a alterações no carácter de ambas as fases e por conseguinte torna-se difícil obter valores de hidrofobicidade correctos (Biswas *et al.*, 2003). A primeira grande escala foi desenvolvida por Nozaki e Tanford (1971). Estes autores usaram o etanol e o dioxano como solventes orgânicos para moldar o interior da proteína. Este trabalho permanece como um dos mais citados na literatura. Têm também sido utilizados métodos de partição que usam fases não líquidas como a fase gasosa e a fase micelar. Contudo, devido à hidrofobicidade das micelas, os coeficientes de partição de aminoácidos polares e carregados não podem ser determinados (Biswas *et al.*, 2003). A utilidade das fases de vapor foi desenvolvida por Wolfenden *et al.*, (1981) com o intuito de medir a afinidade das cadeias laterais dos aminoácidos com a água. Teoricamente, a fase de vapor forma um solvente apolar mais simples uma vez que o soluto não interage com ele (Sharp *et al.*, 1991).

Os problemas relacionados com os métodos de partição assentam primeiramente na incapacidade de simular o interior da proteína o qual é difícil de aceder (Damadoran e Song, 1986). O uso de aminoácidos livres é muito complicado devido à sua solvatação (Biswas *et al.*, 2003). Por outro lado, pontes de hidrogénio que são perdidas na transferência para solventes orgânicos não são restabelecidas nestes, mas frequentemente encontram-se no interior da proteína. Os métodos de partição líquido-vapor também têm várias desvantagens, incluindo a introdução de forças de dispersão e desfavorecimento da fase de vapor originada por aminoácidos alifáticos devido à

necessidade de compensação das ligações de hidrogénio que foram quebradas (Rose *et al.*, 1985). Por outro lado, a partição líquido-micela pode não representar de uma forma acertada os valores de hidrofobicidade devido à presença de outros tipos de interações (Biswas *et al.*, 2003).

Com o advento dos modelos moleculares, e com o aumento de bibliotecas de estruturas de proteínas desenvolveram-se métodos que estimam a hidrofobicidade dos aminoácidos com base no grau de exposição destes ao solvente. Estes métodos têm sido aplicados na maior parte das vezes exclusivamente na previsão da conformação das proteínas. Existem duas principais vantagens no uso da medição da área superficial acessível. A primeira vantagem deste método é não envolver a modelação dos solutos ou do interior da proteína. São realizadas medições nas proteínas e executadas correlações entre o grau de exposição e a hidrofobicidade. A segunda vantagem deste método é que se consegue verificar nas proteínas a presença da estrutura secundária, estrutura terciária e também a presença da estrutura quaternária (Biswas *et al.*, 2003). As desvantagens dos métodos de área superficial acessível devem-se ao facto de que estes métodos são dependentes das definições de átomos polares e apolares e de a base de dados de estruturas das proteínas ser limitada. Os métodos de área superficial acessível também só efectuam a medição da acessibilidade estática, em vez da acessibilidade de proteínas dinâmicas em solução (Biswas *et al.*, 2003). Por outro lado a maior parte das escalas não tem em conta a polaridade da superfície antes de efectuar a distinção entre hidrofóbico e hidrofílico (Biswas *et al.*, 2003). É referido que as medições de área superficial acessível dão-nos informação em termos da hidrofobicidade média de um tipo de aminoácidos mas não providenciam informação acerca dos resíduos individuais (Biswas *et al.*, 2003).

O método cromatográfico considerado o método mais popular para a medição da hidrofobicidade do soluto é a cromatografia líquida de fase reversa (RPC) (Biswas *et al.*, 2003). Pensa-se que uma das razões da sua popularidade se deve ao facto de que a fase estacionária apolar “imita”, uma membrana biológica (Hodges *et al.*, 1994). Muitos dos métodos usam péptidos como soluto e aplicam análises de regressão para relacionar a hidrofobicidade dos aminoácidos com a retenção do péptido. A principal vantagem do uso de péptidos é que a carga terminal dos péptidos não exclui a partição em RPC. A maior parte das vezes são usados péptidos com cerca de 15 resíduos de aminoácidos em termos de comprimento para evitar a formação de estruturas secundárias que deste modo poderiam provocar um grande impacto em termos da retenção. Ocasionalmente

são usadas proteínas e a hidrofobicidade de cada aminoácido é calculada da mesma forma que com péptidos. São raramente usados aminoácidos individuais e a sua derivatização é muitas vezes necessária devido à incapacidade dos aminoácidos livres sofrerem partição em géis com 18 carbonos (C<sub>18</sub>) devido às cargas na zona terminal. Contudo, os aminoácidos livres têm sido usados em outras técnicas cromatográficas. A aplicação de aminoácidos é vantajoso desde que estes não sofram efeitos da vizinhança e que não se encontrem sujeitos a efeitos de localização que podem dar origem a dados ambíguos.

Como referido, além da RPC outras técnicas cromatográficas têm sido usadas, Gehas e Wetlaufer (1990) aplicaram a HIC de aminoácidos derivados de dansil na concepção das suas escalas de hidrofobicidade. Em HIC, a retenção é baseada estritamente na área de contacto hidrofóbica e portanto providencia interacções mais fracas que a RPC.

Aboderin (1971) desenvolveu uma escala usando a retenção de péptidos num gel hidrofílico com uma fase móvel aquosa de 1-butanol e piridina.

A cromatografia de camada fina foi também usada para relacionar os valores de mobilidade dos aminoácidos livres com a sua hidrofobicidade. Apesar da grande utilização dos métodos cromatográficos, estes são algo ambíguos, principalmente devido à dependência das escalas de parâmetros cromatográficos. A densidade de ligação de cadeias à fase estacionária, a área superficial e o diâmetro de poro a escolha e concentração do solvente orgânico, a selecção do pH e até mesmo a temperatura podem afectar os valores absolutos da hidrofobicidade, bem como a sua ordem relativa (Biswas *et al.*, 2003).

A mutagénesse dirigida é um método bioquímico também usado para a medição da hidrofobicidade dos aminoácidos. Este método emprega a tecnologia de ADN recombinante, e são realizadas substituições uma por uma na sequência dos aminoácidos de proteínas naturais. A principal vantagem deste método é a medição da estabilidade da proteína baseada na inserção de aminoácidos específicos (Biswas *et al.*, 2003). Um dos principais inconvenientes dos métodos de mutagénesse dirigida é que nenhum resíduo numa proteína particular pode ser substituído pelos 20 aminoácidos que ocorrem na natureza (Yutani *et al.*, 1987). Outra desvantagem inclui o custo, perturbação de outras interacções (Mendel *et al.*, 1992), e a falta de utilidade que não seja só a medição da estabilidade da proteína (Biswas *et al.*, 2003).

Existem ainda uma variedade de escalas de hidrofobicidade de aminoácidos baseadas na medição das propriedades físicas, como a tensão superficial, temperatura de transição, energia de solvatação e a capacidade calorífica molar parcial. As vantagens deste método são a velocidade, facilidade de uso e a flexibilidade em termos do soluto (Biswas *et al.*, 2003). Bull e Breese (1974) desenvolveram uma das escalas mais reconhecidas, pela medição dos valores de tensão superficial numa solução de cloreto de sódio de 20 aminoácidos naturais. As medições de tensão superficial possuem várias desvantagens importantes (Biswas *et al.*, 2003). As ligações de hidrogénio que são quebradas e os grupos carregados que são neutralizados após transferência da solução aquosa para a proteína mantêm-se intactos na interface solução-ar (Kyte e Doolittle, 1982).

Outra propriedade física usada na medição da hidrofobicidade dos aminoácidos é a energia livre de solvatação (Biswas *et al.*, 2003). A energia livre de solvatação é estimada como o produto da acessibilidade de um átomo ao solvente por um parâmetro de solvatação atómico.

Makhatadze e Privalov (1990) mediram a capacidade calorífica aparente de vários péptidos e compostos orgânicos usando a microcalorimetria na gama de temperatura entre os 5 e os 125°C. Os aminoácidos foram divididos em 3 categorias, com base nos valores das suas capacidades caloríficas, e são classificados como hidrofóbicos se o aumento da temperatura conduz à diminuição dos valores da variação da capacidade calorífica. Com base neste método a treonina, tirosina e histidina foram categorizados.

Outra técnica de medição de escalas de hidrofobicidade de aminoácidos baseada na medição de propriedades físicas é a temperatura de transição, esta é medida por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e o estudo estabelece uma relação entre a hidrofobicidade relativa do péptido e o inverso da sua temperatura de transição. No entanto existem várias desvantagens no uso da temperatura de transição para a medição da hidrofobicidade. A carga e a baixa solubilidade de alguns aminoácidos influenciam os valores de hidrofobicidade obtidos (Biswas *et al.*, 2003). Também o “melting” gradual das proteínas pode conduzir a valores que são difíceis de distinguir (Bull e Breese, 1974).

Examinando os diferentes métodos de medição da hidrofobicidade dos aminoácidos anteriormente descritos, é razoável colocar a seguinte questão: como é que os valores destes métodos correspondem a medições exactas da hidrofobicidade.

Um dos estudos mais completos acerca das discrepâncias observadas nas escalas de hidrofobicidade dos aminoácidos foi realizado por Trinquier e Sanejouand (1998). Estes investigadores combinaram os vários valores da hidrofobicidade de 144 escalas e desenvolveram um sistema de ordenação baseado na frequência com que cada aminoácido é marcado como hidrofílico ou hidrofóbico. Foram produzidos três grupos como resultado desta análise: Como aminoácidos hidrofóbicos existem o triptofano, a metionina, a cisteína, a fenilalanina, a isoleucina, a leucina, a valina, a glicina, a arginina e a serina. Como aminoácidos hidrofílicos existem a tirosina, a asparagina, a lisina, o aspartato, o glutamato, a histidina e a glutamina. Como aminoácidos ambivalentes existem a alanina, a treonina e a prolina (Biswas *et al.*, 2003). Trinquier e Sanejouand (1998) afirmaram que estas categorias deveriam ser aceites com algum grau de precaução uma vez que não partem de uma amostra suficientemente grande.

#### **1.4.2. Métodos para o estudo das interacções**

Cooper (1999) abordou a questão da compreensão da termodinâmica de interacção entre as biomoléculas e afirmou que existindo modelos que examinam estas interacções, estes dificilmente distinguem os vários componentes da interacção, como proteína-proteína, proteína-ligando e ácido nucleico-ligando. Nesta mini-revisão de (Cooper, 1999) as vantagens das medidas de calorimetria sobre a análise de Van't Hoff são discutidas assim como a compensação entropia-entalpia.

Como já foi referido anteriormente a cromatografia é um método tradicionalmente usado para a separação das misturas. No entanto a coluna cromatográfica em vez de ser usada somente como meio de separação, pode também ser usada como ferramenta para a medição das interacções. A fase estacionária pode ser considerada como o “receptor” enquanto que as amostras injectadas podem ser consideradas como “ligandos” (Biswas *et al.*, 2003). Mant e Hodges (1989) aplicaram esta premissa para medirem as interacções e estudarem a hidrofobicidades dos aminoácidos. Lin *et al.* (2000) estudaram extensivamente a área dos péptidos e das proteínas e como é que estas moléculas interagem com as fases estacionárias apolares.

Diferentes áreas de cromatografia foram utilizadas no estudo das interacções entre aminoácidos, destacamos aqui a HIC. Vailaya e Horvath (1996) realizaram um estudo usando três tipos de fases estacionárias diferentes e uma série de aminoácidos

derivados de dansyl com a finalidade de determinarem as interacções hidrofóbicas. Foram realizados muitos estudos de modo a interpretar o papel da concentração de sal em HIC mas até este estudo, os efeitos da temperatura ainda não tinham sido investigados. Os dados termodinâmicos deste estudo revelaram efeitos significativos da capacidade calorífica demonstrando uma variação positiva de entalpia e entropia a baixas temperaturas e a elevadas temperaturas uma diminuição e aproximação de valores negativos (Biswas *et al.*, 2003) destas quantidades. Os dados calorimétricos traduziram muito bem os seus resultados, mostrando que esta característica identifica o processo hidrofóbico.

### **1.5. Aspectos gerais dos péptidos utilizados**

É do conhecimento geral a importância significativa dos péptidos para os organismos vivos. A capacidade de detectar, quantificar e modelar estas biomoléculas é extremamente importante para o estudo das suas funções básicas. Esta capacidade é importante especialmente na área da bioanalítica (Buszewski *et al.*, 2007). O método mais popular para a análise de péptidos é a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). O comportamento cromatográfico dos péptidos é determinado pelo carácter das suas cadeias laterais e grupos substituintes, que definem o seu carácter ácido ou básico (presença de grupos ionizáveis) ou o grau de hidrofobicidade ou hidrofiliidade. Por outro lado a estrutura dos péptidos desempenha também um papel bastante relevante durante a eluição cromatográfica (Buszewski *et al.*, 2007). Neste projecto péptidos como a Angiotensina I e seus derivados serão utilizados de modo a esclarecer o mecanismo de interacção com o adsorvente.

### 1.5.1. Angiotensina I

O péptido utilizado neste estudo foi a Angiotensina I humana. Este é formado na circulação por acção da renina, secretada pelos rins, sobre o angiotensinogénio produzido pelo fígado (Do *et al.*, 1987).

A Angiotensina I é o precursor da Angiotensina II, conhecida pela sua multiplicidade de acções biológicas, relacionadas com o sistema endócrino e com o sistema nervoso central e periférico (Spyroulias *et al.*, 2003). Embora a Angiotensina I não exiba o mesmo interesse biológico e farmacológico que a Angiotensina II, é o precursor desta última. Após hidrólise pela peptidil –peptidase A ou kinase II, a inerte Angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) é convertida na biologicamente activa Angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) (Skeggs *et al.*, 1956). A Angiotensina II é um potente agente vasoactivo tendo um papel vital na regulação da pressão sanguínea, na conservação do volume sanguíneo total e na homeostase (Spyroulias *et al.*, 2003) está também envolvida na libertação da ADH (hormona anti-diurética) no crescimento celular e na estimulação do sistema nervoso simpático.

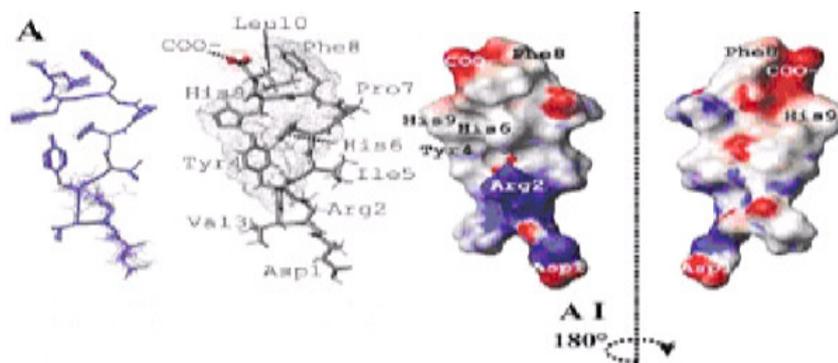
Um dos maiores problemas em determinar a conformação da Angiotensina em solução, a uma resolução elevada, é a disponibilidade de material altamente purificado. A interpretação dos dados físicos de uma grande quantidade de péptidos sintéticos de elevada pureza sugere a existência de diferentes populações de conformações (Galardy *et al.*, 1976).

Spyroulias *et al.*, (2003) analisaram a estrutura da Angiotensina I através de espectroscopia bidimensional de ressonância magnética nuclear de protão em dimetilsulfóxido e numa mistura de 2,2,2 – trifluoroetanol/água. Estes autores demonstraram que os resíduos de Tyr4, His6 e Phe8 compreendem o núcleo hidrofóbico que se encontra no centro da molécula. Os anéis de Tyr4 e His6 formam um ângulo de  $\approx 35^\circ$ , enquanto que a distância entre os seus centros é de 6,1 Å. O anel fenil da Phe8 encontra-se orientado na direcção do “centro” hidrofóbico formado pela Tyr4 e pela His6 (figura 1.8).

Spyroulias *et al.*, (2003) demonstraram ainda que os terminais do péptido possuem um carácter hidrofílico devido à densidade de cargas negativas no terminal C e à densidade de cargas positivas no terminal N (figura 1.8), tais propriedades impõem à Angiotensina I um carácter de dipolo.

Um outro estudo de ressonância magnética nuclear da Angiotensina foi realizado por (Galardy *et al.*, 1976). Estes autores estudaram a dependência da conformação da Angiotensina do pH. Observaram que o isómero cis (em menor quantidade) e o isómero trans (em maior quantidade) são claramente visíveis para as ressonâncias do carbono  $\gamma$  da prolina 7 a elevado valor de pH, enquanto que apenas a baixo pH o trans é visível. Mostraram assim a possibilidade de isomerização cis-trans da prolina 7 no péptido Angiotensina.

A existência de duas conformações para a Angiotensina II a elevados valores de pH pode ser relevante em termos de actividade biológica. O aumento da actividade biológica observado para a Angiotensina II com o aumento de pH pode assim ser resultado da existência do isómero cis-prolina (Schaechtelin *et al.*, 1974).



Estrutura principal

**Figura 1.8.** Estrutura da Angiotensina I. Os potenciais electrostáticos à superfície molecular estão codificados por cores: potenciais menores que  $-10$  kT estão ilustrados a vermelho, potenciais superiores a  $10$  kT estão a azul e potenciais neutros ( $0$  kT) estão a branco ( $k$  é a constante de Boltzmann,  $1,380622 \times 10^{-23}$  J/K e  $T$  é a temperatura absoluta) (Spyroulias *et al.*, 2003).

### **1.5.2. Péptidos derivados da Angiotensina I**

É sabido que factores como a composição e sequência em aminoácidos de um péptido e o tamanho da sua cadeia podem afectar fortemente a sua retenção em cromatografia de interacção hidrofóbica. Apesar de a hidrofobicidade relativa dos diferentes péptidos poder ser avaliada por diferentes métodos, a compreensão a nível molecular de como os diferentes aminoácidos presentes interagem com a superfície hidrofóbica não é facilmente obtida (Liu *et al.*, 2006). De acordo com Liu *et al.*, (2006) a interacção hidrofóbica pode ser dividida em cinco sub-processos sequenciais: (a) moléculas de água ou iões que rodeiam a superfície das biomoléculas são excluídas, (b) moléculas de água ou iões que rodeiam o adsorvente de HIC são excluídas; (c) interacções hidrofóbicas entre a biomolécula e o adsorvente, (d) rearranjo estrutural da biomolécula no adsorvente e (e) rearranjo estrutural no seio da solução das moléculas de água e iões excluídos. A forma como cada aminoácido participa em cada sub-processo necessita de ser elucidada.

