B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

20487

**A DERIVATIZAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E
AMINOÁCIDOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS**

ORLANDO GUARILHA JÚNIOR

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. JORGE CÉSAR MASINI

SÃO PAULO

2003

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005565

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Guarilha Júnior, Orlando

G915^a A derivatização na determinação de proteínas e aminoácidos
em fluidos biológicos / Orlando Guarilha Júnior. -- São Paulo,
2003.
113p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Masini, Jorge César

1. Análise em fluxo contínuo : Química 2. Análise por
injeção em fluxo : Química 3. Análise por injeção sequencial :
Química 4. Reagentes : Química analítica I. T. II. Masini,
Jorge César, orientador.

543.08 CDD

“A derivatização na determinação de proteínas e aminoácidos em fluidos biológicos”

ORLANDO GUARILHA JÚNIOR

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química - Área: Química Analítica.

Aprovado por:

Prof. Dr. JORGE CÉSAR MASINI
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. SILVIA HELENA PIRES SERRANO
IQ – USP

Profa. Dra. MARIA TERESA MACHINI DE MIRANDA
IQ – USP

Prof. Dr. ODAIR ZENEBON
Instituto Adolfo Lutz – SP

Prof. Dr. MAURO AQUILES LA SCALEA
FCF – USP

SÃO PAULO
06 DE JUNHO 2003.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Agradecimentos

Ao Prof. Jorge César Masini por todo apoio, orientação paciência e amizade durante estes anos.

À querida Rosa Maria da Silva de Oliveira, por tudo que tem feito por mim, sem o que este trabalho jamais teria sido feito.

Ao meu primo Marcelo Videira Rodrigues, que diversas vezes consertou meu computador em momentos difíceis, sem o que não conseguiria apresentar esta Tese em tempo hábil.

À minha mãe Antonietta Romanelli Guarilha pelo apoio e dedicação que sempre tem me dado.

Ao meu pai Orlando Guarilha (*in memoriam*), pelo apoio onde quer que esteja.

Aos professores do Instituto de Química que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Química Analítica (Gilberto, Chico, Cristiane, Luciana, Paulo César, Ulisses, Carlos, Marcelo, Sandro), pela convivência, amizade e ajuda em muitos momentos.

Aos professores Mauro Aquiles, Marina Tavares, Maria Teresa Miranda, Dimas Zaia, Odair Zenebom e Sílvia Serrano, por aceitarem participar da banca de defesa.

Ao Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento das amostras de albumina humana, com os respectivos valores de determinações pelo método de Kjeldahl.

A todos, que de forma direta ou indireta me apoiaram, meu

MUITO OBRIGADO

INDICE

	Página
RESUMO	I
ABSTRACT	II
ABREVIACÕES	III
1. - INTRODUÇÃO	1
2. - Métodos Analíticos para a Determinação de Proteínas e	
Aminoácidos	2
2.1. - Métodos Analíticos para a Determinação de Proteínas	2
2.1.1. - Métodos não espectrofotométricos	3
2.1.1.1. - Método de Kjeldahl	3
2.1.1.2. - Determinação potenciométrica	3
2.1.2. - Métodos espectrofotométricos	4
2.1.2.1. - Reação com prata amoniacal	4
2.1.2.2. - Reação com eritrosina B	5
2.1.2.3. - Reagente de Biureto	5
2.1.2.4. - Reação com ácido bicinchônico	7
2.1.2.5. - Reação com Ouro Coloidal	7

2.1.2.6. - Método de Bradford	8
2.1.2.7. - Reação com p-Benzoquinona (PBQ)	9
2.1.2.8. - Método de Lowry	12
 2.2. - Métodos Analíticos para a Determinação e Identificação de Aminoácidos	 13
2.2.1. - Métodos espectrofotométricos	13
2.2.1.1. - Ninhidrina	13
2.2.1.1. - Fenilisotiocianato (PITC)	14
2.2.2. - Métodos fluorimétricos	16
2.2.2.1. - Reação com fluorescamina	16
2.2.2.2. - Orto-ftalaldeído (OPA)	17
2.2.2.3. - 9-Fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl)	18
2.2.3. - Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)	19
2.2.4. - Análise por injeção em fluxo (FIA)	21
2.2.5. - Análise por injeção seqüencial (SIA)	22
2.2.6. - Cromatografia a gás	24

3. - OBJETIVOS	25
4. - Utilização do reagente PBQ num sistema em fluxo e em análise por injeção seqüencial (SIA).....	26
4.1. - Reações entre a PBQ e uma proteína	26
4.2. - Utilização da PBQ num sistema em fluxo	27
4.2.1. - Parte experimental	27
4.2.1.1. - Aparelhagem e Materiais Utilizados	27
4.2.1.2. - Esquema da Aparelhagem	28
4.2.1.3. - Bombeamento da mistura reacional	30
4.2.1.4. - Controle do aquecimento do reator	30
4.2.1.5. - Preparo do reagente PBQ e obtenção das amostras de albumina humana	31
4.2.1.6. - Preparo das soluções tampão	34
4.2.1.7. - Condições experimentais para a determinação de proteínas e obtenção dos espectros das proteínas e aminoácidos	34
4.2.1.7.1. - Condições experimentais nas análises em fluxo das proteínas	34
4.2.1.8. - Condições experimentais para a obtenção dos espectros da albumina bovina e dos aminoácidos	35

4.3. - Resultados e discussão	35
4.3.1. - Espectros de cada branco em diferentes valores de pH e tempos de aquecimento	35
4.3.2. - Espectros da albumina bovina com e sem derivatização e dos derivados com PBQ em diferentes tempos de reação e valores de pH	39
4.3.3. - Espectros dos aminoácidos sem derivatização e dos respectivos derivados com PBQ.....	44
4.3.4. - Absorbâncias dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ em função do tempo de aquecimento e do pH	53
4.3.5. - Variação da quantidade de reagente PBQ nas análises em fluxo	55
4.3.6. - Curvas analíticas em pH 8,0 e pH 9,0	57
4.3.7. - Análises de amostras de albumina humana, comparando-se os valores das concentrações obtidos com o método oficial de Kjeldahl	61
4.4. - Utilização da PBQ num sistema de análise por injeção seqüencial (SIA) para a determinação de albumina humana	64

4.4.1. - Parte experimental	64
4.4.1.1. - Equipamentos	64
4.4.1.2. - Procedimento	65
4.4.2. - Resultados e Discussão	67
4.4.3. - Conclusões	70
 5. - Utilização do reagente tetraamin cobre (II) num sistema FIA para a determinação de proteínas e aminoácidos	 71
5.1. - Reações entre a proteína e o reagente tetraamin cobre (II)	71
5.2. - Parte experimental	72
5.2.1. - Aparelhagem e materiais utilizados	72
5.2.2. - Preparo do reagente tetraamin cobre (II)	75
5.2.3. - Condições experimentais para a determinação de proteínas e aminoácidos	76
5.3. - Resultados e discussão	78
5.3.1. - Espectros do reagente tetraamin cobre (II) na ausência e presença de albumina bovina e aminoácidos	78
5.3.2. - Diagramas da albumina bovina e dos aminoácidos	88

5.3.3. - Curvas analíticas e suas respectivas equações obtidas para a albumina bovina e os aminoácidos	92
5.3.4. - Análises de amostras de albumina humana e comparações com o método oficial de Kjeldahl	96
6. - CONCLUSÕES	100
7.- PERSPECTIVAS FUTURAS	102
8. - BIBLIOGRAFIA	103
CURRICULUM VITAE	109

FIGURAS

Figura nº 1 - Estrutura do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250	8
Figura nº 2 - Reação entre a glicina e a PBQ	11
Figura nº 3 - Reação entre a ninhidrina e um aminoácido	14
Figura nº 4 - Reação entre fenilisotiocianato e um aminoácido para formar um feniltiocarbamil derivado	15
Figura nº 5 - Reação entre a fluorescamina e uma amina primária, originando um produto fluorescente	16
Figura nº 6 - Reação de derivatização entre um aminoácido, orto-ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol	18
Figura nº 7 - Reação de FMOC-Cl conduzindo à formação de derivados altamente fluorescentes	19

Figura nº 8 - Esquema da aparelhagem utilizada para a análise em fluxo de proteínas e aminoácidos, com o emprego do reagente PBQ	28
Figura nº 9 - Fotografia da aparelhagem	29
Figura nº 10 - Fotografia do reator dentro do béquer com glicerina, juntamente com o aquecedor	31
Figura nº 11 - Aparelhagem utilizada para a purificação da PBQ por sublimação	33
Figura nº 12 - Espectros do branco em pH 7,0 , obtidos em diferentes tempos de aquecimento	36
Figura nº 13 - Espectros do branco em pH 8,0 , obtidos em diferentes tempos de aquecimento	37
Figura nº 14 - Espectros do branco em pH 9,0 , obtidos em diferentes tempos de aquecimento	38
Figura nº 15 - Espectros da albumina bovina com e sem derivatização em pH 7,0	40
Figura nº 16 - Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de reação sob aquecimento a 100 °C (pH 7,0).....	41
Figura nº 17 - Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de reação sob aquecimento a 100 °C (pH 8,0)	42
Figura nº 18 - Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de reação sob aquecimento a 100 °C (pH 9,0)	43

Figura nº 19- Espectro da asparagina sem derivatização e do derivado formado com PBQ (pH 7,0)	45
Figura nº 20 - Espectro da DL-histidina sem derivatização e do derivado formado com PBQ (pH 7,0)	46
Figura nº 21 - Espectro da glicina sem derivatização e do derivado formado com PBQ (pH 7,0)	47
Figura nº 22 - Espectro da L-serina sem derivatização e do derivado formado com PBQ (pH 7,0)	48
Figura nº 23 - Espectro da L-isoleucina sem derivatização e do derivado formado entre L-isoleucina e PBQ (pH 7,0)	49
Figura nº 24 - Espectros da L-leucina sem derivatização e do derivado formado entre L-leucina e PBQ (pH 7,0)	50
Figura nº 25 - Espectro da L-metionina sem derivatização e do derivado formado entre L-metionina e PBQ (pH 7,0)	51
Figura nº26 - Espectro da L-valina sem derivatização e do derivado formado entre L-valina e PBQ (pH 7,0)	52
Figura nº 27 - Absorbância dos derivados formados entre PBQ e albumina bovina nos valores de pH 7,0 , 8,0 e 9,0	54
Figura nº 28 - Variação da absorbância em função da quantidade de reagente PBQ	56
Figura nº 29 - Curvas de calibração dos derivados albumina bovina-PBQ nos valores de pH 8,0 e 9,0	59
Figura nº 30 - Desvios porcentuais entre os valores obtidos no sistema em fluxo nos valores de pH 8,0 e pH 9,0 e os fornecidos pelo método oficial de Kjeldahl	62

Figura nº 31 - Esquema do sistema de injeção seqüencial para	
determinação de proteínas totais, usando o reagente PBQ .	66
Figura nº 32 - Sinais obtidos pelo sistema de análise por injeção	
seqüencial para determinação de proteínas totais, utilizando	
padrões de soro albumina bovina e o reagente PBQ	67
Figura nº 33 - Curva analítica obtida pelo sistema SIA utilizando o	
reagente PBQ para determinação de proteínas totais	68
Figura nº 34 - Esquema da aparelhagem que empregou o reagente	
tetraamin cobre (II) para a determinação de proteínas e	
aminoácidos	73
Figura nº 35 - Fotografia da aparelhagem que empregou o reagente	
tetraamin cobre (II) para a determinação de proteínas e	
aminoácidos	74
Figura nº 36 - Balões contendo solução estoque (balão central) e reagente	
tetraamin cobre (II)	76
Figura nº 37 - Espectro do reagente tetraamin cobre (II), na	
concentração 3,3 mmol/L	78
Figura nº 38 - Espectros da albumina bovina sem derivatização e do	
complexo tetraamin cobre (II) na presença de albumina	
bovina	79
Figura nº 39 - Espectros da DL-histidina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de DL-histidina	80
Figura nº 40 - Espectros da glicina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de glicina	81
Figura nº 41 - Espectros da L-isoleucina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de L-isoleucina	82

Figura nº 42 - Espectros da L-leucina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de L-leucina	83
Figura nº 43 - Espectros da L-metionina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de L-metionina	84
Figura nº 44 - Espectros da L-serina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de L-serina	85
Figura nº 45 - Espectros da L-valina sem derivatização e do complexo	
tetraamin cobre (II) na presença de L-valina	86
Figura nº 46 - Fiagrama da albumina bovina com o reagente	
tetraamin cobre (II)	89
Figura nº 47 - Fiagrama da glicina com o reagente tetraamin cobre (II) ...	90
Figura nº 48 - Fiagrama da L-isoleucina com o reagente	
tetraamin cobre (II)	91
Figura nº 49 - Curvas analíticas absorbância em função da	
concentração da albumina bovina, utilizando-se o	
reagente tetraamin cobre (II)	92
Figura nº 50 - Curvas analíticas da absorbância em função da	
concentração de cada aminoácido, empregando-se o	
reagente tetraamin cobre (II)	94
Figura nº 51 - Desvios porcentuais entre o método oficial de Kjeldahl	
e o que utiliza o reagente tetraamin cobre (II) no	
sistema FIA	98

TABELAS

Tabela nº 1 - Valores de absorbância a 361 nm dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ (pH 8,0).....	57
Tabela nº 2 - Valores de absorbância a 361 nm dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ (pH 9,0)	58
Tabela nº 3 - Valores das concentrações das amostras de albumina humana, empregando-se o sistema em fluxo nos valores de pH 8,0 e pH 9,0 , comparados com os valores das concentrações fornecidos pelo método oficial de Kjeldahl	61
Tabela nº 4 - Concentrações obtidas pelo método SIA para amostras de albumina humana comparadas com as concentrações obtidas pelo método de Kjeldahl	69
Tabela nº 5 - Equações das curvas analíticas dos aminoácidos	95
Tabela nº 6 - Valores das concentrações de albumina humana das amostras de soro obtidos pelos método oficial de Kjeldahl e pelo método que emprega o reagente tetraamin cobre (II), com suas respectivas comparações	97

RESUMO

No presente trabalho são apresentadas análises de amostras de proteínas totais e aminoácidos empregando-se os reagentes p-benzoquinona e tetraamin cobre (II).

No caso do reagente p-benzoquinona, as análises foram feitas através de um sistema inédito em fluxo, no qual a mistura reacional passava através de um reator composto de um tubo capilar de aço inoxidável aquecido num banho de glicerina. Os derivados formados passavam através de uma cela de fluxo acoplada a um espectrofotômetro, onde eram feitas as leituras das absorbâncias. Este método se mostrou mais rápido em relação àquele feito em banho-maria.

A utilização de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) com o reagente tetraamin cobre (II), permitiu que as análises fossem feitas de forma rápida, a baixo custo e com a vantagem de não necessitarem de aquecimento, como no caso da p-benzoquinona.

Os resultados das análises de amostras de albumina humana obtidos em ambos os métodos acima apresentaram boa concordância quando comparados àqueles obtidos pelo método Kjeldahl para as mesmas amostras.

ABSTRACT

This work describes two methods for analysis of total proteins and aminoacids using both p-benzoquinone (PBQ) and tetraamin copper (II) reagents. With the p-benzoquinone reagent the method was performed by an original flow system made with stainless steel capillary tubing, conveniently heated into a glycerin bath, where the reactional mixture travels in its way to the detector. The derivate products are carried out to a flow cell adjusted to a spectrophotometer where the absorbances are measured. This method was efficient, with a fair cost, and providing results very faster than in the batch mode of operation. The second method, using the tetraamin copper (II) reagent, was performed by a common flow injection system (FIA). When compared with the PBQ method, the FIA tetramin copper (II) method was also rapid, efficient, with a fair cost and with the great advantage of simplicity, once it is performed at room temperature. The results obtained with human albumine samples using both methods are in agreement with those ones obtained by the Kjeldahl method for the same samples.

ABREVIACÕES

DMSO	: Dimetil sulfóxido
FMOC-Cl	: 9-fluorenilmetil cloroformato
HPLC	: Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho
FE	: Fase estacionária
FIA	: Análise por injeção em Fluxo
FM	: Fase móvel
OPA	: orto-ftaldialdeído (ou orto-ftalaldeído)
PBQ	: p-Benzoquinona
PITC	: Fenilisotiocianato
SIA	: Análise por injeção seqüencial

1. - INTRODUÇÃO

As proteínas e os aminoácidos desempenham um papel muito importante para os seres vivos, em, praticamente, todos os processos biológicos.

