INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

19.6.25

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

NAO UILACS

**ANÁLISE DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE USO
COSMETOLÓGICO POR ELETROFORESE CAPILAR**

NEIDE MITSUE FUJIYA

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100003892

Ficha Catalográfica

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

Fujiya, Neide Mitsue
F961a Análise de hidrolisados de proteína de uso cosmetológico por
eletroforese capilar / Neide Mitsue Fujiya. -- São Paulo, 2001.
132p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Eletroforese capilar: Química analítica 2. Cosmetologia 3.
Proteína: Hidrólise: Bioquímica I. T. II. Tavares, Marina
Franco Maggi, orientador.

543.0871 CDD

"Análise de Hidrolisados de Proteína de Uso Cosmetológico por Eletroforese Capilar"

NEIDE MITSUE FUJIYA

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área:
Química Analítica.*

Aprovado por:

Profa. Dra. MARINA FRANCO MAGGI TAVARES
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

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

Prof. Dr. EMANUEL CARRILHO
IQ SC – USP

**SÃO PAULO
14 DE MAIO 2001.**

“Aprendi com a natureza a me deixar cortar

e voltar sempre inteira”

Cecília Meireles

*Aos meus pais pela dedicação, amor
e oportunidade que me proporcionaram.
As minhas irmãs pela amizade e carinho.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Marina F. M. Tavares pela orientação, confiança e amizade que sempre demonstrou, todo o meu reconhecimento e gratidão.

À Farma Service, especialmente ao Nestor Pinto Neto e Levi Oliveira Jr. por todo o apoio e incentivos prestados e permissão de uso do equipamento de eletroforese capilar.

À professora Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda pela colaboração, sugestões e discussões sobre o trabalho.

À professora Dra. Dulcinéia Abdalla pela doação de aminoácidos.

Ao professor Dr. Hugo Armelim e Telma pela eletroforese em gel

Ao professor Dr. Claudimir Lúcio do Lago e Carol pelo espectro de ESI.

À professora Dra. Úrsula M. Lanfer Marques pelas análises de Kjeldhal.

Aos colegas do grupo LACE Alessandra, Bete Lima, Clóvis, Fabiana, Fernando, Gustavo, Lurdinha, Marcone, Wilsinho e dona Fátima pela colaboração e apoio e especialmente à grande amiga Beth pela sua grande ajuda, paciência e conselhos prestados.

Ao Alexandre pelo “empréstimo” das mercaptanas.

Em especial aos meus queridos amigos Paty Lopes, Luciano, Ivan, Maurício, Áurea e Daniel, principalmente, ao Júnior, por estar ao meu lado nos momentos mais críticos da minha vida.

Ao “trio calafrio”.

Ao pessoal do curso de dança, especialmente ao professor Roberto pelo seu perfeccionismo e dedicação e ao Luciano por todo o seu carisma, incentivo e entusiasmo prestados desde o início do curso.

À Fapesp pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Hidrolisados de proteína.....	2
1.2 - Métodos clássicos de análise dos hidrolisados de proteína.....	4
1.2.1 - Determinação do grau de hidrólise.....	4
1.2.2 - Caracterização dos peptídeos nos hidrolisados de proteína	5
1.2.3 - Identificação de aminoácidos	5
1.2.4 - Determinação da distribuição da massa molar.....	6
1.3 - Fundamentos da Eletroforese Capilar.....	7
1.3.1 - Mobilidade eletroforética.....	9
1.3.2 - O conceito de mobilidade efetiva.....	10
1.3.3 - Fluxo eletroosmótico.....	12
1.3.4 - Inversão do fluxo eletroosmótico	12
1.3.5 - Método de detecção indireta na análise de compostos aniônicos.....	13
1.4 - Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE).....	14
1.5 - Eletroforese Capilar em Gel.....	17
1.6 - Referências Bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	25
CAPÍTULO 3- ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL.....	26
3.1 - Introdução.....	27
3.1.1 - Análise por FSCE.....	27
3.1.2 - Extração em Fase Sólida (SPE).....	27
3.1.3 - Determinação de porcentagem de proteína total.....	30
3.1.3.1 - O Método Kjeldahl.....	30
3.2 - Procedimento Experimental.....	32
3.2.1 - Obtenção do perfil eletroforético dos hidrolisados de proteína.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
RP	Fase Reversa
SPE	Extração em Fase Sólida
FSCE	Eletroforese Capilar em Solução Livre
CGE	Eletroforese Capilar em Gel
CD	Ciclodextrina
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
TFA	Ácido Trifluoracético
ACN	Acetonitrila
Tris	Tris (hidroximetil)aminoetano
CMC	Concentração Micelar Crítica
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina

Val	Valina
Da	Dalton
h	Hora
min	Minutos
s	Segundos
V	Volt
λ	Comprimento de onda
μm	Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

Observação: As abreviaturas utilizadas de aminoácidos estão de acordo com as recomendações da IUPAC – IUB Commission on Biochemical Nomenclature (J. Biol. Chem., 264, 668-73, 1989).

3.2.1.1 - Testes de repetibilidade.....	33
3.2.2 - Extração em Fase Sólida.....	33
3.2.3 - Determinação de proteínas totais pelo método de Kjeldhal.....	34
3.3 - Resultados e Discussão.....	35
3.3.1 - Otimização das condições para obtenção do perfil eletroforético.....	35
3.3.1.1 - QUERATAN.....	35
3.3.1.1.1 - Condicionamento do capilar.....	35
3.3.1.1.2 - Estudos de otimização de condições analíticas e instrumentais.....	37
3.3.1.2 - SILKION.....	45
3.3.1.3 - PROTEINAN.....	47
3.3.1.4 - PROMARIN.....	48
3.3.1.5 - Perfis eletroforéticos de outros hidrolisados de proteína.....	48
3.3.2 - Otimização das condições de extração.....	51
3.3.3 - Extração de hidrolisados de proteína.....	59
3.3.4 - Método de Kjeldahl.....	62
3.4 - Conclusões.....	63
3.5 - Referências Bibliográficas.....	64
CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLAR DOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA.....	66
4.1 - Introdução.....	67
4.2 - Procedimento Experimental.....	68
4.2.1 - Determinação do intervalo de massa molar.....	68
4.3 - Resultados e Discussão.....	70
4.3.1 - Otimização da separação usando dextran como rede polimérica.....	70
4.3.2 - Obtenção das massas molares dos hidrolisados.....	72
4.3.3 - Separação de padrão de proteína usando Pro-Sort.....	82
4.4 - Conclusões.....	88
4.5 - Referências Bibliográficas.....	89
CAPÍTULO 5 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA.....	90
5.1 - Introdução.....	91
5.2 - Procedimento Experimental.....	93
5.3 - Resultados e Discussão.....	94

5.3.1 - Uso do ácido 3,5-dinitrobenzóico como eletrólito de corrida.....	94
5.3.1.1 - Testes de repetibilidade.....	94
5.3.1.2 - Otimização da separação	95
5.3.1.3 - Identificação dos aminoácidos.....	98
5.3.1.4 - Identificação dos aminoácidos nos hidrolisados de proteína.....	99
5.3.1.5 - Estudos de otimização com uso de ciclodextrinas.....	103
5.3.2 - Uso do hidrogenoftalato de potássio como eletrólito de corrida.....	108
5.3.2.1 - Aplicação da metodologia.....	111
5.3.3 - Comparação de metodologias.....	115
5.4 - Conclusões.....	117
5.5 - Referências Bibliográficas.....	118
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES FINAIS.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Instrumentação para eletroforese capilar.....	9
Figura 2 - Representação do interior do capilar de sílica fundida mostrando a inversão do fluxo eletroosmótico pela adição da amina quaternária.....	13
Figura 3 - Representação da análise de ânions pelo método de detecção indireta.....	14
Figura 4 - Representação esquemática da eletroforese.....	15
Figura 5 - Estruturas químicas das ciclodextrinas e sua interação com o analito.....	16
Figura 6 - Representação da eletroforese capilar em gel ou matriz porosa.....	17
Figura 7 - Estrutura monomérica do dextran.....	19
Figura 8 - Equipamento para destilação	31
Figura 9 - Teste de repetibilidade na análise do QUERATAN, lavando o capilar entre as corridas com NaOH 1 molL ⁻¹ , água deionizada e tampão tetraborato.....	35
Figura 10 - Teste de repetibilidade na análise do QUERATAN, lavando-se o capilar entre as corridas com NaOH 0,1 molL ⁻¹ , água deionizada e tampão tetraborato.....	36
Figura 11 - Teste de repetibilidade na análise do QUERATAN lavando-se o capilar somente com tampão entre as corridas.....	36
Figura 12 - Efeito do pH na separação do QUERATAN.....	38
Figura 13 - Efeito da concentração do tampão borato na separação do QUERATAN.....	39
Figura 14 - Efeito da voltagem na separação do QUERATAN.....	40
Figura 15 - Efeito da diluição e tempo de injeção na separação do QUERATAN.....	41
Figura 16 - Efeito da adição de SDS na separação do QUERATAN.....	42
Figura 17 - Efeito da adição de β-ciclodextrina no tampão borato na separação do QUERATAN.....	42
Figura 18 - Efeito da adição de éter coroa no tampão na separação eletroforética do QUERATAN.....	43
Figura 19 - Comparação entre o capilar normal e revestido.....	44

Figura 20 - Comparação entre os tipos de injeção.....	45
Figura 21 - Efeito do pH na separação do SILKION.....	46
Figura 22 - Efeito da diluição e tempo de injeção na separação do SILKION.....	47
Figura 23 - Efeito do pH na separação do PROTEINAN.....	47
Figura 24 - Efeito do pH na separação do PROMARIN.....	48
Figura 25 - Perfil eletroforético dos hidrolisados de SILKION, PROTEINAN e PROMARIN.....	49
Figura 26 - Perfil eletroforético dos hidrolisados PROSOJA, LACTOSOL, QUERATAN.....	50
Figura 27 - Perfil eletroforético dos hidrolisados SILKION, PROTEINAN, PROMARIN.....	50
Figura 28 - Eletroferogramas de SILKION em em Sep-Pak Plus C-18.....	52
Figura 29 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em Sep-Pak Plus CN.....	52
Figura 30 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em Sep-Pak Plus NH ₂	53
Figura 31 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em Sep-Pak Plus Diol.....	53
Figura 32 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em diferentes volumes do hidrolisado inserido no cartucho.....	54
Figura 33 - Eletroferogramas dos eluatos de hidrolisado de SILKION em diferentes diluições.....	55
Figura 34 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION após eluição em C-18 com o aumento do volume do eluente.....	56
Figura 35 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em diferentes pH's ajustado antes da adição da amostra no cartucho.....	57
Figura 36 - Eletroferogramas do SILKION nas condições ótimas.....	58
Figura 37 - Eletroferogramas do QUERATAN em Sep-Pak Plus C-18.....	59
Figura 38 - Eletroferogramas do PROMARIN em C-18.....	60
Figura 39 - Eletroferogramas do PROSOJA em C-18.....	60
Figura 40 - Eletroferogramas do LACTOSOL em C-18.....	61
Figura 41 - Eletroferogramas do PROTEINAN em C-18.....	61
Figura 42 - Efeito do tempo de injeção e da voltagem aplicada na separação dos padrões de proteína.....	70
Figura 43 - Efeito da adição de metanol na separação dos padrões de proteína.....	71
Figura 44 - Eletroferograma do SILKION.....	72

Figura 45 - Eletroferograma do SILKION após tratamento em SPE e Speed Vac.....	73
Figura 46 - Eletroferogramas do LACTOSOL.....	74
Figura 47 - Eletroferogramas do SILKION.....	75
Figura 48 - Eletroferogramas do PROSOJA.....	75
Figura 49 - Eletroferogramas do PROTEINAN.....	76
Figura 50 - Eletroferogramas do PROTRIGO.....	76
Figura 51 - Eletroferograma do PROMARIN puro.....	77
Figura 52 - Eletroferogramas do QUERATAN.....	77
Figura 53 - Eletroferogramas da alcalase, do branco e do conservante.....	78
Figura 54- Eletroferogramas dos padrões de proteínas.....	79
Figura 55 - Curva de calibração das proteínas.....	80
Figura 56 - Eletroferogramas dos padrões de proteína de alta massa molar.....	82
Figura 57 - Curva de calibração das proteínas de alta massa molar.....	83
Figura 58 - Eletroferograma do branco.....	84
Figura 59 - Eletroferograma do PROTEINAN.....	85
Figura 60 - Eletroferograma do PROMARIN.....	85
Figura 61 - Eletroferograma do PROSOJA.....	86
Figura 62 - Eletroferograma do QUERATAN.....	86
Figura 63 - Eletroferograma do LACTOSOL.....	87
Figura 64 - Estrutura dos aminoácidos.....	91
Figura 65 - Curvas de mobilidade efetiva versus pH dos aminoácidos.....	96
Figura 66 - Efeito da voltagem na separação dos padrões de aminoácidos....	97
Figura 67 - Efeito das concentrações do eletrólito na separação da mistura de aminoácidos.....	98
Figura 68 - Identificação de aminoácidos.....	99
Figura 69 - Figura 70 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do QUERATAN.....	100
Figura 70 - Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do SILKION	100
Figura 71 - Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do LACTOSOL.....	101
Figura 72 - Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do PROSOJA.....	101

Figura 73 - Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do PROMARIN.....	102
Figura 74 - Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do PROTEINAN.....	102
Figura 75 - Efeito da concentração do ácido 3,5-dinitrobenzóico na separação dos aminoácidos.....	104
Figura 76 - Efeito da concentração da α -ciclodextrina na separação dos padrões de aminoácidos.....	105
Figura 77 - Efeito da concentração do metanol na separação dos aminoácidos....	105
Figura 78 - Efeito da concentração da β -ciclodextrina na separação dos padrões de aminoácidos.....	106
Figura 79 - Efeito da concentração do metanol.....	107
Figura 80 - Identificação do padrão de aminoácidos.....	108
Figura 81 - Mobilidade efetiva do ácido 3,5-dinitrobenzóico e do hidrogenoftalato de potássio.....	109
Figura 82 - Identificação da mistura dos padrões de aminoácidos.....	110
Figura 83 - Identificação da mistura dos padrões de aminoácidos.....	111
Figura 84 - Eletroferograma do QUERATAN com seus respectivos aminoácidos identificados.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e tipos de processos de obtenção dos hidrolisados de proteína estudados.....	3
Tabela 2 - Propriedades das proteínas hidrolisadas.....	4
Tabela 3 - Métodos para determinação do grau de hidrólise.....	5
Tabela 4 - Propriedades dos sorventes e aplicações típicas.....	28
Tabela 5 - Determinação do teor de proteína total dos hidrolisados.....	62
Tabela 6 - Dados para construção da curva de calibração	79
Tabela 7 - Estimativa da massa molar dos hidrolisados.....	81
Tabela 8 - Dados para construção da curva de calibração de proteínas de alta massa molar.....	83
Tabela 9 - Valores do coeficiente de variação para injeção de cisteína.....	94
Tabela 10 - Valores de mobilidade e pK_a	95
Tabela 11 - Possíveis aminoácidos dos hidrolisados de proteína.....	103
Tabela 12 - Tempo de migração, desvio padrão e repetibilidade das áreas e da alturas dos picos de cada aminoácido.....	111
Tabela 13 - Equações da curva de calibração, coeficiente de correlação e limite de detecção.....	114
Tabela 14 - Resultados da análise do QUERATAN calculado pela altura do pico.....	114
Tabela 15 - Ordem do tempo de migração dos aminoácidos.....	115

RESUMO

As proteínas têm sido objeto de extenso estudo e um dos passos mais importantes que se obteve industrialmente nas últimas décadas foi a produção de proteínas hidrolisadas, viabilizando sua aplicação em uma gama de produtos cosméticos e alimentícios. Os hidrolisados de proteína são incorporados em formulações destinadas aos cuidados de cabelo e pele, possuindo facilidade de penetração na cutícula dos cabelos proporcionando brilho, hidratação e condicionamento. Também são incluídos em cremes e loções para o corpo, possuindo propriedades amaciantes, hidratantes e de proteção à pele.

Neste trabalho, a técnica de eletroforese capilar foi utilizada para a obtenção do perfil eletroforético de diversos hidrolisados, a saber, de soja, leite, seda, queratina, pele de animal bovino, incluindo proteína de origem marinha, variando-se condições analíticas e instrumentais. Os hidrolisados apresentaram um perfil pouco resolvido e uma investigação com extração em fase sólida foi realizada, proporcionando um fracionamento de peptídeos e, posteriormente um perfil eletroforético com maior resolução. O método de Kjeldhal foi empregado para a determinação de proteínas totais dos diversos hidrolisados de proteína estudados.

Duas metodologias para a obtenção das massas molares dos hidrolisados de proteína foram implementadas, utilizando a eletroforese capilar em gel. Um dos métodos empregou o polímero linear de acrilamida para a separação de padrões de proteína na faixa de 14 a 94 kDa. Outro método desenvolvido utilizou dextran (com massa molar de 2.000.000), como rede polimérica, para a separação de padrões de proteína entre 2.512 a 16.949 Da e de 14 a 67 kDa. Os hidrolisados de proteína estudados apresentaram massa molar na faixa de 10-70 kDa.

O método com detecção indireta foi desenvolvido para a separação de uma mistura de 20 aminoácidos, sendo que dezesseis aminoácidos foram efetivamente separados em dois métodos distintos. A metodologia estudada foi aplicada para a identificação dos aminoácidos dos hidrolisados de proteína (QUERATAN, SILKION, LACTOSOL, PROSOJA, PROMARIN e PROTEINAN). A quantificação dos aminoácidos foi realizada para o hidrolisado de queratina (QUERATAN), apresentando concentrações na faixa de mgL^{-1} .

ABSTRACT

Proteins have been object of extensive investigation and in the last years, an important step has been reached from an industrial point of view, which was the production of protein hydrolysates, employed in cosmetic and nourishing products.

Protein hydrolysates are employed in shampoo formulations and skin care products because they confer to the products characteristics associated to protection, conditioning and repair of the hair fiber whereas to the body they contributes to moisturization.

In this work, the profile of protein hydrolysates from a variety of sources was determined by capillary electrophoresis optimizing analytical and instrument conditions. The protein hydrolysates presented a poorly resolved peak profile. However, when the hydrolisates were submitted to solid phase extraction procedures, a rich peptide mapping was obtained. The Method of Kjeldhal was employed to determine the total protein of several protein hydrolysates.

Two methodologies to determine molar masses of protein hydrolysates were implemented using capillary gel electrophoresis. Acrilamide was used to separate protein standards from 14,4 to 94 kDa and dextran, a physical gel, was used to separated protein of 2,5- 16 kd and 14 – 67 kDa.

Additionally, an indirect UV/vis absorbance detection methodology was developed to identify and quantify free amino acids in the protein hydrolysates.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 - Hidrolisados de proteína

Proteínas de várias fontes e seus hidrolisados têm sido amplamente usados na formulação de shampoos, condicionadores e preparados para o cuidado dos cabelos e pele há mais de 40 anos ^{1,2}. Em anos recentes, o número de proteínas disponíveis para uso cosmético tem aumentado.

As proteínas de uso cosmetológico são tipicamente insolúveis em água, sendo necessária sua hidrólise ³ para possibilitar a utilização em cosméticos, isto é, a transformação de uma proteína insolúvel com uma massa molar de milhões de Daltons para uma proteína com uma massa molar de milhares de Daltons.

O processo de hidrólise de uma proteína é realizado industrialmente pela ação de ácidos, bases ou processos enzimáticos ⁴. Sob condições ácidas, asparagina e glutamina são completamente hidrolisadas a ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente, triptofano é completamente destruído, tirosina é parcialmente destruída por traços de impurezas presentes no agente de hidrólise e, serina e treonina são parcialmente hidrolisadas (usualmente ocorrem perdas de aproximadamente 10 e 5%, respectivamente). Comercialmente ⁵, os hidrolisados ácidos são obtidos pelo tratamento da proteína com 4-6 molL⁻¹ HCl a 100-130 °C por 20-24 h seguido pela neutralização com NaOH.