De forma a interpretar a contribuição hidrofóbica no processo de adsorção de alguns dos aminoácidos na Angiotensina I foi realizado um estudo alterando apenas um aminoácido na sua sequência. Neste estudo aplicamos na substituição apenas aminoácidos alifáticos. O grupo dos aminoácidos alifáticos é considerado o maior grupo de aminoácidos que contribui para a hidrofobicidade das biomoléculas. Num estudo realizado por Liu *et al.*, (2006) a contribuição hidrofóbica dos aminoácidos alifáticos segue uma determinada ordem: leucina> isoleucina> valina> alanina. Este resultado é semelhante aos obtidos pelas diferentes escalas de hidrofobicidade. Com excepção da leucina que aparece como sendo mais hidrofóbica que a isoleucina. Num estudo realizado por Meek (1980) os coeficientes de retenção (em minutos) determinados por HPLC de fase reversa numa coluna de ODS demonstraram que os aminoácidos alifáticos e aromáticos contribuem positivamente para os valores de retenção e que se alteram com as pequenas variações de pH. Os resíduos com cadeias acídicas contribuem negativamente para os valores de retenção que aumentam de magnitude com o aumento do seu estado ionizado. Os resíduos dos aminoácidos básicos e neutros contribuem com um pequeno efeito na retenção (Meek, 1980).

## **1.6. Aspectos gerais dos suportes utilizados em HIC**

O primeiro tipo de fase estacionária hidrofóbica foi obtido por ligação de vários aminoácidos apolares a um suporte inerte ou matriz (Rimerman e Hatfield, 1973). O suporte mais usado foi a agarose mas a celulose, dextrano e sílica também foram empregues (Queiroz *et al.*, 2001). Inicialmente a fase estacionária usada em HIC exibia tanto um carácter hidrofóbico como iónico (Er-el *et al.*, 1972; Yon, 1972; Hofstee, 1973) resultando da ligação de grupos amina alifáticos e aromáticos à agarose (Sephacrose) pelo método do brometo de cianogénio (Axén *et al.*, 1967). Assim o fraccionamento cromatográfico obtido com estas fases estacionárias era devido tanto a interacções electrostáticas como hidrofóbicas com as proteínas (Queiroz *et al.*, 2001).

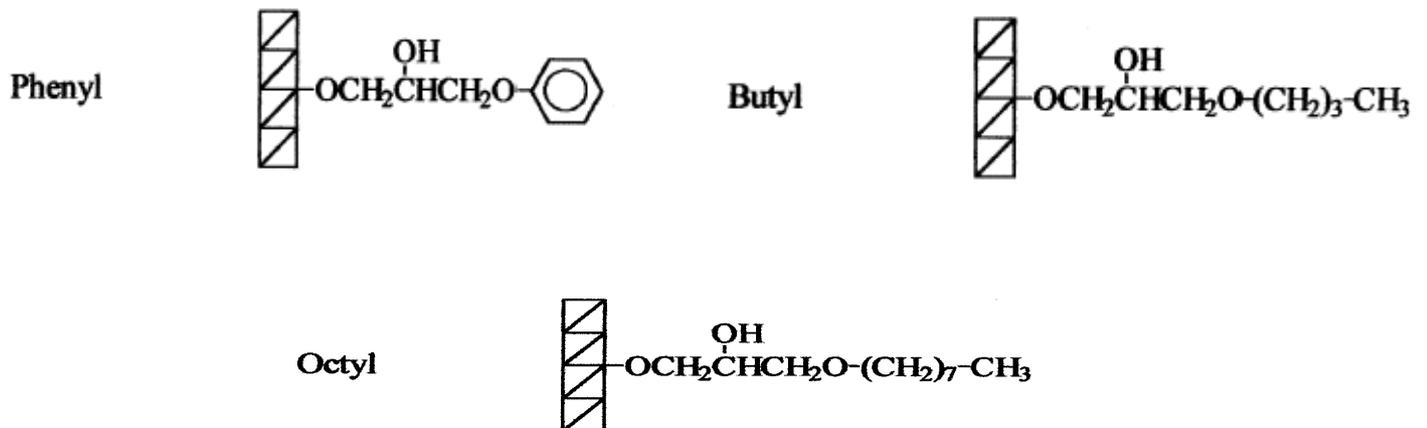
Porath *et al.*, (1973), Hjertén *et al.*, (1974) foram os primeiros investigadores a sintetizar adsorventes hidrofóbicos não carregados. Hjertén *et al.*, (1974) aplicou um método baseado no éter glicidil que hoje em dia é muito aplicado na produção dos géis comerciais phenyl e octyl Sepharose.

Os géis constituídos por polissacarídeos (agarose) são os suportes mais usados na tradicional HIC de baixa pressão, no entanto em HIC de alta pressão têm sido introduzidas várias fases estacionárias baseadas em suportes orgânicos e inorgânicos constituídas por micropartículas rígidas (Queiroz *et al.*, 2001).

Os vários tipos de fases estacionárias podem diferir no tipo de ligando, no tamanho da cadeia do ligando, na densidade de ligando e no tipo de matriz ou suporte.

Os ligandos mais usados em HIC são cadeias lineares de alcanos com ou sem um grupo amino terminal. Phenyl (e outros grupos aromáticos) são também usados como ligandos com bons resultados devido à mistura de interacções hidrofóbicas com interacções aromáticas (II-II). Para um grau de substituição constante na matriz a hidrofobicidade e a força de interacção aumenta com o aumento do comprimento da cadeia alquil linear: metyl<ethyl<propyl< butyl<l pentyl< hexyl< heptyl <octyl no entanto a selectividade de adsorção pode decrescer (Queiroz *et al.*, 2001).

Neste trabalho foi usada como matriz a Sepharose. Os suportes comerciais utilizados (figura 1.9) são sintetizados por imobilização covalente de Phenyl em Sepharose High Performance, Butyl em Sepharose 4 Fast Flow e Octyl em Sepharose CL-4B, respectivamente.



**Figura 1.9.** Estrutura da Phenyl-Sepharose High Performance, Butyl-Sepharose 4 Fast Flow e Octyl-Sepharose CL-4B, respectivamente (Queiroz *et al.*, 2001).

A matriz Phenyl Sepharose High Performance é formada por acoplamento de ligandos phenyl, a agarose 6% via ligações éter estáveis e tanto a Butyl -Sepharose 4 Fast Flow como a Octyl-Sepharose CL-4B são formadas por acoplamento de ligandos butyl e octyl, respectivamente, a agarose 4% via também ligações éter estáveis (Pharmacia).

## **2- Objectivos**

Existe um interesse prático considerável em desenvolver um melhor entendimento dos mecanismos subjacentes à adsorção de biomoléculas em cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC).

Assim sendo, o principal objectivo deste trabalho é investigar o mecanismo pelo qual o péptido Angiotensina I, estruturalmente mais simples que uma proteína, adsorve ao suporte cromatográfico de interacção hidrofóbica. Sob condições cromatográficas lineares, são analisados no processo os efeitos da temperatura, do suporte, da concentração e tipo de sal e da substituição de aminoácidos no péptido.

### **3. Procedimento Experimental**

#### **3.1. Reagentes**

##### **3.1.1. Fase estacionária**

Os suportes de HIC usados neste trabalho foram a Phenyl-Sepharose High Performance, Butyl-Sepharose 4 Fast Flow, e a Octyl-Sepharose CL-4B (figura 1.9), ambas adquiridas à GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden). Cada suporte é empacotado numa coluna com uma altura de 1,9 cm e com um diâmetro de 1,0 cm. Algumas das características dos suportes são enumeradas na tabela 3.1 a 3.3.

**Tabela 3.1:** Características da Phenyl-Sepharose High Performance (Pharmacia).

<b>Estrutura dos poros</b>	Agarose a 6%, em forma esférica
<b>Tamanho mínimo das partículas</b>	34 $\mu\text{m}$
<b>Limites das dimensões das partículas</b>	24-44 $\mu\text{m}$
<b>Grau de substituição</b>	Aproximadamente 25 $\mu\text{m}$ de phenyl/ mL de gel

**Tabela 3.2:** Características da Butyl-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia).

<b>Estrutura dos poros</b>	Agarose a 4%, em forma esférica
<b>Tamanho mínimo das partículas</b>	90 $\mu\text{m}$
<b>Limites das dimensões das partículas</b>	45-165 $\mu\text{m}$
<b>Grau de substituição</b>	Aproximadamente 50 $\mu\text{mol}$ de grupos butyl/ mL de gel

**Tabela 3.3:** Características da Octyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia).

<b>Estrutura dos poros</b>	Agarose a 4%, em forma esférica
<b>Tamanho mínimo das partículas</b>	90 $\mu\text{m}$
<b>Limites das dimensões das partículas</b>	45-165 $\mu\text{m}$
<b>Grau de substituição</b>	Aproximadamente 40 $\mu\text{m}$ de octyl/ mL de gel

### 3.1.2. Péptidos

A Angiotensina I Humana (figura 1.8) com um grau de pureza superior a 90% (HPLC) foi escolhida como péptido de estudo. A angiotensina I é um péptido com peso molecular de 1296 Da e cuja sequência de aminoácidos é Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu; foi adquirida à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), e foi usada sem purificações adicionais.

Outros péptidos (tabela 3.4 e 3.5) também aplicados no sistema de cromatografia líquida foram os derivados da Angiotensina I Humana também estes adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). O estudo destes péptidos foi realizado de modo a interpretar o papel de cada aminoácido substituído no péptido no processo de adsorção por interacção hidrofóbica.

**Tabela 3.4.** Características dos péptidos usados.

<b>Péptidos derivados da Angiotensina I</b>	<b>Sequência</b>	<b>Massa Molecular (Da)</b>	<b>Pureza (%)</b>
Ile 10	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Ile	1297	95
Ala 10	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Ala	1254	88
Val 10	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Val	1282,5	97
Val 5	Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Leu	1282	93
Val 7	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Val-Phe-His-Leu	1299	95

**Tabela 3.5.** Apresentação dos valores de hidrofobicidade a pH 6.8 dos vários péptidos estudados ([https://www.sigmaaldrich.com/cgibin/hsrun/Suite7/Suite/HAHTpage/Suite.HsDesignTool.run?prod\\_type=PPEPTIDE](https://www.sigmaaldrich.com/cgibin/hsrun/Suite7/Suite/HAHTpage/Suite.HsDesignTool.run?prod_type=PPEPTIDE)).

<b>Angiotensina e péptidos derivados desta</b>	<b>Hidrofobicidade (pH 6.8)</b>
Angiotensina I	33,60
[Isoleucina 10] – Angiotensina I	33,50
[Alanina 10] -Angiotensina I	27,70
[Valina 10] -Angiotensina I	31,20
[Valina 5] -Angiotensina I	31,30
[Valina 7] -Angiotensina I	45,80

### 3.1.3. Outros reagentes

Em todas as experiências foi usado tampão fosfato (pH 7) o qual consiste numa mistura de soluções de fosfato de sódio dibásico e monobásico (tabela 3.6). Como modelador foram utilizados o sulfato de amónio e sódio (tabela 3.6). Outros reagentes utilizados na técnica de HIC são igualmente enumerados na tabela 3.6.

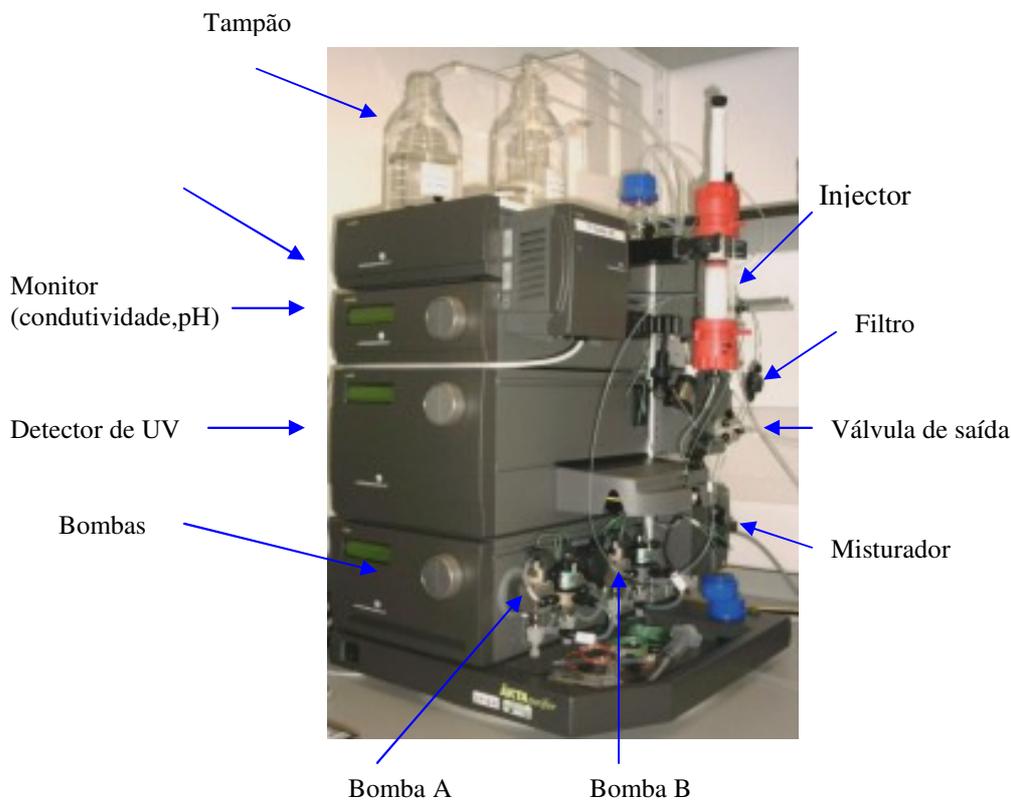
**Tabela 3.6.** Reagentes utilizados na técnica de cromatografia de interacção hidrofóbica.

Reagentes	Grau de pureza (%)	Marca
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	99,5%	Panreac
Hidróxido de sódio (NaOH)	> 98%	Pronalab
Ácido clorídrico (HCl)	≥ 99,5%	Merck
Cloreto de sódio (NaCl)	≥ 99,5%	Merck
Sulfato de amónio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	100%	Sigma-Aldrich
Sulfato de sódio (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	99%	Merck
Dihidrogenofosfato de sódio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	99%	Riedel-de-Haën
Hidrogenofosfato de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	99%	Sigma-Aldrich

## 3.2. Instrumentação

### 3.2.1. Equipamento

Para a obtenção dos diferentes dados experimentais foi utilizado o sistema cromatográfico de alta resolução (HPLC/FPLC), AKTA PURIFIER 10 da GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden) desenhado para separações rápidas e seguras de biomoléculas tais como proteínas, péptidos ou ácidos nucleicos. Este sistema pode ser utilizado em várias técnicas cromatográficas nas quais se aplicam gamas de trabalho que vão desde o  $\mu\text{g}$  ao mg, taxas de fluxo de 0,001 mL/min a 10 mL/min e pressões de 0-25 MPa. O AKTA PURIFIER possui um sistema operacional de fácil execução, incorporando várias características que minimizam o tempo de preparação dos ensaios e maximizam a reprodutibilidade dos resultados. Os sistemas do AKTA PURIFIER são controlados pela UNICORN 5.11.



**Figura 3.1.** Figura representativa do sistema cromatográfico AKTA PURIFIER ([http://www.york.ac.uk/depts/biol/tf/protein\\_purifier.htm](http://www.york.ac.uk/depts/biol/tf/protein_purifier.htm)) (12/03/08).

A temperatura foi controlada por um banho da Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden) o Multi- Temp III, o qual circula através da camisa termostática, que envolve a coluna, água a temperatura constante com uma precisão de  $\pm 0,1$  °C.

### **3.2.2. Eluição isocrática**

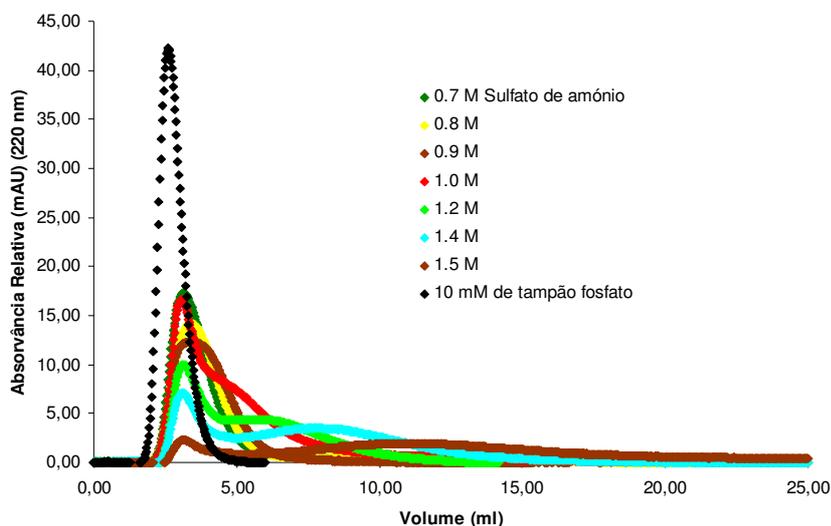
A determinação do factor de capacidade medido para a Angiotensina I e seus derivados foi realizada a várias temperaturas 288; 293; 298; 303 e 308 K. A coluna é inicialmente equilibrada com a fase móvel de interesse (sulfato de amónio ou sulfato de sódio com concentrações que variaram entre 0,5 e 1,5 M) a uma taxa de fluxo que variou entre 0,5 e 5,0 ml/min. Considera-se atingido o equilíbrio quando a linha de base do ultravioleta e a condutividade se mantêm estáveis. O tempo de retenção do soluto ( $t_r$ ) foi obtido através da injeção de 100  $\mu$ L de diferentes concentrações (0,1; 0,075; 0,050; 0,1 mg/ml) de Angiotensina I Humana e seus derivados (usando como solvente o tampão fosfato, pH 7, com modelador). O tempo de eluição de um composto não retido ( $t_0$ ) foi determinado injectando à mesma taxa de fluxo a mesma quantidade e concentração de amostra preparada em tampão fosfato sem modelador. O perfil da eluição foi determinado por medições contínuas de absorvância a 220 nm. Foram realizados entre 2 a 3 ensaios para o estudo do perfil de cada eluição. Posteriormente à eluição, a coluna foi lavada com 5 volumes de tampão fosfato 10 mM a pH 7 de forma a eluir qualquer material que tenha permanecido ligado hidrofobicamente à coluna e em seguida com água destilada e etanol 20%.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Adsorção da Angiotensina I em Butyl-Sepharose

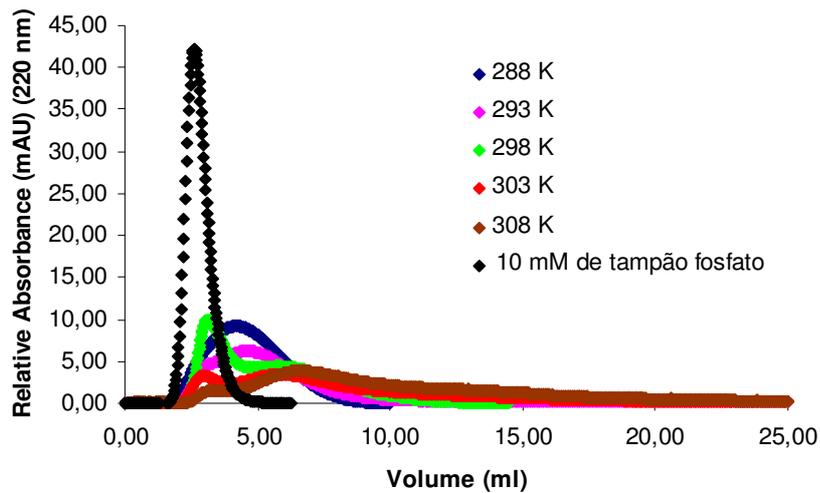
#### 4.1.1. Interpretação das curvas cromatográficas

O comportamento de retenção da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose foi investigado em função da concentração de sal (figura 4.1) e temperatura (figura 4.2). Sob condições de eluição isocrática e a elevadas concentrações de sal uma das características a salientar acerca da performance da Angiotensina I humana é o “tailing” do pico ou a presença de dois picos no perfil cromatográfico.