Como exemplos de funções das proteínas, temos: a) **Catálise enzimática**, no qual quase todas as reações químicas nos sistemas biológicos são catalisadas por macromoléculas chamadas enzimas ; b) **Transporte e armazenamento**, sendo o transporte de íons e pequenas moléculas realizado por moléculas de proteínas específicas, como no caso do transporte do oxigênio realizado pela hemoglobina presente nos eritrócitos e ainda no caso da albumina, que serve para o transporte de proteínas e aminoácidos ; c) **Movimento coordenado**, no qual temos que as proteínas são os maiores componentes dos músculos, como também temos como exemplos o movimento dos cromossomos na mitose e a propulsão do espermatozóide por seus flagelos, compostos por conjuntos contráteis constituídos de proteínas ; d) **Suporte mecânico**, como no caso do colágeno, uma proteína alongada que forma fibras, responsável pela elevada força de tensão da pele e ossos ; e) **Proteção imunológica**, no qual os anticorpos, que são proteínas altamente específicas, reconhecem e se combinam com substâncias estranhas tais como vírus, bactérias, e células de outros organismos ; f) **Formação e transmissão de impulsos nervosos**, no qual a resposta das células nervosas a estímulos específicos é mediada por receptores protéicos, como no caso da rodopsina, que é uma proteína fotorreceptora presente nas células dos bastonetes da retina; g) **Controle de crescimento e diferenciação**, no qual a expressão sequencial controlada de informação genética é essencial para o crescimento ordenado e diferenciado das células. Exemplos de proteínas: **enzimas, hemoglobina, mioglobina, colágeno, anticorpos, rodopsina, albumina, etc** ¹.

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas. O primeiro aminoácido isolado a partir de um hidrolisado protéico foi a glicina em 1820, obtida da gelatina, por H. Braconnot. Como exemplo de um dos aminoácidos descoberto mais recentemente e que está entre os 20 comumente encontrados nas proteínas pode-se citar a treonina, que foi o primeiro isolado a partir da hidrólise da fibrina, W.C. Rose, em 1935. Além dos vinte aminoácidos encontrados como blocos construtivos das proteínas, muitos aminoácidos adicionais se encontram ocorrendo biologicamente e desempenhando outras funções nas células.

Um aminoácido consiste de um amino grupo, um carboxil grupo, um átomo de hidrogênio e um grupo característico R, ligados a um átomo de carbono chamado carbono α . No metabolismo animal, os aminoácidos são essenciais, estando presentes em alimentos, produtos dietéticos, bem como em fluidos biológicos.

2. - Métodos Analíticos para a determinação de Proteínas e Aminoácidos

Atualmente, existem diversos métodos analíticos para a determinação de proteínas e aminoácidos. A seguir, serão descritos os mais importantes para cada caso.

2.1. - Métodos Analíticos para a Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas totais em fluidos biológicos é largamente empregada em análises clínicas e biomédicas³, o que pode dar diagnóstico a respeito de diferentes doenças correlacionadas com a alteração da quantidade de proteína nos fluidos biológicos; em nutrição animal⁴, ressaltando o aproveitamento racional de nutrientes; em problemas relacionados à nutrição humana^{5,6}, como obesidade, anorexia nervosa, desnutrição, devendo as dietas apresentar teor balanceado de proteínas; em tecnologia e ciências de alimentos⁷, objetivando o aproveitamento racional da matéria prima e o melhoramento dos produtos novos e já existentes; e na área da química de proteínas, objetivando purificar novas proteínas e enzimas⁸.

Existem, atualmente, diversos métodos analíticos para a determinação de proteínas em diversas amostras. Os mais utilizados são os métodos espectrofotométricos no ultravioleta e visível. A seguir, são apresentados exemplos de métodos não espectrofotométricos e, em seguida, os métodos espectrofotométricos.

2.1.1. - Métodos não espectrofotométricos

2.1.1.1. - Método de Kjeldahl

No método analítico de Kjeldahl⁹ para a determinação de proteínas totais, o material protéico é decomposto a quente por ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador, geralmente o sulfato de cobre. Nestas condições, o nitrogênio é convertido em sulfato de amônio. Pela adição do excesso de álcali (hidróxido de sódio), o sulfato de amônio se converte em amônia, que é libertada e destilada em corrente de vapor, para ser fixada em solução de ácido bórico. No final, titula-se o borato de amônio formado, mediante solução de ácido clorídrico 0,02 mol/L, utilizando vermelho de metila e azul de metileno como indicador.

Apesar dos inconvenientes de ser um método demorado e determinar não somente o conteúdo protéico, atualmente o micro Kjeldahl é a metodologia mais utilizada nas áreas de ciências e tecnologia de alimentos e áreas correlatas, para a determinação de proteínas totais.

2.1.1.2. - Determinação potenciométrica

Eletrodos potenciométricos apresentam sinais de envenenamento na presença de proteínas¹⁰. Uma forma de reduzir este problema é utilizar um excesso de reagente, medindo o potencial antes e depois da adição da proteína.

Alexander e Rechitz¹¹ reconheceram este fato como um método potenciométrico indireto para a determinação de proteínas que possuíam grupos -SH. Estes autores dissolveram essas proteínas em solução tampão pH 8,4, que foi adicionada a uma solução contendo excesso de íons Ag^+ . Dessa forma, os íons Ag^+ reagiram com os grupos tiol e o excesso de íons Ag^+ foram medidos num eletrodo de sulfeto de prata. A diferença entre o potencial medido e o potencial obtido para uma solução tampão sem a proteína (ΔE) mostrou uma relação linear com a concentração da proteína até cerca 1,2 mg/mL. Ovoalbumina foi determinada de forma semelhante¹².

Hitchman e Nyasulu¹³ determinaram proteínas empregando potenciometria indireta com um eletrodo de cobre, num sistema em fluxo. O método baseia-se no fato de as proteínas causarem uma diminuição na resposta do eletrodo de cobre para com os íons Cu^{2+} , que se ligam às proteínas através do grupo amino destas, sendo esta diminuição proporcional à concentração das proteínas totais presentes.

2.1.2. - Métodos espectrofotométricos

2.1.2.1. - Reação com prata amoniacal

Krystal e outros¹⁴ desenvolveram um método rápido e sensível para a determinação de proteínas em solução, baseado na capacidade de as proteínas serem capazes de se ligarem ao íon Ag^+ . Neste método analítico, as amostras de proteínas são, primeiramente, tratadas com glutaraldeído, e depois com prata em meio amoniacal (diamin prata). Após 10 minutos, a reação é terminada com a adição de tiosulfato de sódio e as leituras feitas num espectrofotômetro a 420 nm.

A sensibilidade deste método analítico, para a maioria das proteínas, está entre 15 e 2000 ng, o que representa um aumento de cerca de 100 vezes com relação ao método de Coomassie brilliant blue.

Notou-se não haver, praticamente, nenhuma interferência com relação a carboidratos, detergentes não iônicos ou etanol. O pré-tratamento das amostras de proteínas com Bio-Gel P-2 (poliacrilamida), um material polimérico para remover sais, agentes tiólicos, EDTA e dodecil sulfato de sódio torna este método analítico adequado para utilização em soluções tampão.

Segundo os autores, em função da pequena quantidade de reagente utilizado, este método analítico é de baixo custo, permitindo que a análise de 10 amostras custe cerca de 2 centavos de dólar.

Posteriormente, Krystal¹⁵, em seu novo trabalho, menciona a utilização de dodecil sulfato de sódio, com o objetivo de reduzir a adsorção de proteínas nas paredes dos frascos em que são feitas as reações.

2.1.2.2. - Reação com eritrosina B

No trabalho de Soedjak¹⁶ são apresentadas as reações entre proteínas e eritrosina B, que resultam em derivados altamente coloridos, com máximo de absorção a 545 nm.

As reações podem ser feitas à temperatura ambiente, porém são mais rápidas quando a mistura reacional é aquecida a 90 ou 95 °C.

Este método analítico possui as seguintes vantagens:

- a) A cor dos derivados formados é estável
- b) Faixa de trabalho linear para proteínas (2 a 14 µg/mL)
- c) Tempo de reação pequeno (entre 1,5 e 2 minutos)
- d) Boa repetitividade
- e) Pouca interferência dos reagentes mais comuns
- f) Pequena variabilidade de uma proteína para outra

O reagente eritrosina B pode ser utilizado em análises rotineiras, tendo poucas limitações.

2.1.2.3. - Reagente de Biureto

As origens do método de biureto podem ser traçadas desde a proposta inicial de Autenrieth, em 1915. Posteriormente, diversos autores propuseram modificações do mesmo, sendo, atualmente, a proposta metodológica de Gornall e outros¹⁷ a mais utilizada.

O reagente de biureto é uma solução aquosa azul, consistindo numa mistura de sulfato de cobre, hidróxido de sódio, tartarato de sódio e potássio, além de iodeto de potássio. Quando se adiciona este reagente a uma proteína, surge uma coloração azul-violeta, com máximo de absorção no visível a cerca de 545 nm, que é tanto mais intensa quanto maior a quantidade de proteína total contida na solução^{17,18}.

A função principal do tartarato de sódio e potássio é estabilizar o cátion Cu^{2+} , impedindo a formação do precipitado azul de $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

Gornall et al¹⁷ fizeram diversos estudos relacionados às diferentes condições experimentais, tais como variações na composição do reagente de biureto, chegando a algumas conclusões:

a) **Sulfato de cobre:** Aumentando-se a concentração do $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ocorre, inicialmente, um aumento rápido na intensidade da cor desenvolvida, diminuindo à medida que a concentração do $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ vai se tornando cada vez maior até um ponto em que não mais se observa nenhum incremento na coloração desenvolvida.

b) **Hidróxido de sódio:** A importância do hidróxido de sódio na reação de biureto é muito grande, tendo sido estudada por Rising e Johnson¹⁹, bem como Itzhaki e Gill²⁰. A absorção do complexo cobre-proteína é independente da concentração de hidróxido de sódio, quando esta estiver na faixa de 6 a 20 % (massa/volume). Abaixo de 6 % ocorre a formação de um precipitado, formado a partir da reação entre Cu^{2+} e proteína. Em muitos casos, utiliza-se concentração de NaOH igual a 10 %.

c) **Tartarato de sódio e potássio:** O emprego deste sal serve para estabilizar o Cu^{2+} , evitando sua precipitação em forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Com isso, a solução adquire forte coloração azul²¹.

d) **Iodeto de potássio:** A utilização deste sal é necessária serve para prevenir a autorredução e separação do óxido cuproso.

Shideler e outros²² utilizaram o reagente de biureto num sistema FIA para a determinação de proteínas totais.

O método de biureto está sujeito à interferência de substâncias que possam reagir com os cátions cobre (II), como, por exemplo bilirrubina, íons amônio, lipídios, hemoglobina, peptídeos, aminoácidos, lactose, amido e glicose²³.

2.1.2.4. - Reação com ácido bicinchônico

Smith e outros²⁴ utilizaram o ácido bicinchônico, que é um composto solúvel em água capaz de formar um complexo de intensa coloração púrpura com o íon cuproso, Cu^+ , cujo máximo de absorção é em 562 nm. O ácido bicinchônico forma a base de um método analítico capaz de monitorar o íon cuproso formado a partir da reação entre uma proteína e o íon Cu^{2+} (reação de biureto).

A cor produzida a partir deste método analítico é estável e aumenta proporcionalmente numa larga faixa de concentração da proteína.

Quando comparado com o método de Lowry e outros, os resultados aqui obtidos apresentam grande tolerância do ácido bicinchônico para com alguns interferentes, tais como detergentes não iônicos e alguns sais.

A estabilidade do reagente e do cromóforo também é uma vantagem deste método analítico, cuja reação é feita num único passo.

2.1.2.5. - Reação com Ouro Coloidal

Na ausência de uma proteína, o ouro coloidal exibe uma coloração púrpura avermelhada, com máximo de absorção a 530 nm. A adição de uma proteína causa um deslocamento e alargamento do espectro para comprimentos de onda mais elevados, com máximo de absorção a 595 nm, utilizando-se, como branco, água mais ouro coloidal, sem proteína^{25,26}.

No trabalho apresentado por Stoscheck²⁶, este método analítico, simples e rápido, apresenta certas vantagens, comparando-se com outros métodos analíticos, como alta sensibilidade (cerca de 20 ng de proteína), dispensando o uso de instrumentos mais sensíveis, como um fluorímetro. Além disso, poucos produtos químicos interferem neste método analítico, incluindo bases fortes contendo altos níveis de sais, como também dodecil sulfato de sódio. O problema dos interferentes alcalinos (altos níveis de sais ou dodecilsulfato de sódio) pode ser solucionado acidificando-se as soluções de proteínas antes de se fazerem as análises.

Como desvantagem deste método analítico, pode-se mencionar que proteínas purificadas possuem diferentes capacidades de interagir com o ouro coloidal, podendo conduzir a valores mais altos ou mais baixos, quando se utiliza albumina bovina como padrão. Este problema pode ser solucionado utilizando-se a mesma proteína como padrão daquela que está sendo determinada.

Stoscheck²⁶ concluiu que este método que emprega ouro coloidal, em função de sua simplicidade é adequado para substituir em alguns casos os métodos de Bradford e Lowry. Comparativamente aos métodos de Bradford e Lowry, o método que emprega ouro coloidal é 25 e 50 vezes mais sensível, respectivamente.

2.1.2.6. - Método de Bradford

O método de Bradford²⁷ é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante "Coomassie brilliant blue" BG-250, cuja estrutura²⁸ se encontra na figura nº 1 .

Figura nº 1 - Estrutura do corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250.

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

O método de Bradford é mais rápido e sensível que o de Lowry, tendo sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios, tais como: plasma sanguíneo, líquido, saliva humana, produtos alimentícios, leite humano, tecidos de plantas, suspensões de células, etc²³.

Apesar de o método de Bradford ser mais rápido, sensível e estar sujeito a um número bem menor de interferentes que o método de Lowry, o mesmo apresenta algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade²⁹ ou baixo peso molecular das mesmas³⁰, como também fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis, devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência, sendo recomendável a padronização das condições de reação para cada lote de corante adquirido.

Existem poucas substâncias, citadas na literatura, que são interferentes no método de Bradford. Estes interferentes, normalmente, reagem com as proteínas, impedindo a reação com o corante BG-250 ou reagem com o corante, causando aumento na absorbância. Alguns exemplos de interferentes podem ser: glicerol (provoca falso positivo), lipídios (causam turbidez na amostra), 2-mercaptoetanol + guanidina (diminuem a absorção da amostra), ciclodextrinas (formam um complexo de inclusão com o corante BG-250, resultando em falso positivo) e fluoreto (diminui a absorção da amostra).

2.1.2.7. - Reação com p-Benzoquinona (PBQ)

A utilização da p-benzoquinona (PBQ), para a determinação de proteínas totais, tem-se mostrado muito interessante, pois é um método espectrofotométrico de custo relativamente baixo e de fácil execução. Este método está baseado na formação de produtos entre uma proteína e a PBQ, apresentado um máximo de absorção no ultravioleta a cerca de 350 nm^{31,32,33,34}.

Os produtos de reação, de coloração avermelhada, apresentam-se estáveis durante horas à temperatura ambiente após a reação entre a proteína e a PBQ, realizada a 100 °C durante 20 minutos, permitindo que a leitura da absorbância possa ser realizada num intervalo relativamente grande sem erros apreciáveis. Anticoagulantes comuns como EDTA, citrato, ou heparina, nas concentrações utilizadas no laboratório, não interferem com o método da PBQ. O método da PBQ possui um baixo limite de detecção, em torno de 4 µg/mL, apresentando-se mais sensível do que o método do biureto, cujo limite de detecção está em torno de 45 µg/mL³².

A figura nº 2 apresenta a reação entre um aminoácido e o reagente PBQ.

Figura nº 2 - Reação entre a glicina e a PBQ.

O reagente PBQ foi empregado nesta Tese, num sistema em fluxo e em análise seqüencial em fluxo (SIA), como está exposto adiante com detalhes.

2.1.2.8. - Método de Lowry

O método que atualmente conhecemos como de Lowry³⁵ foi, inicialmente, proposto por Wu³⁶, em 1922, sendo o mais utilizado para a determinação de proteínas totais.