A hidrólise alcalina é quase exclusivamente usada para determinação de triptofano, o qual é estável sob condições básicas. Entretanto, nestas condições, serina, treonina, arginina e cisteína são destruídas e outros aminoácidos são racemizados. A hidrólise é usualmente feita com NaOH, KOH ou Ba(OH)₂ ⁶.

A hidrólise enzimática é um tratamento mais ameno. Geralmente aquece-se a proteína a 85-90 °C por alguns minutos em pH entre 5-7, dependendo das condições ótimas da enzima, e posteriormente, mantém-se o sistema na temperatura de 50-55°C por 10-24 h.

A Tabela 1 apresenta os hidrolisados de proteína estudados neste trabalho, com seus nomes comerciais, bem como a origem e os tipos de processos de hidrólise empregados na sua obtenção.

TABELA 1 – ORIGEM E TIPOS DE PROCESSOS DE OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA ESTUDADOS

NOME COMERCIAL	ORIGEM	TIPO DE HIDRÓLISE
QUERATAN	Cabelos humanos	Ácido
SILKION	Casulo da seda	Ácido
PROMARIN	Tecido de peixe	Enzimático
PROTEINAN	Pele de animal (bovino)	Enzimático
LACTOSOL	Leite bovino	Ácido
PROSOJA	Soja	Enzimático
PROTRIGO	Trigo	Ácido

Nota: A alcalase foi empregada nos processos de hidrólise enzimática.

Tanto as proteínas vegetais como as animais diferem entre si em relação a uma variedade de fatores além de sua origem, tais como o tamanho molecular, a polaridade e a presença de grupos funcionais na molécula ^{7,8}.

Em geral, as propriedades funcionais das proteínas responsáveis pelo condicionamento do cabelo e pele dependem de suas características físicas, tais como: substantividade (que refere-se à quantidade de peptídeos não extraídos por água, devido ao estabelecimento de ligações fracas ou moderadamente fortes com a superfície do cabelo e da pele), penetração, formação de filme, retenção de umidade e brilho. Entretanto, nem todas as proteínas exibem todas as características mencionadas na mesma extensão. Por exemplo, proteínas de alta massa molar não penetram significativamente dentro da pele, permanecendo na superfície, sendo melhores na formação de filme, enquanto proteínas de baixa massa molar têm maior poder de adsorção. Estudos demonstram que proteínas de massa molar entre 1-10kDa são adsorvidas pelo cabelo e que maior adsorção ocorre quando o cabelo está danificado ⁹.

A Tabela 2 mostra as propriedades dos hidrolisados de proteína no uso de cabelos e pele.

TABELA 2 – PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS HIDROLISADAS ¹⁰

CUIDADOS DOS CABELOS	CUIDADOS DA PELE
- Proteção contra danos	- Formação de filme
- Substantividade	- Umidade
- Formação de filme / Elasticidade	- Estímulo de proliferação celular
- Condicionamento	- Melhoramento da sensação da pele
- Saúde e vitalidade	- Suavidade
- Reparação	- Redução de irritação de surfactantes

Nota: * Capacidade do hidrolisado adsorver na superfície capilar.

1.2 - Métodos clássicos de análise dos hidrolisados de proteína ¹¹

É difícil saber a composição dos hidrolisados de proteína, pelo grande número de possíveis constituintes, os quais por sua vez são constituídos por 20 aminoácidos. Entretanto, para o controle de qualidade dos hidrolisados, várias análises podem ser realizadas, tais como: a determinação de nitrogênio total, obtenção da osmolalidade e do grau de hidrólise e a identificação da composição de aminoácidos, presença de compostos tóxicos nos hidrolisados (por exemplo, aminas biogênicas) e a determinação da massa molar ¹¹. Abaixo, alguns desses métodos de análise são citados.

1.2.1 - Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise é uma medida da extensão de clivagem das ligações peptídicas. A determinação do grau de hidrólise ¹¹ é baseada em 2 princípios:

- 1- A determinação da quantidade de nitrogênio livre e/ou total.
- 2- A determinação de α - amino grupos.

A Tabela 3 apresenta alguns métodos que são usados para avaliar o grau de hidrólise, usando os princípios citados.

TABELA 3 – MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE

PRINCÍPIOS	MÉTODOS
1 - Quantidade de nitrogênio total	- Kjeldhal
- Quantidade de nitrogênio livre	- Determinação espectrofotométrica na região do UV dos peptídeos com grupos aromáticos.
	- Determinação espectrofotométrica na região do visível após reação colorimétrica.
2 - α - amino grupos	- Titulação com formol.
	- Reação com ninidrina, OPA, etc.

1.2.2 - Caracterização dos peptídeos nos hidrolisados de proteína

Vários métodos têm sido empregados para o conhecimento sobre a composição dos hidrolisados de proteína, entre eles a cromatografia em meio líquido (HPLC) ¹², especialmente o modo da fase reversa (RP-HPLC), eletroforese em gel de poliacrilamida ¹³, eletroforese capilar ¹⁴.

Para a obtenção da composição dos peptídeos, Lemieux e Amiot ¹⁵ analisaram hidrolisados de caseína e da hemoglobina bovina fracionando os peptídeos por cromatografia de exclusão (SEC) e isolando-os e purificando-os por RP-HPLC. Perea *et al.* ¹⁶ utilizaram a técnica de RP-HPLC para analisar os peptídeos das proteínas do trigo, produzidos em diferentes estágios da hidrólise.

Castagnola ¹⁴ usou a técnica de eletroforese capilar acoplada com RP-HPLC para analisar hidrolisado trípico da mioglobina. Estas duas técnicas são complementares, uma vez que a separação por RP-HPLC ocorre devido a diferenças de polaridade e a técnica de CE é associada à diferença de razão carga/massa dos peptídeos.

1.2.3 - Identificação de aminoácidos

Historicamente a análise de aminoácidos é conduzida usando a técnica de HPLC ¹⁷.

A falta de um cromóforo nos aminoácidos alifáticos tem sido contornada pela derivatização de aminoácidos com um forte cromóforo.

Cromóforos comumente usados incluem: cloreto de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil para produzir aminoácidos dansilados (Dns), 9-fluorenilmetilcloroformato (Fmoc), 2-4 dinitrofluorbenzeno (DNP), o-ftalaldeído (OPA), naftaleno-2-3-dicarboxaldeído (NDA) e fenilisotiocianato (PITC) para produzir o derivativo feniltiodantoin (PTH) ¹⁸.

Destes compostos um dos mais importantes, tanto historicamente quanto tecnicamente, é a ninidrina (derivatização pós-coluna). Esta envolve a separação dos aminoácidos em coluna trocadora de cátions. Quando os aminoácidos são aquecidos em solução contendo excesso de ninidrina, todos aqueles que têm um grupo α -amino livre produzem um produto púrpura, a prolina (na qual o grupo α -amino está substituído), libera um produto amarelo.

Métodos envolvendo a derivatização pré-coluna, com reagentes fluorogênicos como cloreto de dansila e o-ftalaldeído foram os primeiros a serem desenvolvidos, porém, este tipo de método apresenta algumas desvantagens, incluindo, a instabilidade dos derivativos, a interferência de reagentes, além do consumo do tempo de análise ¹⁹.

A habilidade em analisar espécies carregadas que não possuem cromóforo sem qualquer derivatização foi desenvolvida com a introdução do método de detecção indireta ²⁰, o qual será apresentado na seção 1.3.5, utilizando a técnica de eletroforese capilar. A escolha do eletrólito é de vital importância na separação dos analitos, comprometendo a resolução e a sensibilidade. Bruin *et al.* ²¹ descreveram o uso do salicilato, utilizando a técnica de eletroforese capilar, como eletrólito para separar 7 aminoácidos não derivatizados na forma aniônica (em pH 11). Lee e Lin ²² investigaram 9 diferentes eletrólitos na análise de 20 aminoácidos, os mesmos ainda incorporaram ciclodextrinas ²³ ao eletrólito de corrida e obtiveram melhoria de seletividade.

1.2.4 - Determinação da distribuição da massa molar

Devido à simplicidade da técnica e relativa rapidez, SDS-PAGE tem sido empregada freqüentemente para estimar a massa molar de proteínas. Em geral, pequenos peptídeos não conseguem ser detectados por essa técnica, uma vez que são eliminados do gel durante as etapas de coloração e lavagem.

A técnica de SDS-PAGE tem sido utilizada para caracterizar os hidrolisados de proteína em diferentes aspectos ¹¹. Desphande e Nielsen ²⁴ utilizaram a técnica para comparar a distribuição de tamanho dos peptídeos em diferentes condições de hidrólise. Perea *et al.* ¹⁶ monitoraram o perfil de peptídeos produzidos em diferentes estágios do processo de hidrólise de caseína. Parrado *et al.* ²⁵ empregaram a técnica para estudar a distribuição molecular dos hidrolisados de proteína de girassol com potencial utilidade na indústria de alimentos.

Com o desenvolvimento da técnica de eletroforese capilar a tradicional técnica de SDS-PAGE foi adaptada a capilares com dimensões de 75 e 100 μm . Originalmente, as separações de proteínas foram conduzidas em géis polimerizados dentro do capilar ²⁶, mas devido a problemas decorrentes com a polimerização do gel e formação de bolhas, polímeros enovelados têm sido usados. Tais soluções consistem de metilcelulose, hidroxietilcelulose, agarose e dextran, como apresentado na seção 1.5.

Um método alternativo para determinação de massa molar é a cromatografia por exclusão de tamanho (SEC-HPLC). Uma grande variedade de géis Sephadex, utilizados em SEC-HPLC, tem sido descrita na literatura para caracterizar os hidrolisados de proteína, tais como Sephadex G-15 ²⁷, G-25 ²⁸, entre outros.

1.3 – Fundamentos da eletroforese capilar

Eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis sob ação de um campo elétrico. O uso da eletroforese como uma técnica de separação foi introduzida por Tiselius ²⁹ em 1937, que obteve a separação parcial de algumas proteínas constituintes de soro sangüíneo em solução livre em tubos verticais em formato de “U”. Em 1967, Hjerten ³⁰ descreveu o primeiro trabalho com uso de campo elétrico elevado empregando tubo de quartzo com dimensões de 300 μm de diâmetro interno e 36 cm de comprimento, com voltagem de 2,5 a 3,0 kV. Em 1979, Everaerts *et al.* ³¹ demonstraram o uso de tubos de teflon com diâmetro interno de 200 μm , para a separação de 16 ânions, constituindo a primeira publicação de eletroforese capilar. Na década de 80, Jorgenson e Lukacs ³² avançaram com a técnica, com o uso de capilares de sílica fundida de 75 μm de diâmetro interno.

A eletroforese capilar é realizada em tubos com dimensões capilares, tipicamente 25-75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. O uso do capilar apresenta numerosas vantagens, particularmente por favorecer a dissipação de calor, que é causado pela passagem de corrente através do meio condutor (efeito Joule). Um dos fatores desfavoráveis decorrente do efeito Joule é que moléculas localizadas na região central do meio de separação migrarão mais rapidamente que as moléculas localizadas nas bordas, causando o efeito de dispersão de zona; altas temperaturas também podem causar degradação térmica de algumas moléculas. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100-500 Vcm^{-1}), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos).

A eletroforese capilar oferece outras vantagens sobre os métodos eletroforéticos convencionais, como a injeção de volumes bastante reduzidos (1-10 nL) de amostra, baixo consumo de reagentes e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo. A configuração instrumental básica de um equipamento de eletroforese capilar está esquematizado na Figura 1.

O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (o mais comumente usado é o de sílica fundida), eletrodos (usualmente platina) e um detector apropriado. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios contendo um eletrólito adequado, sendo preenchida com o mesmo. Uma fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico, sendo conectada através de eletrodos aos dois reservatórios.

Capilares de sílica fundida são tipicamente usados como uma célula de detector, pois são transparentes a luz ultravioleta (UV) e visível. A janela da célula pode ser simplesmente queimada em uma pequena seção do capilar, retirando-se a cobertura externa de poliimida. Esta seção é então colocada no caminho de luz do detector. Capilares são freqüentemente inseridos em cartuchos dotados de sistema de circulação de líquido que permitem o controle termostático do capilar. Um outro sistema utiliza ventiladores para dissipação do calor.

Na eletroforese capilar as amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo conhecido, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão.

O gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonagem.

O desenvolvimento de novos sistemas de detecção em eletroforese capilar tem sido uma área de intensa pesquisa desde a implementação da técnica ³³. O rápido avanço técnico nessa área tem sido atribuído à relativa facilidade com que alguns detectores, de uso geral para cromatografia líquida, são adaptados para eletroforese capilar. Pequenas modificações nestes detectores são suficientes para acomodar capilares de sílica fundida, como células de detecção em fluxo.

Uma variedade de detectores tem sido usados na eletroforese capilar, incluindo: UV/Vis, fluorescência, condutividade, amperométrico, espectrometria de massas, etc. O detector mais amplamente utilizado é o de UV/Vis, sendo um tipo deste utilizado o arranjo de diodos (*diode array detector* – DAD), que tem a vantagem de detecção em múltiplos comprimentos de onda e a habilidade de fornecer dados espectrais.

Figura 1 – Instrumentação para eletroforese capilar.

1.3.1 - Mobilidade eletroforética

Solutos carregados são separados devido as diferenças em suas mobilidades eletroforéticas (μ_{ef}). Sob ação de um campo elétrico (E) e na ausência de fluxo, um

isto é, não migra quando colocada em um campo elétrico (mobilidade zero). Somente as mobilidades iônicas da base ou do ácido conjugado são consideradas, cada um com um valor particular de mobilidade, dependendo do pH do meio. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_j), a mobilidade efetiva (μ_{ep}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius³⁴.

$$\mu_{ep} = \sum (\mu_j \cdot \alpha_j) \quad [6]$$

μ_{ep} = mobilidade efetiva

μ_j = mobilidade iônica de cada espécie individual

α_j = fração molar

A fração molar depende da magnitude das constantes de dissociação do soluto e do pH do meio e, para sistemas monopróticos, é definida como:

$$\alpha_j = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad [7]$$

α_j = fração molar

K_a = constante de dissociação

Desta forma, a Equação [7] sugere a dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio, assim sendo, curvas de mobilidade efetiva *versus* pH para solutos de interesse são excelentes indicadores da condição de pH propícia para a separação ocorrer, ou seja, o pH onde as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos são máximas.

A mobilidade efetiva é um parâmetro usado para descrever a migração de analitos parcialmente dissociados, consistindo de espécies iônicas e neutras que interagem por um equilíbrio dinâmico ácido-base. Sob a influência de um campo elétrico, todas as espécies migram como um todo.

1.3.3 - Fluxo eletroosmótico

Quando um eletrólito é introduzido dentro do capilar, a superfície interna do capilar adquire carga. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de grupos silanóis que são carregados negativamente em pH superior a 3, sendo que esta dissociação pode ser melhorada introduzindo no capilar uma solução básica seguido pelo eletrólito. Os grupos silanoato atraem cátions carregados positivamente do eletrólito, que formam uma camada interna de cátions na parede do capilar (camada fixa). Como estes cátions não neutralizam todas as cargas negativas, uma segunda camada de cátions é formada (camada difusa). Este modelo é conhecido como dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado, parte dos cátions da camada difusa são atraídos em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo eletroosmótico.

A mobilidade do fluxo eletroosmótico (μ_{osm}) é dependente das características do tampão, como a constante dielétrica, a viscosidade, o pH e a concentração, e é expressa pela Equação [8].

$$\mu_{osm} = \frac{V_{osm}}{E} \quad [8]$$

Onde, v_{osm} = velocidade eletroosmótica e E = campo elétrico.

A mobilidade aparente (μ_{app}) de um analito pode ser expressa como a soma da mobilidade eletroforética (μ_{ef}) com a mobilidade do fluxo eletroosmótico (μ_{osm}) do sistema (Equação [9]).

$$\mu_{app} = \mu_{ef} + \mu_{osm} \quad [9]$$

1.3.4 - Inversão do fluxo eletroosmótico³⁵

Em eletroforese capilar no modo normal, o fluxo eletroosmótico é do ânodo para o cátodo, sendo que o detector está localizado no cátodo. Dessa forma, ânions são atraídos para o ânodo e o fluxo eletroosmótico deve ser suficientemente forte para carregá-los em direção ao cátodo. Sob estas condições, a ordem de migração dos compostos é de solutos catiônicos, neutros e aniônicos. Para a análise de ânions o tempo de separação pode ser reduzido revertendo-se a direção do fluxo

eletroosmótico e a polaridade dos eletrodos, neste caso, o fluxo eletroosmótico é do cátodo para o anodo.

O fluxo eletroosmótico pode ser invertido, adicionando-se um sal quaternário de amônio ao tampão. Como mostrado na Figura 2, as cargas positivas da amina quaternária ligam-se através de interações iônicas com os grupos silanoatos da parede do capilar. O grupo hidrofóbico da amina quaternária associa-se através de interações hidrofóbicas com as aminas quaternárias que estão em solução. O seu grupo hidrofílico, carregado positivamente, atrai os ânions do tampão. Quando um campo elétrico é aplicado, estes ânions são atraídos para o eletrodo positivo e seu movimento desloca o fluxo como um todo em direção ao eletrodo positivo, resultando na direção inversa do fluxo eletroosmótico.

Uma variedade de sais de amina quaternária tem sido usadas como modificadores de fluxo, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB), etc.

Figura 2 - Representação do interior do capilar de sílica fundida mostrando a inversão do fluxo eletroosmótico pela adição da amina quaternária. v_{osc} = velocidade eletroosmótica, v_{ef} = velocidade eletroforética e v_i = velocidade aparente (soma vetorial da velocidade eletroosmótica e eletroforética)

1.3.5 - Método de detecção indireta na análise de compostos aniônicos

A análise de aminoácidos por eletroforese capilar na forma de ânions (em altos valores de pH) pode ser realizada por meio de detecção espectrofotométrica indireta,

uma vez que a maioria dos aminoácidos apresenta baixa absortividade molar na região de trabalho (200-900 nm)^x. A detecção indireta envolve a adição ao eletrólito de uma espécie que absorve fortemente na região do ultravioleta (cromóforo). Assim sendo, a absorbância de um cromóforo aniônico é monitorada continuamente no decorrer da análise. Quando a banda do soluto aniônico atinge o detector, o ânion do cromóforo é deslocado e o sinal da absorbância decai, retornando a sua posição original assim que o soluto deixa o detector, como representado na Figura 3.

Figura 3 - Representação da análise de ânions pelo método de detecção indireta.

A versatilidade da eletroforese capilar é parcialmente derivada de numerosos modos de operação: eletroforese capilar em solução livre, cromatografia eletrocinética micelar, eletroforese capilar em gel, focalização isoeletrica capilar e isotacoforese. Neste trabalho foram utilizados os dois primeiros modos de operação, discutidos em maior detalhe nos próximos itens.

1.4 - Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE)

Em FSCE, o capilar é preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. Sob a influência de um campo elétrico, o eletrólito move-se através do capilar devido ao fluxo eletroosmótico. Moléculas carregadas são separadas devido a diferenças em suas mobilidades eletroforéticas e tenderão a migrar em direção ao eletrodo de carga oposta. O fluxo eletroosmótico do eletrólito é usualmente maior que a mobilidade eletroforética dos solutos orgânicos carregados negativamente, sendo arrastados pelo eletrólito em direção ao detector, geralmente

posicionado no terminal catódico. Solutos neutros não possuem mobilidade eletroforética e movem-se através do capilar com a mesma velocidade que o fluxo eletroosmótico. Solutos carregados positivamente migram em direção ao cátodo sob a influência de ambos, mobilidade eletroforética e fluxo eletroosmótico, movendo-se mais rápido que o fluxo eletroosmótico, portanto, a ordem na qual os solutos passam através do capilar é de cátions, neutros e ânions. A velocidade com que os solutos carregados migram em direção ao detector depende da relação carga/massa: solutos pequenos com maior mobilidade são os primeiros a migrar através do capilar (cátions altamente carregados), ânions pequenos altamente carregados são os últimos a migrar (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da eletroforese. "+", "N" e "-" representam solutos catiônicos, neutros e aniônicos, respectivamente.

