**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**HIDRÓLISE DE CASTANHA-DO-PARÁ, AVEIA E
TRIGO COM RESINA DE TROCA CATIONICA E
DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, ÁCIDOS
GRAXOS E SACARÍDEOS UTILIZANDO
ELETROFORESE CAPILAR**

Edgar Perin Moraes
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
ORIENTADORA

**SÃO PAULO
2004**

***“Hidrólise de castanha-do-pará, aveia
e trigo com resina de troca catiônica e
determinação de aminoácidos, ácidos
graxos e sacarídeos utilizando
eletroforese capilar”***

EDGAR PERIN MORAES

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 Química – Área: Química Analítica.

Aprovado por:

Profa. Dra. MARINA FRANCO MAGGI TAVARES
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. CLAUDIMIR LUCIO DO LAGO
IQ – USP

Profa. Dra. SUSANNE RATH
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
26 DE ABRIL DE 2004.

AGRADECIMENTOS

A DEUS POR TUDO

Dedico esta dissertação de mestrado ao meu pai Orlando Moraes e minha mãe Anita Perin Moraes. Vocês me deram tudo, inclusive a oportunidade de redigir estas páginas.

“In memorian”

Ao nosso grande amigo Wilson Roberto Toselli que, enquanto permaneceu entre nós, me ajudou para que este trabalho chegasse a fim.

À nossa Profa. Dra. Marina Tavares pela grande amizade, respeito, competência, confiança e, principalmente, por ser minha psicóloga nas horas vagas.

À Farma Service, especialmente ao Nestor Pinto Neto por todo apoio, incentivos prestados e a nossa nova amizade.

Ao Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira e meu amigo, por toda a ajuda na compreensão do mundo científico e do mundo real.

À Profa. Dra. Úrsula M. Lanfer Marques pelas análises de Kjedaahl.

Ao Prof Ernst Kenndler pela colaboração e sugestões.

Ao Dr. Scott Bean e ao Prof. Dr. G. L. Lookhart, que mesmo estando em Kansas me ajudaram muito.

Aos colegas do laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar Alessandra, Ana Carolina, Beth Alves, Beth Lima, Claudinei, Clóvis, Dona Fátima, Juliana e Neide pelos ensinamentos diários e por sofrerem em silêncio nos meus piores dias, meu muito obrigado e desculpem.

Aos meus grandes amigos Fernando e Gustavo, já se passaram onze anos, e quando olho para vocês ganho força para enfrentar a tudo.

Aos meus irmãos Edson e Shirley que sempre cuidaram muito bem do irmão caçula e o colocaram no caminho do bem.

Aos meus cunhados Elody e Jarbas por cuidarem muito bem de meus irmãos e por terem me dado as duas maiores alegrias dos últimos tempos.

Às duas maiores alegrias dos últimos tempos, meus sobrinhos Amanda e Augusto, quando estou com vocês, eu volto a ser criança novamente.

À todos os jogadores do "Fechô Balada Futebol e Alegria" pela amizade, pelo título do Torquim 2002 e pelo vice em 2003. Esse ano têm mais.

Aos meus amigos do clube de xadrez RXK pelo título do campeonato de xadrez de 2003.

Enfim, a todos os amigos do IQ, que me ajudaram a evoluir como homem.

Ao CNPQ pela bolsa e auxílio.

*“O VALOR DAS COISAS NÃO ESTÁ NO TEMPO
EM QUE ELAS DURAM, MAS
NA INTENSIDADE COM QUE ACONTECEM.
POR ISSO EXISTEM
MOMENTOS INESQUECÍVEIS,
COISAS INEXPLICÁVEIS E
PESSOAS IMCOMPARÁVEIS.”*