O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato e tungstato de sódio e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II) e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Chou e Goldstein³⁷, assim como Legler e outros³⁸ estudaram extensivamente o mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu com proteínas, peptídeos e aminoácidos, sugerindo que esta redução ocorra diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade, em torno de 4 a 40 µg/50µL, sendo utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios, tais como: líquido, plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal, plantas, suco biliar, membranas, leite humano e produtos alimentícios²³.

Apesar de o método de Lowry apresentar uma grande sensibilidade para proteínas, este apresenta algumas desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, tais como fenóis, hidrazina, sulfato de amônio, citrato, penicilina, sacarose, glicose e frutose, apresentar longo tempo de análise à temperatura ambiente, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e seguir a Lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas.

Várias modificações no método de Lowry têm sido propostas para resolver os problemas acima citados. Pode-se, por exemplo, aumentar a velocidade da reação, conforme proposto por Shakir e outros³⁹, que recomendam aquecer a amostra por três minutos a 37 °C, após a adição de sulfato de cobre alcalino, e por mais três minutos, após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu.

2.2. - Métodos Analíticos para a Determinação e Identificação de Aminoácidos

2.2.1. - Métodos espectrofotométricos

2.2.1.1. - Ninhidrina

A ninhidrina é amplamente utilizada para se determinarem aminoácidos, mesmo em pequenas quantidades, pois os derivados formados apresentam alta absorvidade no visível^{40,41}.

Pelo aquecimento, um α -aminoácido reage com duas moléculas de ninhidrina para produzir um composto intensamente corado. Uma cor púrpura é obtida (máximo de absorção a 550 nm) na reação da ninhidrina por todos os aminoácidos e peptídeos que apresentam um α -amino grupo livre, enquanto que a prolina e a hidroxiprolina, em que o α -amino grupo está substituído, produzem derivados com uma cor amarela característica (máximo de absorção a 440 nm)⁴².

A figura nº 3 abaixo apresenta a reação entre a ninhidrina e um aminoácido.

Esse reagente fortemente oxidante ocasiona a oxidação descarboxilativa dos aminoácidos.

Figura nº 3 - Reação entre a ninhidrina e um aminoácido.

2.2.1.1. - Fenilisotiocianato (PITC)

Este reagente, largamente utilizado para o sequenciamento de polipeptídeos, foi introduzido para a análise de aminoácidos no começo da década de 1980⁴³, sendo atualmente o

reagente mais utilizado para a análise de amostras de aminoácidos com o emprego da derivatização pós-coluna em HPLC.

A figura nº 4 abaixo representa a equação da reação entre PITC e um aminoácido genérico.

Figura nº 4 - Reação entre fenilisotiocianato e um aminoácido para formar um feniltiocarbamil derivado.

A reação de PITC com os aminoácidos (incluindo prolina e hidroxiprolina) é relativamente rápida (tempo de reação inferior a 20 minutos) numa solução alcalina e à temperatura ambiente. Todos os derivados possuem propriedades espectrais similares, sendo empregados para sua detecção comprimentos de onda na faixa de 240 a 255 nm. Os produtos de reação apresentam-se relativamente estáveis, apesar de ser possível a ocorrência de alguma conversão para feniltioidantoína se o pH do meio não for corretamente controlado.

Utiliza-se fase reversa em HPLC para a separação entre os derivados formados. A resposta é linear, com limite de detecção em torno de 1 pmol.

Apesar de o emprego de PITC apresentar-se superior a outras técnicas de derivatização, sua maior desvantagem reside no fato de diversos derivados serem afetados pela presença de alguns sais, cátions divalentes e soluções tampão .

2.2.2. - Métodos fluorimétricos

2.2.2.1. - Reação com Fluorescamina

O emprego da fluorescamina em HPLC, para a determinação de aminoácidos, começou com os trabalhos de Samejima et al^{44,45} como também Weigele et al⁴⁶, que se basearam no emprego da ninhidrina e o fenilacetaldéido, como reagentes colorimétricos.

A fluorescamina é um reagente não fluorescente, que reage quase instantaneamente à temperatura ambiente com os aminoácidos, a um pH entre 9,5 e 10, gerando produtos fluorescentes. Este reagente é dissolvido num solvente não hidroxílico, tal como acetona ou acetonitrila. Os comprimentos de onda máximos de excitação e emissão para os derivados fluorescentes entre aminoácidos e fluorescamina são, respectivamente, 390 nm e 475 nm⁴⁷. O excesso da fluorescamina, após a reação de derivatização com os aminoácidos, é hidrolisado, conduzindo à formação de produtos não fluorescentes, o que torna este reagente ideal para a análise de aminoácidos em sistemas automatizados⁴⁸.

Em derivatização pós-coluna, o efluente da coluna, o tampão borato e a fluorescamina dissolvida em acetona são simultaneamente misturados⁴⁹. A fluorescamina não pode ser misturada diretamente ao tampão borato, pois rapidamente sofre hidrólise.

Figura nº 5 - Reação entre a fluorescamina e uma amina primária, originando um produto fluorescente.

2.2.2.2. Orto-ftalaldeído (OPA)

A reação entre orto-ftalaldeído (OPA), na presença de 2-mercaptoetanol, com aminas primárias, conduz à formação produtos altamente fluorescentes⁵⁰. A reação ocorre rapidamente em tampão borato (pH 6 a 8 para aminas e pH 9,5 a 10 para aminoácidos). Esta reação pode ser aplicada em derivatização pós-coluna, como também em derivatização pré-coluna em HPLC^{51,52}. Quando se emprega a derivatização pós-coluna, a separação entre os aminoácidos é realizada numa fase estacionária composta de uma resina de troca catiônica e na derivatização pré-coluna utiliza-se fase reversa.

Quantidades da ordem de pmol de aminoácidos, peptídeos e proteínas podem ser detectadas facilmente. Este reagente é cerca de 5 vezes mais sensível do que a fluorescamina, além de ser solúvel e estável em tampões aquosos⁵⁰.

Os comprimentos de onda máximos de excitação e emissão para os derivados fluorescentes entre aminoácidos e o-ftalaldeído são, respectivamente, 340 nm e 455 nm.

Uma grande vantagem no emprego de OPA é o fato de os reagentes não apresentarem fluorescência, além de a reação ocorrer rapidamente à temperatura ambiente⁵³. Apesar de os derivados serem relativamente instáveis, isto não é um problema na derivatização pós-coluna, desde que o tempo decorrente após a reação até a detecção não seja muito grande.

A maior desvantagem na utilização de OPA é o fato de reagir pouco com aminas secundárias (imino ácidos: prolina e hidroxiprolina). O problema pode ser resolvido, oxidando-se estas espécies com cloramina T ou hipoclorito⁵⁴. Entretanto, na derivatização pós-coluna pode ocorrer maior alargamento dos picos, em função da maior complexidade da aparelhagem, pois requer uma bomba a mais, a qual impulsiona o agente oxidante.

A figura nº 6 apresenta a reação de derivatização entre um aminoácido, OPA e 2-mercaptoetanol.

Figura nº 6 - Reação de derivatização entre um aminoácido, orto-ftaldialdeído e 2-mercapto-etanol.

2.2.2.3. - 9-Fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl)

Este reagente foi utilizado, primeiramente, por Einarsson^{55,56,57} e Betner⁵⁸ para a determinação de aminoácidos em derivatização pré-coluna. A reação, apresentada na figura nº 7 abaixo, ocorre rapidamente com todos os aminoácidos, incluindo prolina, numa solução alcalina à temperatura ambiente, sendo completada em menos de um minuto, além de ser tolerante à presença de sais e outros contaminantes. Os derivados formados com os aminoácidos são altamente estáveis durante horas, como também apresentam alta fluorescência, como os derivados obtidos com OPA. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para os derivados formados com aminoácidos são, respectivamente, 270 e 316 nm.

Entretanto, pode ocorrer a formação de mono e bi derivados com histidina, tirosina e lisina, sendo que a proporção varia em função do pH bem como com a relação entre as quantidades de reagente e de cada aminoácido. Outro problema é o fato de os produtos de hidrólise do reagente apresentarem propriedades semelhantes aos derivados de aminoácidos, o que interfere nas separações cromatográficas, requerendo sua remoção com solventes orgânicos antes da introdução da amostra na coluna cromatográfica.

Smith e outros⁵⁹ utilizaram um sistema automatizado para a determinação de aminoácidos, empregando este reagente, chegando a limites de detecção, dependendo do aminoácido e das condições experimentais, em torno de 50 a 500 pmol de aminoácido injetado na coluna cromatográfica.

A figura nº 7 apresenta a reação entre FMOC-Cl com um aminoácido genérico.

Figura nº 7 - Reação de Fmoc-Cl conduzindo à formação de derivados altamente fluorescentes.

2.2.3. Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)

A Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC) é uma das melhores técnicas de separação entre aminoácidos conhecida atualmente, sendo largamente utilizada em muitos campos.

Entre os vários métodos de detecção utilizados em HPLC, tem-se a detecção por fluorescência, que é altamente sensível e seletiva, bem como excelente para a determinação de aminoácidos presentes em baixíssimas concentrações (traços) em matrizes complexas, tais como urina e tecidos. O desenvolvimento de sistemas analíticos mais sofisticados, bem como o emprego de novos reagentes derivatizantes, tem tornado esta técnica analítica cada vez mais utilizada para a análise de amostras de aminoácidos⁶⁰.

Atualmente, podemos utilizar, para as análises de amostras de aminoácidos, a derivatização pré-coluna e a derivatização pós-coluna⁶¹.

Na derivatização pré-coluna, os aminoácidos presentes numa amostra sofrem uma reação de derivatização adequada antes de serem introduzidos na coluna cromatográfica, sendo estes derivados separados por fase reversa, no qual a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. Comparativamente com a derivatização pós-coluna, a derivatização pré-coluna necessita de uma aparelhagem menos sofisticada, não necessitando, por exemplo, de uma segunda bomba que teria a função de impulsionar o reagente após a separação cromatográfica.

Os reagentes utilizados na derivatização pré-coluna conferem ao aminoácido certas propriedades, como absorção no ultravioleta e fluorescência.

A derivatização pós-coluna exige aparelhagem um pouco mais sofisticada. Porém, tem certas vantagens sobre a derivatização pré-coluna, pois é relativamente rápida, sendo um processo automático e contínuo.

Na derivatização pós-coluna, os aminoácidos são, inicialmente, separados numa coluna contendo, como fase estacionária, uma resina de troca-catiônica e uma fase móvel composta de uma solução tampão. Em seguida, o efluente da coluna cromatográfica e o reagente, que é impulsionado por uma bomba ou por pressão de um gás, se juntam por meio de uma conexão, a partir de onde essa mistura começa a reagir, antes de chegar no detector, conduzindo à formação de espécies que apresentam propriedades compatíveis com o detector utilizado (absorção no ultravioleta, fluorescência, etc)

Geralmente, é necessário utilizar-se um reator para que ocorra a reação desejada, pois, muitas vezes, a reação é lenta, mesmo com algum aquecimento. Esses reatores consistem num tubo de um material inerte, geralmente enrolados em espiral. Scholten e outros⁶² estudaram as vantagens de se utilizarem tubos de PTFE (teflon) para a construção dos reatores, pois esse material é, praticamente, inerte às substâncias com as quais entra em contato.

É muito importante que a reação seja efetuada o mais rápida possível, caso contrário a sensibilidade do método será diminuída. Além do mais, seria necessário utilizar-se um reator mais longo ou de maior diâmetro interno, o que causaria alargamento exagerado dos picos no cromatograma, devido à maior mistura das espécies. Shih e Carr⁶³ estudaram a otimização da derivatização pós-coluna e sua dependência com a vazão do reagente e efluente da coluna, bem como o comprimento do reator, no caso de reações lentas. Chegaram, assim, a comprimentos de reator e vazões ideais, que permitiam reações o mais completas possível, sem alargamento considerável dos picos. Segundo Poulsen e outros⁶⁴, o alargamento dos picos deve-se, também, ao fato de o fluxo da mistura ser parabólico dentro do reator. Para minimizar esses efeitos, utilizaram um reator "crochetado", ao invés de o enrolarem em espiral.

Em muitos casos, é necessário aquecer-se o reator, para que a reação ocorra o mais rápido possível. Porém, a temperatura não pode ser muito elevada, o que causaria a formação de bolhas, que iriam ao detector⁶⁵.

Existe uma vazão ótima do reagente para se obter a maior sensibilidade possível numa análise⁶⁵. Se a vazão do reagente for baixa, sua quantidade será inferior à necessária para reagir quantitativamente com os componentes da amostra. Por outro lado, se a vazão do reagente for alta, ocorrerá grande diluição da solução que contém os derivados formados, além de o tempo de permanência no reator ser diminuído, conduzindo a uma sensibilidade mais baixa.

Os reagentes derivatizantes descritos anteriormente podem ser utilizados tanto na derivatização pós-coluna como na pré-coluna na determinação de aminoácidos.

2.2.4. - Análise por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA) é baseada na injeção de uma amostra líquida em um fluxo, contínuo e não segmentado de um carregador composto de um fluido adequado. Geralmente, o fluxo de carregador que contém a amostra em estudo conflui com um outro fluxo, que no caso possui um reagente adequado, que forma com os componentes da amostra derivados com propriedades físicas ou químicas compatíveis com o detector utilizado, como absorbância no ultravioleta e visível, fluorescência, etc⁶⁶.

O sinal elétrico gerado no detector é amplificado e enviado a um sistema de registro, que pode ser constituído desde um simples registrador gráfico a um microcomputador. Aos registros gráficos assim obtidos damos o nome de fiagramas.

Uma análise dos fiagramas nos permite fazer análises quantitativas a partir das alturas dos picos, que são proporcionais à concentração do componente da amostra em estudo.

Uma pequena bomba, geralmente peristáltica, é utilizada para impulsionar os líquidos que contêm o carregador com a amostra bem como o reagente, através de tubos independentes.

MacDonald e Nieman⁶⁷ utilizaram a FIA para a determinação de aminoácidos, baseando-se no fato de haver supressão da quimiluminescência do sistema Co(II)-luminol-peróxido.

Já Renoe e outros⁶⁸, utilizaram um sistema FIA com o reagente verde de bromocresol para a determinação de albumina em soro, resultando numa excelente sensibilidade.

Se a reação entre os componentes da amostra e o reagente não ocorrerem rapidamente, é necessário o emprego de um reator, que, geralmente, consiste num tubo de um material inerte, pelo qual passa a mistura reacional. Quanto maior o comprimento do reator, maior o tempo e mais completa a reação. O aquecimento do reator pode conduzir a reações mais rápidas. Um inconveniente dos reatores mais longos é tornar as análises mais demoradas, com maior alargamento dos picos, devido à dispersão. Uma alternativa para aumentar o tempo de residência sem aumentar a dispersão da amostra, que é uma consequência do aumento do reator, seria a diminuição da vazão ou até mesmo uma parada de fluxo. Após a reação ocorrer em extensão adequada para a detecção e quantificação, retoma-se o fluxo da zona de reação em direção ao detector. O aquecimento do reator pode conduzir a reações mais rápidas.

2.2.5. - Análise por injeção sequencial (SIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA), proposta por Ruzicka e Hansen⁶⁹ visando mecanização e automatização de análises químicas, é uma técnica com muitas virtudes, entre as quais pode-se citar, boa precisão, alta frequência de amostragem, grande versatilidade, para adaptar-se a várias metodologias analíticas, envolvendo métodos de separação, como extração com solventes, troca iônica, diálise, entre outras. A utilização de múltiplas linhas de transmissão de fluxo permite incorporar vários reagentes, muito embora a configuração mecânica complexa do sistema implique na necessidade de manutenção e re-calibrações frequentes. De igual modo, o consumo de reagente é relativamente alto devido ao fato que se tem um sistema de fluxo contínuo, embora este consumo ainda seja bem menor do que em análises tradicionais realizadas em batelada.