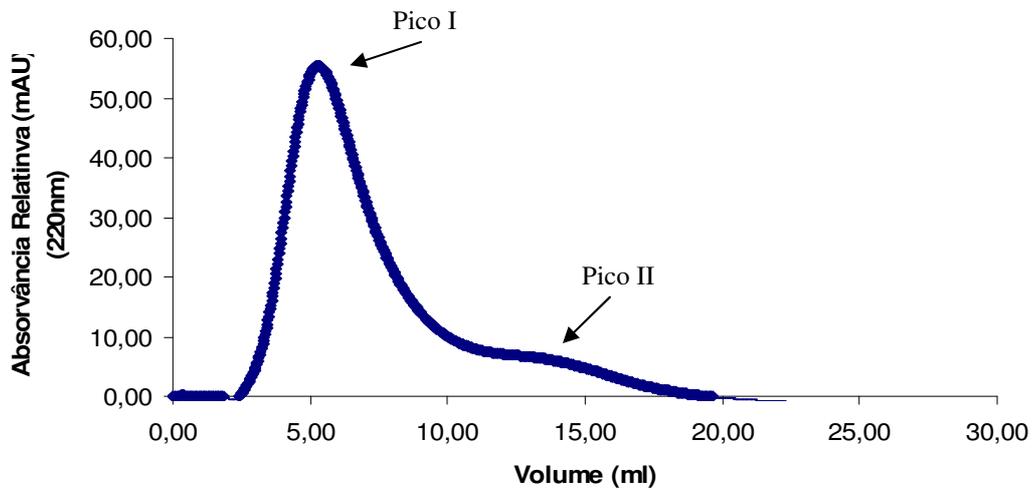


**Figura 4.1.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

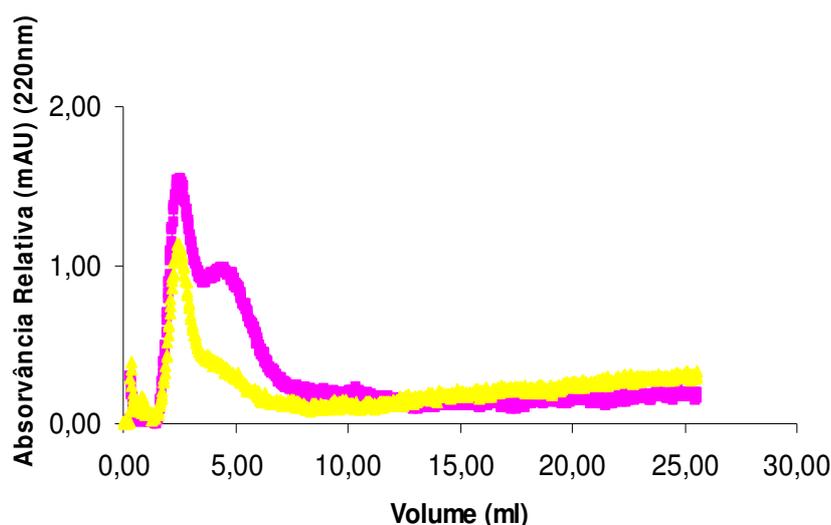
A presença de mais picos num cromatograma do que o esperado com base no número de componentes na amostra é usualmente atribuído a impurezas. Para testar esta hipótese, os picos I e II resultantes da separação mostrada na figura 4.3.A foram recolhidos e re-cromatografados sob as mesmas condições. Ambas as fracções, apesar da sua homogeneidade inicial, eluíram também como dois picos (figura 4.3.B). Com base nestes resultados, é pouco provável a presença de impurezas o que era de esperar uma vez que a Angiotensina I utilizada apresenta uma pureza superior a 95%.



**Figura 4.2.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.



**Figura 4.3.A.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (0,5ml/min) da Angiotensina I (0,075 mg/ml) numa coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 1,2 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

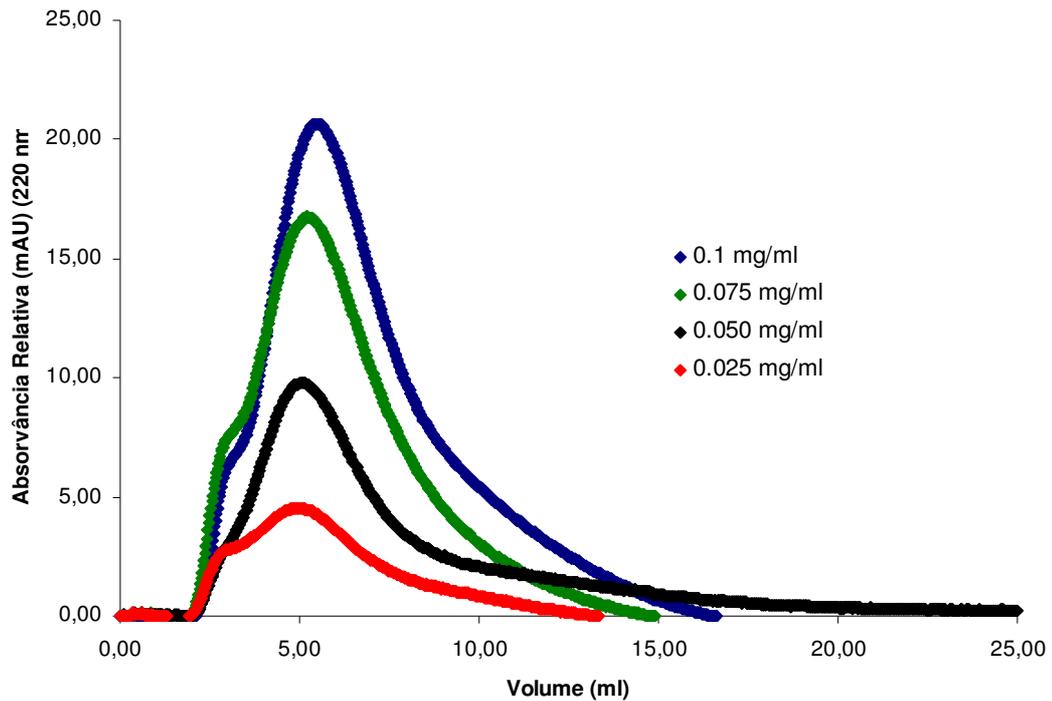


**Figura 4.3.B.** Reinjecção (0,5 ml/min) das fracções colectadas da adsorção de Angiotensina I (0,075 mg/ml) numa coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 1,2 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 — Reinjecção do pico I; — Reinjecção do pico II.

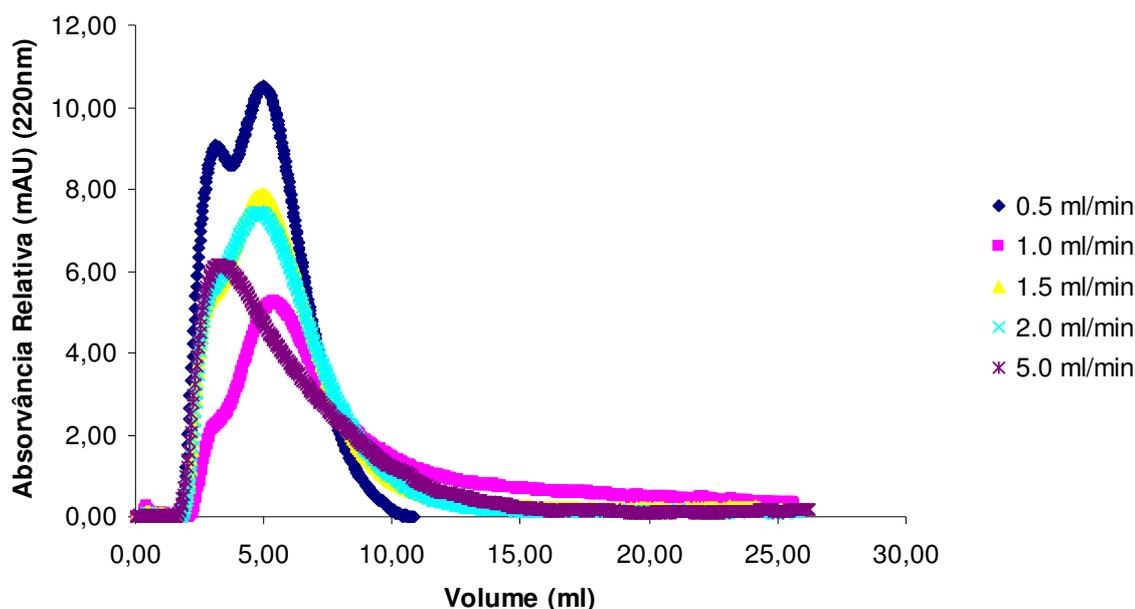
Existem, contudo uma série de razões físicas pelas quais uma substância pode produzir picos múltiplos. Entre estas razões físicas encontram-se uma introdução pobre da amostra na coluna, a heterogeneidade do empacotamento da coluna (Cavazzini *et al.*, 1999), uma má distribuição do fluxo de eluente (Horvath e Lin, 1976) e um perfil radial de temperatura na coluna não uniforme (Perchalski e Wilder, 1979). A introdução da amostra e o controlo do fluxo do eluente foram realizados correctamente considerando as características do sistema cromatográfico usado, o AKTA PURIFIER 10. De forma a verificar o empacotamento da coluna, o factor de assimetria ( $A_f$ ) foi calculado e o valor obtido foi de 1.5, um valor bastante razoável para colunas de HIC pequenas (Builder, 1993). Finalmente o perfil de temperatura na coluna foi assegurado por uma camisa de termostatização (adquirida à GE Healthcare) com uma precisão de  $\pm 0,1$  °C. Assim, nenhuma das razões físicas acima enumeradas parece estar na origem dos perfis cromatográficos observados neste trabalho. Uma outra interpretação dos resultados poderia ser a presença de uma superfície não homogénea (Jungbauer *et al.*, 2005). Podem existir zonas no suporte com elevada e baixa afinidade para as biomoléculas. Neste caso, a razão de ambos os picos seria constante e não deveria depender da concentração de sal na fase móvel (figura 4.1) e da temperatura (figura 4.2).

A cinética de transferência de massa e a sobrecarga da coluna podem também ser responsáveis pelo perfil cromatográfico aqui observado. O processo cinético que dita o “broadening” da banda de moléculas de baixo peso molecular, e de moléculas orgânicas rígidas é influenciado pela dispersão axial no seio da fase móvel, dispersão devido a uma transferência de massa lenta no espaço intrapartículas e dispersão devido à resistência de transferência de massa na fase móvel e na fase estacionária (Builder, 1993). Para compostos onde a área superficial molecular e a respectiva difusividade do soluto permanecem essencialmente constantes durante a análise cromatográfica, cada uma das contribuições para um “broadening” da banda enumeradas acima podem ser satisfatoriamente contabilizadas por tratamento teórico (Builder, 1993), designadamente a equação de Van Deemter. Dois pontos fundamentais distinguem a origem de um “broadening” do pico com origem na cinética de transferência de massa de outros efeitos, particularmente os de origem não linear. Sabe-se que o “broadening” de origem não linear diminui à medida que a concentração da amostra diminui, enquanto que o “broadening” com origem na cinética de transferência de massa é pouco afectado por tais alterações, também o “broadening” cinético é especialmente proeminente a elevadas velocidades (Fornstedt *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1988), mas o “broadening” não linear é quase independente da taxa de fluxo (Minoura *et al.*, 2002). Na figura 4.4 podemos observar que com a diminuição da concentração da amostra os perfis de eluição do péptido são idênticos sendo a área total do pico proporcional à concentração da amostra, também o tempo de retenção da amostra demonstrou pouca dependência da sua concentração. Por outro lado o “broadening” depende da taxa de fluxo (figura 4.5), podemos observar que o “broadening” aumenta com o aumento da taxa de fluxo como esperado da cinética de transferência de massa no entanto o “splitting” do pico é mais proeminente a velocidades lentas. Em condições extremas o “splitting” do pico com origem na cinética de transferência de massa pode ser observado quando uma porção da amostra injectada abandona a coluna a um tempo zero não sendo retida, enquanto que o resto da amostra elui com um perfil alongado (Cavazzini *et al.*, 1999). As tendências observadas com a variação da concentração de sulfato de amónio e da temperatura (figuras 4.1 e 4.2) à primeira vista parecem ser consistentes com um pico “flow-through”, mas não é o caso porque o primeiro pico elui a um tempo diferente do tempo de eluição do traço “inerte” ( $t_0$ ) (figura 4.1 e 4.2). Também, como referido anteriormente, a dependência do perfil cromatográfico da taxa de fluxo (figura 4.5) demonstrou um “splitting” do pico mais proeminente a baixas taxas de fluxo. A uma

taxa de fluxo baixa um pico “flow-through” é menos provável uma vez que existe tempo suficiente para ser estabelecido o equilíbrio entre a Angiotensina I ligada e não ligada. Logo para explicar estes resultados, outros mecanismos que não a cinética de transferência de massa e a sobrecarga da coluna devem ser tidos em conta.



**Figura 4.4.** Perfil da eluição (1ml/min) de diferentes concentrações de Angiotensina I numa coluna Butyl-Sepharose a 298,15 K com 1,2 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.



**Figura 4.5.** Efeito da taxa de fluxo na forma dos picos resultantes da adsorção da Angiotensina I a uma coluna de Butyl-Sepharose a 298.15 K em presença de 1,2 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

A agregação do soluto e alterações na composição molecular da área de contacto hidrofóbica estabelecida entre o soluto e os ligandos podem também causar o “broadening” e/ou “splitting” do pico. A agregação do soluto não é provavelmente responsável pelo fenómeno observado sob as condições cromatográficas de interacção hidrofóbica usadas e a concentração de péptido empregue.

As variações na composição molecular da área de contacto hidrofóbica estabelecida entre o soluto e os ligandos cromatográficos pode ser a causa para o “broadening” da banda ou até mesmo do “splitting” do pico, mas se for este o caso, apenas ocorrerá durante o contacto com a fase estacionária, após a interacção o péptido sofre uma “re-conformação” uma vez que o perfil de eluição da Angiotensina I (figura 4.3.A) e a reinjecção das fracções colectadas são semelhantes (figura 4.3.B).

A interconversão entre diferentes estados conformacionais pode levar à formação de regiões de interacção múltiplas envolvendo a superfície da molécula e dos ligandos imobilizados no suporte e a alterações na cinética de adsorção (Purcell *et al.*, 1993).

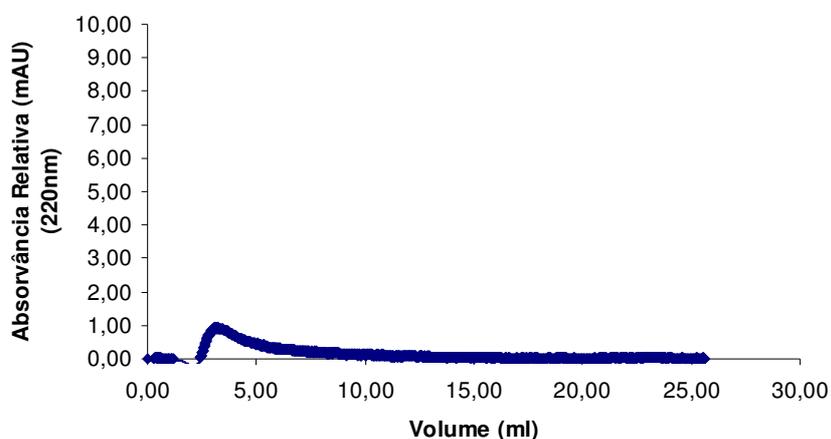
Associadas com a interconversão conformacional estão mudanças nas dimensões hidrodinâmicas dos péptidos as quais influenciam as suas propriedades de difusão,

contudo as mudanças nas regiões interactivas do péptido terão um efeito mais significativo no perfil experimental observado (Purcell *et al.*, 1993), particularmente quando esta alteração ocorre na presença da superfície cromatográfica. A capacidade de detectar e resolver estes intermediários cinéticos dependerá da sensibilidade da técnica de espectroscopia, do tempo de relaxação cromatográfica associado com os diferentes fenómenos, da magnitude das diferenças entre o tempo de retenção para as diferentes espécies, e na variância do pico de cada espécie (Melander *et al.*, 1982).