FERNANDO PESSOA

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1	Castanha-do-Pará	2
1.2	Aveia	5
1.3	Trigo	6
1.4	Eletroforese Capilar	9
1.5	Sistema de Eletroforese Capilar	9
1.5.1	Injeção da amostra	10
1.5.2	Reservatório (vials)	11
1.5.3	Capilares	11
1.5.4	Detectores	12
1.5.5	Fonte de tensão	13
1.6	Princípios da separação	13
1.6.1	Fluxo eletrosmótico invertido	17
1.7	Modos de Eletroforese Capilar	18
1.7.1	Eletroforese Capilar em Solução Livre	18
1.7.2	Cromatografia Eletrocinética Micelar Capilar	19
1.7.3	Eletroforese Capilar em Gel	21
1.7.4	Isotacoforese Capilar	21
1.7.5	Focalização Isoelétrica Capilar	22
1.8	Resina de troca iônica	23
1.9	Ácidos graxos	24
1.10	Sacarídeos	27
1.11	Método de Kjeldahl	28
1.12	Método Fenol-sulfúrico	28
1.13	Referências bibliográficas	29

CAPÍTULO 2 – HIDRÓLISE UTILIZANDO RESINA DE TROCA IÔNICA

2.1	Hidrólise de proteínas	33
2.2	A eletroforese capilar na análise de aminoácidos	35
2.3	Objetivos	36
2.4	Seção experimental	37
2.5	Análise dos aminoácidos	38
2.5.1	Aminoácidos na forma catiônica	39
2.5.2	Aminoácidos na forma aniônica	44

2.6	Estudo do tipo de resina de troca iônica	51
2.7	Conclusões	55
2.8	Referências bibliográficas	56

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA HIDRÓLISE

3.1	Estudo da evolução da hidrólise	59
3.2	Objetivos	61
3.3	Seção experimental	62
3.4	Evolução da hidrólise da castanha-do-Pará	64
3.5	Evolução da hidrólise da aveia	69
3.6	Evolução da hidrólise do trigo	73
3.7	Conclusões	77
3.8	Referências bibliográficas	78

CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, ÁCIDOS GRAXOS E SACARÍDEOS

4.1	Esquema para caracterização sequencial	80
4.2	Objetivos	81
4.3	Seção experimental	82
4.4	Caracterização sequencial da castanha-do-Pará	85
4.5	Caracterização sequencial da aveia	92
4.6	Caracterização sequencial do trigo	96
4.7	Conclusões	100
4.8	Referências bibliográficas	101

CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

5.1	Considerações finais	103
5.2	Trabalhos futuros	106

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

μ_{EOF}	mobilidade eletrosmótica
μ_{EP}	mobilidade eletroforética
μ_{EFF}	mobilidade efetiva
ϵ	constante dielétrica
v_{EOF}	velocidade eletrosmótica
v_{EP}	velocidade eletroforética
ζ	potencial zeta
E	campo elétrico
η	viscosidade
C.V.	coeficiente de variância
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CEC	<i>Capillary Electrochromatography</i>
CGE	<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>
CIEF	<i>Capillary Isoelectric Focusing</i>
CITP	<i>Capillary Isotachophoresis</i>
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
EOF	<i>Electroosmotic Flow</i>
FA	<i>fatty acids</i>
FSCE	<i>Free Solution Capillary Electrophoresis</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MECK	<i>Micelar Electrokinetic Chromatography</i>
MEECK	<i>Microemulsion Electrokinetic Chromatography</i>
UV-vis	ultravioleta e visível
V	diferença de potencial

RESUMO

A presente dissertação de mestrado propõe o estudo da hidrólise catalítica de proteínas utilizando resina de troca catiônica, para separação e análise sequencial de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos presentes em aveia, trigo e castanha-do-Pará via eletroforese capilar.

Os processos de hidrólise comumente utilizados para proteínas destroem alguns aminoácidos, como a rota em meio ácido (asparagina, glutamina, triptofano, tirosina, serina e treonina) e em meio básico (serina, treonina, arginina e cisteína). O processo de hidrólise de proteínas utilizando-se uma resina de troca catiônica gera um substrato livre de interferentes, pois a fração peptídica é retida na resina e pode ser isolada da matriz. Em adição, a análise dos ácidos graxos e sacarídeos é facilitada, porque adsorção de proteínas na superfície do capilar é um sério problema em eletroforese capilar.