Ruzicka e Marshall⁷⁰ propuseram em 1990 a técnica de análise por injeção sequencial (SIA), cujo equipamento consiste numa bomba de pistão (ou peristáltica), uma única linha de transmissão e uma válvula seletora, que é o componente principal do sistema, contendo várias portas (8 no modelo usado), existindo uma porta comum, que tem acesso a cada uma das outras,

individualmente, com a rotação da válvula. A ligação da válvula ao sistema de propulsão de líquidos é feita com uma bobina coletora, cuja função é acomodar os volumes de reagentes e amostra que são seqüencialmente aspirados para o seu interior. As outras portas da válvula são conectadas às soluções de reagentes, amostra, padrões, detector, reservatório para acúmulo de resíduos, etc. Após a aspiração dos reagentes e amostra para a bobina coletora, a válvula seletora gira fazendo a conexão desta bobina com o detector, geralmente através de uma bobina de reação com dimensões apropriadas. Em seguida o sistema de propulsão é revertido e as misturas de soluções colocadas na bobina coletora são injetadas através da bobina de reação em direção ao detector e descarte.

Nos sistemas SIA sempre é necessário um computador interfaceado à bomba, à válvula e ao detector, com um software apropriado, para controle sincronizado do movimento de ambos, assim como para a aquisição de dados. No caso de sistemas FIA o controle por computador nem sempre é necessário, podendo ser operado manualmente.

A vantagem principal dos sistemas SIA é a grande economia de amostra e reagentes. Além disso, os sistemas SIA não requerem reconfigurações mecânicas para alterar parâmetros instrumentais como volume de amostra, tempo de reação, diluição da amostra e relação entre volumes de reagentes e amostras. Apesar de existirem modelos comerciais tanto de sistemas FIA, como SIA, sempre é necessária uma etapa de montagem prévia de um sistema de análises. No caso dos sistemas SIA estas reconfigurações do sistema para diferentes analitos são mínimas. Geralmente o que se substitui é o programa que comanda os movimentos do sistema de propulsão e o da válvula seletora.

Por outro lado, os sistemas SIA apresentam como desvantagem uma baixa interpenetração entre as soluções de reagentes e amostra se a seleção dos volumes aspirados para a bobina coletora não for apropriada, principalmente se mais de dois reagentes são necessários no método. Além disso, a frequência analítica é bem menor do que nos sistemas de análise por injeção em fluxo tradicionais.

Neste trabalho procurou-se automatizar a determinação de proteínas totais utilizando o reagente PBQ utilizando o sistema de análise por injeção seqüencial. O reator de aço inox, imerso no banho termostaticado a $90,0 \pm 0,1$ °C foi acoplado a uma das portas da válvula seletora e à cela de fluxo do detector espectrofotométrico. Ao contrário do sistema em fluxo contínuo, o reagente

PBQ e a amostra foram mantidos em frascos separados e misturados somente no momento da análise, sendo que esta mistura é feita já pelo sistema automatizado.

2.2.6. - Cromatografia a gás

Matsumura e outros⁷¹ fizeram a determinação de aminoácidos empregando cromatografia em fase gasosa.

Inicialmente, foi feita a desproteinização de soro com ácido perclórico e os aminoácidos livres no sobrenadante foram convertidos em seus N(O,S)-isobutoxicarbonil metil éster derivados e medidos com o emprego de um detector por ionização de chama. A separação foi feita empregando-se uma coluna capilar DB-17. As curvas analíticas foram lineares na faixa de 0,2-50 µg para cada aminoácido, com coeficientes de correlação da ordem de 0,998.

Através deste método analítico, os aminoácidos puderam ser diretamente analisados, sem a necessidade de se fazer um procedimento de "clean-up" prévio.

3. - OBJETIVOS

São os seguintes os objetivos deste trabalho:

- 1) Desenvolver métodos em fluxo para determinação de proteínas e aminoácidos, utilizando reagentes de baixo custo**
- 2) Determinar albumina humana em soros, com o emprego da PBQ, num sistema em fluxo e em análise por injeção seqüencial (SIA)**
- 3) Determinar albumina humana e aminoácidos, com o emprego do reagente tetraamin cobre (II), num sistema de análise por injeção em fluxo (FIA)**

4. - Utilização do reagente PBQ num sistema em fluxo e em análise por injeção seqüencial

4.1. - Reações entre a PBQ e uma proteína

A utilização da p-benzoquinona (PBQ), para a determinação de proteínas totais, tem-se mostrado muito interessante, pois é um método espectrofotométrico de custo relativamente baixo e de fácil execução. Este método está baseado na formação de produtos entre uma proteína e a PBQ, apresentando um máximo de absorção no ultravioleta a cerca de 350 nm^{31,32,33,34}.

Os produtos de reação, de coloração avermelhada, apresentam-se estáveis durante horas à temperatura ambiente após a reação entre a proteína e a PBQ, realizada a 100 °C por 20 minutos, permitindo que a leitura da absorbância possa ser realizada num intervalo relativamente grande sem erros apreciáveis. Anticoagulantes comuns como EDTA, citrato, ou heparina, nas concentrações utilizadas no laboratório, não interferem com o método da PBQ. O método da PBQ possui um baixo limite de detecção, em torno de 4 µg/mL, apresentando-se mais sensível do que o método do biureto, cujo limite de detecção está em torno de 45 µg/mL³².

A figura nº 2 na página nº 11 apresenta a reação entre uma quinona e o reagente PBQ.

4.2. - Utilização da PBQ num sistema em fluxo

4.2.1 - Parte experimental

4.2.1.1. Aparelhagem e Materiais Utilizados

- Espectrofotômetro UV-visível Beckman DU 70 com impressora matricial
- 2 cubetas de quartzo
- Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo
- Tubos de ensaio 16 x 100 mm com tampas de rosca
- Reator consistindo num tubo de aço inoxidável com 0,28 mm de diâmetro interno e 2,2 m de comprimento e volume interno de aproximadamente 135 μ L
- Bomba peristáltica com controlador de velocidade de bombeamento
- Termômetro de – 10 °C a 150 °C
- Béqueres de 50, 100 e 500 mL
- Frascos de café solúvel
- Recipiente para aquecer água (banho-maria)
- Termostato
- Aquecedores, construídos com resistores de chuveiro elétrico
- Sistema controlador de voltagem (“variac”)
- Suportes com garras
- p-benzoquinona impura
- Dimetilsulfóxido
- Albumina bovina fração V
- Glicerina
- Frasco com dedo frio para purificar a PBQ por sublimação
- Pipetas graduadas e volumétricas

- Recipientes de isopor
- Microseringa para HPLC com capacidade de 100 μL
- Voltímetro
- Suportes para tubos de ensaio
- Balões volumétricos de 50, 100 e 250 mL
- Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_3BO_3 e NaOH para o preparo das soluções tampão
- Tubos de Tygon™

4.2.1.2. - Esquema da Aparelhagem

A figura nº 8 apresenta o esquema da aparelhagem que empregou o reagente PBQ para a derivatização de proteínas.

Figura nº 8 - Esquema da aparelhagem utilizada para a análise em fluxo de proteínas, com o emprego do reagente PBQ .

A mistura reacional da PBQ mais amostra de proteína (ou padrão), após diluição, foi colocada no tubo de ensaio imerso num banho de água e gelo e mantido ao abrigo da luz. Essa mistura reacional foi impulsionada, com o emprego de uma bomba peristáltica, através do reator composto de um tubo de aço inoxidável com 2,2 metros de comprimento e 0,28 mm de diâmetro interno, imerso num banho de glicerina a 90 °C, sendo o tempo de reação de aproximadamente 17 segundos. O aquecimento da glicerina foi efetuado empregando-se um resistor de chuveiro elétrico, montado num fio encapado de cobre, com área de secção de 2,5 mm².

Logo após a reação, a mistura dos derivados formados foi rapidamente resfriada num banho de água à temperatura ambiente e enviada ao espectrofotômetro Micronal B 382, ajustado ao comprimento de onda adequado.

Após passar pelo espectrofotômetro, a mistura dos derivados foi descartada num frasco de vidro. Utilizou-se uma pipeta graduada, conforme figura nº 9, para se determinar a vazão.

Figura nº 9 - Fotografia da aparelhagem .

4.2.1.3. - Bombeamento da mistura reacional

A mistura reacional composta de proteína (ou aminoácido) dissolvida numa solução tampão (pH 8,0 ou pH 9,0) mais PBQ 0,10 mol/L em DMSO, foi bombeada através de um tubo de Tygon ® , empregando-se uma bomba peristáltica com controle de velocidade, a uma vazão de aproximadamente 0,48 cm³/min. A solubilidade da PBQ em água é muito baixa, sendo necessário dissolvê-la previamente em DMSO, no qual sua solubilidade é bem maior.

4.2.1.4. - Controle do aquecimento do reator

O controle da temperatura do reator, imerso em glicerina num béquer de 500 mL dentro de uma caixa de isopor com sua parte superior coberta com folhas de alumínio, foi um ponto de extrema importância, pois mesmo pequenas variações na temperatura puderam ocasionar diferenças na velocidade de reação. Inicialmente, para se fazer o controle da temperatura no valor desejado, utilizou-se um regulador de voltagem, impondo-se ao resistor de chuveiro elétrico uma “voltagem” de aproximadamente 25 volts (valor esse conhecido com a utilização de um voltímetro), fazendo com que a potência liberada pelo resistor fosse ao redor de 50 watts. Utilizou-se um termostato simples (adquirido em loja de materiais elétricos), que se mostrou inviável, pois se desligava quando a temperatura passava de 90 °C, voltando a ligar a cerca de 6 °C abaixo do valor desejado. O problema pôde ser muito bem contornado, impondo-se uma ddp de 25 volts até a temperatura chegar a 90 °C, baixando-se para cerca de 13 volts (valor encontrado experimentalmente), o que manteve a temperatura do banho de glicerina em 90 °C. Obteve-se, dessa forma, um excelente controle da temperatura, pois a energia térmica gerada no sistema era igual (ou quase igual) à energia térmica dissipada. Raramente, houve a necessidade, de tempos em tempos, de se interromper a energia elétrica imposta ao resistor, empregando-se um simples interruptor de abajur. A leitura da temperatura foi feita com a utilização de um termômetro -10 °C a 150 °C.

A figura nº 10 apresenta a fotografia do reator, juntamente com o aquecedor, dentro do béquer contendo glicerina.

Figura nº 10 - Fotografia do reator dentro do béquer com glicerina, juntamente com o aquecedor.

4.2.1.5. - Preparo do reagente PBQ e obtenção das amostras de albumina humana

A PBQ precisou ser previamente purificada por meio de sublimação. Para isso, utilizou-se um frasco de vidro, que possuía em seu interior um “dedo frio”, através do qual circulava água. A PBQ impura foi colocada dentro do frasco de vidro, que foi aquecido em um banho de glicerina contida num frasco de café solúvel e mantida a uma temperatura entre 80 e 85 °C (o ponto de fusão da PBQ está em torno de 115 °C). O aquecimento foi feito com o emprego de um resistor de chuveiro elétrico, montado num fio encapado de 2,5mm². Através do resistor, passava corrente elétrica, cujo valor era controlado aplicando-se um potencial próximo a 20 volts, com o emprego de um “variac”. Um termostato imerso na glicerina permitiu um melhor controle da temperatura. Não foi necessário um controle rígido da temperatura, pois teve-se intenção de apenas sublimar a PBQ impura, sem que houvesse decomposição desta.

Na faixa de temperatura esperada ocorreu a sublimação da PBQ, que foi verificada pelo aparecimento de um sólido amarelo claro em volta do dedo frio. Após cerca de uma hora de sublimação, retirou-se o dedo frio do frasco de vidro e, cuidadosamente, transferiu-se a PBQ sublimada para um tubo de ensaio com tampa de rosca.

Um ponto muito importante a considerar é o fato de que vapores de PBQ, que sublima muito facilmente, atacam a córnea, devendo, com isso, a operação de sublimação ser feita dentro de uma capela. O manuseio da PBQ também é relativamente difícil, já que o material sublimado e purificado vai se perdendo por sublimação, exigindo que as operações de transferência sejam rápidas. A figura nº 11 apresenta a aparelhagem utilizada para a purificação da PBQ.

Após a sublimação, colocou-se uma certa quantidade de PBQ num frasco com tampa de rosca, previamente pesado em balança analítica. Pesando-se novamente o frasco, pôde-se conhecer a quantidade total de PBQ e adicionar-se a quantidade necessária de dimetilsulfóxido para se obter o reagente PBQ na concentração 0,10 mol/L. Dessa forma, evitou-se ao máximo a exposição do material sublimado ao ar, pelos motivos expostos acima. O reagente PBQ em DMSO foi guardado no freezer, permanecendo congelado. Pouco antes de cada utilização, foi retirado do freezer e deixado aquecer naturalmente até a temperatura ambiente.

As amostras de albumina humana foram fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP), onde foram feitas as determinações das concentrações de albumina humana com o emprego do método oficial de Kjeldahl, conforme o método USP (United States Pharmacopeia) 23/NF 18 de 1995, método 461 - determinação de nitrogênio - I.

Figura nº 11 - Aparelhagem utilizada para a purificação da PBQ por sublimação.

4.2.1.6. - Preparo das soluções tampão

Foram preparadas soluções tampão nos valores de pH 7,0 ; 8,0 e 9,0.

Para a solução tampão pH 7,0 , foram preparadas, inicialmente, uma solução **A** de Na_2HPO_4 0,10 mol/L e uma solução **B** de NaH_2PO_4 0,10 mol/L . O pH desejado foi obtido misturando-se as soluções **A** e **B** em proporções adequadas, com o auxílio de um medidor de pH com eletrodo de vidro. No caso das soluções tampão pH 8,0 e pH 9,0 utilizou-se uma solução de H_3BO_3 0,10 mol/L, que foi titulada com solução de NaOH 0,10 mol/L até a obtenção do pH desejado, tendo sido utilizado, também neste caso, um medidor de pH.

4.2.1.7. - Condições experimentais para a determinação de proteínas e obtenção dos espectros das proteínas e aminoácidos

4.2.1.7.1 .- Condições experimentais nas análises em fluxo das proteínas

Neste caso, foi utilizado o espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais:

- Valores de pH em que se realizaram as reações: pH 8,0 e pH 9,0
- Temperatura do reator no banho de glicerina: $(90,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$
- Tempo de reação: aproximadamente 17 segundos
- Volume do reator: aproximadamente 135 μL
- Vazão da mistura reacional: aproximadamente 0,48 mL/min.
- Volume do reagente PBQ 0,10 mol/L adicionado em 10 mL de amostra diluída em solução tampão: 50 μL
- Comprimento de onda do espectrofotômetro Micronal B 382: 361 nm

4.2.1.8. - Condições experimentais para a obtenção dos espectros da albumina bovina e dos aminoácidos

Utilizou-se, neste caso, o espectrofotômetro Beckman DU 70 com as cubetas de quartzo. As reações foram feitas em tubos de ensaio com tampa de rosca.

- Valores de pH em que se realizaram as reações:

albumina bovina: pH 7,0 , pH 8,0 e pH 9,0

aminoácidos: pH 7,0

- Temperatura do banho-maria: 100 °C

- Tempo de reação: 20 minutos

- Concentração do reagente PBQ em DMSO: 0,10 mo/L

- Volume do reagente PBQ adicionado em 5 mL de amostra diluída em solução tampão: 50µL

4.3. - Resultados e discussão

4.3.1. - Espectros de cada branco em diferentes valores de pH e tempo de aquecimento

Observou-se que mesmo na ausência da albumina bovina, as amostras de soluções tampão, após reação com PBQ, conduziam à formação de uma mistura de derivados de coloração avermelhada semelhante aos derivados obtidos com albumina bovina.

Para a obtenção dos espectros obtidos entre a albumina bovina e a PBQ em diferentes valores de pH apresentados mais adiante, foi necessário submeter-se cada branco correspondente (solução tampão mais PBQ, sem albumina bovina) às mesmas condições de reação (pH, tempo de reação e temperatura) que as das amostras que continham a proteína.

As figuras n° 12, 13 e 14, apresentam os espectros dos brancos, ou seja, reação entre 5 mL de solução tampão nos valores de pH 7,0 , 8,0 e 9,0 e 50 μ L de solução de PBQ 0,10 mol/L em DMSO, sendo esta mistura reacional submetida ao aquecimento em banho-maria (100 °C) durante 20 minutos. Utilizou-se água deionizada como um segundo branco, a fim de se conhecerem os respectivos espectros. As leituras foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU-70.

Figura n° 12 - Espectros do branco em pH 7,0 , obtidos em diferentes tempos de aquecimento. Condições experimentais: Espectrofotômetro Beckman DU 70, comprimento de onda 348 nm; temperatura em que foram feitas as reações: 100 °C.