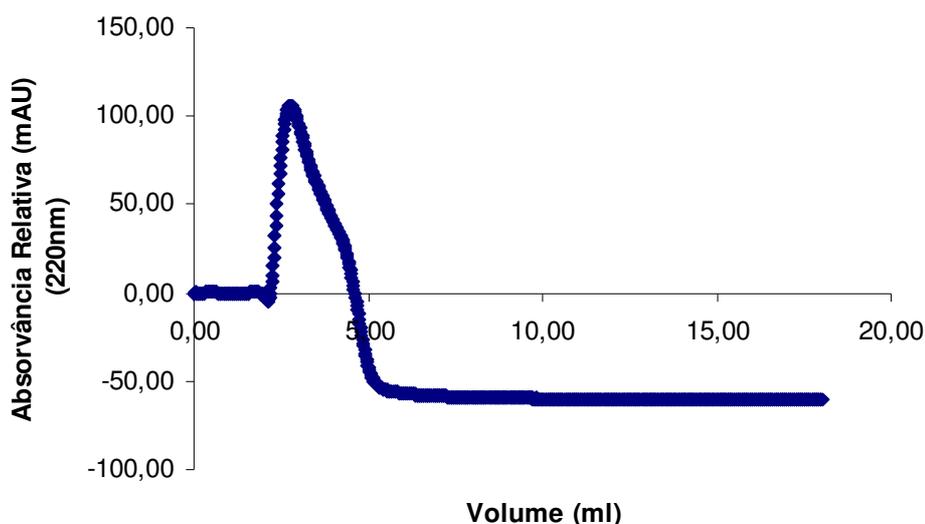
É sabido que os péptidos podem estar tanto na conformação cis como na trans no que respeita à ligação amida, no entanto a maior parte dos péptidos existem exclusivamente na forma trans. Contudo, uma mistura dos isómeros pode muitas vezes ser observada com péptidos que contêm um grupo amino secundário (prolina ou os aminoácidos N-alquilados). A prolina é conhecida como tendo um papel único, uma vez que a sua cadeia lateral se encontra ligada a um átomo de azoto  $\alpha$ , o isómero cis deste péptido é apenas ligeiramente menos estável do que o isómero trans e ambos os isómeros são geralmente observados durante os estudos de NMR de pequenos péptidos que contêm na sua composição o aminoácido prolina (Lebl *et al.*, 1991). A Angiotensina I como péptido precursor da Angiotensina II, um péptido que possui uma gama interessante de actividades biológicas e um interesse farmacológico bastante relevante, foi igualmente estudado por espectroscopia de  $^1\text{H}$  NMR (Spyroulias *et al.*, 2003; Liakopoulou-Kyriakides e Galardy, 1979; Galardy *et al.*, 1976). Este estudo demonstrou que estes péptidos exibem isomerismo cis-trans da ligação Histidina-Prolina (Galardy *et al.*, 1976). Esta observação é consistente com o facto de que a velocidade de isomerização de ambas as estruturas é lenta quando comparada com a escala de tempo da análise de NMR. A velocidade à qual uma nova composição de equilíbrio da mistura cis-trans é alcançada por pequenas variações das condições é relativamente lenta, (na mesma escala de tempo que uma corrida em FPLC) (Melander *et al.*, 1982). Assim, a rotação cis-trans da ligação prolina pode estar na origem dos perfis cromatográficos observados neste trabalho. O fenómeno poderá ser causado por uma cinética de isomerização lenta que se encontra na mesma escala de tempo da separação cromatográfica (Melander *et al.*, 1982). Melander *et al.*, (1982) estudaram em detalhe o efeito da isomerização cis-trans de dipéptidos que continham na sua estrutura o aminoácido prolina por RPC. Os seus resultados demonstraram claramente que a isomerização lenta da ligação imido no péptido é a responsável pela formação do “splitting” do pico sob condições isocráticas; a área superficial hidrofóbica que afecta a

força da ligação do eluído à fase estacionária é diferente para a conformação trans e cis, a forma cis tem uma maior área superficial hidrofóbica. Também o estudo de Gesquire *et al.*, (1989) e Lebl *et al.*, (1991) acerca da isomerização cis-trans de pequenos péptidos com aminoácido prolina é consistente com esta conclusão. No entanto, o perfil cromatográfico observado no nosso estudo é distinto do estudo realizado por Yamasaki *et al.*, (1999) e Byun *et al.*, (2000). Nos seus estudos usando Angiotensina I, nenhum “broadening” da banda e/ou “splitting” do pico foi referido por estes autores. As diferenças observadas podem ter base nos diferentes sistemas péptido/adsorvente estudados (Phenyl-5PW, Ether-5PW e Synchropak pentyl columns), dando ênfase aos distintos comportamentos que os sistemas podem manifestar, e à importância de caracterizar cada sistema de forma independente.

Outra forma de analisarmos a origem do “splitting” do pico foi substituindo a prolina na posição 7 da Angiotensina I pela valina nesta mesma posição. Uma vez que este péptido modificado possui um coeficiente de hidrofobicidade maior que a Angiotensina I (tabela 3.5) em presença de 1,2 M de sulfato de amónio e à temperatura de 298 K ficou retido na coluna de Butyl-Sepharose tendo sido apenas eluído após a regeneração da coluna com tampão fosfato a pH 7 (figura 4.6.A e 4.6.B).



**Figura 4.6.A.** Cromatografia da interação hidrofóbica (1 ml/min) da [Valina 7] – Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a 298 K em presença de 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

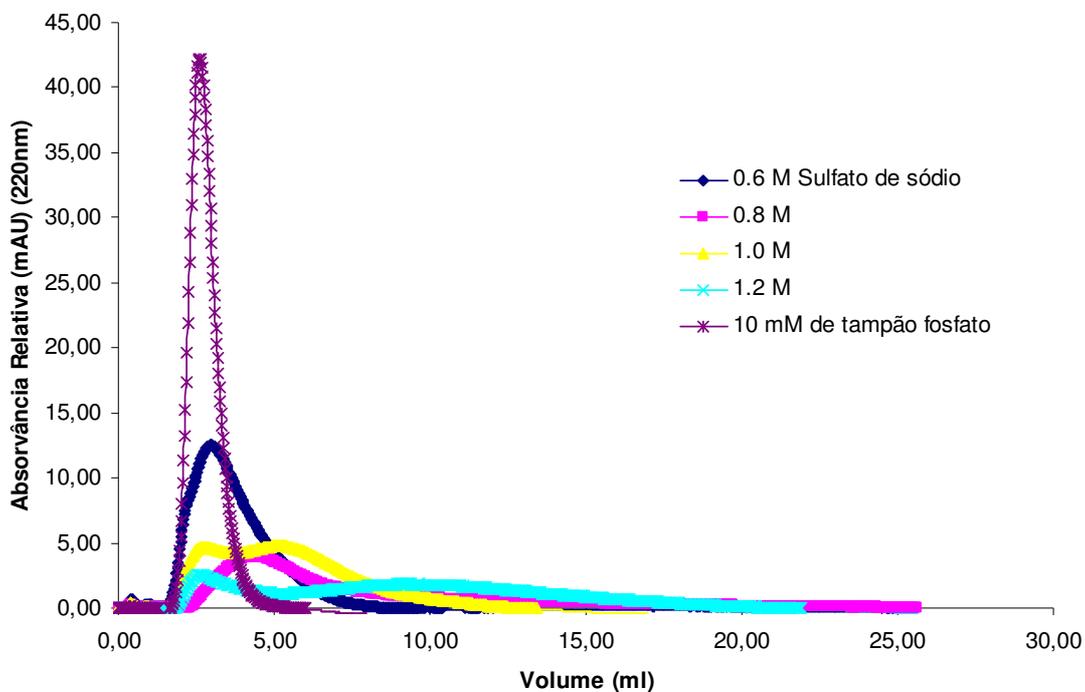


**Figura 4.6.B.** Regeneração da coluna (1 ml/min) após eluição da [Valina 7] – Angiotensina I (0,025 mg/ml) de uma coluna de Butyl-Sepharose a 298 K com 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

Com base na análise realizada neste ponto pode ser assumido que o primeiro pico, do perfil cromatográfico resultante da eluição da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose, representa a forma trans da Angiotensina I, o segundo pico representa a forma cis e a conversão entre estas duas formas é promovida em presença do suporte Butyl-Sepharose, a altas concentrações de sal no eluente. De facto, a análise dos perfis cromatográficos mostra que os dois picos se encontram em coalescência (figura 4.1 e 4.2) sugerindo que a região localizada entre eles contém moléculas que experimentaram uma alteração da conformação durante a eluição e que ocorreu uma isomerização cis-trans significativa da Angiotensina I na coluna (Gesquiere *et al.*, 1989). A semelhança entre o perfil da eluição da Angiotensina I (figura 4.3.A) e a reinjecção das fracções colectadas (figura 4.3.B) também reforça a ideia de um processo que ocorre na coluna seguido de uma rápida “re-conformação” do péptido após interacção. O progresso da alteração de conformação induzido pela interacção com a fase estacionária é claramente dependente do tempo de contacto. Previsivelmente, à medida que o tempo de contacto com o suporte aumenta, a probabilidade da molécula sofrer alteração da conformação aumenta simultaneamente, resultando como já foi dito anteriormente no aumento do “splitting” do pico observado a taxas de fluxo mais baixas (figura 4.5).

#### 4.1.2. Efeito do tipo e concentração de sal

Na região linear da isotérmica, a adsorção pode ser completamente caracterizada pelo comportamento do factor de retenção. Desta forma, os valores de retenção para a Angiotensina I humana numa coluna Butyl – Sepharose foram determinados em função do tipo e concentração de sal. A presença de sal desempenha uma grande influência sobre o modo de equilíbrio em HIC (Queiroz *et al.*, 2001). Assim, as eluições isocráticas para a Angiotensina I humana numa coluna Butyl-Sepharose foram obtidas aplicando diferentes concentrações de sulfato de amónio (figura 4.1) e sulfato de sódio (figura 4.7) a 298 K.



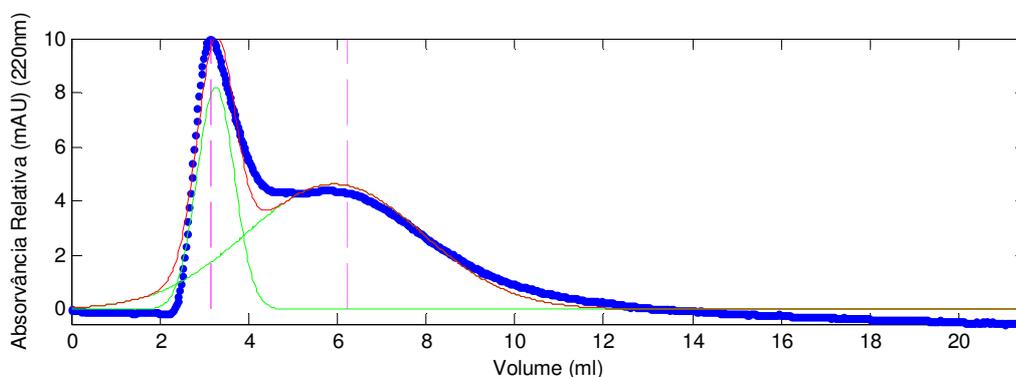
**Figura 4.7.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a 298,15 K usando como modelador diferentes concentrações de ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em 10mM de tampão fosfato, pH 7.

O factor de retenção,  $k'$ , medido sob condições isocráticas foi calculado directamente dos cromatogramas como:

$$k' = t_r - t_0 / t_0$$

onde o  $t_r$  é o tempo de retenção do soluto e  $t_0$  o tempo de eluição do soluto.

De forma a obter o tempo de retenção dos picos foi feito um “deconvolute” dos cromatogramas onde se verificava a existência de dois picos, utilizando a subrotina “Peak Fit” do programa MATLAB (figura 4.8).



**Figura 4.8.** Deconvolução do cromatograma de interacção hidrofóbica da Angiotensina I numa coluna Butyl-Sepharose, 298.15 K a 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de fosfato, pH 7. — Cromatograma real; — Picos individuais depois da deconvolução; — Cromatograma soma de picos após deconvolução.

Este estudo indicou que não existe uma retenção significativa para as concentrações mais baixas de sulfato de amónio 0,7; 0,8 e 0,9 M (tabela 4.1) a esta temperatura. Mas para concentrações mais elevadas deste sal a retenção da Angiotensina I humana neste suporte aumentou com o aumento da molaridade do sulfato de amónio na fase móvel (tabela 4.1), como esperado de acordo com a teoria solvofóbica. O mesmo resultado foi obtido aplicando diferentes concentrações de sulfato de sódio, para as concentrações mais baixas de sulfato de sódio (0,6 e 0,8 M) não existe uma retenção significativa (tabela 4.2) mas para as concentrações mais elevadas deste sal (1,0 e 1,2 M) a retenção da Angiotensina I humana aumentou com o aumento da molaridade de sulfato de sódio na fase móvel (tabela 4.2).

**Tabela 4.1.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7 a 298 K.

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (M)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
0,7	0,21	-
0,8	0,31	-
0,9	0,28	-
1,0	0,20	0,82
1,2	0,25	1,27
1,4	0,23	1,94
1,5	0,25	3,41

**Tabela 4.2.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7, a 298 K.

$[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ (M)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
0,6	0,10	-
0,8	0,70	-
1,0	0,07	1,03
1,2	0,12	2,67

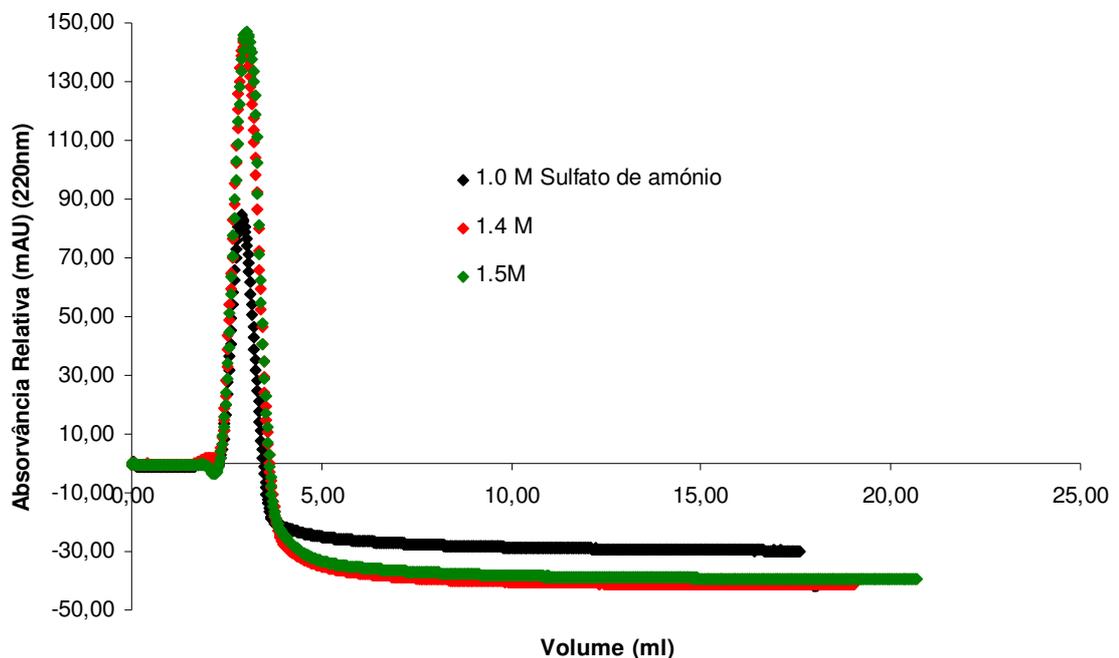
Quanto ao estudo do efeito do tipo de sal, indicou que a 298 K e para a mesma concentração a retenção em presença de sulfato de sódio é maior que em presença de sulfato de amónio, indicando que o sulfato de sódio tem uma maior habilidade para promover as interações hidrofóbicas entre a Angiotensina I e a Butyl-Sepharose. Este facto deve-se ao sulfato de sódio possuir um incremento de tensão superficial molal mais elevado que o sulfato de amónio ( $2,73 \times 10^{-3} \text{ dym g cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  versus  $2,16 \times 10^{-3} \text{ dym g cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , respectivamente) (Melander *et al.*, 1984; Shansky *et al.*, 1990) desta forma o sulfato de sódio irá promover um acréscimo da tensão à superfície superior ao sulfato de amónio, o qual fortalece a interacção péptido-ligando (Pahlman *et al.*, 1977; Melander e Horváth, 1977).

Pode observar-se através da (figura 4.1 e 4.7) que à medida que a concentração de sal aumenta, a área do primeiro pico diminui simultaneamente aumentando a área do segundo pico. Estes resultados podem ser interpretados com base nos factos enumerados no ponto 4.1.1 (Melander *et al.*, 1982; Lebl *et al.*, 1991; Galardy *et al.*, 1976; Gesquiere *et al.*, 1989) que: (i) a maior parte dos péptidos existem exclusivamente na forma trans, (ii) pequenos péptidos com prolina podem encontrar-se tanto na forma cis como na forma trans, (iii) interconversão entre a forma trans e cis é promovida na coluna (iv) devido a uma área hidrofóbica menor, a conformação trans do péptido elui mais rapidamente do que a conformação cis correspondente.