O fluxo eletroosmótico é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector, permitindo assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos, muito embora não haja discriminação temporal entre diferentes solutos neutros. Estes podem ser separados usando um tipo de eletroforese capilar conhecido como cromatografia eletrocinética micelar.

Em FSCE é bastante comum o uso de eletrólitos aditivados. O uso de aditivos é bastante indicado em quatro situações: para alterar a mobilidade do soluto, modificar o fluxo eletroosmótico, solubilizar solutos ou compostos na matriz da amostra e reduzir a interação de certos solutos com a parede do capilar ³⁶.

Um dos aditivos mais utilizados na eletroforese capilar é o surfactante. Numerosos tipos de surfactantes podem ser utilizados em FSCE, os quais podem ser aniônicos (por exemplo, SDS) ou catiônicos (por exemplo, CTAB). Cada surfactante possui uma concentração micelar crítica (CMC), sendo que em FSCE os surfactantes usados estão abaixo do valor da CMC. Quando um detergente está presente em uma concentração acima da CMC, formam-se micelas, agregados de moléculas de detergentes individuais. O valor de CMC do SDS é de $8,1 \text{ mmolL}^{-1}$ e do CTAB é de 1 mmolL^{-1} ³⁶.

Um dos aditivos utilizados na separação de aminoácidos são as ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos não iônicos consistindo de 6, 7 ou 8 unidades de glicose, sendo chamados de α , β e γ CD's, respectivamente ³⁷. As ciclodextrinas possuem a forma toroidal, com uma cavidade que tem o diâmetro determinado pelo número de unidades de glicose. A cavidade é relativamente hidrofóbica, enquanto a superfície externa é hidrofílica. A seletividade quiral resulta da inclusão da porção hidrofóbica do soluto na cavidade e também da ligação de hidrogênio do soluto a centros quirais da ciclodextrina. Para os aminoácidos essa interação pode acontecer devido a presença de suas cadeias laterais ou grupo R, como representado na Figura 5. A extensão da inclusão depende da estabilidade do complexo formado, se dois enantiômeros têm diferentes constantes de estabilidade, um deles migrará mais devagar que o outro e a resolução quiral ocorre.

Figura 5 – Estruturas químicas das ciclodextrinas (a) e sua interação com o analito (b).

1.5 - Eletroforese Capilar em Gel

A eletroforese capilar em gel (CGE), tem sido extensivamente utilizada na separação de compostos de caráter iônico e alta massa molar. O capilar é preenchido com uma matriz polimérica, sendo que há duas classes de matrizes utilizadas em CGE: géis químicos e géis físicos. Os géis químicos são covalentemente ligados ao capilar com ligações inter cruzadas em seu interior e os géis físicos não são covalentemente ligados ao capilar, consistindo de polímeros enovelados, como detalhado abaixo.

Na CGE os solutos migram através da estrutura polimérica sendo impedidos de seu percurso de acordo com o seu tamanho, processo conhecido como peneiramento³⁶ (Figura 6).

Figura 6 – Representação da eletroforese capilar em gel ou matriz porosa.

Em CGE, os peptídeos e/ou proteínas são desnaturados e a migração ocorre em um meio viscoso, na ausência de fluxo eletroosmótico, onde os solutos são separados com base no tamanho e não na mobilidade. A separação de proteínas desnaturadas em SDS é baseada na suposição que proteínas adsorvem em quantidades idênticas de SDS por unidade de massa (1,4 g de SDS/1 g de proteína), fazendo com que todas as proteínas adquiram idêntica relação carga/massa. SDS adiciona uma grande carga negativa à proteína tornando insignificante as cargas intrínsecas da proteína, a conformação nativa é alterada e a maioria das proteínas adquirem a mesma forma geométrica, isto as torna semelhantes entre si e por esta

razão passam a ter a mesma relação carga/massa. Sendo assim, a mobilidade permanece a mesma, não havendo discriminação temporal e/ou espacial dos oligômeros em um sistema de eletroforese em solução livre. A restrição seletiva na passagem de moléculas de diferentes tamanhos pela matriz polimérica é, portanto, condição necessária para a separação ocorrer ^{48, 49}.

Neste modo de eletroforese, é utilizada uma curva de calibração do logaritmo da massa molar *versus* tempo de migração para a determinação da massa molar dos componentes do produto em análise. Uma avaliação alternativa da massa molar na faixa de 10.000 a 200.000 Da, que já engloba a faixa de massa molar de proteínas, pode ser feita com um eletrólito contendo polímeros enovelados derivados de acrilamida ³⁸, como o Pro-Sort (Applied Biosystems, Perkin Elmer Div.) em capilar revestido dinamicamente, ou seja, onde os grupos silanol são “bloqueados” e o fluxo eletroosmótico é suprimido ³⁹.

Há inúmeros trabalhos em eletroforese capilar envolvendo o uso de matrizes poliméricas (géis físicos) para a separação por tamanho de proteínas e DNA. Esses géis são facilmente substituíveis, evitando a contaminação entre amostras e melhorando a reprodutibilidade. Tais matrizes podem-se constituir de metilcelulose ⁴⁰, hidroxietilcelulose ⁴¹, dextran ⁴² e óxido de polietileno ⁴³.

Géis físicos são matrizes porosas compreendidas de materiais poliméricos dissolvidos usualmente em tampão aquoso. O tamanho do poro é determinado pela concentração do reagente polimérico e a estrutura tridimensional da matriz. A estrutura do gel determina a separação efetiva de macromoléculas baseada no tamanho ⁴⁴.

Estes sistemas são melhores descritos como rede polimérica (polymer networks), polímeros enovelados (entangled polymer) ou géis físicos. Os poros desses sistemas são obtidos por interações físicas ao invés de ligações químicas cruzadas. Isto possibilita fácil substituição destes polímeros na separação capilar ⁴⁴. O efeito de peneiramento dos géis físicos pode ser modificado por variáveis físicas, tais como a temperatura da coluna ⁴⁵.

O mecanismo de separação com polímeros enovelados foi investigado por Grossman e Soane ⁴⁶. Existe uma diferença importante entre a solução de polímero diluído e concentrado. Enquanto que em soluções diluídas as cadeias são hidrodinamicamente isoladas uma das outras, em soluções concentradas as cadeias se tornam sobrepostas e ocorre interação entre elas. A fração de volume do polímero (Φ) onde a cadeia polimérica começa a interagir com outra é denominada “overlap

threshold" (Φ^*). Acima da concentração do "overlap threshold" a solução do polímero é chamada enovelada. Experimentalmente, Φ^* pode ser determinado construindo uma curva do logaritmo da viscosidade específica *versus* fração de volume do polímero ⁴⁷.

Celuloses e derivados não são apropriados para a separação de proteínas ⁵. Karger e colaboradores ⁴⁸ mostraram que a separação de proteínas pode ser conduzida em redes poliméricas contendo dextran ou polietileno glicol.

Dextran é um polissacarídeo que forma uma solução viscosa quando dissolvida em tampão aquoso. A baixa viscosidade relativa resulta em um aumento no tempo de vida da coluna devido a simples substituição do polímero entre as corridas. Outra vantagem é a baixa absorção na região de 200 nm, sendo assim a detecção pode ser realizada em 214 nm ⁴⁴, diferentemente do polímero de acrilamida no qual a absorção nessa faixa é alta (quanto maior a concentração de acrilamida maior a absorção). A seletividade é dependente da massa molar do dextran, sendo que maiores massas molares resultam em um aumento na seletividade, portanto, dextran com massa molar de 2.000.000 oferece melhor resultado que 72.000 ou 5.000 ⁴⁸.

Zhang *et al.* ⁴⁹ descreveram um método de separação de proteínas de baixa massa molar (na faixa de 2512 Da -16949 Da), utilizando dextran como rede polimérica. Novamente se verificou que utilizando alta massa molar do polímero, maior resolução era obtida. A Figura 7 apresenta a estrutura monomérica do dextran.

Figura 7 – Estrutura monomérica do dextran.

1.6 - Referências Bibliográficas

- 1 - Challoner, N. I.; Chahal, S. P.; Jones, R. T.; Formulating Cosmetic Emulsions, *Cosmetics & Toiletries*, **1997**, 112, 51-63.
- 2 - Burmeister, F.; Brooks, G. L.; O' Brien, K. P.; Proteínas Vegetais em Shampoos, *Cosmetics & Toiletries* (versão em português), *Cosmetics & Toiletries*, **1994**, 6, 56-59.
- 3 - Romanowski, P.; Scuellier R.; Polymers in Personal-Care Products, *Cosmetic & Toiletries*, **1998**, 113, 51-56.
- 4 - Gallagher, K. F.; Jones, R. T.; Hydrolyzed Vegetable Proteins: A Formulator's Guide (Part II), *Drugs and Cosmetic Industry*, **1992**, 26-36 (Part II).
- 5 - Aaslyng, M.D.; Martens, M.; Poll, L.; Nielsen P.M.; Flyge, H.; Larsen, L.M.; Characterization of Hydrolyzed Vegetable Protein, a Savory Flavoring, *J.Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 482-489.
- 6 - Fountoulakis, M.; Lahm, H.; Hydrolysis and Amino Acid Composition Analysis of Protein, *J. Chromatogr.*, **1998**, 826, 109-134.
- 7 - Gallagher, K. F.; Hydrolyzed Vegetable Proteins: A Formulator's Guide (Part I), *Drugs and Cosmetic Industry*, **1991**, 34-38, 66 (Part I).
- 8 - Kowata, Y.; Tamura, H.; Motoi, H.; Tabata, Y.; Polipeptídeos da Proteína de Trigo como Ingredientes Cosméticos, *Cosmetics & Toiletries*, **1993**, 5, 41-45.
- 9 - Hunting, A.L.L.; Pode um Produto Limpar e Condicionar ao Mesmo Tempo?, *Cosmetics & Toiletries*, **1989**, 1, 38-43.
- 10 - Griesbach; U. Klingels M.; Hörner V.; Proteins: Classic Additives and Actives for Skin and Hair Care, *Cosmetic & Toiletries*, **1998**, 113, 69-73.
- 11 - Silvestre, M.P.C.; Review of Methods for the Analysis of Protein Hydrolysates, *Food Chem.*, **1997**, 60, 2, 263-271.
- 12 - Lemieux, L; Piot, J.M.; Guillochon, D.; Amiot, J.; *J. Chromatogr.*, **1991**, 572, 51-58.
- 13 - Henn, R.L.; Netto, F.M.; Biochemical Characterization and Enzymatic Hydrolysis of Different Commercial Soybean Protein Isolates, *J Agric Food. Chem.*, **1998**, 46, 3009-3015.
- 14 - Castagnola, M.; Cassiano, L.; Rabino, R.; Valeria D.; Peptide Mapping Through the Coupling of Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid

- Chromatography: Map Prediction of the Tryptic Digest of Myoglobin, *J. Chromatogr.*, **1991**, 73, 189-206.
- 15 - Lemieux, L.; Amiot, J.; Application of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography to the Separation of Peptides from Phosphorylated and Dephosphorylated Casein Hydrolysates, *J. Chromatogr.*, **1989**, 73, 189-206.
- 16 - Perea, A., Ugalde, U., Rodrigues, I. Serra J.L.; *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, 15, 418-423. Silvestre, M.P.C.; *Food Chem.*, **1997**, 60, 2, 263-271.
- 17 - Smith, J.T. ; Recent Advancements in Amino Acid Analysis Using Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, **1999**, 29, 3078-3083.
- 18 - Molnár-Perl I. ; Role of Chromatography in the Analysis of Sugars, Carboxylic Acids and Amino Acids in Food, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 891, 1-32.
- 19 - Krull, I.S., Deyl, Z., Lingeman, H.; General Strategies and Selection of Derivatization Reactions for Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, **1994**, 659, 1-17.
- 20 - Smith, J.T.; Developments in Amino Acid Analysis Using Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis*, **1997**, 18, 2377-2392.
- 21 - Bruin, G.J.M.; van Asten, A.C.; Xu, X.; Poppe, H.; Theoretical and Experimental Aspects of Indirect Detection in Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1992**, 608, 979.
- 22 - Lee, Y.H., Lin, T.I.; Capillary Electrophoretic Determination of Amino Acids with Indirect Absorbance Detection, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 680, 287-297.
- 23 - Lee, Y.H., Lin, T.I.; Capillary Electrophoretic Determination of Amino Acids. Improvement by Cyclodextrin Additives, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 716, 335-346.
- 24 - Desphande, S.S., Nielsen, S.S.; In Vitro Enzymatic Hydrolysis of Phaseolin, the Major Storage Protein of *Phaseolus L.*, *J. Food Sci.*, **1987** 52 (5), 1326-29.
- 25 - Parrado, J., Millan, F., Hernandez-Pinzón, I., Bautista, J.; Characterization of Enzymatic Sunflower Protein Hydrolysates, *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, 41, 1821-1825.
- 26 - Wu, D.; Regnier, F.E.; Sodium Dodecyl-Sulfate Capillary Gel-Electrophoresis of Proteins Using Non-Cross-Linked Polyacrylamide, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 744, 249-257.

- 27 - Umetsu, H.; Matsuoka, H. ; Ichishima, E. J.; Debbitering Mechanism of Bitter Peptides from Milk Casein by Wheat Carboxypeptidase, *Agric. Food Chem.*, **1983**, 31, 50-53.
- 28 - Takase, M.; Kawase, K.; Diyosowa, I; Ogasa, K.; Susuki, S.; Kuroume, T.; *J. Dairy Sci.*, 62, 1570-1576.
- 29 - Tiselius, A; A New Apparatus for Eletrophoretic Analysis of Colloidal Mixtures, *Trans. Faraday Soc.*; **1937**, 33, 524.
- 30 - Hjérten, S.; High Performance Zone Electrophoresis, *Chromatogr. Rev.*, **1967**, 9, 122.
- 31 - Everaerts, F.M.; Mikkers, F.E.P.; Verheggen, T.P.E.M.; High Performance Zone Electrophoresis, *J. Chromatogr.*, **1979**, 169, 11.
- 32 - Jorgenson, J.; Lukacs, K.D.; Zone Electrophoresis in Open Tubular Glass Capillaries, *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1298.
- 33 - Tavares, M.F.M.; Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos, *Química Nova*, **1996**, 19 (2), 173-181.
- 34 - Colombara R., Tavares M.F.M., Massaro S., Rubim, J.C.; Method Development Strategy for the Analysis of Anionic Solutes by Capillary Electrophoresis, *J. Cap. Elec.*, **1996**, 003:3, 147.
- 35 - Baker, D. R.; *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York, **1995**.
- 36 - Tavares, M.F.M.; Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar, *Química Nova*, **1997**, 20 (5).
- 37 - Altria, K.D. Rogan, M.M. ; *Aplication Notes da Beckman IV*, USA, **1993**.
- 38 - Werner, W.E.; Demorest, D.M.; Stevens, J.; Wiktorowicz; Size-Dependent Separation of Protein Desnaturated in SDS by Capillary Electrophoresis Using a Replaceable Sieving Matrix, *Anal.Biochem*, **1993**, 212, 253-258.
- 39 - Protocolo da Applied Byosystems – ProSort SDS-Protein Analysis by Capillary Electrophoresis, **1993**.
- 40 - Baba, Y.; Ishimaru, N.; Samata, K.; Tsuhako, M.; High Resolution Separation of DNA Restriction Fragments by Capillary Electrophoresis in Cellulose Derivative Solutions, *J. Chromatogr. A*, **1993**, 653, 329-335.
- 41 - Barron, E.A.; Soane, D.S.; Blanch, H.W.; Capillary Electrophoresis of DNA in Uncross-Linked Polymer Solutions, *J. Chromatogr. A*, **1993**, 652, 3-16.

- 42 - Takagi, T.; Karim, M.R.; A New Mode of Size-Dependent Separation of Proteins by Capillary Electrophoresis in Presence of Sodium Dodecyl Sulfate and Concentrated Oligomeric Dextran, *Electrophoresis*, **1995**, 16, 1463 – 1467.
- 43 - Bean S.R.; Lookhart; Bean, S.R.; Sodium Dodecyl Sulfate Capillary Electrophoresis of Wheat Protein 1 – Uncoated Capillaries, *J. Agric. Food. Chem*, **1999** , 47, 4246– 4255.
- 44 - Kuhn, R.; Kuhn, S.H.; *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, **1993**.
- 45 - Guttman, A; Horváth, J.; Cooke, N.; Influence of Temperature on the Sieving Effect of Different Polymer Matrices in Capillary SDS Gel Electrophoresis of Protein, *Anal. Chem*, **1993**, 65, 199-203.
- 46 - Bae, Y.; Soane, D.; Polymeric Separation Media for Electrophoresis: Cross-Linked Systems or Entangled Solutions, *J. Chromatogr. A*; **1993**, 652, 17-22.
- 47 - Heller, C.; Finding a Universal Low-Viscosity Polymer for DNA Separation, *Electrophoresis*, **1998**, 19, 1691–1698.
- 48 - Ganzler, A.; Greve, K.S.; Cohen, A.S.; Karger, B.L.; Guttman A; Cooke, N.C.; High Performance Capillary Electrophoresis Of SDS Protein Complexes Using UV Transparent Polymer Networks , *Anal. Chem*, **1992**, 64, 2665-2671.
- 49 - Zhang, Y.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y.; Separation of Myoglobin Molecular Mass Markers Using Non-Gel Sieving Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 744, 9, 249-257.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil eletroforético de uma linha de produtos de fabricação industrial (Farma Service Bioextract Ind. e Com. Ltda.), derivados da hidrólise de proteínas de diversas procedências, a saber: soja, leite, seda, queratina, pele de animal bovino, incluindo proteína de origem marinha, utilizando eletroforese capilar em solução livre. Adicionalmente, duas metodologias para a determinação do intervalo de massa molar dos hidrolisados de proteína foram implementadas: uma entre 2,5 a 16 kDa e 14 a 67 kDa, e outra de 14 a 94 kDa, utilizando eletroforese capilar em matriz porosa. Metodologias para identificação e quantificação dos aminoácidos livres presentes nos hidrolisados foram desenvolvidas, utilizando eletroforese capilar com detecção indireta.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE ELETROFORÉTICA DOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNA TOTAL

3.1 – INTRODUÇÃO

3.1.1 – Análise por FSCE

Em geral, para pequenos peptídeos consistindo de poucos aminoácidos, a mobilidade eletroforética pode ser explicada pelas características de massa e carga. As cargas de pequenos peptídeos podem ser estimadas dos valores de pK_a de aminoácidos individuais. Para grandes peptídeos e proteínas, os cálculos da carga baseados nas constantes de dissociação não são triviais e não podem ser obtidos facilmente a partir dos pK_a 's dos aminoácidos livres. Além da relação carga/massa, outros fatores podem afetar a mobilidade como: hidrofobicidade, sequência primária, diferença conformacional e quiralidade dos aminoácidos ¹.

Aminoácidos e pequenos peptídeos podem ser bem separados por FSCE em capilar de sílica fundida, mas a separação de proteínas pode ser dificultada por sua adsorção na parede do capilar, resultando em picos largos e pobre quantificação. Estes problemas podem ser parcialmente superados pelo uso de tampões com valores extremos de pH (maior que 9 e menor que 2) ^{2,3}, capilares recobertos ⁴, aditivos inseridos ao tampão ⁵ e lavando-se o capilar entre as corridas ⁶.