Figura nº 13 - Espectros do branco em pH 8,0 , obtidos em diferentes tempos de aquecimento. Condições experimentais: Espectrofotômetro Beckman DU 70, comprimento de onda 348 nm; temperatura em que foram feitas as reações: 100 °C.

Pode-se notar, a partir dos espectros apresentados a seguir, que cada branco apresenta uma certa absorbância nos comprimentos de onda no qual foram feitas as leituras das absorbâncias dos derivados entre a PBQ e a proteína, sendo que em valores de pH mais elevados os valores das absorbâncias são mais acentuados.

Quando as reações são realizadas em pH 9,0 , conforme se pode observar na figura nº 14, o branco já reagiu totalmente com a PBQ em cerca de 5 minutos de aquecimento, o que mostra ser este valor de pH mais adequado para ser utilizado num sistema em fluxo, já descrito, no qual o tempo de reação é muito pequeno (cerca de 17 segundos).

Figura nº 14 - Espectros do branco em pH 9,0 , obtidos em diferentes tempos de aquecimento. Condições experimentais: Espectrofotômetro Beckman DU 70, comprimento de onda 348 nm; temperatura em que foram feitas as reações: 100 °C.

Empregou-se a temperatura de 90 °C no banho de glicerina com o objetivo de se conseguir reação o mais rápida possível, sem a ocorrência da formação de bolhas dentro do reator, pelo fato de a mistura reacional entrar em ebulição. Dessa forma, temperaturas mais baixas do que 90 °C conduziriam a reações mais lentas, diminuindo a sensibilidade do método. Já temperaturas mais elevadas causariam a formação de bolhas no reator, que se concentrariam na cela do detector, causando leituras errôneas das absorbâncias.

4.3.2. - Espectros da albumina bovina com e sem derivatização e dos derivados com PBQ em diferentes tempos de reação e valores de pH

Neste caso, as reações foram realizadas em tubos de ensaio com tampa de rosca. Imediatamente após o tempo de aquecimento desejado ter sido atingido, o tubo era retirado do banho-maria e resfriado à temperatura ambiente com água corrente. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU 70, empregando-se cubetas de quartzo.

Na figura nº 15 estão apresentados os espectros de absorção no ultravioleta da albumina bovina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre albumina bovina e PBQ. Nos dois casos, a concentração da albumina bovina foi de 200 µg/mL.

Figura nº 15 - Espectros da albumina bovina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre albumina bovina e PBQ (espectro em marrom). Concentrações da albumina bovina com ou sem derivatização: 200 µg/mL. Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ sob aquecimento a 100 °C, durante 20 minutos. Reações realizadas em banho-maria, adicionando-se 50 µL de PBQ 0,10 mol/L em 5 mL de solução tampão pH 7,0 contendo albumina bovina na concentração 200 µg/mL. Branco: solução tampão pH 7,0 mais PBQ sem albumina bovina, nas mesmas condições experimentais mencionadas. Aparelho utilizado: espectrofotômetro Beckman DU 70. Branco utilizado na obtenção do espectro da albumina bovina sem derivatização: água deionizada.

Figura nº 16 - Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de reação sob aquecimento a 100 °C. Reações realizadas em banho-maria, adicionando-se 50 µL de PBQ 0,10 mol/L em 5 mL de solução tampão pH 7,0 contendo albumina bovina na concentração 200 µg/mL . Branco: solução tampão pH 7,0 mais PBQ sem albumina bovina, nas mesmas condições experimentais mencionadas. Aparelho utilizado: espectrofotômetro Beckman DU 70.

A figura nº 16 apresenta os espectros dos derivados formados após a reação entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de aquecimento e em pH 7,0 .

Já a figura nº 17 apresenta os espectros dos derivados formados a partir da reação entre albumina bovina e PBQ em pH 8,0.

Figura nº 17 - Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de reação sob aquecimento a 100 °C. Reações realizadas em banho-maria, adicionando-se 50 µL de PBQ 0,10 mol/L em 5 mL de solução tampão pH 8,0 contendo albumina bovina na concentração 200 µg/mL . Branco: solução tampão pH 8,0 mais PBQ sem albumina bovina, nas mesmas condições experimentais mencionadas. Aparelho utilizado: espectrofotômetro Beckman DU 70.

Finalmente, a figura nº 18 apresenta, nas mesmas condições descritas anteriormente, os espectros dos derivados obtidos em pH 9,0.

Figura nº 18 - Espectros dos derivados obtidos entre albumina bovina e PBQ em diferentes tempos de reação sob aquecimento a 100 °C. Reações realizadas em banho-maria, adicionando-se 50 µL de PBQ 0,10 mol/L em 5 mL de solução tampão pH 9,0 contendo albumina bovina na concentração 200 µg/mL . Branco: solução tampão pH 9,0 mais PBQ sem albumina bovina, nas mesmas condições experimentais mencionadas. Aparelho utilizado: espectrofotômetro Beckman DU 70.

Este estudo permitiu verificar que quanto maior o valor do pH do meio reacional, maior a velocidade da reação entre a proteína e a PBQ, provavelmente pelo fato de ocorrer maior desprotonação dos amino-grupos terminais das proteínas em valores mais elevados de pH.

Pelo fato de o tempo de reação no sistema em fluxo apresentado neste trabalho ser muito pequeno (cerca de 17 segundos), foi necessário empregar-se um pH mais elevado, o que

tornou as reações de derivatização mais rápidas, aumentando a sensibilidade do método, em função da maior absorbância obtida.

4.3.3. - Espectros dos aminoácidos sem derivatização e dos respectivos derivados com PBQ

Os espectros dos aminoácidos sem derivatização, bem como dos derivados formados entre os aminoácidos e PBQ estão expostos nas figuras a seguir.

No caso dos aminoácidos sem derivatização, a concentração do respectivo aminoácido, dissolvido em água deionizada, foi sempre de 200 µg/mL. Para o caso dos derivados dos aminoácidos com PBQ, a concentração de cada aminoácido também sempre foi de 200 µg/mL, sendo a respectiva reação com PBQ feita em solução tampão pH 7,0 .

Figura nº 19 - Espectros da asparagina sem derivatização (curva em azul) e do derivado formado entre a asparagina e PBQ (curva em vermelho). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 µg/mL. Condições experimentais para os derivados entre o aminoácido e a PBQ: solução tampão pH 7,0 , 0,10 mol/L contendo Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄; quantidade de reagente PBQ 0,10 mol/L em DMSO: 50 µL para cada 5 mL de solução tampão. temperatura do banho-maria 100 °C ; tempo de reação 20 minutos. Como branco utilizou-se a mesma solução tampão, sem o aminoácido, submetida às mesmas condições experimentais. Aparelho utilizado: espectrofotômetro Beckman DU 70, com o emprego de cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Como branco para o aminoácido sem derivatização utilizou-se água deionizada.

Figura nº 20 - Espectros da DL - Histidina sem derivatização (curva em azul) e do derivado formado entre DL-histidina e PBQ (curva em marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 µg/mL. Condições experimentais descritas na figura nº 19 .

Figura nº 21 - Espectro da glicina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre glicina e PBQ (espectro marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 $\mu\text{g/mL}$. Condições experimentais descritas na figura nº 19 .

Figura nº 22 - Espectro da L-serina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre L-serina e PBQ (espectro em marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 µg/mL. Condições experimentais descritas na figura nº 19 .

Figura nº 23 - Espectro da L-isoleucina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre L-isoleucina e PBQ (espectro em marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 $\mu\text{g/mL}$. Condições experimentais descritas na figura nº 19 .

Figura nº 24 - Espectro da L-leucina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre L-leucina e PBQ (espectro em marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 $\mu\text{g/mL}$. Condições experimentais descritas na figura nº 19 .

Figura nº 25 - Espectro da L-metionina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre L-metionina e PBQ (espectro em marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 µg/mL. Condições experimentais descritas na figura nº 19.

Figura nº 26 - Espectro da L-valina sem derivatização (espectro em azul) e do derivado formado entre L-valina e PBQ (espectro em marrom). Concentração do aminoácido (com ou sem derivatização): 200 $\mu\text{g/mL}$. Condições experimentais descritas na figura nº 19 .

4.3.4. - Absorbâncias dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ em função do tempo de aquecimento e do pH

Neste caso, utilizaram-se tubos de ensaio com tampa de rosca. Em cada tubo, colocaram-se 5 mL de solução tampão contendo albumina bovina na concentração 200 µg/mL e 50 µL de reagente PBQ 0,10 mol/L em DMSO, submetendo-se ao aquecimento a 100 °C em banho-maria, respectivamente, durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, e 20 minutos. Depois de decorrido o tempo de aquecimento, o tubo era retirado do banho-maria e imediatamente resfriado à temperatura ambiente em água corrente. O branco, em cada caso, era a respectiva solução tampão sem a albumina bovina, submetido às mesmas condições experimentais.

Através dos testes realizados, constatou-se que quanto maior o valor do pH em que se realizava a reação, maior o valor da absorbância (maior a velocidade da reação). Entretanto, notou-se que para maiores tempos de aquecimento, a reação se completou em menos de 20 minutos de aquecimento, não importando o valor do pH do meio.

Supõe-se que quanto maior o valor do pH maior é a desprotonação a que está submetida a proteína, de forma que esta pode transferir com mais facilidade o seu par de elétrons, conforme pode ser visto na figura nº 2, página 11 da introdução.

No caso do sistema em fluxo desenvolvido neste trabalho, pode-se concluir que o valor de pH 9,0 é o mais adequado, pois a reação é mais completa no tempo de reação de aproximadamente 17 segundos. Porém, para maiores tempos de aquecimento, o valor de pH 9,0 não é adequado, como se pode verificar através da figura nº 27, pois temos muita interferência do branco (conforme figuras nº 12, 13 e 14), que também absorve consideravelmente nas condições em que a reação é feita.

Figura nº 27 - Absorbância dos derivados formados entre PBQ 0,10 mol/L em DMSO e albumina bovina nos valores de pH 7,0 , 8,0 e 9,0, respectivamente. Condições experimentais: volume de albumina bovina 200 µg/mL; 5 mL ; temperatura de reação: 100 °C ; tempo de aquecimento: 20 minutos ; volume do reagente PBQ: 50 µL; comprimento de onda: 348 nm. Espectrofotômetro: Beckman DU 70. Branco utilizado em cada caso: a respectiva solução tampão, sem a adição da proteína, submetida às mesmas condições de reação.

4.3.5 - Variação da quantidade de reagente PBQ nas análises em fluxo

Estudou-se a variação da quantidade de reagente PBQ adicionada às soluções-tampão contendo as amostras padrões de albumina bovina, com o objetivo de se verificar se havia ou não alterações nas respostas.

A quantidade de reagente que se tem utilizado nos experimentos foi de 50 μL . Pode-se ver, a partir da figura nº 28, que com a adição de 70 μL do reagente PBQ 0,10 mol/L em DMSO ocorreu um pequeno aumento na absorbância. Já uma quantidade menor de reagente, no caso 30 μL , ocasionou uma queda significativa na absorbância.

Entretanto, preferiu-se utilizar sempre 50 μL do reagente, pois quantidade maior ocasionava grande dificuldade de se zerar o espectrofotômetro com o branco, que também absorvia consideravelmente com grandes quantidades do reagente.

Figura nº 28 - Variação da absorbância em função da quantidade do reagente PBQ 0,10 mol/L em DMSO. Concentrações da albumina bovina variando de 10 µg/mL a 1000 µg/mL. Condições experimentais já descritas anteriormente para as análises em fluxo com o reagente PBQ. Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo. Valor do pH : 9,0 .

4.3.6. - Curvas analíticas em pH 8,0 e pH 9,0

A pureza da albumina bovina, utilizada como padrão, empregando-se o método de Kjeldahl, era de 89,69 %.

A tabela nº 1 apresenta os valores da absorbância dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ, em função da concentração da albumina bovina, em pH 8,0. Na tabela nº 2 são apresentados os mesmos valores da tabela nº 1, tendo sido as reações realizadas em pH 9,0.

Tabela nº 1 - Valores de absorbância a 361 nm dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ. Condições experimentais: tempo de reação 17 segundos; pH 8,0 ; temperatura do reator 90 °C . Adicionaram-se 50 µL de PBQ 0,10 mol/L em 10 mL de solução tampão pH 8,0 contendo albumina bovina padrão nas concentrações descrita na tabela. Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo. Vazão: 0,48 mL/min.

Concentração da albumina bovina (µg/mL)	Absorbância 1ª medida (u.a.)	Absorbância 2ª medida (u.a.)	Absorbância 3ª medida (u.a.)	Média das 3 medidas (u.a.)	Estimativa do desvio padrão
44,84	0,024	0,024	0,024	0,024	0
89,69	0,044	0,047	0,050	0,047	0,003
179,38	0,098	0,098	0,096	0,097	0,001
269,07	0,137	0,140	0,141	0,139	0,002
358,76	0,188	0,184	0,192	0,188	0,004
448,45	0,235	0,235	0,235	0,235	0

Tabela nº 2 - Valores de absorbância a 361 nm dos derivados formados entre albumina bovina e PBQ. Condições experimentais: tempo de reação 17 segundos; pH 9,0 ; temperatura do reator 90 °C . Adicionaram-se 50 µL de PBQ 0,10 mol/L em 10 mL de solução tampão pH 9,0 contendo albumina bovina padrão nas concentrações descrita na tabela. Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo

Concentração da albumina bovina (µg/mL)	Absorbância 1ª medida (u.a.)	Absorbância 2ª medida (u.a.)	Absorbância 3ª medida (u.a.)	Média das 3 medidas (u.a.)	Estimativa do desvio padrão
44,84	0,059	0,060	0,062	0,060	0,002
89,69	0,124	0,128	0,129	0,127	0,003
179,38	0,248	0,248	0,247	0,248	0,001
269,07	0,354	0,362	0,364	0,360	0,005
358,76	0,471	0,479	0,467	0,472	0,006
448,45	0,555	0,554	0,543	0,551	0,007

Figura nº 29 - Curvas de calibração dos derivados albumina bovina-PBQ nos valores de pH 8,0 e pH 9,0. Condições experimentais já descritas anteriormente. Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo

Analisando-se a figura acima, na qual tem-se a equação da reta do tipo $A = L + B.C$, sendo A a absorbância, L o coeficiente linear e C a concentração da proteína, pode-se notar que em pH 9,0, apesar do bom valor de R , existe uma clara perda de linearidade para as soluções mais concentradas. Como já foi visto em pH 9,0, a reação é mais rápida e deve se proceder em maior extensão do que em pH 8,0. Com isso, a sensibilidade é bem maior, mais do que o dobro (2,5 vezes). Portanto, para amostras mais diluídas que requerem mais sensibilidade, recomenda-se pH 9,0.

Por outro lado, em pH 9,0 a faixa de resposta linear é mais estreita, correspondendo pelo menos à metade da faixa observada em pH 8,0 (0-450 μg/mL) para a qual observou-se excelente linearidade.

Apesar de o branco absorver, o sistema permitiu adequada correção, tanto que os coeficientes lineares obtidos para as duas condições de pH não diferem estatisticamente de zero.

No presente método em fluxo, mesmo sendo o tempo de reação pequeno (17 segundos), foi necessário esperar cerca de 3 minutos, a fim de que ocorresse lavagem da linha, que possuía volume morto relativamente grande. Esse volume incluía desde a saída do frasco que continha a mistura reacional até a cela do detector, sendo muito maior do que o volume morto do sistema FIA apresentado mais adiante.

O controle da temperatura do reator foi outro fator de extrema importância, pois quanto maior a temperatura mais rápida era a reação. Mesmo pequenas variações de temperatura, da ordem de $\pm 0,2$ °C, eram capazes de alterar de forma significativa a velocidade da reação, de modo a causar erros nas determinações das proteínas. A utilização de um termostato, adquirido numa loja de materiais elétricos, não resolveu o problema, pois quando a temperatura do banho de glicerina chegava aos 90 °C, o termostato desligava o aquecimento, tornando a ligá-lo somente quando a temperatura caía ao redor de 84 °C. Termostatos mais sofisticados seriam muito onerosos, o que seria inviável para este trabalho. Dessa forma, optou-se por trabalhar ajustando-se o "variac" a uma d.d.p. de aproximadamente 30 volts no começo, até a temperatura do banho de glicerina atingir 90 °C. Em seguida, reduziu-se essa d.d.p. a um valor próximo de 12 volts (dependia da temperatura do ambiente no dia em que era feita a análise), de forma que o calor gerado no resistor de chuveiro elétrico fosse igual ao calor perdido pelo sistema (vide figura nº 8, página 28). Esse valor de d.d.p. foi obtido empiricamente, após vários testes. Foi necessário o acompanhamento constante da temperatura lida no termômetro, a fim de se evitarem variações. De tempos em tempos, necessitou-se desligar a d.d.p. imposta ao resistor, simplesmente utilizando-se um interruptor de abajur.