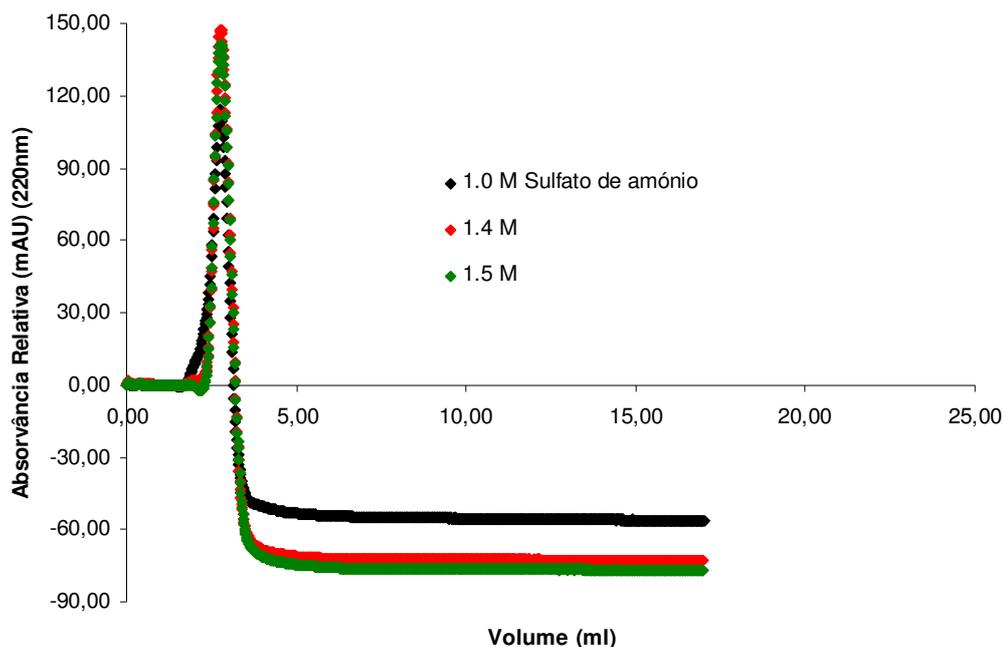
Das figuras 4.1 e 4.7 também pode ser observado que para concentrações de sal elevadas a retenção do segundo pico aumenta com o aumento da concentração de sal na fase móvel, este comportamento é de esperar uma vez que a conformação cis da Angiotensina I interage preferencialmente com a fase estacionária e a teoria solvofóbica prevê o aumento da retenção com o aumento da concentração de sal (tabelas 4.1 e 4.2). A energia livre das biomoléculas em solução é aumentada em presença de sulfato de amónio e sulfato de sódio, devido ao poder destes sais para estruturarem a água. A interacção entre a biomolécula e os ligandos aumenta à medida que a concentração do sal aumenta. As moléculas de sal removem algumas moléculas de água que se encontram a rodear a biomolécula e esta num esforço para reduzir a sua energia livre adsorve-se à superfície do gel. Como consequência a energia livre da biomolécula é reduzida porque a área superficial da biomolécula exposta ao sal é reduzida (Melander *et al.*, 1984).

A HIC é uma forma alternativa de explorar as propriedades hidrofóbicas das biomoléculas, trabalhando num ambiente mais polar e menos desnaturante que a RPC.

Como já foi dito anteriormente as interações hidrofóbicas são promovidas na presença de sal e assim as biomoléculas são retidas em presença de sais “salting-out”. Quando as biomoléculas em presença do sal são injectadas numa coluna de HIC sob condições isocráticas, dependendo da força de interacção podem ser observados diferentes cenários: as biomoléculas podem ser retardadas na coluna mas não retidas ou uma fracção da quantidade de amostra aplicada é eluída e o resto da amostra que ficou retida no suporte é desorvida com tampão de concentração salina baixa ou água. A interacção entre a Angiotensina I e a Butyl-Sepharose está relacionada com o primeiro cenário, a Angiotensina I foi apenas retardada mas não retida na coluna, uma vez que a regeneração da coluna com tampão fosfato 10 mM a pH 7.0 apresenta um perfil cromatográfico idêntico para as diferentes condições estudadas após a eluição da Angiotensina I a diferentes concentrações de sulfato de amónio (figura 4.9) ou após o equilíbrio da coluna com diferentes concentrações de sulfato de amónio (figura 4.10).



**Figura 4.9.** Regeneração da coluna (1ml/min) após eluição da Angiotensina I (0,025 mg/ml) de uma coluna de Butyl-Sepharose a 298. 15 K e diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.



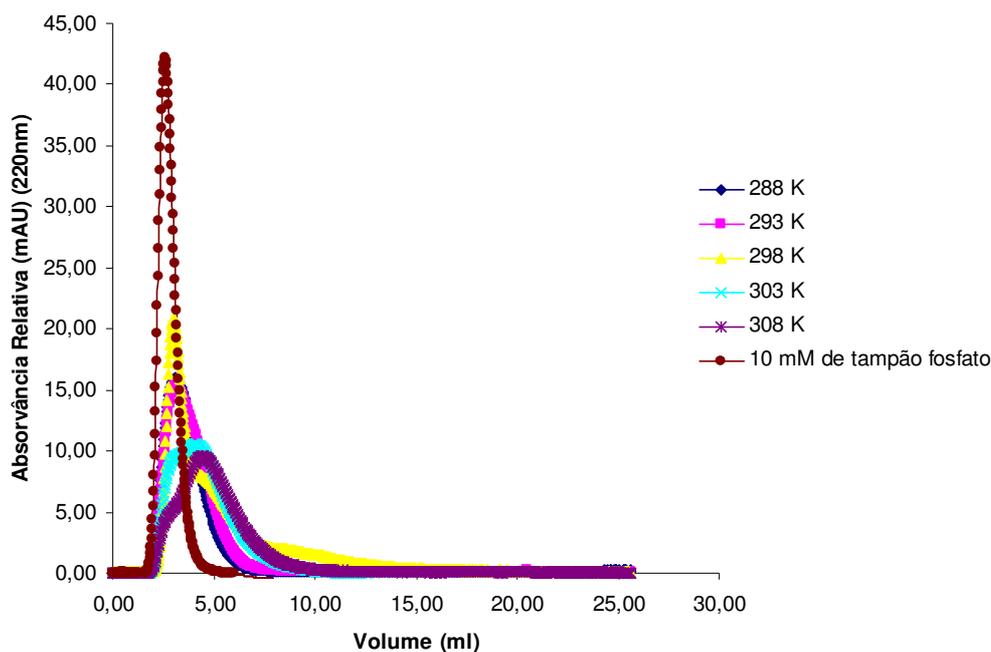
**Figura 4.10.** Regeneração da coluna (1ml/min) após equilíbrio da coluna de Butyl-Sepharose a 298. 15 K com diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.

Assim é observado neste estudo a alteração de conformação na coluna, seguida de uma rápida “re-conformação”, de uma biomolécula não retida em HIC sob condições isocráticas.

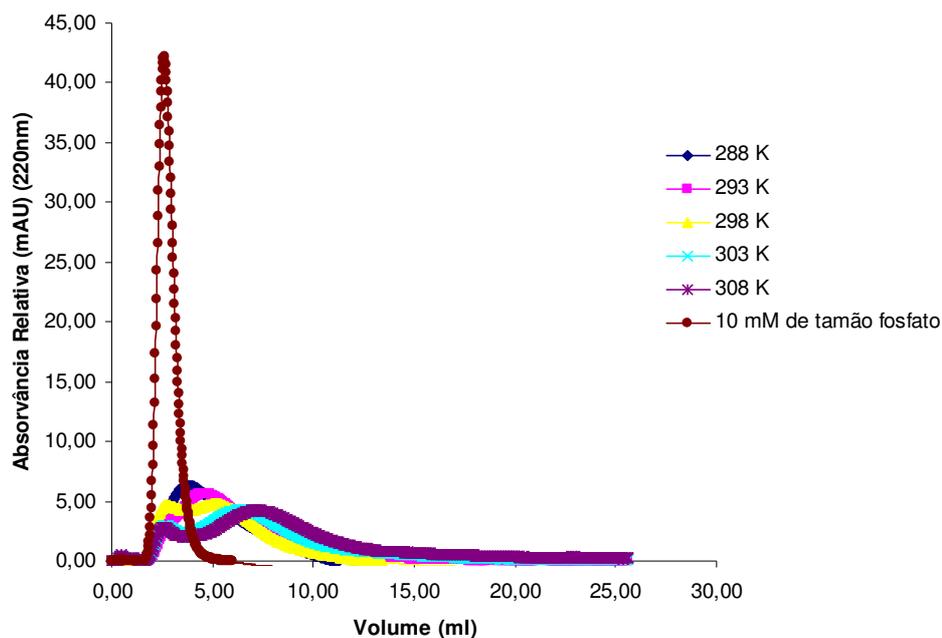
#### **4.1.3. Efeito da temperatura**

Uma vez que a temperatura tem um papel importante em HIC. O comportamento cromatográfico da Angiotensina I foi também analisado a diferentes temperaturas. Em HIC, sob condições de não sobrecarga, quando a superfície cromatográfica, as propriedades da fase móvel, a solubilidade da biomolécula em solução aquosa e o seu estado conformacional não variam com a temperatura, a HIC é um processo conduzido entropicamente, baixas temperaturas geralmente promovem a eluição da proteína, e o aumento da temperatura aumenta a retenção das proteínas (Hjertén *et al.*, 1974). Neste trabalho podemos observar, tanto em presença de sulfato de amónio como sulfato de sódio, que com o aumento da temperatura, a área do primeiro pico da Angiotensina I diminui simultaneamente com o aumento da área do segundo pico (figuras 4.2, 4.11 e 4.12). Este resultado, como referido anteriormente, é consistente com um processo de isomerização cis-trans. À medida que a temperatura aumenta a taxa de isomerização

também deverá aumentar, isto porque a energia de activação da isomerização cis-trans é tipicamente 20 Kcal/mol (Melander *et al.*, 1982; Brandts *et al.*, 1975; LaPlanche e Rogers, 1964; Love *et al.*, 1972). Por outro lado a temperatura tem um efeito menos dramático na retenção do que o efeito da concentração de sal, para as temperaturas mais altas a retenção do segundo pico é aproximadamente igual (figuras 4.2, 4.11 e 4.12 e tabelas 4.3 a 4.5).



**Figura 4.11.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.



**Figura 4.12.** Cromatografia de interação hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

**Tabela 4.3.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,2 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7.

Temperatura (K)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
288,15	0,60	-
293,15	0,61	1,32
298,15	0,25	1,27
303,15	1,08	3,26
308,15	1,55	3,17

**Tabela 4.4.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7.

Temperatura (K)	$k'$ (1ºpico)	$k'$ (2º pico)
288,15	0,19	-
293,15	0,20	-
298,15	0,20	0,82
303,15	0,17	0,72
308,15	0,16	0,78

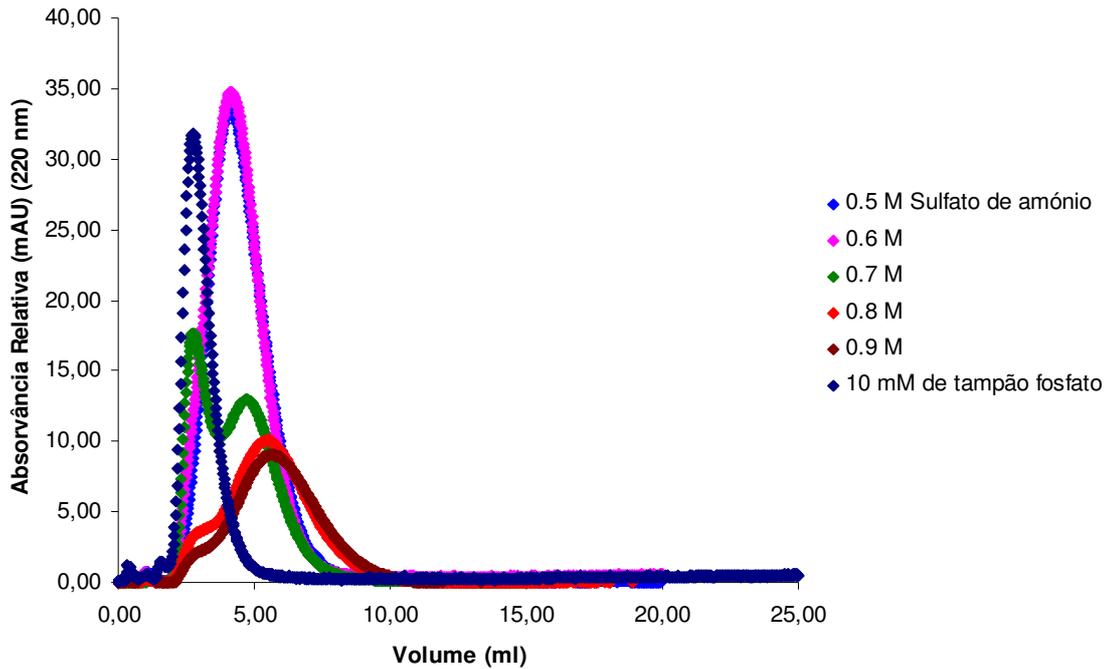
**Tabela 4.5.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Butyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,0 M de  $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7.

Temperatura (K)	$k'$ (1ºpico)	$k'$ (2º pico)
288,15	0,45	-
293,15	0,71	2,03
298,15	0,07	1,03
303,15	0,03	1,52
308,15	0,02	1,83

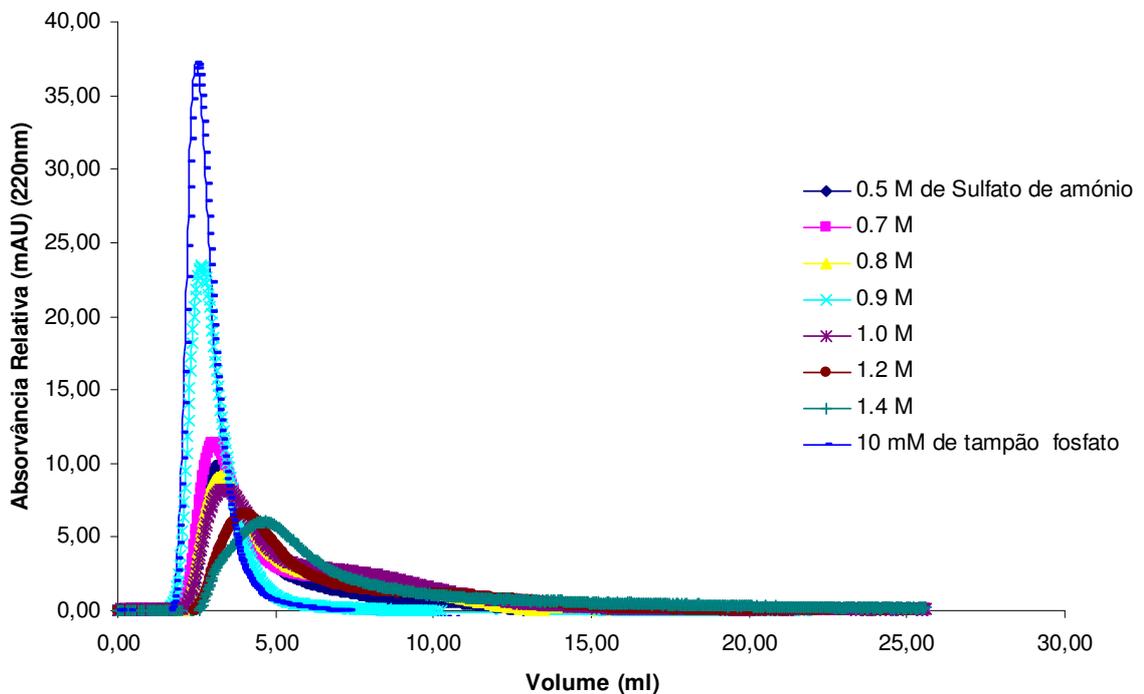
Em solução aquosa (Melander *et al.*, 1982; Lin e Brandts, 1979) a entalpia do equilíbrio cis-trans é aproximadamente zero, como resultado a composição de equilíbrio cis-trans não deverá ser influenciada pela temperatura e por conseguinte não é de prever alteração na retenção. Contudo, tendo em conta o efeito da temperatura em HIC é de esperar um ligeiro aumento na retenção devido ao aumento da magnitude das interacções hidrofóbicas com o aumento de temperatura e à alteração de conformação das biomoléculas e no concomitante aumento da área de contacto hidrofóbica durante a ligação à superfície cromatográfica (Vailaya *et al.*, 1998). Este facto pode ser observado às temperaturas mais altas nas figuras 4.2, 4.11 e 4.12 e nas tabelas 4.3 a 4.5.

#### **4.2. Efeito do tipo de ligando na adsorção da Angiotensina I**

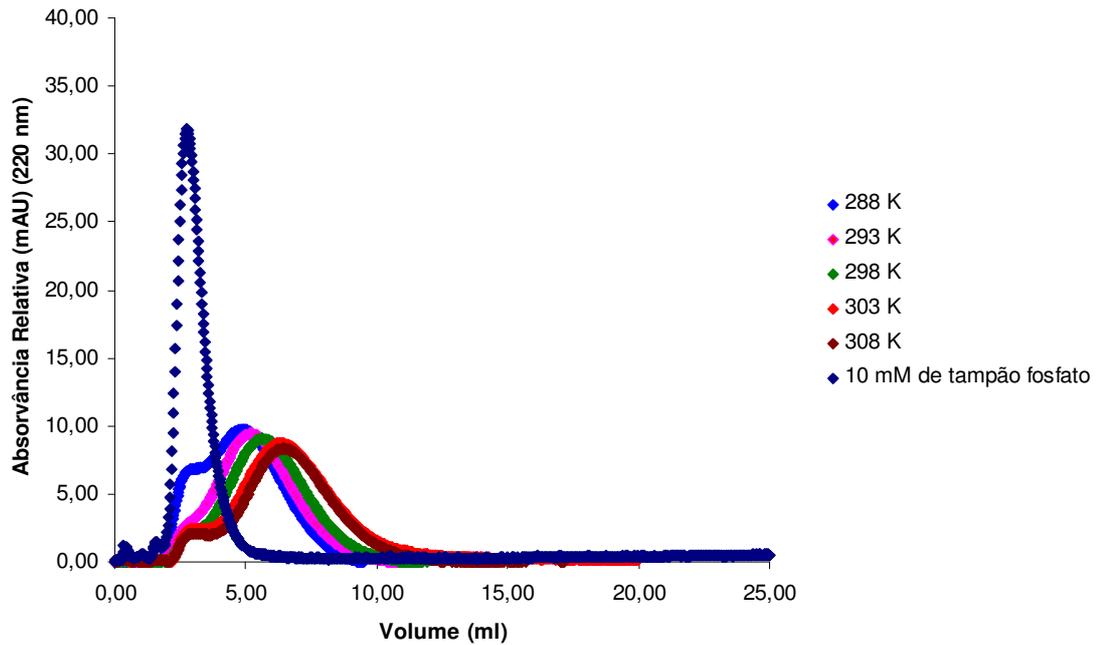
Com o intuito de obter uma visão mais geral acerca da retenção e alteração de conformação durante a adsorção da Angiotensina I seleccionamos uma variedade de fases estacionárias. As fases estacionárias estudadas neste trabalho consistiram de grupos apolares (phenyl, butyl e octyl) ligados a um suporte polimérico hidrofílico, a Sepharose. Deste modo o comportamento da retenção da Angiotensina I em presença de ligandos lineares (butyl e octyl) e aromáticos (phenyl) foi estudado em função da concentração de sal (figura 4.1, 4.13 e 4.14) e temperatura (figura 4.2, 4.15 e 4.16).



