

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS DE SEPARAÇÃO DE COMPONENTES DE VENENOS OFÍDICOS

Erika F. Ferrari¹, Roberta S. Carreiro da Costa¹, Natalia M. Ribeiro², Antonio Carlos G. Prianti Jr.¹, Rodrigo A. Lazo Osório¹, Milton Beltrame Jr.², Wellington Ribeiro¹

¹ Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, ² Laboratório de Síntese Orgânica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos/SP, ferrari.erika@yahoo.com.br, gton@univap.br

Resumo – As técnicas cromatográficas aliadas à busca de novos fármacos ou substâncias com potencial farmacológico e/ou terapêutico têm demonstrado crescente interesse de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas na busca de possibilidades analíticas que permitam maior rapidez e eficácia na descoberta de substâncias bioativas. Os venenos de serpentes representam uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, sendo formados por compostos inorgânicos e orgânicos dos quais 90% são proteínas. Este trabalho tem por objetivo relacionar técnicas cromatográficas empregadas na separação dos constituintes dos venenos ofídicos de modo a esclarecer os métodos e a razão de suas aplicações.

Palavras-chave: venenos, serpente, separação, cromatografia, técnicas cromatográficas, caracterização.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Os venenos de serpentes representam uma mistura complexa de substâncias biologicamente ativas, sendo formados por compostos inorgânicos e orgânicos dos quais 90% são proteínas (THOMAS; POUGH, 1979).

Essa diversidade na composição dos venenos oferece a oportunidade para pesquisas de moléculas farmacologicamente ativas e possibilita o acesso a novas soluções para diversas patologias já conhecidas.

Os grandes progressos alcançados na descoberta do modo de ação dos venenos ofídicos e de suas toxinas são devido, não somente, ao emprego dos mais variados métodos e técnicas de investigação farmacológica, mas também à separação e purificação dos constituintes das peçonhas (VITAL BRAZIL, 1982).

Este artigo tem como objetivo a descrição elucidativa dos diversos métodos cromatográficos empregados atualmente para o isolamento, purificação e determinação dos compostos presentes nas toxinas ofídicas.

Histórico

Quando a estrutura da proteína a ser isolada é conhecida, ou é estruturalmente homóloga à outra proteína já estudada, o processo de purificação é mais simples. Contudo, quando nada se conhece sobre a composição da proteína a ser purificada, o processo de obtenção desta se torna uma rotina empírica, devendo ser testada várias condições e técnicas (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

A separação e/ou identificação dos componentes dos venenos pode ser obtida por

uma variedade de técnicas, mais notavelmente por técnicas eletroforéticas e de cromatografia líquida (CHIPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991). Essas técnicas têm se tornado mais sofisticadas com o tempo e com as novas tecnologias (GUBENSEK *et al.*, 1974; RAEI; KNIGHT; ZEPEDA, 1984).

A purificação de biomoléculas está geralmente envolvida com a combinação de diferentes etapas, em particular, a precipitação utilizando sais e procedimentos cromatográficos (CHO *et al.*, 2001). Cada etapa tem uma especificidade relativamente baixa e, portanto, emprega-se outra técnica cromatográfica mais seletiva para remover as impurezas das amostras e se obter uma maior seletividade (DA SILVA E MOUTA JR *et al.*, 2003) e, recentemente, acoplamento a outros métodos para melhorar qualitativa e quantitativamente a eficiência da separação (COUMANS; HUMPHERY-SMITH; DOS REMEDIOS, 1997).

O conhecimento da estrutura primária da proteína de estudo, ou sua composição de aminoácidos é um fator bastante importante que deve ser considerado, se disponível na escolha dos métodos cromatográficos a serem utilizados (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

No entanto, a escolha da técnica a ser utilizada na purificação dos polipeptídeos depende dos objetivos da separação (tabela 1). A purificação de um único polipeptídeo de uma mistura complexa exigirá uma técnica diferente àquela necessária para separar todos os componentes da mistura. Os métodos de separação empregados com esta finalidade precisam ser de alta resolução, porém esta exigência pode ser restringida à diversidade limitada das impurezas intimamente relacionadas com o composto alvo e que devem ser eliminadas. Em alguns casos, o objetivo é separar todos os

componentes de uma mistura complexa, onde cada componente possui uma importância particular (MOKRZYCKI, 1999).