Não foi possível utilizar-se uma temperatura mais elevada no banho de glicerina, pois ocorreria a formação de bolhas dentro do reator, causando leituras totalmente erradas no espectrofotômetro.

4.3.7. - Análises de amostras de albumina humana, comparando-se os valores das concentrações obtidos com o método oficial de Kjeldahl

Com o emprego do sistema em fluxo descrito nesta Tese, fizeram-se as análises de doze amostras de albumina humana, nos valores de pH 8,0 e pH 9,0. A tabela nº 3 apresenta os valores das concentrações obtidos, comparando-se com os valores fornecidos pelo método oficial de Kjeldahl.

Tabela nº 3 - Valores das concentrações das amostras de albumina humana, empregando-se o sistema em fluxo nos valores de pH 8,0 e pH 9,0 , comparados com os valores das concentrações fornecidos pelo método oficial de Kjeldahl. Condições experimentais: temperatura do reator no banho de glicerina: 90 °C; tempo de reação 17 segundos; vazão da mistura reacional: 0,48 mL/min.; quantidade de reagente PBQ 0,10 mol/L em DMSO adicionado em 10 mL de solução tampão contendo a amostra: 50µL; diluição da amostra de albumina humana: 50µL num balão de 50 mL e o volume completado com a solução tampão correspondente. Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo.

Número da amostra	Kjeldahl (g/100 mL)	Fluxo pH 8,0 (g/100 mL)	Desvio (%)	Fluxo pH 9,0 (g/100 mL)	Desvio (%)
1	19,54	18,72	- 4,20	19,78	+ 1,23
2	19,76	19,33	- 2,18	19,78	+ 0,10
3	19,22	19,78	+ 2,91	19,78	+ 2,91
4	19,13	19,48	+ 1,83	19,70	+ 2,98
5	19,92	18,68	- 6,22	19,63	- 1,46
6	19,54	18,42	- 5,73	18,87	- 3,43
7	19,94	18,87	- 5,37	19,53	- 2,06
8	20,50	18,57	- 9,41	19,51	- 4,83
9	19,50	19,55	+ 0,25	19,54	+ 0,20
10	19,05	19,48	+ 2,26	19,45	+ 2,10
11	19,92	18,49	- 7,18	19,88	- 0,20
12	20,12	18,10	- 10,04	20,03	- 0,45

Os desvios encontrados na tabela acima podem ser visualizados na figura nº 30 a seguir.

Figura nº 30 - Desvios percentuais entre os valores obtidos no sistema em fluxo nos valores de pH 8,0 e pH 9,0 e os fornecidos pelo método oficial de Kjeldahl. Condições experimentais já descritas na tabela anterior.

Utilizando o teste t pareado Miller e Miller⁷² para comparar os resultados obtidos entre o método proposto e o método de Kjeldahl, obteve-se o valor de $t = 0,92$ para pH 8,0 e $t = 0,72$ para pH 9,0, os quais, comparados ao valor de t tabelado para 12 graus de liberdade e 95% de grau de confiança que é 2,14, sugere que não existe evidência estatisticamente significativa de diferença sistemática entre os dois métodos.

Além disso, o gráfico da figura nº 30 mostra uma distribuição aleatória de erros positivos e negativos, dando suporte à hipótese de que não há evidência de diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método de Kjeldahl.

4.4. - Utilização da PBQ num sistema de análise por injeção seqüencial (SLA) para a determinação de albumina humana

4.4.1. - Parte Experimental

Reagentes e Soluções:

Concentração da solução de PBQ dissolvida em água: 0,0010 mol/L

Diluição realizada nas amostras: de 50 a 1000 µg/mL

Volume da solução transportadora água: 1500 µL

Volume de amostra injetada: 200 µL

Vazão: 30 µl/s

4.4.1.1. - Equipamentos

Os experimentos de análise por injeção seqüencial foram realizados com o aparelho “FiaLab 3500” da Alitea (Medina, WA, USA) montado conforme descrito na Figura nº 31. As soluções foram impulsionadas através do sistema com uma bomba de pistão. O direcionamento das soluções através do sistema foi obtido através de uma válvula rotatória de 8 portas (RV) da Valco Instrument Company (Houston, TX, USA). A bobina coletora (HC) foi construída com um tubo de Teflon (PTFE) de 3 metros e diâmetro interno de 0,8 mm. A bobina de reação (RC1) foi constituída pelo tubo de aço inox com 2,2 m de comprimento e 0,28 mm de diâmetro interno, já descrito no sistema de análise por fluxo contínuo, figura nº 8, página 28. O reator RC2 foi constituído de um pequeno pedaço do tubo de aço inox similar ao usado no reator RC1, mergulhado em um béquer com água na temperatura ambiente, tendo a finalidade de resfriar a mistura reacional antes da entrada na cela de fluxo. Todas as demais conexões entre os tubos foram feitas ou com tubos de Teflon de diâmetro interno 0,5 mm ou com conexões, também em Teflon, da Upchurch (Oak Harbor, WA, USA). A detecção foi feita com um espectrofotômetro da Micronal modelo B382 (São Paulo, SP, Brasil) com uma cela de fluxo com formato em U de 10 mm de caminho ótico e 80 µL de volume interno (Hellma GmbH&Co.,

Mulheim, Baden, Alemanha). O controle da bomba e da válvula foi feito com o software FiaLab 3500 e a aquisição dos dados com a placa PC-LPM-16 da National Instruments (Austin, TX, USA).

4.4.1.2. - Procedimento

O procedimento é baseado no esquema da aparelhagem mostrado na Figura nº 31. Inicialmente a bobina coletora HC e as bobinas de reação RC1 e RC2 são preenchidas com a solução transportadora, constituída da solução tampão borato 0,10 mol/L, pH 9,0. Os tubos conectando os reagentes com a válvula rotatória RV são preenchidos com as respectivas soluções. O detector é ajustado para o comprimento de onda de 361 nm.

O programa que comanda o sistema realiza então a seqüência de passos: a válvula SV conecta a seringa da bomba de pistão SP com o reservatório de solução transportadora C e, com uma vazão de 500 $\mu\text{L/s}$, são aspirados para dentro da seringa 1500 μL de transportador. A válvula SV então conecta o pistão com a válvula rotatória RV e a bomba de pistão aspira seqüencialmente, com uma vazão de 50 $\mu\text{L/s}$, 100 μL de da solução do reagente PBQ pela porta 4 e 200 μL da amostra pela porta 3. O pistão pára cada vez que a válvula rotatória RV está girando para evitar diferenças de pressão e conseqüente formação de bolhas. Por fim, a válvula rotatória muda para a porta 1 e a mistura de PBQ e amostra é injetada através das bobinas de reação RC1 e RC2, em direção ao detector, com uma vazão de 30 $\mu\text{L/s}$, até esvaziar-se completamente a seringa da bomba de pistão. Com isso, a cela de fluxo, assim como o resto do sistema é lavado e, ao final de cada ciclo, encontra-se pronto para realização de nova análise.

Figura 31 – Esquema do sistema de injeção seqüencial para determinação de proteínas totais usando o reagente PBQ. C = solução transportadora de tampão borato 0,10 mol/L, pH 9,0; SV = válvula do sistema de seringa e bomba de pistão; SP = bomba de pistão; RV = válvula de seleção rotatória multiportas; HC = bobina coletora (tubo de PTFE de 3 m de comprimento com 0,8 mm de diâmetro interno); RC1 = bobina de reação (tubo de aço inox de 2,2 m de comprimento com 0,28 mm de diâmetro interno); RC2 = reator de resfriamento (tubo de aço inox de 15 cm de comprimento com 0,28 mm de diâmetro interno); PBQ = solução de p-Benzoquinona 0,0010 mol/L, em meio aquoso; D = celda detectora espectrofotométrica; W, descarte.

4.4.2. - Resultados e Discussão

Nas condições descritas na parte experimental realizou-se a calibração do equipamento, obtendo-se os sinais mostrados na Figura 32

Figura nº 32 – Sinais obtidos pelo sistema de análise por injeção seqüencial para determinação de proteínas totais utilizando padrões de soro albumina bovina (BSA) e o reagente p-Benzoquinona. Os experimentos foram realizados em duplicata, nas seguintes concentrações de BSA: (A) Branco (solução de tampão borato 0,10 mol/L, pH 9,0); (B) 50,0; (C) 100,0; (D) 200,0; (E) 300,0; (F) 400,0; (G) 500,0; (H) 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Como se pode observar da Figura nº 32, o branco apresenta absorvância significativa. O sinal do branco é função da vazão utilizada, sendo que vazões mais baixas levam a maior sinal, tanto do branco como das amostras. Neste sentido, optou-se pela vazão de 30 $\mu\text{L/s}$ na etapa de injeção da mistura reacional através do reator como um compromisso entre sensibilidade e possibilidade de subtração do sinal do branco. Utilizando-se esta vazão a frequência analítica do método proposto foi de 45 análises por hora. Com os experimentos mostrados na Figura 32, construiu-se a curva analítica tomando-se a absorvância na altura máxima de pico, após subtração do sinal do branco, em função da concentração de albumina bovina, conforme é mostrado na Figura 33

Figura 33 – Curva analítica obtida pelo sistema SIA utilizando o reagente p-benzoquinona para determinação de proteínas totais. Equação Resultante: $Y = [(3,7554 \pm 0,0002) \times 10^{-6}]X - (0,006 \pm 0,002)$, onde Y é a absorvância no máximo do pico e X a concentração de albumina, com $R = 0,9992$ ($n = 7$).

Uma vez calibrado o instrumento, realizou-se a determinação da concentração de proteínas totais em dez amostras de albumina humana. A Tabela nº 4 apresenta os resultados obtidos, comparando-os com os obtidos pelo método oficial de Kjeldahl.

Tabela nº 4 - Concentrações obtidas pelo método SIA com o reagente PBQ para amostras de albumina humana comparadas com as concentrações obtidas pelo método de Kjeldahl.

Amostra	Concentrações de Albumina (g/100 mL)		Desvio Relativo (%)
	SIA-PBQ	Kjeldahl	
1	20,83	20,50	1,61
2	19,23	19,03	1,05
3	21,13	21,20	-0,33
4	17,63	20,00	-11,85
5	20,73	20,00	3,65
6	16,33	18,05	-9,52
7	19,83	21,10	-6,01
8	16,93	19,00	-10,89
9	17,63	19,00	-7,21
10	18,33	19,03	-3,68

Para comparação dos resultados utilizou-se o teste t-pareado⁷², $t = (\bar{x}d\sqrt{n})/sd$, onde t é o valor determinado experimentalmente, $\bar{x}d$ a média das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos, sd o desvio padrão das diferenças e n o número de amostras. O valor de t experimental obtido foi de 2,41, que comparado ao valor 2,76, tabelado para 10 graus de liberdade e 98 % de grau de confiança, sugere que não existem diferenças sistemáticas entre os resultados. Entretanto, o teste realizado para 95 % de confiança, condição na qual o valor de t tabelado é 2,23, portanto menor que o valor experimental de 2,41, indica a existência de diferenças sistemáticas entre os dois métodos. Estas diferenças podem ser decorrentes da estocagem das amostras por longo período entre a realização das análises pelo método de Kjeldahl e pelo método SIA.

4.4.3. - Conclusões

O sistema SIA mostrou-se adequado para automatizar a determinação de proteínas utilizando o reagente PBQ. Uma vez que o reagente utilizado foi bem mais diluído do que no método de fluxo contínuo, pode-se prever uma significativa economia do reagente, bem como a minimização de resíduos gerados. Além disso, a frequência analítica foi maior do que no método de fluxo contínuo, fator este que se deve a maior vazão utilizada, bem como ao fato do pequeno volume de amostra e reagente que são injetados no sistema e não mais bombeados continuamente através do reator e cela de fluxo. Um fator adicional que permitiu um aumento da frequência analítica foi a diluição do reagente em meio aquoso e não mais em dimetilsulfóxido. Com esta modificação diminui-se significativamente a aderência do reagente nas paredes do reator e da cela espectrofotométrica, permitindo uma rápida e eficiente lavagem do sistema entre a injeção de amostras diferentes.

5. - Utilização do reagente tetraamin cobre (II) num sistema FIA para a determinação de proteínas e aminoácidos

5.1. - Reações entre a proteína e o reagente tetraamin cobre (II)

Neste trabalho, utilizou-se uma solução de CuSO_4 em água, adicionando-se NH_4OH 28-30 %, obtendo-se, inicialmente, um precipitado:

Com excesso de NH_4OH , ocorreu dissolução do precipitado e formação do complexo tetraamin cobre (II).

A reação provável entre alb (albumina) e $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ seria:

O novo complexo que se formou apresentou um diferente espectro de absorção no ultravioleta, com $\lambda_{\text{máx}} = 263 \text{ nm}$.

Já no caso de um aminoácido, a reação provável entre aa (aminoácido) e $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ seria:

Agora os novos complexos formados apresentam diferentes espectros de absorção no ultravioleta, com $\lambda_{\text{máx}}$ apresentados adiante.

5.2. - Parte experimental

5.2.1. - Aparelhagem e materiais utilizados

- Espectrofotômetro Beckman DU 70
- 2 cubetas de quartzo
- Impressora matricial
- Espectrofotômetro Micronal B 382 com cela de fluxo
- Bomba peristáltica Alitea com regulagem de velocidade
- Registrador simples
- Erlenmayers de 250 e 500 mL
- Frascos de vidro de 500 mL
- Béqueres de 50 mL
- Balões volumétricos de 50 , 100, 200, 500, 1000 e 2000 mL
- Provetas de 10 , 50 e 100 mL
- Seringas plásticas de 1 , 5 e 10 mL
- Tubos de ensaio com tampa de rosca 16 x 100 mm
- Válvula de injeção com alça de amostragem de 216 µL
- Tubos de Teflon ® de 0,8 mm de diâmetro interno
- União "T"
- Água deionizada
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- NH_4OH 28-30 %
- Cronômetro
- Pipeta graduada de 10 mL
- Microseringa de 100 µL para HPLC

O esquema da aparelhagem utilizado para a determinação de proteínas e aminoácidos, empregando-se o reagente tetraamin cobre (II), está exposto na figura nº 34 a seguir

Figura nº 34 - Esquema da aparelhagem que empregou o reagente tetraamin cobre (II) para a determinação de proteínas e aminoácidos.

Já a figura nº 35 apresenta a fotografia desta mesma aparelhagem.

Figura nº 35 - Fotografia da aparelhagem que empregou o reagente tetraamin cobre (II) para a determinação de proteínas e aminoácidos.

O sistema proposto opera por confluência, ou seja, a amostra é injetada em uma solução transportadora inerte (no caso água deionizada). O reagente é bombeado em uma linha separada que conflui com a solução transportadora após válvula de injeção.

Para uma mesma vazão de reagente e solução transportadora, como foi utilizado neste sistema, o coeficiente de dispersão será sempre muito maior do que 2 (diluição por um fator sempre maior que 2 após a confluência).

Apesar desta diluição, o sistema de confluência apresenta como grande vantagem a eficiência da mistura entre o reagente e a amostra.

Ruzicka e Hansen⁶⁶ demonstram que com este tipo de configuração todos os elementos da solução da amostra recebem o reagente, garantindo a presença deste em condições de excesso em relação à concentração estequiométrica, diminuindo consideravelmente o risco de erros na análise de amostras complexas. Ganho de sensibilidade pode ser obtido aumentando-se o

volume da amostra e diminuindo-se a vazão do reagente, conferindo grande flexibilidade ao método.

As condições experimentais estão descritas adiante em cada caso.

5.2.2. - Preparo do Reagente Tetraamin cobre (II)

Inicialmente, preparou-se a solução estoque, dissolvendo-se 6,25 gramas de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em 125 mL de água deionizada contida num balão de 250 mL, 12,5 mL de hidróxido de amônio P.A. 28-30 %, completando-se o volume de 250 mL com água deionizada. Esta solução estoque pôde ser guardada num frasco hermeticamente fechado durante dois meses.