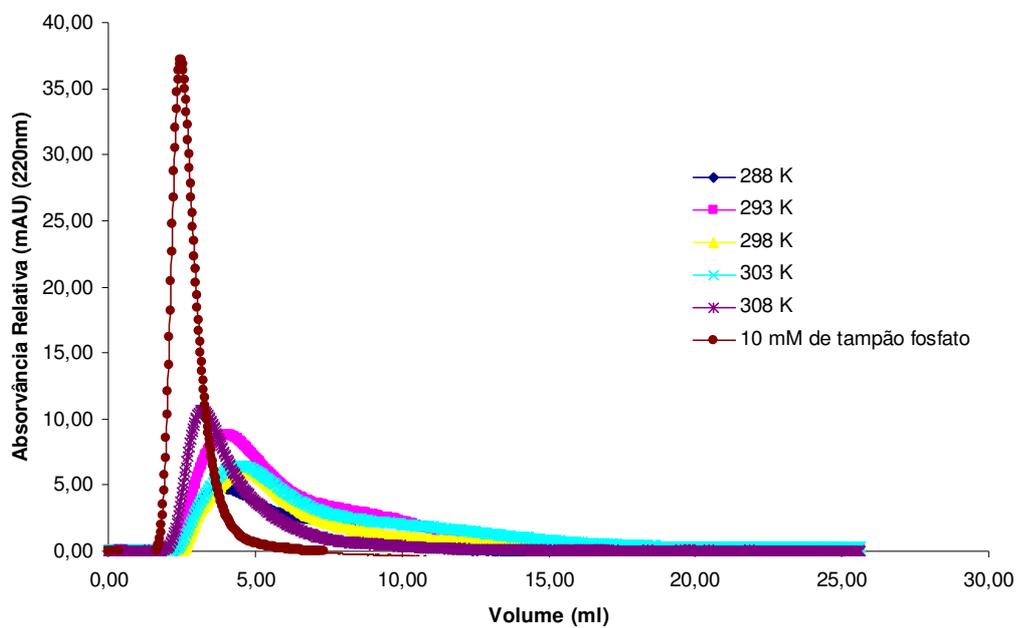
**Figura 4.13.** Cromatografia de interação hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Phenyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.



**Figura 4.14.** Cromatografia de interação hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.



**Figura 4.15.** Cromatografia de interação hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Phenyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 0,9 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.



**Figura 4.16.** Cromatografia de interação hidrofóbica (1ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Octyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

O perfil cromatográfico da Angiotensina I a 298 K nos vários suportes aqui estudados indicou que às concentrações mais baixas de sulfato de amónio quer na Butyl-Sepharose quer na Phenyl-Sepharose (0,5 a 0,8 M) não existe uma retenção significativa, mas para as concentrações mais elevadas de sal (tabela 4.1 e 4.6) a retenção aumentou com o aumento da concentração de sal na fase móvel. Já em presença da Octyl-Sepharose mesmo às concentrações mais baixas de sal foi observado alguma retenção (tabela 4.7).

**Tabela 4.6.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Phenyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7 a 298 K.

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (M)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
0,5	0,39	-
0,6	0,52	-
0,7	0,06	0,52
0,8	0,05	0,86
0,9	0,01	1,08

O efeito da temperatura no processo de interacção hidrofóbica com os diferentes suportes estudados (Phenyl e Octyl-Sepharose) seguiu uma tendência idêntica à apresentada em presença da Butyl-Sepharose no ponto 4.13, a taxa de isomerização parece aumentar com a temperatura e às temperaturas mais altas a retenção não varia significativamente (figura 4.15 e 4.16 e tabela 4.8 e 4.9).

**Tabela 4.7.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Octyl-Sepharose usando como modelador diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  preparadas em tampão fosfato, pH 7 a 298 K.

$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (M)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
0,5	0,32	1,06
0,7	0,31	1,71
0,8	0,37	1,70
0,9	0,07	1,99
1,0	0,43	1,72
1,2	0,64	2,14
1,4	0,88	2,66

**Tabela 4.8.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Phenyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 0,9 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7.

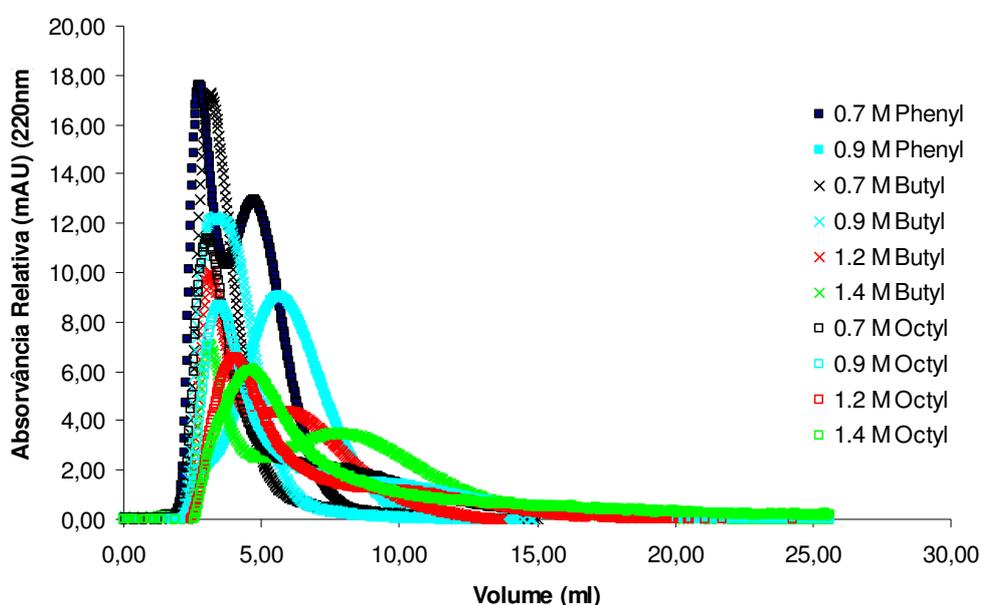
Temperatura (K)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
288,15	0,02	0,84
293,15	0,01	0,96
298,15	0,01	1,08
303,15	0,03	1,27
308,15	0,03	1,29

**Tabela 4.9.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna Octyl-Sepharose a diferentes temperaturas usando como modelador 1.4 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7.

Temperatura (K)	$k'$ (1º pico)	$k'$ (2º pico)
288,15	0,49	1,45
293,15	0,55	1,85
298,15	0,88	2,66
303,15	1,01	2,97
308,15	0,97	2,12

Vários autores afirmam que a hidrofobicidade e a força da interacção da biomolécula com a fase estacionária aumenta com o aumento do comprimento da cadeia n-alquilo apesar da selectividade da adsorção poder diminuir e ligandos com grupos aromáticos são aplicados em estudos com óptimos resultados devido à existência de interacções hidrofóbicas e aromáticas ( $\Pi$ - $\Pi$ ) (Queiroz *et al.*, 2001). Neste estudo podemos confirmar o facto verificado pelos autores acima referidos, uma vez que a ligação hidrofóbica do péptido ao suporte aumentou com o aumento do comprimento da cadeia n-alquilo no ligando (figura 4.17 e Anexo A, figura A1 e A2) e (tabela 4.10). Apesar do grau de substituição do suporte Butyl-Sepharose ser relativamente maior que o grau de substituição do suporte Octyl-Sepharose (tabela 3.2 e 3.3), o efeito do comprimento da cadeia n-alquilo sobrepõe-se ao efeito do grau de substituição do ligando no suporte.

Analisando os perfis cromatográficos em presença dos diferentes suportes observamos que à medida que a concentração de sal (figura 4.13, 4.14 e 4.17) e temperatura aumentam (figura 4.15 e 4.16) a área do primeiro pico diminui simultaneamente com o aumento da área do segundo pico, a mesma tendência que a observada no suporte Butyl-Sepharose (figura 4.1 e 4.2) enumerada no ponto 4.1.1.



**Figura 4.17.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna de Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7.

**Tabela 4.10.** Valores de  $k'$  obtidos para a eluição isocrática da Angiotensina I numa coluna de Phenyl, Butyl e Octyl-Sepharose a diferentes concentrações de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato, pH 7 a 298 K .

— Primeiro pico; — Segundo pico; X – Não foi realizado o ensaio.

Temperatura 298 (K)	$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (M)	Phenyl	Butyl	Octyl
		( $k'$ )	( $k'$ )	( $k'$ )
298	0,7	0,06	0,16	0,31
		0,52	-	1,71
	0,9	0,01	0,17	0,07
		1,08	-	1,99
	1,2	X	0,21	0,64
		X	1,28	2,14
1,4	X	0,16	0,88	
	X	1,92	2,66	

Com base na análise realizada no ponto 4.1.1 podemos igualmente sugerir que ao primeiro pico corresponde a forma trans do péptido e ao segundo pico a forma cis e que a conversão entre estas duas formas se dá em presença do suporte e é promovida pela temperatura e presença de sal. Nas mesmas condições, comparando a Butyl-Sepharose com a Phenyl-Sepharose podemos apontar que em presença desta última o péptido sofre uma alteração de conformação provavelmente promovida devido às interações aromáticas  $\Pi$ - $\Pi$  que este ligando possui, e assim deste modo irá promover a interação da Angiotensina I com a superfície cromatográfica a concentrações de sal mais baixas do que a Butyl-Sepharose. Pode dizer-se que tanto a Phenyl-Sepharose como a Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose actuam como catalisadores no processo de alteração de conformação da Angiotensina I.

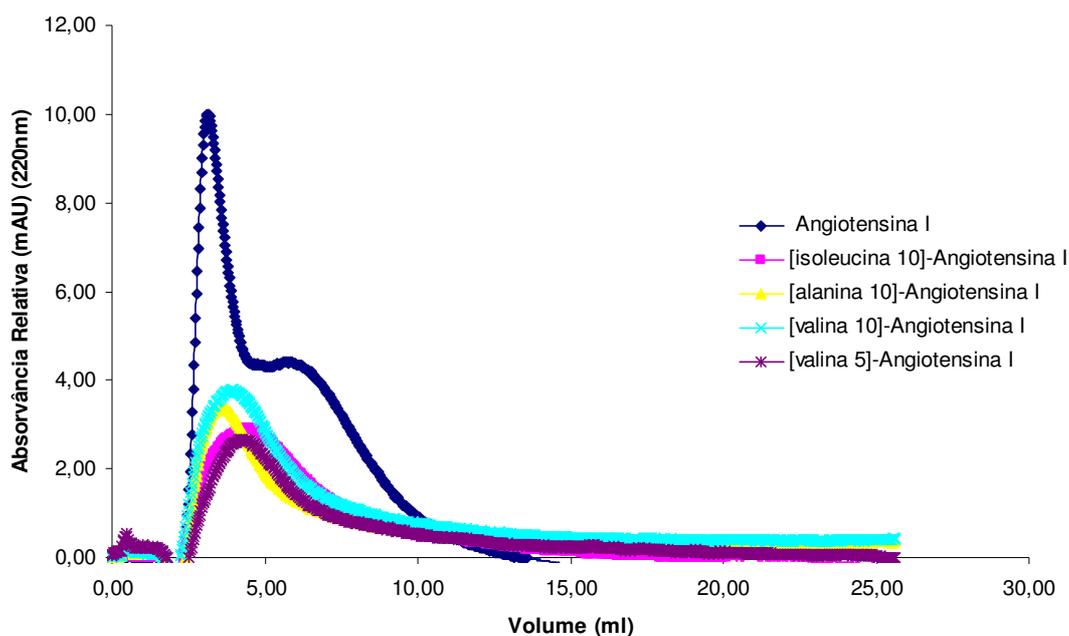
### **4.3. Adsorção de péptidos derivados da Angiotensina I em Butyl-Sepharose**

Foi reconhecido, desde há mais de 20 anos, que a não ser que os péptidos sejam objecto de restrições conformacionais, o comportamento cromatográfico destes em HPLC pode ser relacionado com a sua composição em aminoácidos (Biswas *et al.*, 2003). A HPLC de fase reversa tem sido frequentemente aplicada na criação de escalas de hidrofiliidade/hidrofobicidade (Tripet *et al.*, 2007). Inicialmente, esta aproximação envolve a atribuição de valores de hidrofiliidade/hidrofobicidade por análise de regressão dos tempos de retenção em HPLC de fase reversa de uma série de péptidos de diferente composição e comprimento (Meek, 1980; Meek e Rossetti, 1981; Sue *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1982; Sasagwa *et al.*, 1982; Jinno e Tanigawa, 1988; Valko *et al.*, 1997; Plass *et al.*, 1998; Sílvia *et al.*, 2001). Diferentes investigadores referiram que péptidos com 15-20 resíduos eram eluídos mais rapidamente do que o previsto pelo somatório simples dos coeficientes de hidrofobicidade (Wilson *et al.*, 1981; Sasagawa *et al.*, 1982; Nice *et al.*, 1981; Sue *et al.*, 1981; Wehr *et al.*, 1982). Este comportamento não ideal foi assumido como sendo devido à estrutura do polipéptido a qual pode remover certos aminoácidos do contacto hidrofóbico com a fase estacionária. Contudo Mant *et al.*, (1989) demonstraram que existe também uma dependência do tamanho da cadeia polipeptídica independente de quaisquer considerações conformacionais. O efeito da sequência em aminoácidos no péptido também foi estudado, Zhou *et al.*, (1990) sugeriram que os efeitos da sequência em aminoácidos podem ser divididos em 2 categorias: efeitos conformacionais e efeitos da vizinhança próxima. O primeiro dos efeitos resulta da adopção por parte do péptido de uma dada conformação na interacção com a fase estacionária. O segundo resulta da interacção entre cada aminoácido e o seu vizinho imediato o que vai restringir as conformações acessíveis à cadeia polipeptídica (Tripet *et al.*, 2007).

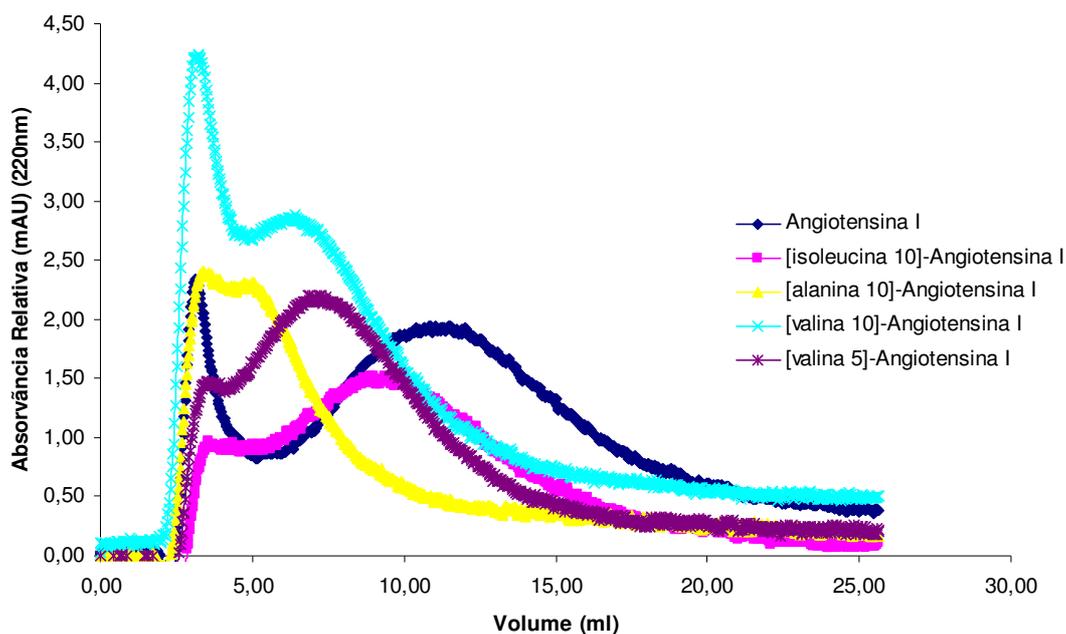
No presente estudo, decidimos investigar o efeito da substituição da [leucina 10] na Angiotensina I, pelos aminoácidos [isoleucina 10], [alanina 10] e [valina 10] e substituição da [isoleucina 5] no mesmo péptido pela [valina 5]. Este estudo foi realizado com o objectivo de interpretar o efeito destas substituições na interacção hidrofóbica destes péptidos com o suporte Butyl-Sepharose. Assim os valores de retenção da substituição da leucina 10 pela isoleucina 10, alanina 10 e valina 10 e

isoleucina 5 pela valina 5 na Angiotensina I foram determinados numa coluna Butyl-Sepharose tendo em conta o efeito da concentração de sulfato de amónio.

De uma forma geral através da observação do perfil da eluição destes péptidos verificamos que a 298 K a retenção aumentou com o aumento da molaridade do sal na fase móvel (figura 4.18 e 4.19) como era de esperar de acordo com a teoria solvofóbica. Pode observar-se através da figura 4.18 e 4.19 que à medida que a concentração de sal aumenta, a área do primeiro pico diminui e simultaneamente aumenta a área do segundo pico. Como já foi mencionado no estudo da adsorção da Angiotensina I os péptidos com prolina podem se encontrar tanto na conformação cis como na conformação trans, devido a uma menor área hidrofóbica a conformação trans elui mais rapidamente do que a conformação cis correspondente. Com o aumento da força iónica, a 1,5 M, podemos verificar um aumento da conversão da forma trans na forma cis.



**Figura 4.18.** Efeito da substituição da leucina 10 pela isoleucina, alanina e valina e substituição da isoleucina 5 pela valina na Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose usando como modelador 1,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K.



**Figura 4.19.** Efeito da substituição da leucina 10 pela isoleucina, alanina e valina e substituição da isoleucina 5 pela valina na Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna Butyl-Sepharose usando como modelador 1,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K.