Após a hidrólise e análise dos aminoácidos, sequencialmente foi feita uma extração líquido/líquido no filtrado, sendo a fase orgânica saponificada e posterior análise dos ácidos graxos e, a fase aquosa hidrolisada em meio ácido e posterior análise dos dissacarídeos.

Duas resinas foram estudadas, sendo que a Dowex 50WX8-200 da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) apresentou resultados mais satisfatórios, atingindo níveis de recuperação entre 90,6 e 96,8%.

O monitoramento da hidrólise ocorreu registrando-se eletroferogramas de aminoácidos em função do tempo sob três formas: detecção direta de fenilalanina na forma aniônica, detecção direta de histidina na forma catiônica e detecção indireta dos aminoácidos na forma aniônica.

Os resultados obtidos mostram que as três formas condizem, podendo-se monitorar a hidrólise por qualquer uma. Estes resultados também concordam com o teor de proteína total obtido pelo método de Kjeldahl. Modelos matemáticos que descrevem o comportamento da hidrólise foram descritos, utilizando-se do software Curve Expert 1.3.

Para os ácidos graxos, obteve-se êxito somente para a castanha-do-Pará, 52,1% de teor de ácidos graxos.

Para os monossacarídeos os valores obtidos foram: 12,6% na castanha-do-Pará, 26,5% na aveia e 39,0% no trigo.

ABSTRACT

In this work, a procedure for hydrolysis of proteins assisted by the protonated form of a strong cation exchanger resin and sequential analysis of amino acids, fatty acids and saccharides by capillary electrophoresis were studied. Brazilian nut, wheat and oat were characterized by the proposed procedure.

The hydrolysis process normally used for proteins destroys some amino acids, e.g. in the acid hydrolysis (asparagine, glutamine, tryptophan, tyrosine, serine and threonine) and basic hydrolysis (serine, threonine, arginine and cysteine).

The catalytic hydrolysis by a protonated cation exchanger produces a clean substract, the amino acids are retained in the resin and can be isolated from the matrix. In addition, the work of analysis of fatty acids and saccharides are facilitated, because adsorption of proteins onto the silica surface is a serious problem in capillary electrophoresis.

After the hydrolysis and amino acids analysis, a liquid/liquid extraction was attempted in the filtrate. The organic phase was saponified for fatty acids analysis and, the aqueous phase was further hydrolysed for monosaccharide analysis.

Two resins were invetigated, the Amberlite IRA 120 from Vetec Química (Rio de Janeiro, BR) and the Dowex 50WX8-200 from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The Dowex resin showed the best results, reaching recoveries from 90,6 to 96,8%.

To monitor the hydrolysis amino acids electropherograms were registered, under three forms: direct detection of phenylalanine; direct detection of hystidine and indirect detection of other amino acids. The results showed that the three forms were similar.

Mathematic models to describe the hydrolysis profile were fitted by the Curve Expert 1.3 software. The results for the amino acids analysis were in agreement with Kjedadhl's method.

The fatty acids analysis was tested with sucess only for brazilian nut, that presented a concentration 54.1% (total fatty acids). The monosaccharides analysis

was tested with sucess for all matrices, showing 12.6% for the brazilian nut, 26.5% for the oat and 39.0% for the wheat.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 CASTANHA-DO-PARÁ

A Amazônia, enorme e fantástica floresta tropical, vem, ao longo da história, povoando a imaginação humana com a existência de seres e plantas desconhecidos. Trata-se de um imenso, vivo e mutante ecossistema, de águas doces e salgadas, verdadeiramente "plantado" sobre territórios de múltiplas nacionalidades e etnias, compreendendo a totalidade dos Estados brasileiros do Acre, do Amazonas, do Pará, de Roraima e de Rondônia, boa parte dos Estados do Maranhão, de Tocantins e do Mato Grosso, além de abarcar, ainda, partes da Bolívia, do Equador, da Colômbia, da Venezuela, do Suriname, da Guiana e da Guiana Francesa.