O preparo do reagente consistiu em se empregar 100 mL de solução estoque, 150 mL de hidróxido de amônio 28-30 %, 100 mL de água deionizada e, após agitação, completando-se o volume com água deionizada num balão de 1 litro.

O reagente tetraamin cobre (II) 1:3 consistiu no emprego de uma parte do reagente acima preparado e duas partes de água deionizada.

Todo reagente preparado foi guardado num frasco hermeticamente fechado quando não em uso.

Empregou-se este mesmo reagente tetraamin cobre (II) nas análises de amostras de proteínas e aminoácidos, em diluições adequadas, conforme descrito adiante nesta tese.

A figura nº 36 abaixo apresenta balões com soluções estoque e reagente tetraamin cobre (II).

Figura nº 36 - Balões volumétricos contendo solução estoque (balão central) e reagente tetraamin cobre (II) (balões laterais).

5.2.3. - Condições experimentais para a determinação de proteínas e aminoácidos

As condições experimentais para a determinação de proteínas e aminoácidos nas amostras, bem como a obtenção das respectivas curvas analíticas, foram as seguintes:

Proteínas

- Concentrações do reagente tetraamin cobre (II): 3,3 mmol/L e 10 mmol/L
- Leituras das absorvâncias: 275 nm
- Volume de amostragem: 216 μ L

- Vazão do reagente tetraamin cobre (II): 2,25 mL/min.
- Vazão da solução transportadora (água): 2,25 mL/min.
- Percurso analítico: tubo de Teflon ® com 100 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno
- Padrões utilizados para a obtenção das curvas analíticas: albumina bovina dissolvida em água leionizada, nas concentrações de 10 µg/mL a 500 µg/mL

Aminoácidos

- Concentração do reagente tetraamin cobre (II): 3,3 mmol/L
- Leituras das absorbâncias: 275 nm
- Volume de amostragem: 216 µL
- Vazão do reagente tetraamin cobre (II): 2,25 mL/min.
- Vazão da solução transportadora (água): 2,97 mL/min.
- Percurso analítico: tubo de Teflon ® com 80 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno
- Padrões utilizados para a obtenção das curvas analíticas: os aminoácidos já mencionados dissolvidos em água, nas concentrações de 10µg/mL a 200 µg/mL

5.3. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. - Espectros do reagente tetraamin cobre (II) na ausência e presença da albumina bovina e aminoácidos

Com a utilização do espectrofotômetro Beckman DU-70, foi obtido o espectro do reagente tetraamin cobre (II), conforme apresentado na figura nº 37 a seguir. Para isso, utilizou-se uma solução 3,3 mmol/L do reagente tetraamin cobre (II) e como branco água deionizada.

Figura nº 37 - Espectro do reagente tetraamin cobre (II) , na concentração 3,3 mmol/L. Condições experimentais: reagente tetraamin cobre (II) 3,3 mmol/L misturado em igual quantidade de água deionizada; espectrofotômetro Beckman DU 70 com cubetas de quartzo de 1 cm. Branco utilizado: água deionizada.

O espectro de absorção no ultravioleta do derivado formado entre a albumina bovina e o reagente tetraamin cobre (II) está apresentado na figura nº 34 . Como branco, utilizou-se o próprio reagente, sem a adição da albumina bovina. Misturaram-se partes iguais de albumina bovina, dissolvida em água, na concentração 200 µg/mL e reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L. Para a composição do branco, misturaram-se partes iguais de água e reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L. Juntamente, para efeito de comparação, é apresentado o espectro de absorção no ultravioleta da albumina bovina sem derivatização, na concentração 200 µg/mL, utilizando-se água deionizada como branco.

Figura nº 38 - Espectros da albumina bovina sem derivatização (em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de albumina bovina (em azul). Condições experimentais para a obtenção do espectro da albumina bovina sem derivatização: concentração da albumina bovina dissolvida em água deionizada: 200 µg/mL; branco: água deionizada. Condições experimentais para a obtenção do espectro do complexo tetraamin cobre (II) na presença de albumina bovina: reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L misturado com igual quantidade de albumina bovina dissolvida em água na concentração 200 µg/mL; espectrofotômetro Beckman DU 70 com cubeta de quartzo; como branco utilizou-se o reagente tetraamin cobre (II) misturado com igual quantidade de água deionizada.

Já as figuras nº 39 a 45 apresentam cada um dos respectivos espectros do complexo tetraamin cobre (II) na presença dos aminoácidos. Para a obtenção de cada espectro, misturaram-se partes iguais do reagente tetraamin cobre (II) com água contendo o respectivo aminoácido na concentração 200 µg/mL.

Figura nº 39 - Espectros da DL-histidina (200 µg/mL) sem derivatização (espectro em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de DL-histidina (espectro em azul). Condições experimentais: reagente tetraamin cobre (II) 3,3 mmol/L com igual quantidade do aminoácido dissolvido em água deionizada na concentração 200 µg/mL; espectrofotômetro Beckman DU 70 com cubeta de quartzo de 1 cm; como branco utilizou-se o reagente tetraamin cobre (II) misturado com igual quantidade de água. Como branco para o aminoácido sem derivatização utilizou-se água deionizada.

Figura nº 40 - Espectros da glicina (200 µg/mL) sem derivatização (espectro em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de glicina (espectro em azul). Condições experimentais idênticas às da figura nº 39 .

Figura nº 41 - Espectros da L-isoleucina (200 $\mu\text{g/mL}$) sem derivatização (espectro em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de L- isoleucina (espectro em azul). Condições experimentais idênticas às da figura nº 39.

Figura nº 42 - Espectros da L-leucina (200 µg/mL) sem derivatização (espectro em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de L-leucina (espectro em azul). Condições experimentais idênticas às da figura nº 39

Figura nº 43 - Espectros da L-metionina (200 µg/mL) sem derivatização (espectro em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de L-metionina (espectro em azul).. Condições experimentais idênticas às da figura nº 39.

Figura nº 44 - Espectros da L-serina (200 µg/mL) sem derivatização (espectro em marrom) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de L-serina (espectro em azul). Condições experimentais idênticas da figura nº 39.

Figura nº 45 - Espectros da L-valina (200 µg/mL) sem derivatização (espectro em vermelho) e do complexo tetraamin cobre (II) na presença de L-valina (espectro em azul).. Condições experimentais idênticas da figura nº 39.

Uma análise dos espectros apresentados acima sugere uma alteração no complexo tetraamin cobre (II) na presença de albumina bovina ou um aminoácido, conduzindo à formação de um novo complexo, com máximo de absorção no ultravioleta deslocado para um comprimento de onda maior.

Não há diferença significativa entre os máximos de absorção entre os novos complexos formados entre tetraamin cobre (II) com a proteína ou um aminoácido, sugerindo

haver deslocamento de igual número de moléculas de amônia do complexo original, quer na presença da proteína quer na presença de um aminoácido.

No presente caso, somente é possível a determinação de proteínas ou aminoácidos totais, já que não há diferença significativa entre seus máximos de absorção. Uma forma de determinar proteínas ou aminoácidos, individualmente, seria utilizar-se previamente a Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC).

5.3.2. - Fiagramas da albumina bovina e dos aminoácidos

As figuras nº 46, nº 47 e nº 48 a seguir apresentam os fiagramas das análises de amostras de albumina bovina e dos aminoácidos glicina e L-isoleucina, respectivamente, com o reagente tetraamin cobre (II). Condições experimentais já descritas anteriormente.

Analisando os fiagramas, pode-se deduzir, em função da velocidade do papel, que é necessário cerca de 0,7 cm para cada análise, o que daria cerca de 100 determinações por hora.

Fundo de escala: 50 mV

Velocidade do papel: 1 cm/min.

Figura nº 46 - Fiagrama da albumina bovina com o reagente tetraamin cobre (II). Condições experimentais: reagente tetraamin cobre (II) 3,3 mmol/L; leitura das absorbâncias: 275 nm; volume de amostragem: 216 µL; vazão do reagente tetraamin cobre (II): 2,25 mL/min. ; vazão da solução transportadora (água): 2,25 mL/min. ; percurso analítico: tubo de teflon com 100 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno

Figura nº 47 - Diagrama da glicina com o reagente tetraamin cobre (II). Condições experimentais: reagente tetraamin cobre (II) $3,3 \text{ mmol/L}$; leitura das absorvâncias: 275 nm ; volume de amostragem: $216 \mu\text{L}$; vazão do reagente tetraamin cobre (II): $2,97 \text{ mL/min.}$; vazão da solução transportadora (água): $2,25 \text{ mL/min.}$; percurso analítico: tubo de teflon com 80 cm de comprimento e $0,8 \text{ mm}$ de diâmetro interno

Figura nº 48 - Diagrama da L-isoleucina com o reagente tetraamin cobre (II). Condições experimentais: reagente tetraamin cobre (II) 3,3 mmol/L; leitura das absorvâncias: 275 nm; volume de amostragem: 216 μL ; vazão do reagente tetraamin cobre (II): 2,25 mL/min. ; vazão da solução transportadora (água): 2,97 mL/min. ; percurso analítico: tubo de teflon com 80 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno

5.3.3. - Curvas analíticas e suas respectivas equações obtidas para a albumina bovina e os aminoácidos

Empregando-se o sistema FIA descrito neste trabalho, foram obtidas as curvas analíticas e suas respectivas equações para a albumina bovina e os aminoácidos disponíveis. As condições experimentais foram descritas anteriormente. A figura nº 49 apresenta as curvas analíticas para a albumina bovina, empregando-se o reagente tetraamin cobre (II) nas concentrações 3,3 mmol/L e 10 mmol/L. Já a figura nº 50 apresenta as curvas analíticas para os aminoácidos, individualmente, empregando-se o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L.

Figura nº 49 - Curvas analíticas absorvância em função da concentração da albumina bovina, utilizando-se o reagente tetraamin cobre (II) nas concentrações 3,3 mmol/L e 10 mmol/L, respectivamente.

As equações das curvas analíticas obtidas do tipo $A = L + B.C$, onde A é a absorvância em u.a. (unidades de absorvância), L o coeficiente linear em u.a., B o coeficiente angular em $\text{u.a.mL}\mu\text{g}^{-1}$, C a concentração da albumina bovina em $\mu\text{g/mL}$ e R o coeficiente de correlação, foram as seguintes:

1- Empregando-se o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L:
 $A = (-0,004 \pm 0,004) + (2,65 \pm 0,02) \times 10^{-3} . C$; $R = 0,9999$

2- Empregando-se o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 10 mmol/L:
 $A = (-0,003 \pm 0,005) + (2,49 \pm 0,02) \times 10^{-3} . C$; $R = 0,9997$

A similaridade entre os coeficientes angulares obtidos com os reagentes tetraamin cobre (II) nas concentrações 3,3 e 10 mmol/L sugere que a reação se completou no tempo de residência da mistura no sistema. Uma das vantagens do sistema de confluências aparece aqui, pois uma vez que o reagente é uniformemente introduzido na zona de amostra no ponto de confluência, podem-se utilizar reagentes mais diluídos, desde que acima da concentração estequiométrica.

No caso de uma mistura pouco eficiente, embora reprodutível, como ocorre nos sistemas FIA de linha única, nos quais a mistura entre reagente e amostra se dá apenas por dispersão axial, o aumento da concentração do reagente poderia levar a um aumento da sensibilidade em relação ao reagente mais diluído. No caso do método proposto a similaridade dos slopes com um aumento de três vezes na concentração do reagente indica a ótima eficiência da mistura após o ponto de confluência.

Obtiveram-se as equações das curvas analíticas para os aminoácidos, individualmente, empregando-se o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L, que apresentou melhores resultados do que o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 10 mmol/L.

Figura nº 50- Curvas analíticas da absorbância em função da concentração de cada aminoácido, empregando-se o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L. As determinações foram feitas reagindo-se cada aminoácido com o reagente tetraamin cobre (II) e não numa mistura de aminoácidos.

Na tabela nº 5 são apresentadas as respectivas equações das curvas analíticas para os aminoácidos.

Tabela nº 5 - Equações das curvas analíticas dos aminoácidos.

Aminoácido	Coefficiente linear (u.a.)	Coefficiente angular (u.a.mLμg⁻¹)	Coefficiente de correlação (R)
Glicina	0,0042 $\pm$ 0,0005	(670 $\pm$ 6) $\times 10^{-6}$	0,9998
L-Valina	0,0015 $\pm$ 0,0005	(750 $\pm$ 5) $\times 10^{-6}$	0,9999
L-Serina	-0,0002 $\pm$ 0,0002	(750 $\pm$ 5) $\times 10^{-6}$	0,9999
DL-Histidina	-0,0007 $\pm$ 0,0008	(1560 $\pm$ 9) $\times 10^{-6}$	0,9999
L-Leucina	0,0042 $\pm$ 0,0007	(670 $\pm$ 8) $\times 10^{-6}$	0,9997
L-Isoleucina	0,0016 $\pm$ 0,0004	(750 $\pm$ 5) $\times 10^{-6}$	0,9999
L-Metionina	0,0018 $\pm$ 0,0006	(550 $\pm$ 7) $\times 10^{-6}$	0,9996

Analisando-se as equações das curvas analíticas dos aminoácidos, pode-se notar que, no caso da DL-histidina, a sensibilidade foi maior, provavelmente pelo fato de este aminoácido possuir um grupo imidazol em sua molécula, o que aumentaria o número de ligações com os cátions Cu²⁺ do reagente tetraamin cobre (II).

5.3.4. - Análises de amostras de albumina humana e comparações com o método oficial de Kjeldahl

Foram analisadas, com o emprego deste sistema FIA com o reagente tetraamin cobre (II) na concentração 3,3 mmol/L, 20 amostras de soro contendo albumina humana para uso parenteral, cujas concentrações estavam em torno de 20 % em peso e uma amostra de hemoderivado. Para isso, inicialmente, utilizou-se uma microseringa de 100 µL, própria para HPLC, colocando-se 50 µL de cada soro em balões de 50 mL, respectivamente, completando-se o volume com água deionizada. Todas as amostras já haviam sido analisadas pelo método oficial de Kjeldahl. Utilizou-se uma seringa de 1 mL para a injeção de cada amostra na alça de amostragem do sistema FIA.

A tabela nº 6 apresenta os valores das concentrações obtidos neste sistema FIA, bem como os valores encontrados pelo método oficial de Kjeldahl e suas respectivas comparações.

Tabela nº 6 - Valores das concentrações de albumina humana das amostras de soro obtidos pelos método oficial de Kjeldahl e pelo método que emprega o reagente tetraamin cobre (II), com suas respectivas comparações.

Número da amostra	Valor obtido pelo método de Kjeldahl (g/100 mL)	Valor obtido com o reagente tetraamin cobre (II) (g/100 mL)	Desvio porcentual (%)
1	19,05	18,70	- 1,84
2	19,76	18,70	- 5,36
3	19,00	20,23	+ 6,47
4	20,50	20,60	+ 6,47
5	19,94	19,06	- 4,41
6	18,05	19,78	+ 9,58
7	19,54	18,86	- 3,48
8	20,12	18,78	- 6,66
9	19,00	19,47	+ 2,47
10	19,54	18,66	- 4,50
11	19,03	20,75	+ 9,04
12	19,50	18,72	- 4,00
13	20,50	19,44	- 5,71
14	19,03	19,47	+ 2,31
15	21,20	19,98	- 5,75
16	6,88	7,17	+ 4,22
17	21,10	17,99	- 14,74
18	19,92	19,52	- 2,00
19	19,13	19,03	- 0,52
20	19,92	18,78	- 5,72
21	19,22	18,72	- 2,60

Os desvios percentuais entre o método oficial de Kjeldahl e o que emprega o reagente tetraamin cobre (II) no sistema FIA, encontram-se na figura nº 51

Figura nº 51 - Desvios percentuais entre o método oficial de Kjeldahl e o que utiliza o reagente tetraamin cobre (II) no sistema FIA.

A utilização do reagente tetraamin cobre (II) num sistema FIA mostrou ser um método simples para a determinação de proteínas e aminoácidos totais .

Pode-se mencionar o fato de o reagente ser de fácil preparação, sendo os reagentes de baixo custo e facilmente encontrados em lojas de materiais de laboratório. O único problema é o fato de o hidróxido de amônio ser, atualmente, um produto controlado, o que não era até o final de fevereiro de 2003.