Não existe dúvida de que os aminoácidos alifáticos são considerados os aminoácidos que mais contribuem para a hidrofobicidade das proteínas ou péptidos (Liu *et al.*, 2006). De entre os péptidos contendo este tipo de aminoácidos segundo Liu *et al.*, (2006) a contribuição hidrofóbica dos aminoácidos alifáticos segue a seguinte ordem: leucina>isoleucina> valina> alanina. Estes resultados são semelhantes à maior parte das escalas hidrofóbicas com exceção da leucina que aparece com um valor superior ao da isoleucina. Gehas e Wetlaufer (1990) mediram o tempo de retenção de dansil derivados com 20 aminoácidos comuns através da HIC e verificaram que a área exposta da isoleucina é maior do que a da leucina. A ordem da hidrofobicidade da leucina e isoleucina varia de acordo com os métodos usados para esta medição. A área superficial hidrofóbica da isoleucina é recorrendo ao cálculo maior do que a da leucina. Contudo de acordo com Biswas *et al.*, (2003) 7 de 13 estudos cromatográficos indicaram que a isoleucina é mais hidrofóbica que a leucina, e 5 de 9 estudos obtidos pelo método de partição de 2 fases demonstraram que a hidrofobicidade da leucina é maior que a da isoleucina.

No nosso estudo a 298 K e à concentração de 1,2 M de sulfato de amónio a retenção dos péptidos segue a ordem mencionada por Liu *et al.*, (2006) (figura 4.18 e tabela 4.11) apresentando a Angiotensina I (com leucina na posição 10) o factor de capacidade mais baixo. Neste caso verifica-se que a variação nos valores de retenção dos diferentes péptidos não está directamente correlacionada com o comprimento das cadeias dos aminoácidos. A variação observada a esta força iónica poderá remeter-nos para um processo de interconversão entre as duas conformações (cis-trans), ainda incompleto. De facto, a uma concentração de 1,5 M de sulfato de amónio verificamos que no primeiro pico os tempos de retenção correspondentes à substituição da [leucina 10] pelos diferentes aminoácidos (isoleucina, valina e alanina) na Angiotensina I não variam significativamente, isto é, os tempos de retenção para os vários péptidos estudados são semelhantes (figura 4.19 e tabela 4.12). Já no que diz respeito ao segundo pico, a variação nos tempos de retenção segue a ordem proposta por Liu *et al.*, (2006) (figura 4.19 e tabela 4.12). Este estudo demonstra ainda o envolvimento da leucina 10 na interacção com a superfície cromatográfica.

**Tabela 4.11.** Valores de  $k'$  da retenção dos péptidos derivados da Angiotensina I, numa coluna de Butyl-Sephacrose usando como modelador 1,2 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato , pH 7 a 298 K.

<b>Péptidos derivados da Angiotensina I</b>	<b><math>k'</math> (1ºpico)</b>	<b><math>k'</math> (2º pico)</b>
Angiotensina I	0,25	1,27
[Isoleucina 10] – Angiotensina I	0,78	1,65
[Alanina 10] -Angiotensina I	0,50	2,19
[Valina 10] -Angiotensina I	0,74	3,17
[Valina 5] -Angiotensina I	0,88	2,90

**Tabela 4.12.** Valores de  $k'$  da retenção dos péptidos derivados da Angiotensina I, numa coluna de Butyl-Sepharose usando como modelador 1,5 M de  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  em tampão fosfato , pH 7 a 298 K.

<b>Péptidos derivados da Angiotensina I</b>	<b><math>k'</math> (1ºpico)</b>	<b><math>k'</math> (2º pico)</b>
Angiotensina I	0,25	3,41
[Isoleucina 10] – Angiotensina I	0,34	2,09
[Alanina 10] -Angiotensina I	0,44	1,19
[Valina 10] -Angiotensina I	0,24	1,64
[Valina 5] -Angiotensina I	0,28	1,72

Em relação à hidrofobicidade da [valina 5] -Angiotensina I e [valina 10] -Angiotensina I, ambas apresentam graus de hidrofobicidade semelhantes (tabela 3.5) o que vai ao encontro aos resultados obtidos no nosso estudo, coeficientes de retenção semelhantes (tabela 4.12). Podemos assim igualmente, dizer que o aminoácido na posição 5 do péptido Angiotensina I se encontra envolvido no processo de interacção hidrofóbica.

## 5. Conclusões

A interacção da Angiotensina I com uma coluna de Butyl-Sepharose em presença do sulfato de amónio e sódio pode promover alterações de conformação deste péptido na coluna seguido de uma rápida “re-conformação” após interacção. O broad e/ou picos múltiplos observados nos perfis cromatográficos deste péptido podem surgir por conversão da forma trans da Angiotensina I na forma cis, a qual tem uma área superficial maior. A influência da concentração de sal e temperatura no processo também foram analisados, pensa-se que a temperatura, a concentração e tipo de sal promovem a isomerização da Angiotensina I na coluna. Também como esperado, a retenção da forma cis da Angiotensina I aumenta com o aumento da concentração de sal na fase móvel e parece não ser afectada pelo efeito da temperatura.

Por forma a melhorar a interpretação do comportamento da Angiotensina I, foram ainda estudados diferentes suportes cromatográficos. Foram comparados três suportes a phenyl, butyl e octyl Sepharose tendo em conta o efeito da temperatura e concentração de sulfato de amónio. Pela análise dos perfis cromatográficos obtidos verificou-se que apesar do grau de substituição do suporte Butyl-Sepharose ser relativamente maior que a Octyl-Sepharose a interacção da Angiotensina I com o suporte aumentou com o aumento do comprimento da cadeia n-alquilo do ligando. A concentrações de sal mais baixas e à mesma temperatura o ligando Phenyl-Sepharose quando comparado com a Butyl-Sepharose promove uma maior alteração de conformação do péptido resultando numa maior retenção deste. Assim consideramos que o suporte parece servir como catalisador desta alteração de conformação.

O presente estudo, também permitiu evidenciar o efeito da adsorção de péptidos derivados da Angiotensina I numa coluna Butyl-Sepharose sob condições lineares variando a concentração de sulfato de amónio. Observamos que o comportamento dos péptidos derivados da Angiotensina I evidenciado só tem significado aplicando concentrações de sal superiores a 1,2 M de sulfato de amónio. No que diz respeito ao estudo da substituição tanto da isoleucina na posição 5 como da leucina na posição 10 da Angiotensina I pelos diferentes aminoácidos, podemos dizer que ambas as posições do péptido acima descritas parecem interagir com a superfície cromatográfica durante o processo de adsorção.

Em HIC, onde as interações não são tão fortes como noutros tipos de cromatografia, a obtenção de uma prova analítica das alterações de conformação é bastante complexa devido a uma “re-conformação” rápida das biomoléculas após desorção. Contudo, quando a cinética da alteração de conformação está na mesma escala de tempo da separação cromatográfica, a sensibilidade da técnica de espectroscopia é suficiente e a magnitude das diferenças observadas nos tempos de retenção para as diferentes conformações é satisfatória, os perfis cromatográficos podem providenciar informação sobre a dinâmica conformacional que pode ocorrer durante a migração cromatográfica.

Assim, pensamos que a Angiotensina I poderá ser um bom péptido modelo para aceder a alterações de conformação em colunas de HIC, facilitando o processo de modelação desta técnica cromatográfica.

## **6. Perspectivas Futuras**

Com a elaboração deste trabalho experimental, surgiram outros aspectos que também podem ajudar a descrever o comportamento da Angiotensina em HIC, e desta forma projectar este estudo para outros projectos de investigação.

Através da análise dos cromatogramas podemos observar que uma das características da Angiotensina I foi o “broadening” e na maior parte dos casos o aparecimento de dois picos. Uma análise da retenção da [valina 7] -Angiotensina I que resulta da substituição da prolina a concentrações salinas mais baixas do que as realizadas neste estudo poderão reforçar a interpretação dos resultados obtidos.

Um dos parâmetros que pode afectar a performance da HIC é o pH da fase móvel, isto porque a forma do pico e o número de picos podem ser examinados qualitativamente em função deste factor.

Quanto ao estudo do comportamento cromatográfico dos péptidos derivados da Angiotensina I, em função da temperatura (estudo realizado, mas não apresentado) não foi conclusivo, concentrações de sal superiores a 1,5 M de sulfato de amónio deveram ser usadas. A interpretação de parâmetros termodinâmicos seria bastante útil na análise dos cromatogramas obtidos. Outro ponto também interessante seria estudar o efeito da substituição de aminoácidos noutros locais da Angiotensina I e a aplicação de outros tipos de aminoácidos.

Também, no estudo do comportamento da Angiotensina I com os vários suportes estudados podem ser utilizados modelos de interacção de HIC. Estes modelos podem ser aplicados para verificar a extensão da alteração de conformação com os vários suportes.

Outro aspecto importante é o estudo do comportamento da Angiotensina I sob condições cromatográficas não lineares. Este estudo poderia ser bastante importante na interpretação do comportamento deste péptido nestas condições cromatográficas.

## 7. Bibliografia

- ❖ Aboderin A.A (1971) An empirical hydrophobicity scale for  $\alpha$ -amino-acids and some of its applications. *Int.J.Biochem.* 2, 537-544.
- ❖ Aguilar M.I, Hearn M.T.W (1991) In HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides: Contemporary Topics and Applications; M.T.W. Hearn Ed., VCH Publishers: New York, 247-275.
- ❖ Asanov A.N, Delucas L.J, Oldham P.B, Wilson W.W (1996) Interfacial aggregation of bovine serum related to crystallization conditions studied by total internal reflection fluorescence. *J.Colloid Interface Sci.* 196, 62-73.
- ❖ Axén R, Porath J, Ernback S (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* 214, 1302-1306.
- ❖ Biswas K.M, DeVido D.R, Dorsey J.G (2003) Evaluation of methods for measuring amino acid hydrophobicities and interaction. *J.Chromatogr.A* 1000, 637-655.
- ❖ Bott R, Sarma M (1976) Crystallographic study of turkey egg-white lysozyme and its complex with disaccharide. *J.Mol.Biol.* 106, 1037-1046.
- ❖ Boulikanz L, Vidal-Madjar C, Balcar N, Baron M-H (1997) Adsorption mechanism of human serum albumin on a reversed-phase support by kinetics, chromatographic, and FTIR methods. *J.Colloid Interface Sci.* 188, 58-67.
- ❖ Brandts J.F, Halvorson H.R, Brennan M (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* 14, 4953-4963.
- ❖ Brown C.A, Bennett H.P.J, Solomon S (1982) The isolation of peptides by high-performance liquid chromatography using predicted elution positions. *Anal. Biochem.* 124, 201-208.
- ❖ Builder S.E (1993) Hydrophobic interaction chromatography: Principles and Methods, Pharmacia: San Francisco, 56-58.
- ❖ Bull H.B, Breese K (1974) Surface tension of amino acid solutions: A hydrophobicity scale of the amino acid residues. *Arch. Biochem.Biophys.* 161, 1665-1670.

- ❖ Burley S.K, Petsko G.A (1985) Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* 229, 23-28.
- ❖ Burley S.K, Petsko G.A (1986) Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Lett.* 203, 139-143.
- ❖ Buszewski B, Kowalska S, Kowalkowski T, Rozpedowska K, Michel M, Jonsson T (2007) HPLC columns partition by chemometric methods based on peptides retention. *J.Chromatogr.B* 845, 253-260.
- ❖ Byun C.K, Song J.H, Lee S.K, Kim D.H, Lee D.W (2000) Salt effects on the retention of peptides in hydrophobic interaction chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23, 2963-2978.
- ❖ Cavazzini A, Remelli M, Dondi F, Felinger A (1999) Stochastic theory of multiple-site linear adsorption chromatography. *Anal.Chem.* 71, 3453-3462.
- ❖ Cooper A (1999) Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 3, 557-563.
- ❖ Cornette, J.L, Cease K.B, Margalit H, Spouge J.L, Berzofsky J.A, DeLisi C (1987) Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins. *J. Mol. Biol.* 195, 659-685.
- ❖ Damodaran S, Song K.B (1986) The role of solvent polarity in the free energy transfer of amino acid side chains from water to organic solvents. *J.Biol.Chem.* 261, 7220-7222.
- ❖ Dill K.A (1990a) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29, 7133-7155.
- ❖ Diogo M.M, Queiroz J.A, Monteiro G.A, Martins S.A.M, Ferreira G.N.M, Prazeres D.M.F (2000) Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol.Bioeng.* 68, 576-583.
- ❖ Do Y.S, Shinagawa T, Tam H, Inagami T, Hseuh W (1987) Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. *J. Biol. Chem.* 262, 1037-1043.
- ❖ Drake A.F, Fung M.A, Simpson C.F (1989) Protein conformation changes as the result of binding to reversed-phase chromatography column materials. *J.Chromatogr.* 476, 159-163.

- ❖ Einarsson M, Kaplan L, Nordenfelt E, Miller E (1981) Removal of Hepatitis-B virus from a concentrate of coagulation-factors 2, 7, 9 and 10 by hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Virological Methods* 3, 213-228.
- ❖ El Rassi Z (1996) Recent progress in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrate species. *J.Chromatogr. A* 720, 93-118.
- ❖ Er-el Z, Zaidenzaig Y, Shaltiel S (1972) Hydrocarboncoated sepharoses. Use in the purification of glycogen phosphorylase. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 49, 383-390.
- ❖ Esposito M.D, Crimi M, Venturoli G (1990) A critical evaluation of the hydrophobicity profile of membrane proteins. *Eur. J.Biochem.* 190, 207-219.
- ❖ Fausnaugh J.L, Kennedy L.A, Regnier F.E (1984) Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. *J.Chromatogr.* 317, 141-155.
- ❖ Fausnaugh J.L, Regnier F.E (1986) Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J.Chromatogr. A* 359, 131-146.
- ❖ Fornstedt T, Zhong G, Guiochon G (1996) Peak tailing and mass transfer kinetics in linear chromatography. *J.Chromatogr. A* 741, 1-12.
- ❖ Gagnon P, Grund E, and Lindback T (1995) Large-scale process development for hydrophobic interaction chromatography. Part I: gel selection and development of binding conditions. *Biopharm* April: 21.
- ❖ Galardy R.E, Bleich H.E, Ziegler P, Craig L.C (1976) The pH dependence of the conformation of angiotensin peptides by nuclear magnetic resonance: Cis-trans isomerism of proline 7. *Biochemistry.* 1976, 2303-2309.
- ❖ Garcia F.A.P, Pires, E.M.V (1993) *Chromatography.* In: Kennedy J.F, Cabral J.M.S (Eds.) Recovery processes for Biological Materials. Wiley, London, 415-451.
- ❖ Gehas J, Wetlaufer D.B (1990) Isocratic hydrophobic interaction chromatography of dansil amino acids: Correlation of hydrophobicity and retention parameters. *J.Chromatogr.* 511, 123-130.
- ❖ Geng X, Regnier F.E (1984) Retention model for proteins in reversed-phase liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 296, 15-30.

- ❖ Gesquiere J.C, Cung M.T, Tartar A (1989) Slow isomerization of some proline-containing peptides inducing peak splitting during reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 478, 121-129.
- ❖ Grund E (1998) Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Biosepar. Bioprocess* 1, 65-88.
- ❖ Haidacher D, Vailaya A, Horváth C (1996) Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2290-2295.
- ❖ Hjertén S (1973) Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. *J.Chromatogr.* 87, 325-331.
- ❖ Hjertén S, Rosengren J, Pahlman S (1974) Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose. *J.Chromatogr.* 101, 281-288.
- ❖ Hodges R.S, Zhu B-Y, Zhou N.E, Mant C.T (1994) Reversed-phase liquid chromatography as a useful probe of hydrophobic interactions involved in protein folding and protein stability. *J.Chromatogr.A* 676, 3-15.
- ❖ Hofstee B.H.J (1973) Protein binding by agarose carrying hydrophobic groups in conjunction with changes. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 50, 751-757.
- ❖ Honig B, Yang A.S (1995) Free energy balance in protein folding. *Adv. Protein Chem.* 46, 27-58.
- ❖ Hopp T.P (1986) Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites. *J.Immunol. Methods* 88, 1-18.
- ❖ Horváth C, Lin H-J (1976) Movement and band spreading of unadsorbed solutes in liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 126, 401-420.
- ❖ Horváth C, Lin H-J (1978) Band spreading in liquid chromatography: General plate height equation and a method for the evaluation of the individual plate height contributions. *J.Chromatogr.* 149, 43-70.
- ❖ Horváth C.S, Melander W (1978) Reversed-phase chromatography and the hydrophobic effect. *Amer.Lab.* 10, 17-36.
- ❖ Jandel Scientific, "Table Curve 2 D", Version 7.3.0.267, USA, 2006.
- ❖ Jason J.C, Rydén L (1993) Protein separation and purification. In: Rehm H.J, Reed G (Eds.) *Biotechnology*. 3 VCH, Weinheim, 617-642.
- ❖ Jennissen H (1986) Protein binding to two-dimensional hydrophobic binding chromatography. Sorption kinetics of phosphorylase b on immobilized butyl residues. *J.Coll.Interf.Sci.* 111, 570-586.

- ❖ Jennissen H (2005) Hydrophobic interaction chromatography: harnessing multivalent protein-surface interactions for purification procedures. *Methods Mol.Biol.* 305, 81-89.
- ❖ Jinno K, Tanigawa E (1988) Retention prediction of small peptides in reversed-phase liquid chromatography. *Chromatographia* 25, 613- 617.
- ❖ Jungbauer A, Machold C, Hahn R (2005) Hydrophobic interaction chromatography of proteins III. Unfolding of proteins upon adsorption. *J. Chromatogr. A* 1079, 221-228.
- ❖ Karger B.L, Blanco R (1989) The effects of on-column structural changes of proteins on their HPLC behaviour. *Talanta* 36, 243-248.
- ❖ Katzenstein G.E, Vrona S.A, Wechsler R.J, Steadman B.L Lewis R.V, Middaugh C.R (1986) Role of conformational changes in the elution of proteins from reversed-phase HPLC columns. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 83, 4268-4272.
- ❖ Kauzmann (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 14, 1-63.
- ❖ Kennedy R.M (1990) Hydrophobic chromatography. In: Deutscher, M.P. (Ed.) *Guide to Protein Purification, Methods Enzymology* Academic Press Inc, London, 182, 339-343.
- ❖ Kondo A, Mihara J (1996) Comparison of adsorption and conformation of haemoglobin and myoglobin on various inorganic ultrafine particles. *J.Colloid Interface Sci.* 177, 214-221.
- ❖ Kurosu Y, Sasaki T, Takakuwa T, Sakayanagi N, Hibi K, Senda M (1990) Analysis of proteins by high-performance liquid chromatography with circular dichroism spectrophotometric detection. *J.Chromatogr.* 515, 407-414.
- ❖ Kyte J.K, Doolittle R.F (1982) A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J.Mol.Biol.* 157, 105-132.
- ❖ Ladiwala A, Xia F, Luo Q, Breneman C.M, Cramer S.M (2006) Investigation of protein retention and selectivity in HIC systems using quantitative structure retention relationship models. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 836-850.
- ❖ LaPlanche L.A, Rogers M.T (1964) Cis and trans configurations of the peptide bond in N-monosubstituted amides by nuclear magnetic resonance. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 337-341.