Tabela 1 – Tipos de cromatografia e utilização para purificação de venenos ofídicos.

| TÉCNICA | APLICAÇÃO | FUNDAMENTOS |
|---|--|---|
| Cromatografia de troca iônica | Determinação da composição da proteína conhecida | É baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz |
| Cromatografia de filtração em gel / por exclusão de tamanho | Separação de moléculas de acordo com sua massa molecular e forma | Uma solução aquosa contendo proteínas passa por uma fase estacionária, proteínas maiores não conseguem passar pelos poros. |
| Cromatografia de afinidade ou bioafinidade | Isolamento de resinas que apresentam características específicas | Este método baseia-se no isolamento de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades destas de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos |
| Cromatografia de fase reversa | Definição rápida de misturas muito complexas; como purificação de desintegrinas de pequena massa | Permite a separação de uma grande variedade de compostos (hidrofílicos e hidrofóbicos) durante o mesmo procedimento cromatográfico |

A cromatografia de troca iônica é uma técnica de purificação bastante utilizada quando a composição da proteína é parcial ou totalmente conhecida. Nesse ponto é importante considerar o potencial isoelétrico (pI) da molécula a ser purificada (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem esta técnica que é baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devida a diferenças de carga, sendo possível controlá-la por pH e força iônica (SPADARO, 2006).

Cogo e colaboradores (1998) utilizaram coluna de sephadex monitorada em espectrofotômetro para purificação do veneno bruto da jararaca-ilhoa (*Bothrops insularis*). As frações obtidas foram novamente purificadas em coluna de DEAE-Sephadex, para testes biológicos.

Kong e Chung (2001) utilizaram cromatografia de troca iônica para purificar duas proteínas isoladas de uma serpente asiática (*Calloselasma rhodostoma*) para posterior determinação estrutural e propriedades funcionais.

Outro tipo de cromatografia é a filtração em gel, também chamada de cromatografia por exclusão de tamanho, em que as moléculas são separadas de acordo com sua massa molecular e forma (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

A cromatografia por exclusão tem propriedades desejáveis, tais como simplicidade técnica,

insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e versatilidade. Esta técnica promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado (ROTHSCHILD, 2006). Assim, uma solução aquosa contendo proteínas de vários tamanhos passa por essa fase estacionária e as proteínas com maiores massas moleculares não conseguem entrar e passar pelos poros, sendo excluídas, e portanto, eluídas anteriormente às proteínas com menores massa moleculares.

Ponce-Soto e colaboradores (2007b) utilizaram dois passos cromatográficos para isolar uma serino protease do veneno de surucucurana (*Bothrops atrox*), cromatografia por exclusão seguida por fase reversa.

Outro processo cromatográfico possível para purificação de toxinas de venenos é a cromatografia de afinidade ou bioafinidade. Nesse processo são utilizadas resinas que apresentam características específicas como ligantes da proteína a ser isolada do veneno bruto (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

A cromatografia por bioafinidade distingue-se dos outros métodos cromatográficos por se basear, principalmente, nas propriedades biológicas ou funcionais das espécies que interagem: a substância a ser separada e a fase estacionária. O princípio deste método é o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos (SPADARO; FONSECA, 2006).

A cromatografia de afinidade é um dos métodos de separação mais seletivos para proteínas. Embora fosse usada somente ocasionalmente como uma técnica intermediária para isolar proteases de veneno, tem sido utilizada extensivamente para remover impurezas restantes em amostras (DA SILVA E MOUTA JR *et al.*, 2003), e também tem sido acoplada a outros métodos de detecção (LEE; LEE, 2004). Além do seu interesse tecnológico, esta técnica é um instrumento excelente para compreender os mecanismos que são a base da interação da enzima e do inibidor (DE-SIMONE *et al.*, 2005).

De Simone e colaboradores (2006) demonstraram que a gel-filtração em Sepharose é funcional na purificação de lectinas de cinco serpentes de espécies diferentes, quatro do gênero *Bothrops* e uma *Lachesis*, as proteínas contidas nas frações foram monitoradas pela absorvância em 280 nm e estimada de acordo com o método de Lowry.