O desenvolvimento de condições experimentais em FSCE é focalizado na composição do tampão: pH, concentração, incorporação de aditivos e desde que os peptídeos são compostos anfotéricos são então apropriados para análise eletroforética, o pH altera a carga das proteínas e peptídeos podendo afetar a mobilidade eletroforética.

Nesta etapa do trabalho, a análise eletroforética dos vários hidrolisados de proteína foi realizada utilizando diferentes eletrólitos e condições experimentais. Todos os hidrolisados apresentarem um perfil pouco resolvido e estudos envolvendo a extração em fase sólida foram realizados, obtendo-se um mapa peptídico com maior resolução dos componentes dos hidrolisados.

3.1.2 - Extração em Fase Sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparação de amostra que utiliza cartuchos contendo fases com materiais ligados à sílica, extraíndo rapidamente compostos de interesse de amostras complexas. Um cartucho típico consiste de uma pequena coluna contendo um sorvente com tamanho de partícula podendo variar de 50-60 μm , empacotado entre fritas. Há várias vantagens que a

SPE oferece, tais como: versatilidade, não requer o uso de equipamento sofisticado, seletividade, velocidade e baixo uso de solventes ⁷.

Os três tipos de fases usados são: fase normal, reversa e troca iônica. A Tabela 4 apresenta uma série de sorventes disponíveis comercialmente e mais utilizados. A melhor retenção do analito é obtida quando a polaridade do analito é a mais próxima da polaridade da fase. A seleção da fase depende também da polaridade do solvente da amostra, por exemplo, se o solvente da amostra é o hexano, a fase reversa seria indesejável pois hexano é um forte solvente para a fase reversa e nenhuma retenção do analito ocorreria.

TABELA 4 – PROPRIEDADES DOS SORVENTES E APLICAÇÕES TÍPICAS ⁸

SORVENTE	PROPRIEDADES E APLICAÇÕES
Fase reversa	
Octadecil (C-18)	- Fortemente hidrofóbica. Usada para adsorver analitos até mesmo de fraca hidrofobicidade. Aplicações típicas incluem: drogas e seus metabólitos, dessalinização de peptídeos, etc.
Octil (C-8)	- Moderada hidrofobicidade. Usada para métodos que requer menor retenção que C-18. Aplicações incluem: plasma, peptídeos, etc.
Fase reversa ou normal	
Amino-Propil (NH ₂)	- Fase ligada à sílica com características básicas, podendo ser usada como sorvente polar. Aplicações incluem: fenóis, sacarídeos, etc.
Ciano-Propil (CN)	- Usada alternativamente como fase menos polar que as aplicações em fase normal ou alternativa menos hidrofóbica que as fases C-8 e C-18 em fase reversa. Aplicações incluem: drogas, pesticidas, etc.
Diol	- Fase ligada à sílica com características neutras que pode ser usada como alternativa à sílica em fase normal, onde as características ácidas da sílica são indesejáveis.

Fase normal	
Sílica	- Sorvente polar. Usado para adsorver analitos de solventes não polares como hidrocarbonetos, ésteres e éteres menos polares. O mecanismo de ligação pode ser por interação dipolo-dipolo ou por pontes de hidrogênio.
Alumina (Tipos: A,B e N)	- Uso similar ao da sílica, mas contém graus de atividade ácida, básica ou neutra. Aplicável em fracionamento de óleos. Os graus ácidos e básicos podem ser usados como trocadores de íons.
Troca iônica	
Quaternário de Amônio (QMA)	- Trocador aniônico. A extração de analitos aniônicos pode ocorrer em soluções aquosas e não aquosas. Usos na remoção de pigmentos ácidos de vinhos, isolamento de compostos fenólicos, isolamento de proteínas iônicas, etc.
Carbóxi Metil (CM)	- Trocador catiônico. A extração de analitos catiônicos pode ocorrer em soluções aquosas e não aquosas. Aplicações incluem o isolamento de proteínas catiônicas, pesticidas, herbicidas, etc

Um método simples para a extração dos componentes consiste de 4 etapas ⁹.

1 – Condicionamento – Inicialmente, o sorvente é condicionado com um solvente requerido para ativar o sorvente por solvatação e também para a retirada de eventuais impurezas contidas no cartucho. Posteriormente, o sorvente é condicionado com o mesmo solvente da amostra.

2 – Adição da amostra – O objetivo é a retenção quantitativa do analito de interesse, enquanto interferentes são removidos.

3 – Lavagem – Uma vez que o analito de interesse está retido no sorvente, a lavagem com um solvente mais fraco deveria remover a maioria dos interferentes,.

4 – Eluição – O passo final do processo é a eluição quantitativa do analito da coluna de SPE com um solvente forte.

Para o desenvolvimento de um método de extração é necessário otimizar a retenção e eluição dos analitos de interesse. Há vários parâmetros que podem ser ajustados para a otimização de extração: volume inserido no cartucho, concentração e pH da amostra, força do solvente, volume do eluente e a escolha de uma fase apropriada.

A SPE tem sido usada como técnica para o isolamento de peptídeos de tecidos biológicos ¹⁰, na extração de peptídeos de amostras derivados do leite com colunas C-18 ¹¹ e é uma técnica promissora para a extração e enriquecimento de peptídeos em alimentos ¹².

3.1.3 - Determinação de porcentagem de proteína total

Métodos espectrofotométricos têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, como os de Biureto, de Lowry e Bradford ¹³. O método mais comum de se determinar nitrogênio orgânico é o método de Kjeldahl, o qual é baseado na titulação de neutralização ¹⁴.

3.1.3.1 - O Método Kjeldahl

No método de Kjeldahl a amostra orgânica é digerida com ácido sulfúrico quente, o qual converte o nitrogênio da amina a amônio. O passo de decomposição da amostra é o que consome mais tempo, dependendo da amostra, e numerosas modificações do procedimento original foram propostas. Sulfato de potássio tem sido adicionado ao sistema de digestão para aumentar o ponto de ebulição da solução de ácido sulfúrico, acelerando, portanto, o processo de digestão. Para encurtar ainda mais o tempo da digestão, catalisadores são adicionados à solução reacional. Um método usando sulfato de cobre como catalisador reduziu o tempo de digestão de 120 para 90 minutos ¹⁵. A Equação [10] é representativa das aminas alifáticas saturadas:

A Figura 8 ilustra um equipamento típico para a destilação. Após a digestão, o ácido sulfúrico é neutralizado pela adição de um excesso de hidróxido de sódio concentrado. Hidróxido de sódio é adicionado lentamente e a amônia é carregada

ao frasco coletor (contendo ácido bórico e o indicador) por destilação. O ácido bórico retém a amônia como mostra a Equação [11]:

O íon dihidrogeno borato é uma base razoavelmente forte e pode ser titulada com uma solução padrão de ácido clorídrico (Equação [12]):

Desde que muitas proteínas contêm a mesma porcentagem de nitrogênio, um fator é utilizado para a determinação de proteína na amostra. Os fatores de 6,25, 6,38 e 5,70 são usados para carne, produtos derivados do leite e cereais, respectivamente.

Figura 8 – Equipamento para destilação.

3.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 – Análise eletroforética dos hidrolisados de proteína.

A análise eletroforética dos hidrolisados de proteína (QUERATAN, SILKION, PROTEINAN e PROMARIN) foi feita utilizando um equipamento para eletroforese capilar, modelo P/ACE 5510 da Beckman Instruments, equipado com fonte de alta tensão (0-30 kV), detector do tipo arranjo de diodos para obtenção do espectro UV em tempo real, controlador de temperatura e com programa de aquisição e tratamento de dados System Gold software. Foi utilizado um capilar de sílica fundida, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 57,5 cm de comprimento total (50 cm até o detector), sendo montado em um cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido a temperatura de 30°C com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão de 34,5 mBar. A injeção eletrocínética foi feita utilizando voltagem de 10 kV com tempo de injeção de 1 s. O comprimento de onda utilizado nas análises foi de 200 nm.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada.

Para a análise eletroforética do QUERATAN, parâmetros operacionais do instrumento foram testados, tais como, tempo de injeção, variando-se de 1 a 20 segundos e voltagem aplicada de 10 a 30 kV em intervalos de 5 kV. Os seguintes tampões foram utilizados para a determinação do pH ótimo de análise: fosfato de sódio (pH 2 e 7), fosfato/tetraborato de sódio (pH 8) e tetraborato de sódio (pH 9). A concentração do tampão foi variada entre 20 a 80 mmolL^{-1} , incorporando-se, posteriormente aditivos ao tampão (SDS, β -ciclodextrina e éter coroa) em diferentes concentrações. Os efeitos de diluição do QUERATAN em água (1:50, 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000) (v/v) com variações no tempo de injeção também foram investigados. Um teste com capilar recoberto com polidimetilsiloxano foi realizado.

Condições detalhadas das análises estão descritas na seção 3.3.1 na legenda das figuras. Com as condições analíticas e instrumentais otimizadas do QUERATAN, o método foi aplicado aos demais hidrolisados.

3.2.1.1 – Testes de repetibilidade

Foram realizados os seguintes procedimentos de condicionamento entre as análises do QUERATAN:

- a - Somente com o tampão tetraborato de sódio 40 mmolL^{-1} .
- b - Condicionamento seqüencial com hidróxido de sódio $0,1 \text{ molL}^{-1}$, água deionizada e tampão tetraborato de sódio 40 mmolL^{-1} .
- c - Condicionamento seqüencial com hidróxido de sódio 1 molL^{-1} , água deionizada e tampão tetraborato de sódio 40 mmolL^{-1} .

Ficou definido que entre as corridas o capilar seria condicionado seqüencialmente com hidróxido de sódio 1 molL^{-1} (1 minuto), água deionizada (1 minuto) e solução tampão (4 minutos).

No início de cada dia de trabalho o condicionamento do capilar foi realizado pela passagem seqüencial de hidróxido de sódio 1 molL^{-1} (5 minutos), água deionizada (5 minutos) e solução tampão (20 minutos).

O capilar recoberto com polidimetilsiloxano foi lavado seqüencialmente entre as corridas com metanol (2 minutos), água (2 minutos) e tampão tetraborato de sódio 20 mmolL^{-1} (4 minutos).

3.2.2 - Extração Em Fase Sólida

O extrator usado para as análises foi da marca Supelco modelo Visiprep™ DL. A retenção e os passos de eluição foram inicialmente otimizados para o SILKION (hidrolisado de seda) e depois aplicado a outros hidrolisados. Concentração, pH, volume do hidrolisado e do eluente foram variados e cartuchos contendo diferentes sorventes foram avaliados tais como: Sep-Pak Plus C-18, Diol, CN e NH_2 , todos da marca Waters, contendo cada um, 360 mg de sorvente com 125 ângstrons.

Sep-Pak Plus C-18, CN, NH_2 e Diol foram condicionados sucessivamente com 5 mL de acetonitrila, 2 mL de água purificada e 2 mL de água purificada contendo 0,1% trifluoacético (TFA), antes da introdução da amostra.

Após a introdução da amostra o hidrolisado de seda (SILKION) foi submetido ao procedimento de extração em fase sólida seguida pela eluição seqüencial com solução de acetonitrila contendo 0,1% TFA aumentando-se a força do solvente (0-80%).

O perfil dos eluatos foi determinado por eletroforese capilar utilizando equipamento da marca Agilent modelo HP 3D-CE ChemStation. Foi empregado um capilar normal de sílica fundida foi empregado nas análises, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 58,5 cm de comprimento total (50 cm até o detector), sendo montado em um cartucho. A voltagem aplicada foi de 20 kV do anodo para o catodo e o comprimento de onda foi de 200 nm. Durante a separação, o capilar foi mantido a temperatura de 25°C. Todas as amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 1 s, com pressão de 50 mBar. O tampão de separação consistiu de fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} em pH 2,5.

Após a otimização, o método foi aplicado aos demais hidrolisados de proteína.

3.2.3 - Determinação de proteínas totais pelo método de Kjeldhal

Para a realização da análise de Kjeldhal foram pipetadas separadamente 0,1 mL dos hidrolisados LACTOSOL, SILKION, PROTEINAN, PROSOJA e PROTRIGO e pesado 0,02 g de QUERATAN, sendo transferidos para os frascos de digestão (frasco de Kjeldhal). Em cada um dos frascos, contendo os hidrolisados, foram adicionados: 2 g de sulfato de potássio, 80 mg de sulfato de cobre e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os frascos foram colocados em um digestor e após a tonalidade dos hidrolisados passarem de preto para verde, mais 3 horas foram necessárias para completa digestão. Após serem resfriadas a temperatura ambiente, as amostras foram diluídas com água para posterior destilação.

Antes do início da destilação, 15 mL de 40% de hidróxido de sódio foi adicionado às amostras digeridas contidas nos frascos de Kjeldhal e ao frasco coletor foram colocados 5 mL de ácido bórico 55,56 gL^{-1} e 4 gotas de indicador vermelho de metila/azul de metileno.

Após a destilação, as amostras foram tituladas com solução padrão de ácido clorídrico 0,02 molL^{-1} .

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - Otimização das condições para obtenção do perfil eletroforético

3.3.1.1 - QUERATAN

3.3.1.1.1 - Condicionamento do capilar

Um dos principais problemas associados à separação de proteínas usando a eletroforese capilar é a adsorção dos sítios carregados das proteínas aos grupos silanóis da parede do capilar de sílica fundida.

Três modos de condicionamento entre as corridas foram testados para a obtenção de ótima repetibilidade com o mínimo de tempo de lavagem. Os resultados estão apresentados nas Figuras 9-11.

O condicionamento do capilar com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , seguido de água deionizada e tampão foi o que apresentou melhor repetibilidade na análise do QUERATAN, como observado na Figura 9, verificando-se a remoção dos hidrolisados na superfície do capilar. Este método de lavagem foi realizado, entre as corridas, na obtenção de perfil eletroforético e nos estudos com SPE.

Figura 9 - Teste de repetibilidade na análise do QUERATAN, lavando o capilar entre as corridas com $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$, água deionizada e tampão tetraborato de sódio. Condições de análise: tampão tetraborato 40 mmol L^{-1} ; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV.

Figura 10 - Teste de repetibilidade na análise do QUERATAN, lavando-se o capilar entre as corridas com NaOH 0,1 molL⁻¹, água deionizada e tampão tetraborato de sódio. Condições de análise: tampão tetraborato 40 mmolL⁻¹; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV.

Figura 11 - Teste de repetibilidade na análise do QUERATAN lavando-se o capilar somente com tampão entre as corridas. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 40 mmolL⁻¹; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV.

3.3.1.1.2 – Estudos de otimização de condições analíticas e instrumentais

O primeiro parâmetro avaliado na separação dos componentes do QUERATAN foi o efeito do pH, utilizando-se diferentes composições de solução tampão.

O controle de pH é particularmente útil para a otimização de separações de solutos anfotéricos. Utilizando uma faixa de pH acima ou abaixo do pI do soluto é possível alterar sua carga, fazendo com que a migração ocorra em direção ao catodo ou anodo.

Em altos valores de pH, a parede do capilar e a proteína apresentam-se negativamente carregadas e o processo de adsorção é minimizado como resultado do efeito de repulsão de cargas. Neste pH, o fluxo eletroosmótico é alto e o tempo de análise é relativamente curto.

Em baixos valores de pH diminui-se o número de grupos silanóis dissociados do capilar e as proteínas estão carregadas positivamente, com isso, as interações eletrostáticas estão minimizadas, diminuindo a adsorção das proteínas no capilar.

A Figura 12 apresenta os perfis eletroforéticos utilizando os tampões escolhidos para a análise. O tampão mais efetivo na resolução dos componentes do QUERATAN foi o tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹ em pH 9,0 que apresentou melhor perfil eletroforético com maior informação dos componentes do QUERATAN. A separação utilizando tampão fosfato de sódio pH 2 mostrou-se ineficiente para a separação, assim como a que utilizou tampão pH 7. Em pH 7, muitos peptídeos podem estar com carga efetiva zero, havendo coeluição dos componentes do QUERATAN, neste pH. Em baixos pH's o fluxo eletroosmótico é quase nulo e os componentes migram devido o fluxo eletroforético aumentando o tempo de análise.

Figura 12 - Efeito do pH na separação do QUERATAN, usando os seguintes tampões: (A) fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 2 (B) tetraborato/fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 8 (C) tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 9 (D) fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 7. Condições de análise: diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

Outro parâmetro analítico avaliado foi a concentração do tampão tetraborato de sódio em pH 9, que foi variada de 20–80 mmolL⁻¹. A concentração do tampão afeta o fluxo eletroosmótico sendo que quanto maior a concentração do tampão, menor o fluxo eletroosmótico.

Comparando-se os dados obtidos das várias concentrações do tampão (Figura 13) verificou-se que a melhor resolução foi obtida com a concentração de 20 mmolL⁻¹, apresentando também um menor tempo de migração dos componentes do QUERATAN e menor corrente.

Figura 13 - Efeito das diferentes concentrações do tampão tetraborato de sódio na separação do QUERATAN. Concentrações: (A) 20 mmol L^{-1} (B) 40 mmol L^{-1} (C) 60 mmol L^{-1} (D) 80 mmol L^{-1} . Condições de análise: tampão tetraborato de sódio; pH 9; diluição do QUERATAN 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

A Figura 14 apresenta os eletroferogramas obtidos pelo efeito de voltagem aplicada. A voltagem foi variada entre 10-30 kV. Em altas voltagens o fluxo é alto e o tempo de migração diminui, reduzindo o tempo de análise. Em baixas voltagens o tempo de residência do soluto aumenta no capilar causando o alargamento das bandas.

Avaliando-se a voltagem aplicada optou-se por trabalhar com voltagem de 20 kV (corrente igual a $106 \mu\text{A}$), que apesar de apresentar um tempo de migração maior, comparado ao tempo obtido quando maiores voltagens foram aplicadas, obteve-se um perfil semelhante mas apresentando menor corrente.

Figura 14 - Efeito da voltagem na separação do QUERATAN. Voltagem: (A) 30 kV (B) 25 kV (C) 20 kV (D) 15 kV (E) 10 kV. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s.

Outros parâmetros avaliados foram o efeito de diluição do hidrolisado e o tempo de injeção.

Em experimento preliminar, observou-se que o QUERATAN quando analisado puro, sem diluição, apresentou um pico largo assimétrico (dados não mostrados). Com base nesse resultado foi feito um estudo de diluição do QUERATAN de 1:50 a 1:1000, como verificado na Figura 15, aumentando-se o tempo de injeção para compensar a possível perda de sinal por diluição.

A partir da Figura 15, pode-se verificar que a melhor diluição do QUERATAN foi de 1:50 (v/v), com um tempo de injeção de 1 s apresentando maior número de componentes e um menor tempo de análise. Diluindo-se grandemente a amostra verificou-se a perda de sinal.

Figura 15 - Efeito da diluição e tempo de injeção na separação do QUERATAN. Diluição / tempo de injeção (A) 1:50 (v/v)/1 s (B) 1:100 (v/v)/2 s (C) 1:250 (v/v)/5 s (D) 1:500 (v/v)/10 s (E) 1:1000 (v/v)/20 s. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 9; voltagem: 20 kV.

Ainda visando otimizar a separação dos componentes do QUERATAN, foram incorporados ao tampão de corrida os seguintes aditivos: β -ciclodextrina, éter coroa e SDS. Esses aditivos poderiam interagir com os grupamentos dos aminoácidos presentes nos polipeptídeos de diferentes formas, alterando a mobilidade, proporcionando dessa forma a separação. A β -ciclodextrina poderia interagir hidrofobicamente com os grupos laterais dos aminoácidos em sua cavidade. Éter coroa poderia formar complexos com a amina terminal dos aminoácidos. SDS poderia interagir hidrofobicamente com os grupos laterais através da cavidade da micela.