A floresta amazônica, com toda a sua imensidão e diversidade biológica, não é, e nem poderia ser, homogênea. No entanto, considerando-se a totalidade da região, pode-se observar distintos agrupamentos florestais que se repetem, intercalam e sobrepõem no interior da mata.

No chão da floresta encontra-se uma camada de matéria vegetal em decomposição, revelando-se um local abafado, úmido e também bastante sombrio. Em meio às raízes expostas das árvores, move-se uma infinidade de insetos e animais em busca de alimento.

Um pouco acima, a 10 ou 20 metros de altura, no sub-bosque ainda pouco iluminado, encontra-se uma camada de árvores jovens e de variadas palmeiras, cujas copas e folhagens constituem o território dos papagaios que fogem das aves predadoras.

A 30, 40 ou 50 metros do solo, capturando mais de 90 % da luz solar, encontra-se o dossel superior da floresta, superpovoado por uma infinidade de animais, entre insetos, aves, anfíbios, répteis e pequenos mamíferos, sempre em busca das flores perfumadas e das frutas suculentas. Vista de cima, a cobertura da floresta parece ser um homogêneo tapete verde que esconde uma vida exuberante.

É nesse ambiente que se encontram as seculares, nobres e majestosas castanheiras. Árvores nativas desse Brasil amazônico, mais precisamente das matas de terras firmes, as castanheiras ocorrem de forma espontânea juntamente com várias espécies de sapucaias, maçarandubas, caimitos, abius, sapotas e sapotis - em agrupamentos mais ou menos extensos: são os tradicionais castanhais.

Figura 1.1. Castanha-do-Pará[1].

Também conhecida como castanheira-do-Brasil ou castanheira-do-Pará, a castanheira é, sem sombra de dúvidas, uma das mais importantes árvores amazônicas conhecidas e sua exploração tem um papel fundamental na organização sócio-econômica de grandes áreas extrativistas da floresta[2,3]. Os frutos da castanheira, também chamados pelo nativo de "ouriços", possuem uma casca lenhosa e bastante dura, chegando a pesar quase dois quilos (figura 1.1). Quando os "ouriços" amadurecem, eles despencam do alto da castanheira, devendo ser apanhados no chão. Por seu peso e pela altura das castanheiras, esses frutos, muitas vezes, alcançam o chão com tal força e velocidade que, dependendo do tipo de terreno, afundam no solo.

Com dimensões e forma equivalentes às de um crânio humano normal, o fruto da castanheira constitui-se em uma resistente cápsula que não se abre espontaneamente, abrigando, em seu interior, um número variado de sementes, entre 10 a 25. As sementes, por sua vez, cujo tamanho varia entre 4 a 7 centímetros de comprimento, têm também uma casca bastante dura e rugosa e encerram a amêndoa tão procurada.

Essa amêndoa é muito rica em gorduras e proteínas: verdadeira "carne vegetal", apresentando aproximadamente 17% (dezessete por cento) referente à fração peptídica, a proteína contida em apenas duas de suas amêndoas equivale à de um ovo de galinha. Já a fração lipídica compreende 69% (sessenta e nove por cento)[4]. Entre seus lipídeos destacam-se os ácidos insaturados, substâncias capazes de retardar o processo oxidativo[5]. Além de poder ser consumida fresca ou assada, sendo tira-gosto muito apreciado em todo o mundo, a castanha-do-brasil participa como ingrediente da composição de inúmeras receitas de doces e de salgados.

A partir da maceração semi-industrial da amêndoa da castanha-do-Pará (*Bertholletia Excelsa*), obtém-se um fino e valioso óleo, comestível e de altíssima qualidade, também muito utilizado como matéria-prima na fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos, sabonetes finos, etc.

O resultado da exploração dos castanhais nativos, além de servir para o sustento de uma grande parcela das populações da região amazônica, tem alcançado índices bastante relevantes no montante das exportações do país.