A fim de isolar uma serino protease do veneno da serpente chinesa, chamada de víbora dos cem passos (*Deinagkistrodon acutus*) Xin e

colaboradores (2007) desenvolveram um protocolo em que o processo da purificação consistiu numa etapa principal de cromatografia de afinidade para remover mais de 95% de outras proteínas, e numa etapa de refinamento foi utilizada cromatografia de troca iônica para remoção de impurezas menores. A serino proteinase foi 100% analisada em HPLC.

A cromatografia de fase reversa proporciona uma definição rápida das misturas muito complexas mesmo as que incluem polipeptídeos muito similares (MOKRZYCKI, 1999). Esta técnica é bastante utilizada na purificação de desintegrinas de pequena massa encontrada nos venenos de serpentes. Nesse tipo de cromatografia a proteína ou peptídeo de interesse se liga a uma molécula hidrofóbica na fase estacionária sendo esta utilizada para a separação dos demais componentes da mistura original com base em seu caráter hidrofóbico (COMINETTI; PONTES; SOUZA, 2007).

A cromatografia é considerada de fase reversa quando a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária, separando os componentes da substância estudada por hidrofobicidade. A fase estacionária é geralmente composta por cadeias hidrofóbicas que interagem com a proteína/peptídeo de interesse. Após a passagem da fase móvel na forma de um gradiente decrescente de hidrofobicidade, a molécula de interesse se dissocia da matriz sendo recuperada e separada ou purificada de outras proteínas e/ou peptídeos da amostra original (VALKO; SNYDER; GLAJCH, 1993). Permite a separação de uma grande variedade de compostos desde compostos muito hidrofílicos a compostos muito hidrofóbicos durante o mesmo procedimento cromatográfico (HUANG; GUIOCHON, 1989).

Ponce-Soto e colaboradores (2007a) utilizaram a cromatografia de fase reversa para fracionar e isolar isoformas de enzimas bioativas de cascavel (*Crotalus durissus ruruima*) e posteriormente foi realizada a caracterização bioquímica, farmacológica e estrutural destas.

TÉCNICAS HIFENADAS

Cooper and Reich (1972) separaram a atividade de uma neurotoxina de naja indiana (*Naja naja siamensis*) em quatro componentes, α , β , γ , e δ através de uma série de passos cromatográficos como cromatografia líquida em coluna de troca iônica com fosfocelulose, seguida por sephadex e de troca iônica com carboximetilcelulose. Uma resolução adicional foi relatado por Qiumin e colaboradores (2002) em subfrações por cromatografia líquida de performance rápida (FPLC) e determinação do peso molecular por espectrometria de massas por tempo de voo com desorção à laser e ionização assistida por matriz (MALDI-TOF MS).

Hernandez-Oliveira e colaboradores (2005) utilizaram cromatografia de exclusão molecular e cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (para subfrações) para purificar e caracterizar bioquímica e farmacologicamente uma nova isoforma de enzima hidrolítica presente no veneno de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*). A purificação foi posteriormente confirmada por espectrometria de massas.

Saha e colaboradores (2006) isolaram e purificaram o veneno de cobra-real (*Ophiophagus hannah*). O veneno foi submetido a cromatografia em camada delgada, a região contendo a amostra foi então raspada, eluída em solvente de polaridade média e purificada em cromatografia líquida de coluna de sílica gel. A coluna foi eluída com misturas de solventes com polaridade crescente. Cada fração eluída teve a letalidade e atividade biológica testadas em camundongos. A fração ativa foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência para posterior caracterização estrutural por espectrofotômetro UV e ressonância magnética nuclear e determinação do peso molecular por espectrômetro de massas.

Conclusão

As técnicas cromatográficas têm se mostrado de grande valor no que se refere à separação, isolamento e purificação de componentes do veneno, uma vez que possibilitam, através de diversos métodos, a separação de substâncias com potencial farmacológico e/ou terapêutico.