Como pode-se observar pelas Figuras 16-18, todos os aditivos testados (SDS, éter coroa e β -ciclodextrina), em variadas concentrações, apresentaram diferenças mínimas no perfil do QUERATAN, não justificando o uso de nenhum deles.

Figura 16 - Efeito da adição de SDS no tampão tetraborato de sódio na separação do QUERATAN em diferentes concentrações: (A) 50 mmolL⁻¹ SDS (B) 20 mmolL⁻¹ SDS. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹ com SDS; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

Figura 17 - Efeito da adição de β -ciclodextrina no tampão tetraborato na separação eletroforética do QUERATAN em diferentes concentrações: (A) 5 mmolL⁻¹ β -ciclodextrina (B) 10 mmolL⁻¹ β -ciclodextrina. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹ com β ciclodextrina; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

Figura 18 – Efeito da adição de éter coroa (18-crown-ether) no tampão na separação eletroforética do QUERATAN em diferentes concentrações: (A) 1 mmol L^{-1} éter coroa (B) 5 mmol L^{-1} éter coroa (C) 10 mmol L^{-1} éter coroa. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmol L^{-1} com éter coroa; pH 9,0; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

Todos os experimentos discutidos até o presente momento, foram realizados no equipamento de eletroforese capilar série 7103150, de propriedade da Ambriex (representante no Brasil dos equipamentos da Beckman), estando localizado na Farma Service (fabricante dos hidrolisados de proteína). A partir do eletroferograma seguinte (Figura 19), os dados foram obtidos na USP com o equipamento de eletroforese capilar série 7103170, que apresentou menor intensidade de sinal.

Um estudo foi realizado com um capilar recoberto internamente com polidimetilsiloxano, comparando-se com o capilar de sílica fundida normal (Figura 19).

Verificou-se que o capilar recoberto apresentou maior ruído, menor intensidade de sinal e menor número de componentes do QUERATAN. O melhor resultado foi obtido usando o capilar de sílica normal, o qual já havia sido feito um estudo entre as corridas para diminuir a adsorção de proteína na parede do capilar,

apresentado na Figura 9. A perda de sinal pode ter ocorrido devido a absorção do próprio recobrimento no comprimento de onda utilizado.

Figura 19 – Comparação entre o capilar normal e revestido. (A) Capilar recoberto internamente com polidimetilsiloxano (B) Capilar de sílica fundida normal. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 20 s; voltagem: 20 kV.

O modo pelo qual a amostra é introduzida dentro do capilar tem implicação direta na análise quantitativa. Na eletroforese capilar as amostras podem ser introduzidas pelo método eletrocinético ou hidrodinâmico.

Avaliou-se, para efeito de comparação, os modos de injeção eletrocinético e hidrodinâmico nas mesmas condições de análise, como visto na Figura 20.

É conhecido que a injeção eletrocinética é discriminatória, ou seja, os solutos de maior mobilidade, que são os que migram primeiro, são injetados preferencialmente na coluna. Observando-se a Figura 20, os últimos picos registrados na injeção hidrodinâmica não apareceram no eletroferograma da injeção eletrocinética, como não ocorreu diferença significativa, além da já citada, utilizando o modo eletrocinético, comparado ao hidrodinâmico, optou-se por trabalhar por esse último modo de injeção.

Figura 20 - Comparação entre os tipos de injeção: (A) hidrodinâmico (tempo de injeção de 1 s/34,5 mBar) e (B) eletrocinético (tempo de injeção de 1 s/10 kV). Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 9; diluição do QUERATAN: 1/50 (v/v); voltagem: 20 kV.

O efeito do pH foi avaliado para outros hidrolisados, pois é o mais importante parâmetro para mudar a seletividade do sistema.

3.3.1.2 - SILKION

A Figura 21 apresenta os perfis eletroforéticos do SILKION obtidos usando diferentes composições de soluções tampões.

Os eletroferogramas que apresentaram melhor resolução foram aqueles que utilizaram solução tampão de tetraborato de sódio em pH 9 e solução tampão de tetraborato/fosfato de sódio em pH 8, sendo que a solução tampão tetraborato de sódio pH 9 proporcionou picos mais resolvidos para os constituintes que migram no final da análise e enquanto que a solução tampão tetraborato/fosfato pH 8, apresentou melhor resolução para os componentes que migram no início da análise.

Figura 21 - Efeito do pH na separação do SILKION usando os seguintes tampões: (A) fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 2 (B) tetraborato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 9 (C) tetraborato/ fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 8 (D) fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 7. Condições de análise: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s, voltagem: 20 kV.

Estudou-se o efeito da diluição e tempo de injeção do SILKION, apresentado na Figura 22, neste caso não se verificou perda de resolução discrepante entre as análises, como verificado pelos dados apresentados do QUERATAN (Figura 15). Todos os eletroferogramas apresentaram basicamente o mesmo perfil eletroforético, Optou-se por trabalhar com a diluição de 1:50 e tempo de injeção de 1 s. Aumentando-se a diluição do produto ocorre a gradativa perda de sinal, apesar do aumento do tempo de injeção.

Figura 22 - Efeito da diluição e tempo de injeção na separação do SILKION. Diluição/tempo de injeção: (A) 1:50 (v/v)/1 s (B) 1:100 (v/v)/2 s (C) 1:250 (v/v)/5 s (D) 1:500 (v/v)/10 s (E) 1:1000 (v/v)/20 s. Condições de análise: tampão tetraborato/fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 8; voltagem 20 kV.

3.3.1.3 – PROTEINAN

Figura 23 - Efeito do pH na separação do PROTEINAN usando os seguintes tampões: (A) tetraborato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 9 (B) tetraborato/fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 8 (C) fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} pH 7. Condições de análise: diluição do PROTEINAN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

Os eletroferogramas do PROTEINAN utilizando diferentes soluções tampões estão apresentados na Figura 23. Nenhum tampão foi efetivo na resolução do PROTEINAN.

3.3.1.4 - PROMARIN

O efeito de pH na separação do hidrolisado de proteína marinha (PROMARIN) foi avaliado utilizando diferentes composições da solução tampão (Figura 24). Nenhum tampão foi efetivo na resolução do PROMARIN.

Figura 24 - Efeito do pH na separação do PROMARIN usando os seguintes tampões: (A) tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 9 (B) tetraborato/fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 8 (C) fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹ pH 7. Condições de análise: diluição do PROMARIN: 1/50 (v/v); tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV.

3.3.1.5 – Perfis eletroforéticos de outros hidrolisados de proteína

As melhores condições analíticas e instrumentais obtidas na otimização da separação dos componentes do QUERATAN foram: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹ em pH 9, voltagem aplicada de 20 kV, diluição de 1:50 (v/v) em água e tempo de injeção de 1 s, utilizando capilar de sílica fundida e injeção hidrodinâmica.

Na Figura 25 estão apresentados os eletroferogramas dos hidrolisados de SILKION, PROTEINAN e PROMARIN, utilizando as condições otimizadas semelhantes ao QUERATAN.

Figura 25 - Perfil eletroforético dos hidrolisados de SILKION, PROTEINAN e PROMARIN. Condições de análise: diluição dos hidrolisados: 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV, tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 9. Equipamento de eletroforese capilar da marca Beckman.

Com a mudança de equipamento para um eletroforese capilar da marca Agilent, os perfis eletroforéticos dos hidrolisados de proteína foram obtidos nas condições otimizadas, como apresentado nas Figuras 26 e 27.

Figura 26 – Perfil eletroforético dos hidrolisados PROSOJA, LACTOSOL, QUERATAN. Condições de análise: diluição dos hidrolisados 1/50 (v/v) em água, tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV; tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 9. Equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent.

Figura 27 – Perfil eletroforético dos hidrolisados SILKION, PROTEINAN, PROMARIN. Condições de análise: diluição dos hidrolisados 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 20 kV; tampão tetraborato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 9. Equipamento de eletroforese capilar da marca Agilent.

3.3.2 – Otimização das condições de extração

Os hidrolisados de proteína apresentaram um perfil pouco resolvido e sempre se suspeitou da presença de sal, principalmente para os hidrolisados obtidos por hidrólise ácida. O problema é principalmente devido ao fato de que altas concentrações de sais na amostra causam alteração e distorção na altura do pico associado ao fenômeno de dispersão, ocorrendo perda de resolução.

Uma investigação com as duas fases de SPE (polar e apolar) foi conduzida para testar a retenção dos analitos e interferentes do hidrolisado de seda (SILKION), permitindo a escolha de condições apropriadas para as análises. Os cartuchos contendo os sorventes: C-18, CN, NH₂ e Diol foram utilizados, proporcionando uma grande faixa de possibilidades de isolamento e fracionamento de peptídeos. Sucessivas lavagens do cartucho contendo o sorvente foram realizadas aumentando-se a força do solvente (0-80%) e monitorando o efluente da extração a cada concentração, determinando desta forma o perfil de eluição da amostra.

Como apresentado nas Figuras 28-31, os peptídeos dos hidrolisados de proteína de seda distribuem-se em diferentes frações na coluna de acordo com sua hidrofobicidade, eluindo com 50% ou menos de ACN.

O cartucho contendo o sorvente C-18 retém peptídeos mais hidrofóbicos, como pode ser visto pela Figura 28-C. Na RP-SPE (C-18) peptídeos apolares adsorvem no sorvente, isto é, peptídeos mais hidrofóbicos exibem uma maior interação com o sorvente, eluindo com maior concentração de acetonitrila. Peptídeos do hidrolisado fracionam com boa resolução dependendo de sua polaridade, como pode ser verificado pelos componentes mais polares, eluídos com água ou com baixa concentração de acetonitrila. A Figura 28 sugere que a presença de sal não afeta o perfil do hidrolisado, como se supunha e que componentes apolares são os responsáveis pelo perfil pouco resolvido do SILKION.

Os sorventes NH₂ e Diol comportam-se como sorvente polar e somente permitem a retenção de peptídeos mais polares, como apresentado nas Figuras 30 e 31.

Figura 28 – Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em C-18. Seqüência da eluição: (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1%TFA (D) 80% ACN em 0,1%TFA. Condições eletroforéticas: fosfato 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

Figura 29 – Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em Sep-Pak Plus CN. Seqüência da eluição: (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

Figura 30 – Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em NH_2 . Seqüência da eluição: (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: fosfato 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

Figura 31 – Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em Diol. Seqüência da eluição: (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

A fase C-18 e o eluente 0,1% TFA em água foram selecionados para investigação adicional do hidrolisado de seda (SILKION) por apresentar maior resolução dos componentes do hidrolisado, boa linha de base e maior quantidade de componentes.

O ácido trifluoracético (TFA) tem sido usado como formador de par iônico. Aumenta também a hidrofobicidade pois os grupos carboxílicos dos peptídeos são protonados enquanto resíduos básicos formam par iônico com TFA. TFA é transparente na região do UV, sendo facilmente eliminado por volatilização.

Uma vez selecionados o sorvente e o eluente, o volume de amostra inserido no cartucho, na diluição do SILKION de 1:50 (v/v), foi determinado inserindo-se diferentes volumes do SILKION no sorvente e coletando-se frações de 1,5 mL, sendo posteriormente analisadas, como apresentado na Figura 32. O melhor resultado foi indicado pelo maior número de componentes e melhor resolução, que foi obtido com um volume de amostra de 5 mL.

Figura 32 – Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em diferentes volumes do hidrolisado inserido ao cartucho (A) 2 mL (B) 5 mL (C) 10 mL (D) 15 mL. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume do eluente: 1,5 mL.

Outro parâmetro avaliado foram as várias diluições do SILKION, antes de sua introdução no cartucho (C-18), em um volume de 5 mL. Estudos indicam que amostras mais diluídas ligam-se melhor aos sítios ativos da coluna de SPE em comparação às amostras viscosas porque ocorre uma maior transferência de massa para a fase estacionária ⁹. O fator ótimo de diluição foi determinado analisando-se as amostras em diferentes proporções de diluição e estudando-se o fator de diluição *versus* resolução e melhor sensibilidade, como observado na Figura 33. As condições de análise foram escolhidas e conduzidas com a diluição de 1:50 (v/v) do SILKION, análises realizadas com menor diluição apresentaram sobreposição de picos com alargamento de bandas.

Figura 33 – Eletroferogramas dos eluatos de hidrolisado de SILKION em diferentes diluições. (A) 1:100 (v/v) (B) 1:50 (v/v). Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: pH 2; volume de amostra 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

A otimização do volume do eluente (0,1% TFA em água) para eluição do SILKION do sorvente foi realizada analisando-se alíquotas de 1,5 mL nas condições já otimizadas anteriormente. Como pode-se verificar pela Figura 34, o menor volume utilizado é o que apresenta melhor performance em termos de magnitude do sinal

analítico, evitando a diluição do hidrolisado. Quanto maior o volume do eluente, percebe-se a eluição de um componente majoritário em aproximadamente 6 min..

Figura 34 – Eletroferogramas dos eluatos de SILKION após eluição em C-18 com o aumento do volume do eluente (0,1 %TFA em água) em alíquotas de 1,5 mL (de A a F). Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

A modificação do pH da amostra antes da introdução do hidrolisado no cartucho foi realizada como uma forma de otimização de retenção dos componentes do SILKION, como apresentado na Figura 35. Os eletroferogramas apresentaram perfis semelhantes, principalmente em pH maior que 7.

Figura 35 - Eletroferogramas dos eluatos de SILKION em diferentes pH's ajustado antes da introdução da amostra no cartucho. (A) 2 (B) 7 (C) 9. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do SILKION: 1/50 (v/v); volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

As condições ótimas de extração e eluição utilizando a SPE para o SILKION foram: sorvente Sep-Pak C-18, eluente 0,1% TFA em água em um volume de 1,5 mL, 5 mL do hidrolisado de seda na diluição de 1:50 (v/v) em pH 2, apresentado na Figura 36.

Figura 36 - Eletroferograma do SILKION nas condições ótimas. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: Sep-Pak Plus C-18; diluição do SILKION: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; eluído em 0,1% TFA em água em um volume de 1,5 mL.

3.3.3 – Extração de hidrolisados de proteína

O estudo da extração dos demais hidrolisados com as condições otimizadas do SILKION, aumentando-se a força do solvente (ACN) foi realizado, como apresentado nas Figura 37-41. Da mesma forma que o SILKION, os hidrolisados apresentaram baixa resolução com o aumento da concentração de ACN.

Figura 37 – Eletroferogramas do QUERATAN em Sep-Pak Plus C-18. Sequência de eluição: (1) 0,1% TFA em água (2) 20% ACN em 0,1% TFA (3) 50% ACN em 0,1%TFA (4) 80% ACN em TFA. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do QUERATAN: 1:50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente 1,5 mL.

Figura 38 - Eletroferogramas do PROMARIN em C-18. Sequencia de eluição: (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: fosfato 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do PROMARIN: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

Figura 39 - Eletroferogramas do PROSOJA em C-18. (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do PROSOJA: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

Figura 40 - Eletroferogramas do LACTOSOL em C-18. (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: tampão fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do LACTOSOL: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

Figura 41 - Eletroferogramas do PROTEINAN em C-18. (A) 0,1% TFA em água (B) 20% ACN em 0,1% TFA (C) 50% ACN em 0,1% TFA (D) 80% ACN em 0,1% TFA. Condições eletroforéticas: fosfato de sódio 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; voltagem: 25 kV. Condições de extração: diluição do PROTEINAN: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; volume de eluente: 1,5 mL.

3.3.4 - Método de Kjeldahl

A quantidade de proteína total dos hidrolisados de proteína foi obtida pelo método de Kjeldhal ¹⁶.

O método de Kjeldhal consiste na digestão da proteína pela ação de ácido sulfúrico. Sulfato de potássio é adicionado para aumentar o ponto de ebulição da solução e portanto, acelerar o processo de digestão e sulfato de cobre é usado como catalisador de reação.

Devido o grande número de componentes dos hidrolisados, o método de Kjeldhal apresenta certas dificuldades como a diferença de sensibilidade de seus constituintes, por exemplo, a facilidade da formação de nitrogênio livre de alguns polipeptídeos na presença de catalisadores e a possível presença de certas substâncias “inibidoras” (ocorrendo, por exemplo, a precipitação) ¹⁷. As análises tornam-se geralmente demoradas (acima de 10 horas) para completa digestão ¹⁸.

A Tabela 5 apresenta os resultados dos valores da quantidade de proteína total dos hidrolisados estudados, obtidos pelo método de Kjeldhal e os respectivos fatores de conversão da % de nitrogênio para % de proteína total.

TABELA 5 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA TOTAL DOS HIDROLISADOS

HIDROLISADOS	FATOR DE CONVERSÃO	% PROTEÍNA TOTAL	C.V. (%)
LACTOSOL	6,38	4,710	0,225
SILKION	6,25	14,59	0,750
PROTEINAN	6,25	34,79	0,156
QUERATAN	6,25	43,77	0,000
PROSOJA	5,77	6,620	0,208
PROTRIGO	5,77	8,620	0,373

NOTA: C.V.: Coeficiente de variação; análise em triplicata

Os resultados apresentaram valores variados de proteína total dos hidrolisados, sendo que o QUERATAN foi o hidrolisado que apresentou a maior porcentagem de proteína total.

3.4 - CONCLUSÕES

O condicionamento do capilar entre as análises das proteínas hidrolisadas mostrou-se fundamental para a manutenção dos tempos de migração.

As melhores condições analíticas e instrumentais na otimização da separação dos componentes do QUERATAN para obtenção do perfil eletroforético foram: tampão tetraborato de sódio 20 mmolL^{-1} em pH 9, voltagem aplicada de 20 kV, diluição do hidrolisado de 1:50 (v/v) em água, tempo de injeção de 1 s, utilizando capilar de sílica fundida e injeção hidrodinâmica.

Os aditivos incorporados ao tampão: β -ciclodextrina, éter coroa e SDS não influenciaram na separação dos componentes do QUERATAN.

Devido à alta complexidade das amostras, verificou-se uma distribuição de picos sem a resolução dos componentes dos hidrolisados e como uma forma de tentar melhorar a resolução dos hidrolisados de proteína, foram realizadas análises utilizando cartuchos Sep-Pak (Waters).

As melhores condições obtidas com relação a extração e eluição utilizando SPE para o hidrolisado de seda foram: sorvente Sep-Pak-Plus C-18, eluente 0,1% TFA em água, 5 mL do hidrolisado de seda, pH 2 do hidrolisado de seda, diluição de 1:50 (v/v) em água, volume do eluente de 1,5 mL, apresentando melhor magnitude de sinal analítico, maior número de componentes do SILKION e melhor resolução.

Análises realizadas envolvendo a extração em fase sólida e, monitorando-se as frações por eletroforese capilar mostraram que componentes apolares são os responsáveis pelo perfil pouco resolvido dos hidrolisados. Assim sendo, foi possível obter-se um mapa peptídico rico em informações após tratamento dos hidrolisados em fase sólida.

O método de Kjeldhal foi a única ferramenta analítica empregada para avaliar a concentração dos hidrolisados de proteína.