No entanto, nos últimos tempos, milhares de castanheiras têm sido derrubadas pelas moto-serras dos exploradores da madeira, pois, além dos frutos, a castanheira produz valiosa madeira. Apesar de ilegal, este comércio vem causando uma significativa redução dos castanhais nativos, especialmente na região conhecida como Polígono dos Castanhais no Estado do Pará.

Em contraponto, outras localidades, no Acre e em Rondônia, por exemplo, vivem experiências muito bem sucedidas de exploração racional dos frutos da floresta. Ali, com o estabelecimento das chamadas reservas extrativistas, os

trabalhadores, organizados em cooperativas, fazem a coleta da castanha e cuidam de seu pré-processamento, armazenando grandes quantidades.

Outra grande relevância do fruto na pesquisa científica é que castanha-do-Pará têm sido investigada como fonte de selênio, associando-se o consumo do fruto com a proteção contra tumores desenvolvidos em animais de laboratório[6].

1.2 AVEIA

A aveia (*Avena sativa* L.), planta originária da Europa Oriental, foi desenvolvida a partir de aveias selvagens. Atualmente, é cultivada em todo mundo, devido à sua ampla utilização na culinária e como forragem.

A aveia apresenta muitas propriedades medicinais como ansiolítica, anti-reumática, antidepressiva, antidiabética, aperiente, calmante, cicatrizante, digestiva, diurética, emoliente, expectorante, hepatoprotetora, hipotensora, laxante, refrescante, tônica e vitaminizante. É também empregada por indústrias cosméticas na fabricação de cremes e máscaras emolientes, tônicos para a pele e shampoos.

Figura 1.2. Aveia[1].

A aveia é rica em proteínas, glicídios, lipídios, carboidratos, fibras, vitaminas e sais. Aproximadamente 16% (dezesesseis por cento) de sua composição são

proteínas, 66% (sessenta e seis por cento) são carboidratos e 6% (seis por cento) são lipídios[4].

O consumo de farinha e farelo de aveia afeta de maneira benéfica a saúde humana, devido à elevada concentração de fibras, situada em torno de 18%[7,8]. A fibra alimentar pode ser classificada em solúvel e insolúvel em água. A fibra alimentar solúvel da aveia é composta de pectinas, beta-glicanas, mucilagens, algumas hemiceluloses e amido resistente. Os principais componentes das fibras insolúveis são a celulose e as hemiceluloses[9]

Na pesquisa, o grande interesse despertado pela aveia concentra-se no estudo das ligações (1-3),(1-4)- β -D-glicose que formam a parede celular, devido suas aplicações no setor industrial e formulações alimentícias[10].

Os produtos contendo fibra de aveia reduzem o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão e obesidade. Além disso, diminuem as concentrações séricas de colesterol total, lipídios totais e triglicerídeos de forma significativa e aumentam a fração de colesterol-HDL, conhecido como colesterol benéfico.

1.3 TRIGO

A origem do trigo (*Triticum vulgare* L.) é incerta, embora ele seja conhecido pela humanidade desde a era pré-histórica. Passou a ser cultivado pelas primeiras civilizações do planeta, as quais deixaram os velhos hábitos nômades e passaram a se dedicar à agricultura. Os cientistas acreditam que o trigo tenha sido plantado pela primeira vez na antiga Mesopotâmia (atual Iraque). Em 1948, o pesquisador norte-americano Robert Braindwood descobriu sementes de trigo no Iraque que datam de aproximadamente 6700 a.C. Os chineses também cultivam o trigo há milênios.

O trigo apresenta muitas propriedades como antioxidante, calmante, emoliente, neurotônica, nutritiva, reconstituente e vitaminizante. Em sua composição encontramos aproximadamente 60-70% de carboidratos, 12% de proteína (glúten), 1,9% de lipídios, ácido ascórbico, vitamina E, entre outros[5]. Na indústria cosmetológica usa-se o gérmen de trigo. Ele é indicado para peles

normais e secas, sendo utilizado em máscaras e cremes nutritivos e hidratantes. Empregado também na composição de óleos para a prevenção de estrias em gestantes e o tratamento de unhas e cutículas.