O entendimento dos métodos e suas variáveis, bem como suas aplicações e limitações permitem ao pesquisador a escolha adequada do método a ser utilizado para separação do(s) componente(s) alvo e determinam ou não a eficácia do método escolhido tanto em termos financeiros como em relação economia de tempo.

Referências

- CHIPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- CHO, S.Y. *et al.* Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). **Toxicon**, v. 39, n.4, p. 499-506, 2001.
- COGO, J.C. *et al.* An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A2 fraction. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1323-1332, 1998.
- COMINETTI, M.R.; PONTES, C.L.; SOUZA, D.H.F. Métodos Cromatográficos e critérios de

pureza. In: SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F. **Métodos em Toxinologia: Toxinas de serpentes**. São Carlos: EduFSCar, 2007. 258p.

- COOPER, D.; REICH, E. Neurotoxin from venom of the cobra, *Naja naja siamensis* - Purification and radioactive labeling. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 10, p. 3008-3013, 1972.

- COUMANS, J.V.; HUMPHERY-SMITH, I.; DOS REMEDIOS, C.G. Two-dimensional gel electrophoresis of actin-binding proteins isolated by affinity chromatography from human skeletal muscle. **Electrophoresis**, v. 18, n. 7, p. 1079-1085, 1997.

- DA SILVA E MOUTA JR, S. *et al.* Simple immunoaffinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells. **J. Chromatogr. B**, v. 787, n. 2, p. 303-311, 2003.

- DE-SIMONE, S.G. *et al.* Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two *p*-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. **J. Chromatogr. B**, v. 822, p. 1-9, 2005.

- DE-SIMONE, S.G.; NETTO, C.C.; SILVA JR, F.P. Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins. **J. Chromatogr. B**, v. 838, p. 135-138, 2006.

- GUBENSEK, F. *et al.* Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. **Toxicon**, v. 12, p. 167-171, 1974.

- HERNANDEZ-OLIVEIRA, S. *et al.* Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of a New PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) Venom. **Protein J.**, v. 24, n. 4, p. 233-242, 2005.

- HUANG, J.X.; GUIOCHON, G. Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins. **J. Chromatogr.**, v. 492, p. 431-469, 1989.

- KONG, C.; CHUNG, M.C.M. Purification and characterization of a variant of rhodocetin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 5, p. 383-390, 2001.

- LEE, W.C.; LEE, K.H. Applications of affinity chromatography in proteomics. **Anal. Biochem.**, v. 324, n. 1, p. 1-10, 2004.

- MOKRZYCKI, N. *et al.* Alternate pooling for optimizing high-performance liquid chromatographic fractionation of complex peptide mixtures. **J Chromatogr. A**, v.839, p.57-69, 1999.

- PONCE-SOTO, L.A. *et al.* Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA₂ Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. **Protein J.**, v. 26, n. 1, p. 39-49, 2007a.

- PONCE-SOTO, L.A. *et al.* Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **Protein J.**, v. 26, n. 6, p. 387-394, 2007.

- QIUMIN, L. *et al.* Comparative study of three short-chain neurotoxins from the venom of *Naja kaouthia* (Yunnan, China). **J. Nat. Toxins**, v. 11, n. 3, p. 221-229, 2002.

- RAEL, E.D.; KNIGHT, R.A.; ZEPEDA, H. Electroforect variants of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxin. **Toxicon**, v. 22, p. 980-985, 1984.

- SAHA, A. *et al.* CNS and anticonvulsant activity of a non-protein toxin (KC-MMTx) isolated from King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 296-303, 2006.

- SPADARO, A.C.C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

- SPADARO, A.C.C.; FONSECA, M.J.V. Cromatografia por bioafinidade. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

- THOMAS, R.G.; POUGH, F.H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, v. 17, p. 221-228, 1979.

- VITAL BRASIL, O. Peçonhas. In: CORBET, C. **Farmacodinâmica**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1044-1074, 1982.

- VALKO, K.; SNYDER, L.R.; GLAJCH, J.L. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. **J. Chromatogr.**, v. 656, n. 1-2, p. 501-520, 1993.

- XIN, Y. *et al.* Affinity purification of serine proteinase from *Deinagkistrodon acutus* venom. **J. Chromatogr. B**, v. 859, n. 1, p. 111-118, 2007.