3.5 - Referências Bibliográficas

- 1 - Schwartz, H.E.; Palmieri R.H.; Nolan J.A.; *Introduction to Capillary Electrophoresis of Protein and Peptides*, Beckman Instruments Inc., U.S.A, **1993**.
- 2 - Lauer, H.H.; D.McManigill; Capillary Zone Electrophoresis of Proteins in Untreated Fused Silica Tubing, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 166-170.
- 3 - Mc Cormick, R.M.; Capillary Zone Electrophoresis Separation of peptides and Proteins Using Low pH Buffers in Modified Silica Capillaries, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2322-2328.
- 4 - Huang, M.; Mitchell D.; Bigelow M.; Highly Efficient Protein Separations in High Performance Capillary Electrophoresis, Using Hydrophilic Coating on Polysiloxane-Bonded Columns, *J. Chromatogr. B*, **1996**, 677, 77-84.
- 5 - Green, J.S.; Jorgenson, J.W.; Minimizing Adsorption of Protein on Fused Silica in Capillary Zone Electrophoresis by the Addition of Alkali Metal Salts to the Buffers, *J. Chromatogr. B*, **1989**, 478, 63-70.
- 6 - Zhu, M.; Rodrigues, R.; Hansen, D.; Wehr T.; Capillary Electrophoresis of Protein Under Alkaline Conditions, *J. Chromatogr.*, **1990**, 516, 123-131.
- 7 - Saari-Nordhaus, ; Anderson, J.M.; Membrane-Based Solid-Phase Extraction as a Sample Clean-Up Technique for Anion Analysis by Capillary Electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 706 563-569.
- 8 - Waters Chromatography Columns and Supplies Catalog, **1999-2000**.
- 9 - Gilson Guide to SPE Automation, France, 1-68.
- 10 - Bennett, H.P.J.; Hudson, A.M.; Kelly, L.; Mc Martin, C.; Purdon, G.E.; Rapid Method, Using Octadecasilyl-Silica, For Extraction Of Certain Peptides From Tissues, *Biochem. J.*, **1978** 175 1139.
- 11 - Voirin, A.; Letavernier, J.F.; Sebille, B.; Improvement of Extraction and Concentration of Milk Peptides with Solid-Phase Cartridges for Analysis by High Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **1991**, 553, 155.
- 12 - Evaluation of Solid Phase Extraction Procedures in Peptides Analysis, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 708, 209-221.
- 13 - Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V.; Lichtig, J.; Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes, *Química Nova*, **1998**, 21(6), 787-793.

- 14 - Badstreet, R.B.; *The Kjeldhal Method for Organic Nitrogen*, Academic Press, New York, **1965**
- 15 - Kane, P.F.; Comparasion of HgO and CuSO₄/TiO₂ as Catalysts in Manual Kjeldahl Digestion for Determination of Crude Protein in Animal Feed: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, 70, 5, 907-911.
- 16 - Horowitz, W; A. O A C. *Official Mehods of Analysis*, 16^a ed., Washington DC, USA, cap 12, 7, **1995**.
- 17 - Hiller, A.; Plazin, J.; D Van Slyke, D.; A Study of Conditions for Kjeldahl Determination of Nitrogen in Protein
- 18 - Jonnard, R.; Determination of Total Nitrogen in Protein and Their Hydrolyzates, *Ind. Eng Chem.*, **1945**, 16, 4, 246-249.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLAR DOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA

4.1 – INTRODUÇÃO

Na última década, a eletroforese capilar em gel tem se estabelecido como uma técnica de separação moderna e poderosa nas análises de macromoléculas como as proteínas, com a vantagem de apresentar separações rápidas, análise quantitativa, detecção em fluxo e automação. A eletroforese capilar em gel separa as proteínas devido a diferenças de massa molar. A separação é baseada na proporção constante de ligação entre a proteína e as moléculas de SDS (1,4 g SDS/1 g proteína) deixando inalterada a relação carga/massa.

Géis físicos, tais como dextran, polietileno glicol e poliacrilamida linear têm sido utilizados como matrizes poliméricas na separação de proteínas por terem estruturas flexíveis e não ligadas quimicamente às paredes interna do capilar. A natureza não rígida de uma rede polimérica permite recolocá-la no início de cada análise, eliminando a contaminação entre as amostras e melhorando a repetibilidade.

Neste trabalho duas metodologias para determinação de massa molar foram implementadas. Um dos métodos descritos utilizou dextran, como rede polimérica, para a separação de proteínas, englobando duas faixas de padrões: uma de 2512 – 16949 Da e outra de 14400 – 67000 Da. Outro método utilizou o kit Pro-Sort (Applied Biosystems) para a separação de padrões de proteínas de massa molar de 14400 - 94000 Da.

4.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 –Determinação do intervalo de massa molar

As análises para a separação de proteína de baixa massa molar (2512 Da – 16949 Da) e de alta massa molar (14400 Da – 94000 Da) foram realizadas utilizando um equipamento para eletroforese capilar da marca Agilent modelo HP 3D-CE ChemStation.

Um capilar normal de sílica fundida foi empregado na análise utilizando dextran como rede polimérica, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 33 cm de comprimento total (24,5 cm até o detector), sendo montado em um cartucho. A voltagem aplicada foi de -10 kV do catodo para o anodo e o comprimento de onda foi de 220 nm. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido a temperatura de 30°C. Todas as amostras foram injetadas eletrocineticamente com voltagem de -10 kV por 5 segundos. O tampão de separação consistiu de 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% de dextran (massa molar 2.000.000) e 5% de metanol em pH 8,3. A superfície do capilar foi condicionada entre as corridas com NaOH 1 molL⁻¹, água deionizada e tampão contendo o dextran por 4, 4 e 8 minutos, seqüencialmente. Os hidrolisados de proteína LACTOSOL, SILKION, QUERATAN, PROMARIN, PROTEINAN foram dissolvidos em 0,1 molL⁻¹ Tris-HCl, 1% SDS em pH 9,2 em apropriadas diluições (citadas nos resultados junto às figuras), sendo deixados em banho-maria por 10 minutos. Análises dos hidrolisados na sua forma pura foram realizadas. Os padrões de proteína nas faixas de 2512-16949 e 14400- 67000 Da (Pharmacia) foram preparados com o mesmo procedimento das amostras na concentração de 1 mgmL⁻¹. O marcador interno utilizado foi o ácido trimelítico 1 mgmL⁻¹.

As análises das proteínas hidrolisadas, utilizando o kit Pro-Sort, foram realizadas em capilar de sílica fundida com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 33 cm de comprimento total (24,5 cm até o detector), sendo montado em um cartucho. A voltagem aplicada foi de -9,5 kV do catodo para o anodo e o comprimento de onda utilizado nas análises foi de 215 nm. Durante as análises o capilar foi mantido a temperatura de 30°C. Todas as amostras foram injetadas eletrocineticamente com - 4 kV por 20 s. O tampão de separação foi o reagente Pro-Sort (Perkin Elmer). Entre as corridas o capilar foi condicionado com

o reagente Pro-Sort por 12 minutos. Os hidrolisados de proteína e os padrões de proteína de 14400–94000 Da (Pharmacia) foram desnaturados com 1% de mercaptoetanol e 1% de SDS, sendo deixados em banho-maria por 15 minutos, na concentração de 1 mg mL^{-1} . Os hidrolisados de proteína foram preparados na concentração de 1 mg mL^{-1} , considerando a porcentagem de proteína total, obtida pelo método de Kjeldhal. O marcador interno utilizado foi o ácido trimelítico 1 mg mL^{-1} .

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 – Otimização da separação usando dextran como rede polimérica

Para a separação dos padrões de proteínas, usando dextran como rede polimérica, utilizou-se o método de Y. Zhang *et al.*¹, porém como não se obteve boa resolução entre as seis proteínas, o método foi otimizado variando-se parâmetros instrumentais, como a voltagem, o tempo de injeção e também pela adição de metanol à solução tampão contendo dextran. A Figura 42 apresenta os resultados obtidos para otimização da separação dos padrões de proteína de baixa massa molar. Diminuindo-se o tempo de injeção de 5 (Figura 42 A) para 2 segundos (Figura 42 B) não se verificou melhora da resolução, porém, quando a voltagem aplicada foi diminuída de -16,5 kV (Figura 42 B) para -10 kV (Figura 42 C), alguns picos que estavam sobrepostos foram separados. Diminuindo-se ainda mais a voltagem (Figura 42 D) não se obteve melhora na resolução, pois ocorreu um maior tempo de permanência dos padrões na coluna capilar resultando na dispersão e aumento do tempo de migração.

Figura 42 – Efeito do tempo de injeção e da voltagem aplicada na separação dos padrões de proteína. Tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000), pH 8,3, voltagem de injeção: -10 kV, tempo de injeção: (A), (C), (D) = 5 s (B) = 2 s, voltagem aplicada: (A), (B) = -16,5 kV (C) = -10 kV (D) = -5 kV.

Visando ainda a otimização da separação das proteínas, 5% de metanol foi adicionado ao tampão de corrida. O objetivo da incorporação de solvente orgânico ao tampão de corrida é diminuir o fluxo eletroosmótico³ fazendo com que haja maior tempo de separação dos solutos, como visto na Figura 43. O ácido trimelítico, um marcador de referência, foi injetado antes da introdução da amostra para ajustar o tempo de migração, pois em sistemas viscosos a variação do tempo de migração pode ocorrer com maior frequência. Como uma forma de minimizar excessivas mudanças do fluxo eletroosmótico, uma sequência de lavagens entre as corridas foi realizada com NaOH (4 min), água deionizada (4 min) e tampão (10 min).

Na Figura 43 B observou-se maior resolução com a adição de metanol, obtendo-se os seis picos correspondentes aos seis padrões de proteína de baixa massa molar.

Figura 43 – Efeito da adição de metanol na separação dos padrões de proteína. (A) sem metanol (B) com 5% de metanol. Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000); pH 8,3; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico. Massas molares: (1) 2512 (2) 6214 (3) 8159 (4) 10701 (5) 14404 (6) 16949 Da.

4.3.2 – Obtenção das massas molares dos hidrolisados

A Figura 44 apresenta o eletroferograma do hidrolisado de seda (SILKION), na concentração de 1 mg mL^{-1} . A obtenção desta concentração foi baseada nos resultados obtidos pelo método de Kjeldhal, sendo que o preparo da amostra foi feito com SDS/Tris, conforme mencionado na seção experimental. Todos os outros hidrolisados analisados nessa mesma concentração apresentaram perfis semelhantes ao do SILKION. Foi observado o aparecimento de um pico situado em um tempo de migração maior que 15 minutos (o qual suspeitou-se da baixa concentração de peptídeos dos hidrolisados) e um outro pico localizado em um tempo de migração menor que o do marcador (podendo corresponder aos conservantes).

Figura 44 – Eletroferograma do SILKION. Tampão $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Os resultados obtidos até aqui não foram conclusivos, pois não havia a certeza de que a falta de sinal dos hidrolisados no meio significasse ausência de componentes naquele intervalo de massa molar ou se simplesmente um problema de sensibilidade do método.

Como uma forma de detectar a presença de componentes dos hidrolisados, análises foram realizadas com a fração de amostras tratadas por RP-SPE, eluída com 0,1% TFA em água. Previamente às análises em eletroforese capilar as

amostras foram concentradas em um evaporador a vácuo de amostras do tipo Speed Vac. Os resultados evidenciaram baixo sinal analítico ou a ausência de sinal, como o mostrado abaixo para o SILKION (Figura 45).

Figura 45 – Eletroferograma do SILKION após tratamento em SPE e Speed Vac. Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Dessa forma, os hidrolisados foram injetados na sua forma pura e como alguns apresentaram uma banda alargada foram diluídos com $0,1 \text{ M}$ Tris-HCl, 1% SDS em pH 9,2 e aquecidas em banho maria por 15 minutos, em concentrações tentativas, conforme demonstrado nas Figuras 46-52.

Após esse tratamento, os hidrolisados apresentaram boa linha de base mas com diminuição do sinal analítico. O eletroferograma do LACTOSOL (Figura 46) apresentou 3 picos principais em um tempo de migração de aproximadamente 20 minutos e um pico maior em 30 minutos. O eletroferograma do SILKION (Figura 47), apresentou picos no intervalo de tempo de migração entre 10-25 minutos. Após a diluição, o hidrolisado de soja (Figura 48) apresentou 2 componentes em um tempo de migração de aproximadamente 30 minutos, o eletroferograma do PROTEINAN

(Figura 49) apresentou 3 picos e observou-se no PROTRIGO (Figura 50) alguns componentes entre 10 - 20 minutos e um outro em um tempo de migração de 30 minutos. O hidrolisado de proteína marinha (PROMARIN) (Figura 51) apresentou baixo sinal analítico, mesmo sendo analisado puro. O eletroferograma do QUERATAN (Figura 52) também apresentou 3 componentes principais em um tempo de migração de 12-16 min, e um outro após 30 min.

Suspeitou-se que o sinal apresentado nos eletroferogramas, no tempo de migração de aproximadamente 30 minutos, fosse a alcalase, utilizada nas hidrólises enzimáticas, mas a análise da alcalase (Figura 53) realizada nas mesmas condições dos hidrolisados, apresentou no eletroferograma um sinal com um tempo de migração maior que 40 minutos, indicando não se tratar dessa enzima, possivelmente, tratando-se de peptídeos constituintes dos hidrolisados.

Em maior ou menor magnitude de sinal analítico, em todos os eletroferogramas apresentados nas Figuras 46-53 houve o aparecimento de um pico à esquerda do ácido trimelítico, esse pico pode ser atribuído à diferença de viscosidade, condutividade e índice de refração entre a banda da amostra e o tampão.

Figura 46 - Eletroferogramas do LACTOSOL. (A) puro (B) 1:1 (v/v). Tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV. * ácido trimelítico

Figura 47 - Eletroferogramas do SILKION (A) puro (B) 1:1 (v/v). Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Figura 48 - Eletroferogramas do PROSOJA (A) puro (B) 1:0,5 (v/v). Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Figura 49 – Eletroferogramas do PROTEINAN (A) puro (B) 1:1 (v/v). Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Figura 50 - Eletroferogramas do PROTRIGO (A) puro (B) 1:1 (v/v). Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Figura 51 - Eletroferograma do PROMARIN puro. Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol, pH 8,3; temperatura: 25°C , λ 220 nm, voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s, voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico.

Figura 52 - Eletroferogramas do QUERATAN (A) puro (B) 1:1. Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

Figura 53 - Eletroferogramas do (A) alcalase 1,5% (B) branco (0,1 molL⁻¹ Tris-HCl e 1% SDS) (C) conservante (zonen) 0,3%. Tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C; λ 220 nm; voltagem de injeção: -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV. * ácido trimelítico

A partir das condições otimizadas da separação dos padrões de proteína de 2512-16949 Da (Figura 54 A), análises em duplicata foram realizadas para a construção de uma curva de calibração do tempo de migração relativo *versus* log da massa molar, para a posterior determinação das massas molares dos hidrolisados de proteína. Os dados para a obtenção da curva estão apresentados na Tabela 6.

Padrões de proteínas na faixa de 14.400 Da – 67000 Da (Figura 54 B) foram separados pelo método usando dextran e puderam contribuir para a construção da curva de calibração (Figura 55).

Pela curva de calibração dos padrões de proteína observou-se que o coeficiente de correlação foi de 0,9212. Alguns estudos ³ têm relatado que o segundo ponto (na faixa de 2500-6000 Da) apresenta um desvio de linearidade e isto ocorre devido às características estruturais da proteína, que acaba alterando sua mobilidade eletroforética. Com a retirada deste ponto da curva de calibração o coeficiente linear apresentou um valor de 0,9833. Como os hidrolisados não apresentaram sinais na faixa citada, o ponto foi excluído e os valores de massa molar dos hidrolisados foram calculados com base na curva que apresentou melhor coeficiente de correlação.

Figura 54- Eletroferogramas dos padrões de proteínas (A) 2,5 - 16 kDa (B) 14,4 - 67 kDa. Tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; temperatura: 25°C ; λ 220 nm; voltagem de injeção -10 kV / tempo de injeção: 5 s; voltagem aplicada: -10 kV . * ácido trimelítico

TABELA 6 – DADOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

MASSA MOLAR	log MASSA MOLAR	t_{mig} (min)	t_{rel}
2.512	3,400	17,84	0,4562
6214	3,793	18,26	0,4458
8159	3,911	19,57	0,4159
10701	4,029	19,91	0,4087
14404	4,158	21,17	0,3845
16949	4,229	21,77	0,3740
14400	4,158	19,87	0,3922
20100	4,303	22,08	0,3530
30000	4,477	24,83	0,3140
43000	4,633	28,56	0,2729
67000	4,826	31,80	0,2451

NOTAS:

t_{mig} = tempo de migração

t_{rel} = tempo de migração relativo

tempo de migração do ácido trimelítico das proteínas de 2,5 – 14,4 kDa = 8,1425 min

tempo de migração do ácido trimelítico das proteínas de 14,4 – 67 kDa = 7,797 min

Observação: O tempo de migração relativo é calculado dividindo-se o tempo de migração do ácido trimelítico pelo tempo de migração dos padrões de proteína.

A partir dos resultados da Tabela 6 construiu-se a curva de calibração (Figura 55).

Figura 55 - Curva de calibração das proteínas.

A massa molar dos hidrolisados, portanto, foi calculada pela Equação [13]:

$$\log \text{ massa molar} = 6,0221 - 4,9079 \cdot (\text{tempo de migração relativo}) \quad [13]$$

A Tabela 7 apresenta os resultados estimados das faixas de massas molares dos hidrolisados de proteína.

TABELA 7 – ESTIMATIVA DO INTERVALO DE MASSA MOLAR DOS HIDROLISADOS

HIDROLISADOS	t_{rel}	DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR (Da)
LACTOSOL	0,4127	9922
	0,4031	11059
	0,2612	54974
SILKION	0,6317	(835)
	0,5720	(1640)
	0,5244	2808
	0,3534	19393
PROSOJA	0,2624	54233
	0,2392	70490
PROTEINAN	0,2866	41256
	0,2597	55914
	0,2337	75011
PROTRIGO	0,8112	(110)
	0,785	(148)
	0,7403	(245)
	0,2962	37015
	0,2616	54726
QUERATAN	0,6179	(976)
	0,5844	(1425)
	0,5559	(1967)
	0,3868	13296
	0,2839	42535
	0,2366	72592

NOTAS: t_{rel} = tempo de migração relativo; valores entre parênteses estão fora do intervalo de calibração

Alguns componentes dos hidrolisados apresentaram massa molar fora da faixa dos padrões de proteína, contudo foram calculados, mas apresentam valores não confiáveis, devido a falta de padrões abaixo da massa molar de 2,5 kDa.

4.3.3 – Separação de padrão de proteína usando Pro-Sort

As análises com os padrões de proteína de alta massa molar (14400 Da-94000 Da) também foram realizadas utilizando o reagente Pro-Sort (Perkin Elmer), constituído de um polímero linear de acrilamida, contendo o ácido 2[2-hidroxi-1,1-bis(hidroxi-metilamino) etanosulfônico (Tes) ajustado com NaOH, em pH 7,0 e 0,2% de SDS⁴.

A partir da média do tempo de migração dos padrões de proteína da Figura 56, construiu-se a curva de calibração do tempo de migração relativa *versus* log da massa molar para obtenção das massas molares dos hidrolisados. Os dados são apresentados na Tabela 8.

Figura 56 - Eletroferogramas dos padrões de proteína de alta massa molar. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0; voltagem aplicada: -9,5 kV; tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: -4 kV; temperatura: 30°C, λ 215 nm. *ácido trimelítico

TABELA 8 – DADOS PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE ALTA MASSA MOLAR

MASSA MOLAR (Da)	log MASSA MOLAR	t_{mig} (min)	t_{tel}
14400	4,1584	6,2875	0,51658
20100	4,3032	6,7185	0,48344
30000	4,4771	7,1690	0,45062
43000	4,6325	7,9575	0,40817
67000	4,8261	8,6950	0,37354
94000	4,9731	9,5675	0,33948

NOTAS: t_{mig} = tempo de migração do ácido trimelítico (= 3,248 minutos)

t_{rel} = tempo de migração relativo

Figura 57 - Curva de calibração das proteínas de alta massa molar.

A curva de calibração apresentou boa linearidade, apresentando coeficiente de correlação acima de 0,99.