Os principais produtores mundiais de trigo, atualmente, são os Estados Unidos, a Comunidade Européia, Rússia e China. No Brasil, esta cultura foi introduzida em 1534, por Martim Afonso, na antiga Capitania de São Vicente.

Figura 1.3. Trigo[1].

Existem muitas variedades de trigo sendo que, no Brasil, cada clima e cada solo torna-se mais propício para o plantio de uma determinada variedade, que se adapte melhor às condições locais. Dentre as variedades existentes, estão as chamadas precoces que apresentam um ciclo de 3 meses e meio e as tardias, com ciclo de mais de cinco meses.

Por haver uma diversidade tão grande nas variedades de trigo e por elas se adaptarem muito especificamente à determinadas regiões, não é possível se recomendar procedimentos de plantio, tratos culturais, adubação e irrigação, controle de doenças e pragas ou qualquer outro aspecto que se relacione diretamente com o cultivo do trigo, pois tais características e procedimentos deverão ser determinados por técnicos que avaliarão, na região onde se planta este cereal, quais as melhores variedades e procedimentos, desde o preparo da terra até a colheita.

O trigo é utilizado, no Brasil, muitas vezes, como cultura de rotação, principalmente com a soja, pois a soja é uma cultura de verão e o trigo de inverno.

Na maioria das regiões onde esta prática é adotada, a soja acaba sendo a cultura principal e o trigo a secundária, por vários fatores, sendo, principalmente, a importância econômica da soja maior do que a do trigo, para os agricultores e para a economia do País.

Por ser uma cultura predominantemente de inverno, o trigo é mais cultivado na região Sul do Brasil, principalmente nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, apesar de ser plantado em outros Estados, como São Paulo, Minas Gerais e até no Mato Grosso do Sul. A produção nacional só não é maior por não haver um interesse especial nesse cereal que, historicamente e culturalmente falando, não é de grande importância se comparado à outras culturas de escala, como a soja, o algodão, o café, a cana-de-açúcar ou o milho (principalmente pelo consumo como ração animal).

1.4 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é o movimento de partículas ou moléculas carregadas eletricamente e um meio líquido condutor, usualmente aquoso, sob a influência de um campo elétrico[11,12].

A eletroforese foi descrita pelo químico sueco Arne Tiselius em 1930[13] em sua tese de doutorado. Em 1937[14] ele descreveu a eletroforese de zona para separar proteínas. A técnica estava limitada na época, devido à falta de tecnologia. Tiselius ganhou o prêmio Nobel em 1948 devido ao seu trabalho pioneiro.

Em 1979 Mikkers et al. demonstraram o uso de um capilar de Teflon com 200 μm para eletroforese capilar de zona[15].

Jorgenson e Lukacs[16] usaram capilares de 75 μm feitos de vidro pyrex. Eles reportaram a alta eficiência dos capilares na dissipação do calor, podendo-se trabalhar com altas tensões (30 kV).

1.5 SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR

A figura 1.4 ilustra uma representação esquemática do sistema de eletroforese capilar. Eletroforese é realizada preenchendo o capilar e reservatórios (vial) com um eletrólito, usualmente uma solução tampão aquosa. Em uma das extremidades é introduzida uma zona de amostra, quando é aplicada uma diferença de potencial, gerando um campo elétrico entre as extremidades, causando o movimento das partículas carregadas.

Figura 1.4. Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.

1.5.1 INJEÇÃO DA AMOSTRA

A injeção da amostra refere-se a como a amostra será introduzida no capilar. Normalmente, as amostras são introduzidas no capilar em volumes da ordem de poucos nanolitros.

Amostras são injetadas no capilar por diferentes técnicas, as mais comuns sendo a injeção hidrodinâmica e a injeção eletrocinética. 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 volume de injeção depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocinética, porque é baseada estritamente na transferência de volume (a repetibilidade de área é de aproximadamente 1 %, desvio padrão relativo). Entretanto, pode ocorrer um alargamento significativo na zona, como resultado do perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de eletroforese capilar em solução livre e micelar, que serão definidas a seguir, particularmente quando a concentração da amostra está dentro dos limites de detectabilidade do detector.