- ❖ Laurine A, Laplanche, Rogers M.T (1963) cis and trans configurations of the peptide bond in N-monosubstituted amides by nuclear magnetic resonance. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 337-341.
- ❖ Lebl M, Fang S, Hruby V.J (1991) High-performance liquid chromatography of peptides at reduced temperatures: Separation of isomers. *J.Chromatogr.* 586, 145-148.
- ❖ Liakopoulou-kyriakides M, Galardy R.E (1979) s-Cis and trans isomerism of the his-pro peptide bonds in angiotensin and thyroliberin analogues. *Biochemistry* 18, 1952-1957.
- ❖ Lienqueo M.E, Mahn A, Asenjo J.A (2002) Mathematical correlations for predicting protein retention times in hydrophobic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A* 978, 71-9.
- ❖ Lin B.L, Golshan-Shirazi S, Ma Z, Guiochon G (1988) Shock effects in nonlinear chromatography. *Anal. Chem.* 60, 2647-2653.
- ❖ Lin F-Y, Chen W-Y, Ruaan R-C, Huang H-M (2000) Microcalorimetric studies of the interactions between proteins and hydrophobic ligands in hydrophobic interaction chromatography: effects of chain length, density and the amount of bound protein. *J.Chromatogr. A* 872, 37-47.
- ❖ Lin L.N, Brandts S.F (1979) Evidence suggesting that some proteolytic enzymes may cleave only the trans form of the peptide bond. *Biochemistry* 18, 43-47.
- ❖ Liu Chih-I, Hsu Keh-Ying, Ruaan Ruoh-Chyu (2006) Hydrophobic Contribution of Aminoacids in Peptides Measured by Hydrophobic Interaction Chromatography. *J.Phys.Chem.B* 110, 9148-9154.
- ❖ Love A.L, Alger T.D, Olson R.K (1972) Nuclear magnetic resonance rate studies of hindered rotation in methyl N-acetylsarcosinate. *J. Phys. Chem.* 76, 853-855.
- ❖ Mahn A, Lienqueo M.E, Asenjo J.A (2004) Effect of surface hydrophobicity distribution on retention of ribonucleases in hydrophobic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A* 1043, 47-55.
- ❖ Mahn A, Zapata-Torres G, Asenjo J.A (2005) A theory of protein-resin interaction in hydrophobic interaction chromatography. *J.Chromatogr. A* 1066, 81-8.

- ❖ Makhatadze G.I, Privalov P.L (1990) Heat capacity of proteins: I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: Hydration effect. *J.Mol.Biol.* 213, 375-384.
- ❖ Mant C.T, Zhou N.E, Hodges R.S (1989) Correlation of protein retention times in reversed-phase chromatography with polypeptide chain length and hydrophobicity. *J.Chromatogr.* 476, 363-375.
- ❖ Maste M.C.L, Pap E.H.W, Hoek A.V, Norde W, Visser A.J.W.G (1996) Spectroscopic investigation of the structure of a protein adsorbed on hydrophobic latex. *J.Colloid Interface Sci.* 180, 632-633.
- ❖ McNay J.L, Fernandez E.J (1999) How does a protein unfold on a reversed-phase liquid chromatography surface. *J.Chromatogr.A* 849, 135-148.
- ❖ Meek J.L (1980) Prediction of peptide retention times in high-pressure liquid chromatography on the basis of amino acid composition. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 77, 1632-1636.
- ❖ Meek J.L, Rossetti Z.L (1981) Factors affecting retention and resolution of peptides in high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 211, 15-28.
- ❖ Melander W, Corradini D, Horváth C (1984) Salt mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography. Application of solvophobic theory. *J. Chromatogr.* 317, 67-85.
- ❖ Melander W, Horváth C (1977) Salts effects on hydrophobic interaction in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of lyotropic series. *Arch.Biochem.Biophys.* 183, 200-215.
- ❖ Melander W.R, Jacobson J, Horváth C (1982) Effect of molecular structure and conformational change of proline-containing dipéptidos in reversed-phase chromatography. *J.Chromatogr.* 234, 269-276.
- ❖ Mendel D, Ellman J.A, Chang Z, Veenstra D.L, Kollman P.A, Schultz P.G (1992) Probing protein stability with unnatural amino acids. *Science* 256, 1798-1802.
- ❖ Minoura N, Rachkov A, Higuchi M, Shimizu T (2002) Study of the factors influencing peak asymmetry on chromatography using a molecularly imprinted polymer prepared by the epitope approach. *Bioseparation* 10, 399-407.
- ❖ Nice E.C, Capp M.W, Cooke N, O'Hare M.J (1981) Comparison of short and ultrashort-chain alkylsilane-bonded silicas for the high-performance liquid

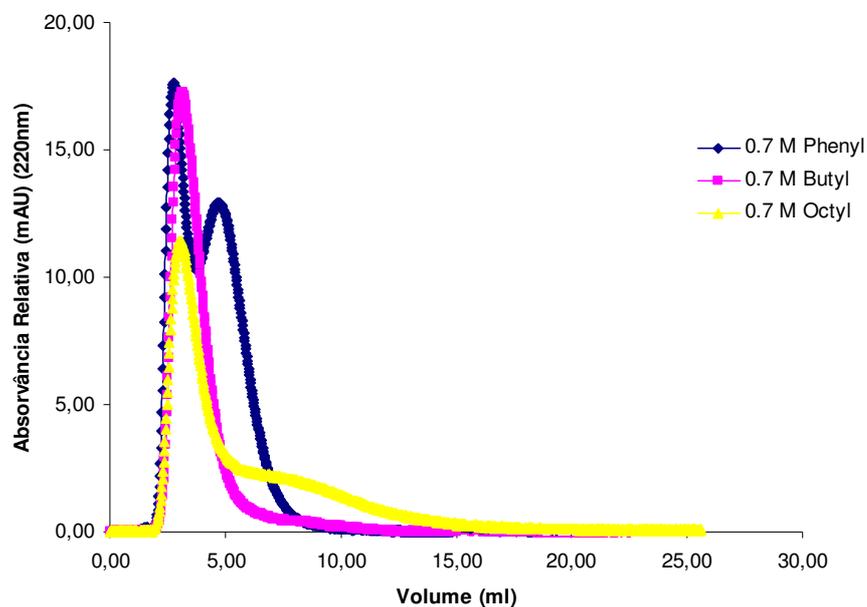
- chromatography of proteins by hydrophobic interaction methods. *J. Chromatogr.* 218, 569-580.
- ❖ Nozaki Y, Tanford C (1971) Chemistry and metabolism of macromolecules: The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. Establishment of a hydrophobicity scale. *J. Biol. Chem.* 246, 2211- 2217.
  - ❖ Oroszlan P, Blanco R, Lu X-M, Yarmush D, Karger B.L (1990) Intrinsic fluorescence studies of the kinetic mechanism of unfolding of  $\alpha$ -lactalbumin on weakly hydrophobic chromatographic surfaces. *J.Chromatogr.*500, 481-502.
  - ❖ Pahlman S, Rosengren J, Hjertén S (1977) Hydrophobic interaction chromatography on uncharged Sepharose derivatives. Effects of neutral salts on the adsorption of proteins. *J.Chromatogr.* 131, 99-108.
  - ❖ Perchalski R.J, Wilder B.J (1979) Reverse phase liquid chromatography at increased temperature *Anal.Chem.* 51, 774-776.
  - ❖ Perkins T.W, Derek S.M, Thatcher W.R, Edwin N.L (1997) Protein retention in hydrophobic interaction chromatography: modelling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity. *J.Chromatogr.A* 766, 1-14.
  - ❖ Pfeiffer N (1995) Companies report progress in possible monoclonal therapies. *Genetic Engineering News* November: 1.
  - ❖ Plass M, Valko K, Abraham M.H (1998) determination of solute descriptors of tripéptido derivatives based on high-throughput gradient high-performance liquid chromatography retention data. *J. Chromatogr.A* 803, 51-60.
  - ❖ Pombeiro AJLO (1998) Técnicas e operações unitárias em química laboratorial, 3ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
  - ❖ Porath J (1986) Salt-promoted adsorption: recent developments. *J.Chromatogr.* 376, 331-341.
  - ❖ Porath J, Sundberg L, Fornstedt N, Olson I (1973) Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. *Nature* 245, 465-466.
  - ❖ Purcell A.W, Aguilar M.I, Hearn T.W (1993) High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides, and proteins. 123. Dynamics of peptides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 65, 3038-3047.
  - ❖ Queiroz J.A, Tomaz C.T, Cabral J.M.S (2001) Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology* 87, 143-159.

- ❖ Regnier F.E (1987) The role of protein structure in chromatographic behaviour. *Science* 238, 319-323.
- ❖ Rimerman R.A, Hatfield G.W (1973) Phosphate-induced protein chromatography. *Science* 182, 1268-1270.
- ❖ Rippel G, Szepesy L (1994) Hydrophobic interaction chromatography of proteins on an Alkyl-Superose column. *J.Chromatogr. A* 664, 27-32.
- ❖ Robeson J.L, Tilton R.D (1996) Spontaneous reconfiguration of adsorbed lysozyme layers observed by total internal reflection fluorescence with a pH-sensitive fluorophore. *Langmuir* 12, 6104-6113.
- ❖ Roe S (1989) Purification based on hydrophobicity. In: Harris, E.L.V, Angal S (Eds.), *Protein Purification Methods: A practical Approach*. IRL Press, Oxford, 221-232.
- ❖ Roettger B.F, Myers J.A, Ladisch M.R, Regnier F.E (1989) Adsorption phenomena in hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol.Prog.* 5, 79-88.
- ❖ Rose G.D Glerash L.M, Smith J.A (1985) Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 37, 1-109.
- ❖ Salvi G, De los Rios P, Vendruscolo M (2005) Effective interactions between chaotropic agents and proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 61, 492-499.
- ❖ Sane S.U, Cramer S.M Przybycien T.M (1999) Protein structure perturbations on chromatographic surfaces. *J.Chromatogr. A* 849, 149-159.
- ❖ Sasagawa T, Okuyama T, Teller D.C (1982) Prediction of peptide retention times in reversed-phases high-performance liquid chromatography during linear gradient elution. *J. Chromatogr.* 240, 329-340.
- ❖ Schaechtelin G, Walter R, Salomon H, Jelínek J, Karen P, Cort J.H (1974) Enhancement of the activity of angiotensin II by certain cations. *Mol.Pharmacol.* 10, 57-67.
- ❖ Sewell P.A (2000) Theory of liquid chromatography. *Encyclopedia of separation science* Academic Press, London.
- ❖ Shansky R.E, Wu S-L, Figueroa A, Karger B.L (1990) HPLC of biological macromolecules: Methods and Applications, Marcel Dekker, New York, 95.

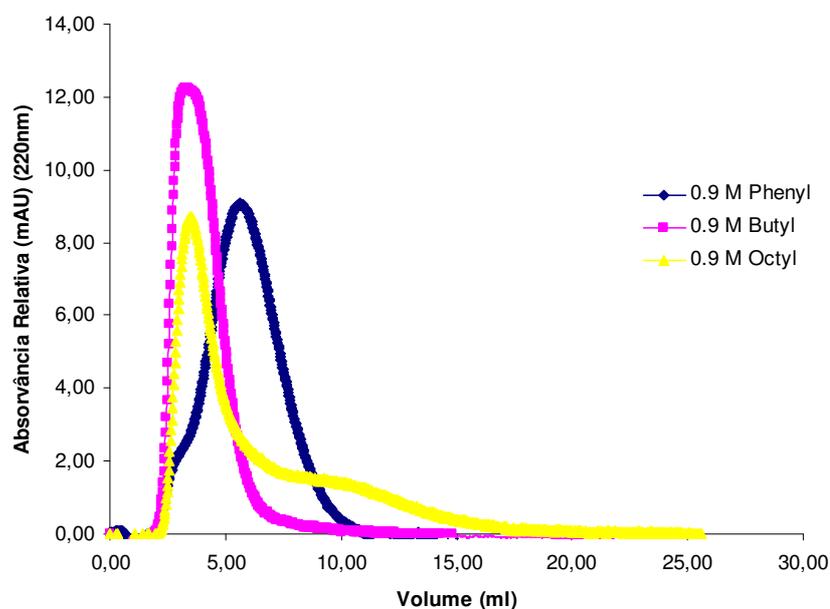
- ❖ Sharp K.A, Nicholls A, Friedman R, Honig B (1991) Extracting hydrophobic free energies from experimental data: relationship to protein folding and theoretical models. *Biochemistry* 30, 9686-9697.
- ❖ Silvia M.F, Chipre L.F, Raba J, Luco J.M (2001) Amino acids characterization by reversed-phase liquid chromatography. Partial least-squares modelling of their transport properties. *Chromatographia* 53, 392- 400.
- ❖ Skeggs L.T, Kahn J.R, Shumway N.P (1956) Preparation and function of the hypertensin converting enzyme. *J Exp Med*, 103, 295-299. The first report on the isolation and partial characterization of ACE, in this case from horse plasma.
- ❖ Sofer G.K, Hagel L (1997) *Handbook of Process Chromatography: A Guide to optimization, scale-up and validation* Academic Press, London.
- ❖ Spyroulias G.A, Nikolakopoulou P, Tzakos A, Gerothanassis I.P, Magafa V, Manessi-Zoupa E, Cordopatis P (2003) Comparison of the solution structures of angiotensin I & II. Implication for structure-function relationship. *Eur. J .Biochem.* 270, 2163-2173.
- ❖ Su S-J, Grego B, Niven B, Hearn M.T.W (1981) Analysis of group retention contributions for peptides separated by reversed phase high performance liquid chromatography. *J.Liq.Chromatogr.* 4, 1745-1764.
- ❖ Tanford C (1972) Hydrophobic free energy micelle formation and the association of proteins with amphiphiles. *J.Mol.Biol.* 67, 59-74.
- ❖ Tanford C (1980) *The hydrophobic effect*, Second ed. Wiley, New York.
- ❖ Thrash M.E, Pinto N.G *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley: Chichester, 2000, 7259.
- ❖ Tiselius A (1948) Adsorption separation by salting out. *Arkiv för Kemi, Mineralogi Geologi*, 26B, 1-5.
- ❖ Trinquier G, Sanejouand Y.H (1998) Which effective property of amino acids is best preserved by the genetic code? *Protein Eng.* 11, 153-169.
- ❖ Tripet B, Cepeniene D, Kovacs J.M, Manta C.T, Krokhin O.V, Hodges R.S (2007) Requirements for prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography: Hydrophilicity/hydrophobicity of side-chains at the N-and C-termini of peptides are dramatically affected by the end-groups and location. *J. Chromatogr.A* 1141, 212-225.

- ❖ Turula V.E, Haseth J.A (1996) Particle Beam LC/FT-IR spectrometry studies of biopolymer conformations in reversed-phase HPLC separations: native globular proteins. *Ana.Chem.* 499, 629-638.
- ❖ Vailaya A (1998) Fundamentals of hydrophobic interactions in liquid chromatography, PhD Thesis, Yale University Yale, USA.
- ❖ Vailaya A, Horváth Cs (1996) Enthalpy-entropy compensation in hydrophobic interaction chromatography. *J.Phys.Chem.* 100, 2447-2455.
- ❖ Valko K, Bevan C, Reynolds D (1997) Chromatographic hydrophobicity index by fast-gradient RP-HPLC: A high-throughput alternative to log P/log D. *Anal. Chem.* 69, 2022-2029.
- ❖ Van Oss C.J, Good R.J, Chaudhury M.K (1986) Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: optimal conditions for association and dissociation. *J.Chromatogr.* 376, 111-119.
- ❖ Wehr C.T, Correia L, Abbot S.R (1982) Evaluation of stationary and mobile phases for reversed-phase high performance liquid chromatography of peptides. *J.Chromatogr.Sci* 20, 114-119.
- ❖ Wilson K.J, Honegger A, Hughes G.J (1981) Comparison of buffers and detection systems for high-pressure liquid chromatography of peptide mixtures. *Biochemical J.* 199, 43-51.
- ❖ Wolfenden R, Anderson L, Cullis P.M, Southgate C.C.B (1981) Affinities of amino acid side chains for solvent water. *Biochemistry* 20, 849-855.
- ❖ Wu S-L, Figueroa A, Karger B.L (1996) Protein conformational effect in hydrophobic interaction chromatography: Retention characterization and the role of mobile phase additives and stationary phase hydrophobicity. *J.Chromatogr.A* 371, 3-27.
- ❖ Wu W-J, Raleigh D.P (1998) Local control of peptide conformation: stabilization of cis proline peptide bonds by aromatic proline interactions. *Biopolymers* 45, 381-394.
- ❖ Xia F, Nagrath D, Garde S, Cramer S.M (2004) Evaluation of selectivity changes in HIC systems using a preferential interaction based analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 87, 354-363.
- ❖ Yamasaki Y.K, Uchida K, Tomizawa H, Ishikawa O, Inouye K (1999) Separation of amino acids and peptides by high performance hydrophobic interaction chromatography. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22, 1965-1974.

- ❖ Yon R.J (1972) Chromatography of lipophilic proteins on adsorbents containing mixed hydrophobic and ionic groups. *Biochemistry* 126, 765-767.
- ❖ Yutani K, Ogasahara K, Tsujita T, Sugino Y (1987) Dependence of conformational stability on hydrophobicity of the amino acid residue in a series of variant proteins substituted at a unique position of tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 84, 4441-4444.
- ❖ Zhou N.E, Mant C.T, Hodges R.S (1990) Effect of preferred binding domains on peptide retention behaviour in reversed-phase chromatography: Amphipatic  $\alpha$ -helices. *Pept.Res.* 3, 8-20.

**Anexos:****Anexo A**

**Figura A1.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna de Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 0,7 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K.



**Figura A2.** Cromatografia de interacção hidrofóbica (1 ml/min) da Angiotensina I (0,025 mg/ml) numa coluna de Phenyl-Sepharose, Butyl-Sepharose e Octyl-Sepharose a 298.15 K usando como modelador 0,9 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em 10 mM de tampão fosfato, pH 7 a 298 K.