Nas Figuras 59-63 estão apresentados os eletroferogramas dos hidrolisados de proteína. Os hidrolisados cujos eletroferogramas apresentaram bandas alargadas foram o PROTEINAN (Figura 59), PROMARIN (Figura 60) e o PROSOJA (Figura 61). Este comportamento pode estar relacionado com a adsorção dos peptídeos na parede do capilar. O reagente Pro Sort tem um pH 7, com isso alguns peptídeos podem ter ficado carregados positivamente, interagindo com os grupos silanóis dissociados da parede do capilar, provocando o alargamento das bandas, ou mesmo, alguns peptídeos poderiam estar com carga efetiva zero, sendo

carregados pelo fluxo eletroosmótico como uma banda única, portanto, a informação não seria confiável para o cálculo de massa molar. O eletroferograma do QUERATAN (Figura 62) não apresentou picos na faixa de massa molar considerada, porém, apresentou um único pico em um tempo de migração de minutos que poder ter vindo da contribuição de peptídeos de menor massa molar. O LACTOSOL (Figura 63) também não apresentou componente na faixa de massa molar considerada. A linha de base apresentou instabilidade provavelmente devido a alta viscosidade do reagente Pro-Sort.

Figura 58 – Eletroferograma do branco. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0; voltagem aplicada: – 9,5 kV; tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: – 4 kV; temperatura: 30°C; λ 215 nm. *ácido trimelítico

Figura 59 - Eletroferograma do PROTEINAN. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0, voltagem aplicada: – 9,5 kV; tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: – 4 kV; temperatura: 30°C; λ 215 nm. *ácido trimelítico

Figura 60 - Eletroferograma do PROMARIN. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0; voltagem aplicada: – 9,5 kV; tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: – 4 kV; temperatura: 30°C; λ 215 nm. *ácido trimelítico

Figura 61 - Eletroferograma do PROSOJA. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0; voltagem aplicada: – 9,5 kV; tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: – 4 kV; temperatura: 30°C; λ 215 nm. *ácido trimelítico

Figura 62 – Eletroferograma do QUERATAN. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0; voltagem aplicada: – 9,5 kV; tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: – 4 kV; temperatura: 30°C; λ 215 nm. *ácido trimelítico

Figura 63 – Eletroferograma do LACTOSOL. Tampão reagente Pro-Sort; pH 7,0, voltagem aplicada: – 9,5 kV, tempo de injeção: 20 s / voltagem de injeção: –4 kV, temperatura: 30°C; λ 215nm. *ácido trimelítico

4.4 – CONCLUSÕES

Os hidrolisados apresentaram faixa de massa molar de 10 – 70 kDa.

Duas faixas de padrões de proteína entre 2,5 – 16 kDa e 14,4 – 67 kDa puderam ser separados usando um único método, usando dextran como rede polimérica.

O reagente Pro-Sort separa com boa resolução os padrões de proteína, apresentando coeficiente de correlação acima de 0,99, mas os hidrolisados apresentaram banda alargada, dificultando a determinação das massas molares.

4.5 -Referências Bibliográficas

- 1 - Zhang, Y.; Lee, H.K.; Li, S.F.Y.; Separation of Myoglobin Molecular Mass Markers Using Non-Gel Sieving Capillary Electrophoresis *J. Chromatogr. A*, **1996**, 744 9, 249-257.
- 2- Weinberger, R.; *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press Inc., San Diego, **1996**
- 3 – Kratzin, H.D.; Wiltfang, J.; Karas, M.; Neuhoff, V.; Gas-Phase Sequencing After Electrophoresis on Polyvinylidene Difluoride Membranes Assigns Correct Molecular Weights to Myoglobin Molecular Weight Markers, *Anal. Biochem*, **1989**, 183, 1-8.
- 4 - Werner, W.E.; Demorest, D.M.; Stevens, J.; Size-Dependent Separation of Proteins Denatured in SDS By Capillary Electrophoresis Using a Replaceable Sieving Matrix, *Anal.Biochem.*, **1993**, 212, 253-258.

CAPÍTULO 5

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA

5.1 - INTRODUÇÃO

Aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas, consistindo de um grupo amino, um grupo carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupo R distinto, referido como cadeia lateral, ligados ao átomo de carbono. A Figura 64 apresenta a estrutura dos 20 aminoácidos, constituintes das proteínas.

Figura 64 - Estrutura dos aminoácidos.

Aminoácidos em solução neutra são predominantemente íons dipolares (ou zwitterions) e o estado de dissociação dos aminoácidos varia com o pH.

A maioria dos aminoácidos não absorve na região do UV-Vis e a detecção é geralmente realizada pela derivatização pré ou pós-coluna. Os derivatizantes

fluorogênicos tem a vantagem de alta sensibilidade, entretanto, o processo de derivatização pode consumir tempo, requerendo adicional trabalho.

Na eletroforese capilar a detecção de aminoácidos não derivatizados tem sido desenvolvida utilizando o método de detecção indireta, com equipamentos dotados de detector UV-Vis. Neste método a escolha do eletrólito é de grande importância afetando a resolução e a sensibilidade.

Neste trabalho investigou-se o uso de dois cromóforos separadamente (ácido 3,5-dinitrobenzóico e o hidrogenoftalato de potássio), como eletrólitos de corrida, para a identificação dos aminoácidos livres nos hidrolisados bem como a identificação e quantificação destes no hidrolisado de queratina.

5.2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As análises de identificação e quantificação dos aminoácidos livres nos hidrolisados de proteína foram realizadas utilizando um equipamento para eletroforese capilar da marca Agilent modelo HP 3D-CE ChemStation.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Soluções estoques de 2000 mgL^{-1} dos aminoácidos foram preparadas em água deionizada.

As análises pelo método de detecção indireta foram conduzidas em capilar de sílica fundida com dimensões de $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno, $375 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro externo e $58,5 \text{ cm}$ de comprimento total (50 cm até o detector), sendo montado em um cartucho.

Um dos eletrólitos de corrida consistiu de ácido 3,5-dinitrobenzóico com a adição de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A voltagem aplicada foi de -30 kV do catodo para o anodo e o comprimento de onda utilizado foi de 254 nm . Durante a eletroforese, o capilar foi mantido na temperatura de 30°C . Todas as amostras foram injetadas pelo modo hidrodinâmico com uma pressão de 50 mBar por 1 s .

Para as análises de reprodutibilidade os seguintes procedimentos de condicionamento entre as corridas foram realizados:

- 1 – somente com o eletrólito, por 5 min .
- 2 – $\text{NaOH } 1 \text{ molL}^{-1}$ (1 min), água deionizada (1 min) e eletrólito (4 min).
- 3 - $\text{NaOH } 1 \text{ molL}^{-1}$ (1 min), água deionizada (1 min), eletrólito (4 min) e aplicação de -10 kV por 60 s .

As análises com a incorporação de aditivos como α e β -ciclodextrinas foram realizadas nas mesmas condições acima, porém o eletrólito utilizado foi o ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} , sem a adição de CTAB e portanto, sem a inversão de fluxo.

Outro eletrólito usado pelo método de detecção indireta foi o hidrogenoftalato de potássio $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ com a adição de CTAB $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$. A voltagem aplicada foi de -30 kV , com inversão de polaridade e o comprimento de onda foi de 214 nm . Durante a eletroforese, o capilar foi mantido na temperatura de 30°C . As amostras foram injetadas pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mBar por 1 s .

5.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 – Uso do ácido 3,5-dinitrobenzóico como eletrólito de corrida

5.3.1.1 – Testes de repetibilidade

Três métodos de condicionamento do capilar entre as corridas foram avaliados com o objetivo de obter maior repetibilidade. Para esta análise foi preparada uma mistura contendo os 20 aminoácidos em água na concentração de 30 mgL^{-1} de cada aminoácido, o eletrólito de corrida consistiu do ácido 3,5-dinitrobenzóico 5 mmolL^{-1} com a adição de CTAB $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ com a inversão do fluxo eletroosmótico. Estas análises foram realizadas com a solução do eletrólito não filtrada, pois estudos indicam que o surfactante utilizado pode adsorver na superfície do filtro, sendo retido ¹.

A Tabela 9 apresenta o coeficiente de variação do tempo de migração, área e altura da cisteína, obtidos pelos 3 diferentes modos de condicionamento. Para cada condicionamento foram realizadas 5 corridas consecutivas. Utilizando somente o eletrólito entre as corridas por um tempo de 5 minutos, verificou-se boa repetibilidade, porém, a maior foi obtida lavando-se o capilar entre as corridas seqüencialmente com NaOH (1 min), água deionizada (1 min) e eletrólito de corrida (4 min), talvez devido a adsorção de alguns analitos que não foram retirados somente com a lavagem utilizando o eletrólito. Estudos têm indicado ² que aplicando-se voltagem para o condicionamento do capilar há maior repetibilidade e estabilidade da linha base, mas neste trabalho, este método de condicionamento não apresentou resultados satisfatórios, optando-se então pelo segundo método de condicionamento do capilar entre as corridas, apresentado na Tabela 9.

TABELA 9 - VALORES DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA INJEÇÃO DE CISTEÍNA (n = 5)

	C.V. DO TEMPO DE MIGRAÇÃO (%)	C.V. DA ÁREA DO PICO (%)	C.V. DA ALTURA DO PICO (%)
Lavagem 1*	0,020	0,77	0,68
Lavagem 2**	0,0044	0,16	0,58
Lavagem 3***	0,048	1,2	0,60

NOTAS:

C.V.: Coeficiente de variação

* Somente com o eletrólito (5 min).

** NaOH 1 molL⁻¹ (1 min), água deionizada (1 min) e eletrólito (4 min).*** NaOH (1 min) 1 molL⁻¹, água deionizada (1 min), eletrólito (4 min) e aplicação de -10 kV (60 s).

5.3.1.2 – Otimização da separação

Um método de separação de aminoácidos foi proposto utilizando a eletroforese capilar baseado na forma aniônica dos aminoácidos. A escolha de um pH adequado para a separação foi feita a partir de curvas de mobilidade efetiva *versus* pH (Figura 65) dos 20 aminoácidos estudados, sendo que os dados de pK_a e mobilidade individual das espécies foram obtidos da compilação de Hirokawa *et al.* (Tabela 10).

TABELA 10 - VALORES DE MOBILIDADE IÔNICA E pK_a DOS AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	pK ₂	μ ₂	pK ₃	μ ₃
Ala	9,862	-32,7		
Arg	12,48	-26,9		
Asn	9,051	-32,1		
Asp	9,308	-30,1		
Cys	8,6	-31,7	10,28	-62,7
Gln	9,308	-30,1		
Glu	4,324	-26,8	9,966	-55,7
Gly	9,78	-37,4		
His	6,04	29,6	9,342	-28,8
Ile	9,765	-26,7		
Leu	9,728	-26,4		
Lys	9,127	26,4	10,79	-26,4
Met	9,376	-30,4		
Phe	9,262	-26,9		
Pro	10,64	-29		

Ser	9,329	-34,3		
Thr	9,229	-31,6		
Trp	9,635	-26,8		
Tyr	9,165	-20,7	10,207	-42
Val	9,71	-28,4		

NOTAS: μ : mobilidade iônica individual; pK: constante de dissociação

A construção da curva visou a escolha de um pH na qual a diferença de mobilidade efetiva dos aminoácidos é máxima, neste estudo o pH escolhido foi o 11, onde se antecipava a resolução do maior número de analitos. Como pode-se verificar pela Figura 65, a separação total entre os analitos não ocorre, ou seja, as mobilidades efetivas são muito próximas, indicando a difícil separação entre os aminoácidos, em solução não aditivada.

Figura 65 - Curvas de mobilidade efetiva *versus* pH dos aminoácidos.

A separação dos aminoácidos foi realizada sob detecção indireta, pois a maioria dos aminoácidos apresenta baixa absorbância na região do UV-Vis. Foi utilizado um agente cromóforo, o ácido 3,5-dinitrobenzóico, cuja absorbância foi monitorada durante a análise. Ao eletrólito, foi incorporado o CTAB (brometo de

cetiltrimetilamônio), um tensoativo catiônico que inverte o fluxo eletroosmótico, diminuindo o tempo de análise de compostos na forma aniônica, neste caso, a análise foi realizada com polaridade invertida.

Para esta análise foi preparada uma mistura contendo os 20 aminoácidos em água na concentração de 50 mgL^{-1} de cada aminoácido. Os resultados da otimização da separação dos 20 aminoácidos padrões em diferentes voltagens estão apresentados na Figura 66. O sinal do detector foi invertido para que no eletroferograma os picos apresentem sinal positivo. Em baixas voltagens verifica-se a instabilidade da linha de base e em altas voltagens aumenta-se o fluxo eletroosmótico, levando a um menor tempo de análise, além da maior eficiência da separação.

Figura 66 - Efeito da voltagem na separação dos padrões de aminoácidos. (A) -10 kV (B) -20 kV (C) -30 kV ; eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 5 mmolL^{-1} com $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30° C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s.

O efeito da concentração do ácido 3,5-dinitrobenzóico na separação dos aminoácidos está apresentado na Figura 67. Para esta análise, foi preparada uma

mistura contendo os 20 aminoácidos em água, na concentração de 30 mgL^{-1} de cada aminoácido.

A concentração de 10 mmolL^{-1} (Figura 67 A) mostrou-se a mais propícia para se trabalhar, pois a linha de base apresentou melhor estabilidade o que facilita a futura quantificação desses padrões nos hidrolisados, além disso quanto maior a concentração do eletrólito, menor o fluxo eletroosmótico, havendo maior tempo de separação dos aminoácidos, obtendo uma maior distância entre os picos. No entanto, maior sensibilidade foi verificada utilizando-se a concentração de 5 mmolL^{-1} .

Figura 67 - Efeito das concentrações do eletrólito na separação da mistura de aminoácidos. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzólico (A) 10 mmolL^{-1} (B) $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ (C) $5,0 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV.

5.3.1.3 – Identificação dos aminoácidos

Os aminoácidos foram identificados adicionando-se um aminoácido (na concentração de 30 mgL^{-1}) a cada corrida, perfazendo um total de 20 misturas e, portanto 20 aminoácidos na mistura final. A Figura 68 apresenta o eletroferograma com as identificações dos 20 padrões de aminoácidos.

Foram identificados 14 picos com 3 coeluições, 11 aminoácidos puderam ser efetivamente separados em um tempo total de análise de menos de 4 minutos. O pico da arginina não apareceu, ou houve a comigração com o pico da água, ou seja, este aminoácido apresenta uma mobilidade muito baixa no pH de trabalho.

Figura 68 - Identificação de aminoácidos. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV. * cloreto

5.3.1.4 - Identificação dos aminoácidos nos hidrolisados de proteína

A identificação dos aminoácidos nos hidrolisados de proteína foi baseada na observação dos tempos de migração de cada hidrolisado em comparação com os tempos de migração dos padrões de aminoácidos. A presença inequívoca dos aminoácidos poderia ser realizada pela adição de padrão.

As Figuras 69 - 74 apresentam os eletroferogramas dos vários hidrolisados de proteína, utilizando o método proposto e os resultados dos possíveis aminoácidos constituintes de cada hidrolisados de proteína na Tabela 11.

Figura 69 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do QUERATAN. (A) Padrões de aminoácidos (B) QUERATAN. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV.

Figura 70 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do SILKION. (A) Padrões de aminoácidos (B) SILKION. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV.

Figura 71 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do LACTOSOL. (A) Padrões de aminoácidos (B) LACTOSOL. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV.

Figura 72 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do PROSOJA. (A) Padrões de aminoácidos (B) PROSOJA. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV.

Figura 73 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do PROMARIN. (A) Padrões de aminoácidos (B) PROMARIN. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV.

Figura 74 – Eletroferogramas contendo os possíveis aminoácidos do PROTEINAN. (A) Padrões de aminoácidos (B) PROTEINAN. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL^{-1} contendo $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ CTAB; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 s; voltagem: - 30 kV.

TABELA 11 – POSSÍVEIS AMINOÁCIDOS DOS HIDROLISADOS DE PROTEÍNA

HIDROLISADOS	AMINOÁCIDOS
QUERATAN	Asp, Glu, Cys, Gly, Ser, (Thr, Ala, Asn), (Leu, Ile)
SILKION	Asp, Glu, Gly, Tyr, Ser, (Thr, Ala, Asn)
LACTOSOL	Glu, Gly, Cys, Tyr, Ser, Met
PROSOJA	Glu, Cys, Gly, (Thr, Ala, Asn)
PROMARIN	Asp, Gly, Met
PROTEINAN	Asp, Tyr, Ser

5.3.1.5 - Estudos de otimização com uso de ciclodextrinas

Um estudo de otimização de separação dos padrões de aminoácidos foi realizado com o ácido 3,5-dinitrobenzóico com a incorporação de ciclodextrinas.

Uma mistura contendo 20 aminoácidos dissolvidos em água foi preparada na concentração de 30 mgL^{-1} de cada aminoácido. CTAB não foi adicionado ao eletrólito, uma vez que com a adição deste composto, os eletroferogramas da mistura de aminoácidos apresentaram um só pico, provavelmente, houve a formação de um complexo entre os analitos e o CTAB, acarretando um mesmo tempo de migração da mistura de aminoácidos.

A identificação dos aminoácidos foi realizada ao final da otimização do método, o objetivo foi primeiramente obter um eletroferograma contendo o maior número possível de aminoácidos.

Um estudo do efeito da concentração do ácido 3,5-dinitrobenzóico foi realizado (Figura 75). A concentração do eletrólito foi variada entre $5\text{-}12 \text{ mmolL}^{-1}$, com o aumento do ácido 3,5-dinitrobenzóico para 12 mmolL^{-1} houve perda de sinal analítico, devido a alta concentração do cromóforo. A concentração de $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ foi a escolhida por apresentar 18 aminoácidos e maior magnitude do sinal analítico. A ordem de eluição é invertida com relação àquela obtida na Figura 68.

Figura 75 - Efeito da concentração do ácido 3,5-dinitrobenzóico na separação dos aminoácidos (A) 5 mmolL^{-1} (B) $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ (C) 10 mmolL^{-1} ; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV.

O efeito da incorporação da α -ciclodextrina foi investigado como uma forma de aumentar a separação dos aminoácidos. As ciclodextrinas são eletricamente neutras e migram com a velocidade do fluxo eletroosmótico. As ciclodextrinas poderiam formar complexos de inclusão com os radicais dos aminoácidos alterando a mobilidade eletroforética dos analitos, causando a separação. A concentração da α -ciclodextrina foi variada entre $5\text{-}20 \text{ mmolL}^{-1}$. Como apresentado na Figura 76, a concentração de 15 mmolL^{-1} foi escolhida, pois apresentou melhor resolução, observando-se 19 picos, apesar de alguns aminoácidos apresentarem-se não resolvido na linha de base.

Visando ainda otimizar a separação dos aminoácidos, ao eletrólito contendo o ácido 3,5-dinitrobenzóico e a α -ciclodextrina, foi incorporado metanol, com uma variação de 5 a 10%, como apresentado na Figura 77. A adição de solvente orgânico ao eletrólito de corrida modifica a viscosidade do tampão, variando o fluxo eletroosmótico e consequentemente os tempos de migração. O melhor resultado obtido foi com a adição de 10% de metanol ao eletrólito com o maior número de aminoácidos.

Figura 76 - Efeito da concentração da α -ciclodextrina na separação dos padrões de aminoácidos. (A) 5 mmolL^{-1} (B) 10 mmolL^{-1} (C) 15 mmolL^{-1} (D) 20 mmolL^{-1} . Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV.

Figura 77 - Efeito da concentração do metanol na separação dos aminoácidos. (A) 5% (B) 10%. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo 15 mmolL^{-1} de ciclodextrina; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV.