Outro fator importante a mencionar é o fato de as reações com as proteínas e aminoácidos ser extremamente rápida à temperatura ambiente, dispensando a utilização de um reator, como também um sistema de aquecimento, como aquele apresentado neste trabalho para a utilização da PBQ num sistema em fluxo e em análise por injeção seqüencial (SIA).

O emprego deste método analítico com o reagente tetraamin cobre (II) apresenta interferências de algumas espécies, como aminas, açúcares e outras espécies que possam formar algum tipo de complexo com os íons Cu^{2+} . Desta forma, este método está limitado para amostras de proteínas e aminoácidos que não possuam interferentes, sendo de fácil utilização em análises rotineiras.

Em Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC) a utilização do reagente tetraamin cobre (II) não é muito conveniente, pelo fato de o reagente absorver nos comprimentos de onda em que são feitas as leituras das absorbâncias (vide figura nº 37), sendo que variações momentâneas da vazão da fase móvel podem alterar a relação efluente da coluna + reagente tetraamin cobre (II), causando ruídos. Já num sistema FIA esse problema, praticamente, não ocorre, pois tanto a solução transportadora como o reagente são impulsionados pela mesma bomba peristáltica, onde as variações nas vazões dos fluidos ocorrem de forma concomitante, não alterando a relação mencionada acima.

Outra limitação deste método analítico reside no fato de se poder conhecer apenas o conteúdo total de proteínas e aminoácidos presentes numa determinada amostra, já que são próximos os comprimentos de onda dos máximos de absorção dos complexos que se formam entre o reagente tetraamin cobre (II) e as proteínas e aminoácidos.

Entretanto, para o caso de se conhecer o conteúdo total de proteínas e aminoácidos, o método apresentou bom desempenho, aumentando na maioria dos casos a sensibilidade em comprimentos de onda mais elevados, como se pode observar através dos espectros das figuras nº 38 a nº 45.

6. - Conclusões

A derivatização de proteínas e aminoácidos mostra-se vantajosa em relação aos métodos sem a derivatização.

Através da derivatização, a sensibilidade do método torna-se maior, pelo fato de os derivados apresentarem, na maioria dos casos, maior absorbância no ultravioleta do que os mesmos produtos não derivatizados. Outra vantagem é que produtos derivados apresentam seu máximo de absorbância em comprimentos de onda mais elevados, em relação aos não derivatizados, o que permite que muitos interferentes deixem de absorver nesses comprimentos de onda mais elevados.

O presente trabalho apresenta, de forma inédita, a utilização do reagente PBQ num sistema em fluxo, que apresentou certas vantagens com relação aos métodos apresentados na literatura. Como vantagens, pode-se citar o fato de as reações serem realizadas em valores de pH mais elevados, o que conduz a reações mais rápidas, como também o fato de a troca de calor entre o banho de glicerina e a mistura reacional se realizar de forma mais rápida, em função de ser o aço inoxidável do capilar um condutor de calor muito melhor do que o vidro dos tubos de ensaio com tampa de rosca em banho-maria.

Além disso, o método apresentou boa sensibilidade, com quantidade mínima detectável inferior a 10 µg/mL.

Verificou-se que o método apresentou boa repetitividade, em relação aos resultados obtidos com a leitura das mesmas amostras quando efetuadas em batelada.

Os resultados obtidos pelo método de análise em fluxo com a PBQ foram comparados estatisticamente com o método oficial de Kjeldahl, não apresentando diferenças significativas.

Uma desvantagem do método em fluxo reside no fato de ser necessário um controle rígido da temperatura, como foi explicado neste trabalho, sendo que, mesmo variações pequenas, conduzem a diferenças apreciáveis nas velocidades das reações de derivatização das proteínas com a PBQ, conduzindo a erros consideráveis nas análises quantitativas. Outra desvantagem é o fato de ser necessário esperar cerca de 3 minutos para que a nova mistura reacional colocada no sistema em fluxo seja capaz de limpar o sistema, já que o volume morto é relativamente elevado (em torno de 1 mL).

Já nas análises por injeção sequencial (SIA), empregando-se a PBQ, as quantidades de reagente e das amostras de albumina humana foram menores, além de serem necessários menores volumes de mistura reacional para realizar a limpeza do sistema. A utilização do reagente tetraamin cobre (II) num sistema FIA para a determinação de proteínas e aminoácidos também é um trabalho inédito, baseado em minha dissertação de mestrado⁷³, no qual se utilizou este reagente em derivatização pós-coluna para a análise de amostras de açúcares, obtendo-se maior absorbância no ultravioleta.

Neste trabalho, verificamos a vantagem de, pelo fato de a reação entre o reagente tetraamin cobre (II) e a proteína ou aminoácido ser extremamente rápida à temperatura ambiente, não foi necessário o emprego de um reator aquecido, como nos casos citados anteriormente em que se empregou a PBQ, tornando a aparelhagem mais simples, como também as análises mais rápidas.

Outras vantagens apresentadas por este método foram: o tempo de reação inferior a um minuto para cada amostra analisada, bem como a boa repetitividade apresentada, como mostram os diagramas obtidos. A sensibilidade do método foi boa, com quantidades mínimas detectáveis também inferiores a 10 µg/mL, que mesmo sendo superior a outros métodos analíticos para a determinação de proteínas totais, apresenta-se adequado para análises rotineiras de amostras de soro humano, nas quais as concentrações das proteínas totais são mais elevadas.

Este método também utiliza, além de um volume pequeno de amostra (216 µL), reagentes de baixo custo.

Ainda em relação ao uso do reagente tetraamin cobre II, foram feitas tentativas de se utilizar a derivatização pós-coluna em HPLC para se determinar a concentração de cada aminoácido presente em algumas amostras, mas problemas técnicos dos cromatógrafos disponíveis, infelizmente, impediram que tais análises pudessem ser realizadas.

7. - Perspectivas futuras

A pesquisa por métodos analíticos que possam detectar quantidades cada vez menores de proteínas tem sido crescente, em nossos dias. É importante, porém, que, além de precisos e reprodutíveis, tais métodos sejam práticos e economicamente viáveis.

Nossa pretensão futura é efetuar a otimização dos métodos analíticos para a determinação de proteínas e aminoácidos, baseado nos métodos desenvolvidos neste trabalho, empregando diferentes tipos de amostras contendo proteínas e aminoácidos.

Pretende-se igualmente, efetuar análises por injeção sequencial (SIA) empregando-se reagentes que conduzam a derivados fluorescentes com as proteínas e os aminoácidos, o que tornaria as análises mais sensíveis.

O aperfeiçoamento de novas aparelhagens e acessórios com materiais de baixo custo, já empregados no presente trabalho (bomba injetora, reator, termostato), otimizando tais métodos, também é um dos pontos de grande interesse nestas perspectivas futuras.

8. - Bibliografia

- 1) Stryer, L. "Bioquímica" , capítulo 2, "Introdução à estrutura e Função das Proteínas" , página 11 (1979)
- 2) Lenninger, A. L. , "Bioquímica", 2ª Edição, volume 1, capítulo 4, página 49 Editora Worth Publishers, INC (1980)
- 3) Ganong, W. F. ; "Review of Medical Physiology" , 17ª edição, Prentice-Hall Inc, San Francisco (1995)
- 4) McDonald, P.; Edwards, R.A.; Greenhalgh, J.F.D.; Animal Nutrition; Longman Scientific & Technical , Hong Kong (1987)
- 5) National Academy of Sciences-National Research Council; "Recommended Dietary Allowances"; Publ. 0-309-02216-9, Washington (1974)
- 6) King, B. M.; Neurosc. Biobehav. Rev. , **12**, 29 (1988)
- 7) Fennema, O. R. ; "Principles of Food Science; Marcel Dekker Inc. , New York (1976)
- 8) Heftmann, E. ; Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic and Eletrophoretic Methods; Van Nostrand Reinhold Company, New York (1975)
- 9) Kjeldahl, J. ; Z. Analyt. Chem. , **22**, 336 (1983)
- 10) Toribara, T. Y. ; Koval,L. , Talanta, **17**, 1006 (1970)
- 11) Alexander, P. W. e Rechnitz, G. A. , Anal. Chem. , **46** , 250 (1974)
- 12) Kentaro, K. ; Tetsutaro, Y. e Toshifumi, T. , Bunseki Kagaku, **32** , 308 (1983)

- 13) Hitchman, M. L. ; Nyasulu, F. W. M. , *Analytica Chimica Acta*, **173** , 337 (1985)
- 14) Krystal, G. ; Macdonald, C. ; Munt, B.; Ashwell, S. , *Analytical Biochemistry*, **148** , 451 (1985)
- 15) Krystal, G. , *Analytical Biochemistry* , **167** , 86 (1987)
- 16) Soedjak, H. S. , *Analytical Biochemistry*, **220**, 142 (1994)
- 17) Gornall, A.G. ; Bardawill, C.J. e David, M.M. , *J. Biol. Chem.* **177**, 751 (1949)
- 18) Wilson et all ; *Am. Clin. Path.* ; **18**, 723 (1948)
- 19) Rising, M.M. e Johnson, C.A. , *J. Biol. Chem.* , **80**, 709 (1928)
- 20) ITzhaki, R. F. e Gill, D.M. , *Anal. Biochem.* **9**, 401 (1964)
- 21) Vogel, A.I., "*Química Analítica Qualitativa*", 5ª Edição, página 241, Editora Mestre Jou (1982)
- 22) Shideler, C. E. ; Stewart, K. K. , Crump, J. ; Wills, M. R. ; Savory, J. e Renoe, B. W. ; *Clin. Chem.* **26(10)** , 1454 (1980)
- 23) Zaia, D. A. M. ; Zaia, C. T. B.V. e Lichtig, J. , *Química Nova*, **21(6)** , 787 (1998)
- 24) Smith, P.K. ; Krohn, G. T. ; Hermanson, A. K. ; Mallia, A. K. ; Gartner, F. H. ; Provenzano, M. D. ; Fujimoto, E. K. ; Goeke, N. M. ; Olson, B. J. e Klenk, D. C. , *Anal. Biochem.*, 150, 76 (1985)
- 25) Moeremans, M. ; Daneels, G. e DeMey, J. , *Anal. Biochem.* **145**, 315 (1985)
- 26) Stoscheck, C. M. , *Anal. Biochem.* **160** , 301 (1987)

- 27) Bradford, M.M. , Anal. Biochem. , **72**, 248 (1976)
- 28) Compton, S.J.; Jones, C.G., Anal. Biochem. , **151**, 369 (1985)
- 29) Marshall, T.; Williams, K.M., Anal. Biochem. , **204**, 107 (1992)
- 30) Wimsatt, D.K.; Lott, J.A.; Clin. Chem., **33**, 2100 (1987)
- 31) Barreto, W. J. ; de Aquino, M. e Zaia, D.A.M. , Anal. Letters, **23** (7) , 1279 (1990)
- 32) Zaia, D.A.M. ; Obara, M.M. ; Rockenbach, S.R. ; Barreto, W.J.; Gaziri, L.C.J. ; Zaia, C.T.B.V. e Lichtig, J. , Brazilian J. Med. Biol. Res. **25**, 549 (1992)
- 33) Zaia, Dimas A.M. ; Rockenbach, Silvana R. ; Obara, Meire M. ; Barreto, Wagner J. ; Arizawa, Shiro ; Curi, Rui e Lichtig, J. , Analytical Letters, **25** (7) , 1225 (1992)
- 34) Zaia, D.A.M. ; Verri Jr., W.A. e Zaia, C.T.B.V. , Talanta, **49**, 373 (1999)
- 35) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.e Randall, R.J.; J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951)
- 36) Wu, H. , J. Biol. Chem. **51**, 33 (1922)
- 37) Chou, S.C. e Goldstein, A., Biochem. J. , **75**, 109 (1960)
- 38) Legler, G.; Müller-Platz, C.M.; Mentges-Hettkamp, M.; Pflieger, G. e Jülich, E.; Anal. Biochem. , **150**, 278 (1985)
- 39) Shakir, F.K.; Audilet, D.; Drake III, A.J. e Shakir, K.M.M.; Anal Biochem. **216**, 232 (1986)

- 40) Lehninger, A. L. , "Bioquímica", Editora Edgard Blücher Ltda. , volume 1, Componentes Moleculares das Células, página 60 (1976)
- 41) Stryer, L. , "Bioquímica", Editora Reverté, S.A. , página 23 (1979)
- 42) Spackman, D. H. ; Stein, W. H. e Moore, S. , Analytical Chemistry, **42** , 1190 (1958)
- 43) Cohen, S. A. e Strydom, D. J. , Analytical Biochemistry, 174 , 1 (1998)
- 44) Samejima, K. , Dairman, W., Stone, J. e Udenfriend, S. , Anal. Biochem. **42** , 222 (1971)
- 45) Samejima, K. , Dairman, W., Stone, J. e Udenfriend, S. , Anal. Biochem. **42** , 237 (1971)
- 46) Weigele, M., Blount, J.F., Teng, J.P. Czaikowski, R.C. e Leimgruber, W., J. Amer. Chem. Soc. **94** , 5927 (1972)
- 47) Ohkura, Y. ; Kai, M. e Nohta, H. ; Journal of Chromatography B , **659** 85-107 (1994)
- 48) Weigele, M. , DeBernardo, S.L. , Teng, J.P. e Leimgruber, W. , J.Amer. Chem. Soc. **94**, 5927 (1972)
- 49) Felix, A. M. e Terkelsen, G. ; Arch. Biochem. Biophys. , **157**, 177 (1973)
- 50) Benson, J. R. e Hare, P.E. , Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 72 n° 2, pp. 619 (1975)
- 51) Hill, D.W. , Walters, F.H. , Wilson, T.D. , and Stewart, J.D. , Anal. Chem. **51** , 1338 (1979)
- 52) Lindroth, P. e Mopper, K. , Anal. Chem. **51** , 1667
- 53) Roth, N. , Anal. Chem. **43** , 880 (1971)

- 54) Böhlen, P. e Mellet, M. , Anal. Biochem. **94**, 313 (1979)
- 55) Einarsson, S., Josefsson, B. e Lagerkvist, S., Chromatography , **282** , 609 , 1983
- 56) Einarsson, S., J. Chromatography. , **348**, 213, 1985
- 57) Einarsson, S., Folestad, S., Josefsson, B. e Lagerkvist, S. , Anal. Chem. **58**, 1638 (1986)
- 58) Betner, I. e Foldi, P. , Chromatography **22** , 381 (1986)
- 59) Smith, A.J. , Academic Press, New York, 225 (1989)
- 60) Ohkura, Y. ; Kai, M. e Nohta, H. ; Journal of Chromatography B , **659** 85 (1994)
- 61) Shively, J. E. , "Methods of Protein Microcharacterization, A Practical Handbook" , Humana Press, Clifton, New Jersey , Capítulo 5, página 121 (1986)
- 62) Schoulten, A. H. M. T. e outros, Journal of Chromatography, **199** , 239 (1980)
- 63) Shih, Y. T. e Carr, P. W. , Analytica Chimica Acta, **167**, 137 (1985)
- 64) Poulsen, J. R. ; Birks, K.S. ; Gandelman, M.S. e Birks, J.W. , Chromatographia, **22(7)**, 231 (1986)
- 65) Vrátný, P. e outros, Anal. Chem., **57**, 224 (1985)
- 66) Ruzicka, J. , "Flow Injection Analysis", 2ª Edição, Editora John Wiley & Sons, capítulo 2, página 15 (1988)
- 67) MacDonald, A.; Nieman, T. A. , Analytical Chemistry, **57**, 936 (1985)

- 68) Renoe, B.W. ; Stewart, K.K. ; Beecher, G.R. ; Wills, M.R. e Savory, J. , Clin. Chem. **26** , 331 (1980)
- 69) Ruzika, J. e Hansen, E.H. ; Anal. Chim. Acta **78** , 145 (1975)
- 70) . Ruzicka, J. e Marshall, G.B. , Anal. Chim. Acta **237** , 329 (1990)
- 71) Matsumura, S. ; Kataoka, H. e Makita, M. , Journal of Chromatography B , **681** , 375 (1996)
- 72) Miller, J.C. e Miller, J.N. , Statistics for Analytical Chemistry, 2nd ed., Wiley, New York, (1988)
- 73) Guarilha Jr., O. , Análise de Carboidratos por Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (CLAD) , dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (1990)