Beta-ciclodextrina foi incorporada ao ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ em 5 e 10 mmolL^{-1} , como apresentado na Figura 78. A diferença na seletividade entre as ciclodextrinas é devida ao tamanho variado da cavidade, sendo que a β -ciclodextrina apresenta maior diâmetro de cavidade que a α -ciclodextrina. Verificou-se que com a adição de 10 mmolL^{-1} de β -ciclodextrina, houve perda de resolução, observando-se 17 picos. Talvez por apresentar maior cavidade não houve interação entre os analitos e a β -ciclodextrina, fazendo com que não houvesse maior diferença de mobilidade e a possível melhora na resolução. Apesar disso foi adicionado ao eletrólito contendo a β -ciclodextrina (Figura 79), metanol que foi variado entre 5-10%, aumentando a resolução, apresentando 18 picos, mas com certa instabilidade da linha de base.

Figura 78 - Efeito da concentração da β -ciclodextrina na separação dos padrões de aminoácidos. (A) 5 mmolL^{-1} (B) 10 mmolL^{-1} . Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV.

Figura 79 - Efeito da concentração do metanol (A) 5% (B) 10%. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo 15 mmolL^{-1} β -ciclodextrina; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV.

O eletrólito escolhido foi o ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ com a incorporação de α -ciclodextrina 15 mmolL^{-1} e 10% metanol. A identificação dos aminoácidos foi realizada do mesmo modo anterior, preparando-se 20 misturas e adicionando um aminoácido, na concentração de 30 mgL^{-1} a cada mistura, obtendo-se na mistura final, 20 aminoácidos. Como apresentado na Figura 80, foram identificados 16 picos com 2 coeluições, sendo que 14 aminoácidos puderam ser efetivamente separados em um tempo total de análise de menos de 8 minutos. O pico da arginina não apareceu, ou houve a comigração com o pico da água, ou seja, este aminoácido apresenta uma mobilidade muito baixa no pH de trabalho.

Os aminoácidos Thr, Ala e Asn, que apresentaram má resolução utilizando o método anterior (Figura 68), foram totalmente resolvidos utilizando o método proposto com a α -ciclodextrina, bem como Gln e Val foram separados. Entretanto, Trp e Met, que coeluíram por este método, foram separados pelo método anterior sem a adição de ciclodextrina. Os dois métodos propostos mostraram-se promissores na identificação de aminoácidos nos hidrolisados de proteína, sendo que 16 aminoácidos poderiam ser identificados utilizando ambos métodos. Nos dois

métodos propostos Ile e Leu não puderam ser separados e o sinal da Arg não pôde ser observado.

Figura 80 - Identificação do padrão de aminoácidos. Eletrólito de corrida: ácido 3,5-dinitrobenzóico $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo 15 mmolL^{-1} α -ciclodextrina e 10% metanol; pH 11; temperatura: 30°C , λ 254 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo; voltagem: - 30 kV .

5.3.2 - Uso do hidrogenoftalato de potássio como eletrólito de corrida

Um segundo sistema de eletrólito foi investigado, o hidrogenoftalato de potássio, cuja mobilidade efetiva foi comparada à mobilidade do ácido 3,5-dinitrobenzóico. A Figura 81 apresenta curvas de mobilidade efetiva *versus* pH dos eletrólitos citados, sendo que os dados de pK_a e mobilidade individual das espécies foram obtidos dos dados compilados de Hirokawa, *et al.* ³.

A mobilidade efetiva do hidrogenoftalato de potássio é maior do que do ácido 3,5-dinitrobenzóico na faixa de pH de 6-11 e próxima das mobilidades dos aminoácidos de maior mobilidade efetiva como a cisteína. A mobilidade efetiva do ácido 3,5-dinitrobenzóico está mais próxima dos demais aminoácidos. Estudos indicam que para melhor separação e resolução, a mobilidade do eletrólito de corrida deve ser próxima da mobilidade dos analitos. A diferença de mobilidade

entre os analitos e o eletrólito causa o efeito de dispersão, diminuindo a simetria e a eficiência dos picos ⁴. A assimetria ocorre quando a presença de banda gera distorções do campo elétrico. Portanto, a simetria dos picos de Cys, Glu e Asp deve ser melhorada em hidrogenoftalato.

Figura 81 - Mobilidade efetiva do ácido 3,5-dinitrobenzóico e do hidrogenoftalato de potássio. Dados compilados de Hirokawa, *et al* ³.

A Figura 82 apresenta o eletroferograma de uma mistura contendo os 20 aminoácidos na concentração de 15 mgL^{-1} de cada aminoácido, empregando como eletrólito hidrogenoftalato de potássio $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo CTAB $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$, em pH 11. A identificação dos aminoácidos foi baseada na observação dos tempos de migração da mistura dos padrões de aminoácidos.

Como apresentado na Figura 82, foram identificados 14 picos com 4 coeluições, sendo que 10 aminoácidos puderam ser efetivamente separados em um tempo total de análise de menos de 7 minutos. Dois aminoácidos não puderam ser identificados por este método, a Arg e Phe.

A incorporação de ciclodextrina ao eletrólito não proporcionou a melhora na resolução, mesmo sem a incorporação de CTAB, houve a perda de sinal, talvez, devido a adsorção dos analitos na parede do capilar, apesar de ter sido realizada o

recondicionamento antes das corridas ou devido a formação de complexos aumentando demasiadamente os tempos de migração.

Figura 82 - Identificação da mistura dos padrões de aminoácidos. Eletrólito de corrida: ácido hidrogenoftalato de potássio $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo CTAB $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$; temperatura: 30°C ; λ 214 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo, voltagem: - 30 kV.

Quatro misturas contendo 5 aminoácidos foram preparadas e observou-se linha de base estável. As identificações dos aminoácidos foram realizadas, com a introdução de um aminoácido a cada corrida, apresentado na Figura 83.

Figura 83 - Identificação da mistura dos padrões de aminoácidos. Eletrólito de corrida: hidrogenoftalato de potássio $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$ contendo CTAB $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$; temperatura: 30°C ; λ 214 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo, voltagem: - 30 kV .

5.3.2.1 - Aplicação da metodologia

A repetibilidade do tempo de migração, área e altura do pico foram determinadas quanto ao coeficiente de variação (C.V.), para 10 consecutivas injeções das soluções padrões dos aminoácidos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DOS TEMPOS DE MIGRAÇÃO, DAS ÁREAS E DAS ALTURAS DOS PICOS DE CADA AMINOÁCIDO (n=10)

AMINOÁCIDO	C.V. DO TEMPO DE MIGRAÇÃO (%)	C.V. DA ÁREA DO PICO (%)	C.V. DA ALTURA DO PICO (%)
Asp	0,50	4,3	4,7
Tyr	0,93	9,3	5,9

Asn	2,4	11	5,7
Val	0,67	7,8	2,9
Trp	1,1	7,5	5,8
Gly	0,67	5,5	3,4
Ala	0,82	5,6	4,6
His	0,56	12	8,0
Ile	0,68	6,4	2,5
Cys	0,28	8,7	8,8
Thr	0,56	6,3	3,7
Gln	0,64	8,8	5,5
Leu	2,2	5,4	5,2
Lys	7,8	6,3	5,5
Glu	0,18	3,6	3,8
Ser	0,18	5,8	5,4
Met	0,20	9,7	3,7
Pro	1,9	5,7	4,1

NOTA: C.V.: Coeficiente de variação

O coeficiente de variação dos tempos de migração foi menor que 1% para a maioria dos aminoácidos e as medidas de altura dos picos apresentaram melhores resultados do que as áreas, portanto, a curva de calibração foi baseada na altura dos picos.

A quantificação dos aminoácidos foi realizada no hidrolisado de queratina na diluição de 1:100 (v/v) (Figura 84) e identificou-se com base no eletroferograma do padrão os possíveis aminoácidos do hidrolisado. Confirmando-se a presença dos aminoácidos através do método de adição de padrão. Seis aminoácidos puderam ser identificados inequivocamente.

Figura 84 - Eletroferograma do QUERATAN com seus respectivos aminoácidos identificados. Eletrólito de corrida: hidrogenoftalato de potássio $7,5 \text{ mmolL}^{-1}$; pH 11; temperatura: 30°C ; λ 214 nm; injeção hidrodinâmica 50 mBar por 1 segundo.

Análise quantitativa dos aminoácidos do QUERATAN foi conduzida usando 5 diferentes concentrações dos padrões, cada ponto correspondendo à análise em triplicata de cada solução padrão.

A relação linear foi obtida pela variação da altura em função da concentração dos aminoácidos, trabalhando nas seguintes faixas de concentração: Asp de $6 - 100 \text{ mgL}^{-1}$, Glu $5-100 \text{ mgL}^{-1}$, Cys $2-30 \text{ mgL}^{-1}$, Gly $25-125 \text{ mgL}^{-1}$, Ser $3-50 \text{ mgL}^{-1}$ e Pro $2,5-75 \text{ mgL}^{-1}$.

Como visto na Tabela 13, boa correlação linear foi obtida para todos os aminoácidos (maior que 0,99), exceto serina. Os valores de limite de detecção são apresentados na mesma tabela e foram calculados para a concentração que fornece relação sinal/ruído igual a três.

TABELA 13 – EQUAÇÕES DA CURVA DE CALIBRAÇÃO, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E LIMITE DE DETECÇÃO

AMINOÁCIDOS	EQUAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	LIMITE DE DETECÇÃO (mgL ⁻¹) *
Asp	3,784 + 0,8785x	0,9946	1,5
Glu	6,654 + 0,5184x	0,9907	3,0
Gly	1,411 + 0,5860x	0,9998	7,0
Cys	0,6416 + 0,3824x	0,9969	2,0
Ser	2,6384 + 0,3190x	0,9852	1,0
Pro	0,03281 + 0,4045x	0,9998	2,5

NOTA: * S/N (sinal/ ruído) = 3

As concentrações aproximadas dos aminoácidos do QUERATAN 1:100 estão apresentadas na Tabela 14.

TABELA 14 – RESULTADOS DA ANÁLISE DO QUERATAN CALCULADO PELA ALTURA DO PICO

AMINOÁCIDOS	CONCENTRAÇÃO (mgL ⁻¹)	C.V. (%)
Asp	35,15	0,50
Glu	66,56	0,30
Cys	13,17	0,21
Gly	60,61	1,55
Ser	33,43	0,21
Pro	38,24	0,31

NOTA: C.V.: Coeficiente de variação

5.3.3 – Comparação de metodologias

Na Tabela 15, uma lista comparativa dos 3 métodos de separação de aminoácidos é apresentada, com a respectiva ordem do tempo de migração dos aminoácidos.

TABELA 15 – ORDEM DE TEMPO DE MIGRAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

MÉTODO 1		MÉTODO 2		MÉTODO 3	
t _{mig} (min)	aminoácido	t _{mig} (min)	aminoácido	t _{mig} (min)	aminoácido
1,886	Asp	2,944	Lys	3,336	Asp
1,951	Glu	3,147	Pro	3,467	Glu
2,067	Cys	3,471	Ile , Leu , Trp	3,712	Cys
2,262	Gly	3,555	Phe	4,146	Tyr
2,303	Tyr	3,637	Met , His	4,173	Gly
2,378	Ser	3,703	Val	4,342	Ser
2,473	Thr, Ala, Asn	3,736	Gln	4,484	Asn
2,555	Met	3,914	Thr	4,539	Thr, Ala
2,591	Gln, His, Val	3,957	Asn	4,720	Gln, Met
2,622	Phe	3,997	Ala	4,812	Val, His
2,670	Leu, Ile	4,141	Ser	4,985	Leu, Ile
2,752	Trp	4,407	Tyr	5,284	Trp
3,238	Pro	4,454	Gly	6,164	Pro
3,544	Lys	5,254	Cys	6,943	Lys
		6,227	Glu		
		7,032	Asp		

NOTAS:

Método 1: Eletrólito: ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mmolL⁻¹ com CTAB 0,2 mmolL⁻¹

Método 2: Eletrólito: ácido 3,5-dinitrobenzóico 7,5 mmolL⁻¹ com α -ciclodextrina 15 mmolL⁻¹ e 10% metanol

Método 3: Eletrólito: hidrogenoftalato de potássio 7,5 mmolL⁻¹ com CTAB 0,2 mmolL⁻¹

t_{mig}: tempo de migração

O sinal da arginina não apareceu em nenhum eletroferograma obtido nos três diferentes métodos. Considerando 19 aminoácidos analisados efetivamente 16 aminoácidos foram separados efetivamente em dois métodos distintos, ou seja, 16 aminoácidos podem ser identificados e quantificados inequivocamente.

5.4 - CONCLUSÕES

O condicionamento do capilar entre as corridas com NaOH 1 molL⁻¹, seguida de água e eletrólito mostrou-se eficaz para a manutenção do tempo de migração.

O método de detecção indireta para análise de aminoácidos tem a vantagem de não necessitar de derivatização e relativa rapidez, principalmente com a adição de tensoativo com a reversão do fluxo eletroosmótico.

O método com a adição de α -ciclodextrina apresentou maior resolução, entretanto, Met, His e Trp não puderam ser resolvidos pelo respectivo método. Leu e Ile não puderam ser resolvidos por ambos métodos (com e sem a incorporação de ciclodextrina) devido a similaridade de estrutura e de carga. O sinal da Arg não foi observado no método por eletroforese capilar em fluxo invertido provavelmente devido a comigração com o pico da água e, no método empregando o modo normal, provavelmente, a mobilidade eletroforética da arginina é maior que a mobilidade do fluxo eletroosmótico, deixando a coluna assim que o campo elétrico é estabelecido, não atingindo o detector.

Tanto a sensibilidade quanto a resolução da mistura de 20 padrões de aminoácidos utilizando o eletrólito ácido 3,5-dinitrobenzóico apresentaram melhores resultados que o hidrogenoftalato de potássio. O ácido 3,5-dinitrobenzóico apresenta mobilidade efetiva próxima da maioria dos aminoácidos, apresentando melhor simetria de picos.

A altura dos picos foi escolhida como parâmetro para a quantificação dos aminoácidos do QUERATAN por apresentar menor coeficiente de variação (C.V.).

A curva de calibração do QUERATAN apresentou boa linearidade na faixa de concentração trabalhada, com o coeficiente de correlação linear acima de 0,99, exceto serina.

5.5 -Referências Bibliográficas

- 1 - Altria, K.D.; Campi, F.; Another 10 Ways to Spoil a CE Separation, *LC-GC*, **1999**, 17, 3, 236.
- 2 - Heiger, D.; High Performance Capillary Electrophoresis - an Introduction, 2nd edition, France, , **1992**.
- 3 - Hirokawa, T.; Kiso, Y.; Gas, B.; Zusková, I.; Vacík, J.; Simulated Quantitative and Qualitative Isotachophoretic Indices of 73 Amino Acids and Peptides in the pH Range 6,4-10, *J. Chromatogr.*, **1993**, 628, 283.
- 4 - Tavares, M.F.M.; Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar, *Química Nova*, **1997**, 20 (5).

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES FINAIS

Neste trabalho a eletroforese capilar em seus vários formatos foi apresentada como técnica de análise de hidrolisados de proteínas apresentando resultados satisfatórios no que se refere à caracterização do perfil, determinação de massa molar e quantificação de aminoácidos.

A seguir foram compiladas todas as informações de cada hidrolisado de proteína considerado neste estudo.

Diluição do Silkion 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; 20 kV; tetraborato 20 mmolL⁻¹; pH 9; 200nm.

Condições eletroforéticas: tampão fosfato 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s 25 kV. Condições de extração: C-18; diluição de Silkion: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL, eluído em 0,1% TFA em água, 200 nm.

% Proteína:
14,59%

Silkion

Possíveis aminoácidos:
Asp, Glu, Tyr, Ser,
(Thr, Ala, Asn), Gly

Diluição do Silkion 1:0,5 (v/v), tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV. * ácido trimelítico.
Massas molares: (1) 835 (2) 1640 (3) 2808 (4) 19393 daltons.

Diluição do Queratan: 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; 20 kV; tetraborato 20 mmolL⁻¹; pH 9; 200 nm.

Condições eletroforéticas: tampão fosfato 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; 25 kV. Condições de extração: C-18; diluição do Queratan: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; eluído em 0,1% TFA em água; 200 nm.

% Proteína:
43,77

Queratan

Aminoácidos (mgmL⁻¹):

Asp: 35,15 (* 0,50)

Glu: 66,56 (* 0,30)

Cys: 13,17 (* 0,21)

Gly: 60,61 (* 1,55)

Ser: 33,43 (* 0,21)

Pro: 38,24 (* 0,31)

* CV (%)

Diluição do Queratan 1:1 (v/v); tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV. * ácido trimelítico
Massas molares: (1) 976 (2) 1425 (3) 1967 (4) 13296 (5) 42535 (6) 72592 daltons.

Diluição do Lactosol 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; 20 kV; tetraborato 20 mmolL⁻¹ pH 9; 200 nm.

Condições eletroforéticas: tampão fosfato 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; 25 kV. Condições de extração: C-18; diluição do Lactosol: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; eluído em 0,1% TFA em água; 200 nm.

% Proteína:
4,710

Lactosol

Possíveis aminoácidos:
Glu, Cys, Gly, Tyr, Ser,
Met,

Diluição do Lactosol 1:1 (v/v), tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV. * ácido trimelítico
Massas molares: (1) 9922 (2) 11059 (3) 54974 daltons.

Diluição do Proteinan 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; 20 kV; tetraborato 20 mmolL⁻¹; pH 9; 200 nm.

Condições eletroforéticas: tampão fosfato 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; 25 kV. Condições de extração: C-18; diluição do Proteinan: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; eluído em 0,1% TFA em água; 200 nm.

% Proteína:
34,79

Proteinan

Possíveis aminoácidos:
Asp, Tyr, Ser

Diluição do Proteinan 1:1 (v/v); tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV. * ácido trimelítico. Massas molares: (1) 41256 (2) 55914 (3) 75011 daltons

Diluição do Prosoja 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; 20 kV; tetraborato 20 mmolL⁻¹; pH 9; 200nm.

Condições eletroforéticas: tampão fosfato 20 mmolL⁻¹; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; 25 kV. Condições de extração: C-18; diluição do Prosoja: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; eluído em 0,1% TFA em água; 200 nm.

% Proteína:
6,62

Prosoja

Possíveis aminoácidos:
Glu, Cys, Gly, Ser, (Thr,
Ala, Asn)

Diluição do Prosoja 1:0,5 (v/v); tampão 0,4 molL⁻¹ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV. * ácido trimelítico

Massas molares: (1) 54233 (2) 70490 daltons.

Diluição do Promarin 1/50 (v/v) em água; tempo de injeção: 1 s; 20 kV; tetraborato 20 mmol L^{-1} ; pH 9; 200 nm.

Condições eletroforéticas: tampão fosfato 20 mmol L^{-1} ; pH 2,5; tempo de injeção: 1 s; 25 kV. Condições de extração: C-18, diluição do Promarin: 1/50 (v/v); pH 2; volume de amostra: 5 mL; eluído em 0,1% TFA em água; 200 nm.

Promarin

Possíveis aminoácidos
Asp, Gly, Met

Promarin puro, tampão $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV. * ácido trimelítico
Não apresentou sinal na faixa correspondente a 2,5 – 67 kd.

Diluição do Protrigo 1:1 (v/v); tampão $0,4 \text{ molL}^{-1}$ Tris-borato, 0,1% SDS, 10% glicerol, 12% dextran (MM 2.000.000) e 5% metanol; pH 8,3; 220 nm; voltagem de injeção -10 kV ; tempo de injeção 5 s; voltagem aplicada -10 kV . * ácido trimelítico

Massas molares: (1) 110 (2) 148 (3) 245 (4) 37015 (5) 54726 daltons.

Protrigo

% Proteína:
8,62

TRABALHOS FUTUROS

A quantificação dos aminoácidos livres nos hidrolisados será obtida por HPLC – troca iônica, técnica tradicional de análise simultânea de aminoácidos, para efeito comparativo e validação cruzada com o método empregado neste trabalho.