1.5.2 RESERVATÓRIOS (VIALS)

Os reservatórios são preenchidos com o eletrólito de corrida. A composição de um eletrólito é uma das variáveis mais importante em eletroforese capilar, e pequenas mudanças no pH ou concentração do tampão podem causar significativas mudanças na velocidade de migração do soluto e, conseqüentemente, mudanças no tempo de migração.

Quando realiza-se repetidas análises com o mesmo tampão, a composição do tampão em cada reservatório muda, devido à formação eletrolítica de íons hidrogênio no ânodo e de íons hidróxido no cátodo e, portanto, a troca de eletrólitos deve ser frequente.

1.5.3 CAPILARES

Em eletroforese capilar, a separação é conduzida em tubos de dimensões capilares, com 50 a 75 μm de diâmetro interno usualmente, diâmetro externo de 375 μm , 30 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico.

O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos), alta resolução e tempos de análise apreciavelmente curtos.

O capilar de sílica fundida é transparente para o ultravioleta (UV) e luz visível (vis), facilitando o uso de detectores UV-vis e fluorescência. Estes capilares são revestidos com poliimida, que é retirada na região do detector como descrito na figura 1.5.

Figura 1.5. Seção do capilar de sílica fundida onde está representada a janela de detecção.

1.5.4 DETECTORES

Muitos detectores aplicados em outras técnicas de separação foram adaptados para a eletroforese capilar, como o UV-vis, fluorescência, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas, condutométrico, amperométrico, radiométrico e índice de refração.

Os limites de detecção são normalmente da ordem de mg.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$, não apresentando valores tão apreciavelmente baixos quanto as outras técnicas de separação. O fato é explicado para detectores UV-vis e fluorescência devido ao pequeno caminho ótico da luz, que é o próprio diâmetro interno do capilar.

1.5.5 FONTE DE TENSÃO

O modo de tensão constante é o mais comumente usado. Isto se faz necessário para se ter uma tensão estável, caso contrário ter-se-ia mudanças no tempo de migração.

Normalmente as separações são realizadas com fonte de tensão de ± 30 kV, correntes menores de $300 \mu\text{A}$ e potência menor que 6 W .

1.6 PRINCÍPIOS DA SEPARAÇÃO

Para compreender como ocorre o movimento das partículas dentro do capilar, se faz necessário a introdução de dois conceitos básicos da eletroforese capilar: a mobilidade eletroforética (μ_{EP}) e a mobilidade eletrosmótica (μ_{EOF}).

Sobre a influência de um campo elétrico, um soluto carregado eletricamente irá migrar através do eletrólito com uma velocidade eletroforética, v_{EP} , em cm/s , dada pela equação 1.1:

$$v_{EP} = \mu_{EP}E \quad (1.1)$$

onde μ_{EP} é a mobilidade eletroforética e E o campo elétrico aplicado. A separação só é atingida pois os solutos migram através do capilar com velocidades diferentes.

A mobilidade eletroforética é descrita pela equação 1.2:

$$\mu_{EP} = q / 4\pi\eta r \quad (1.2)$$

onde q é a carga do soluto ionizado, η é a viscosidade do eletrólito de corrida e r é o raio de hidratação soluto.

Solutos ionizáveis, dependendo do pH do meio, apresentam diferentes cargas. Neste caso temos a mobilidade efetiva (μ_{EFF}), que é a soma das mobilidades de todas as espécies, dada pela equação 1.3:

$$\mu_{EFF} = \sum \alpha_i \mu_{EPi} \quad (1.3)$$

onde α_i é a fração do soluto naquele estado e μ_{EPi} é a mobilidade eletroforética dele.

A utilização de capilares de sílica fundida na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico. O fluxo eletrosmótico é consequência de uma interação entre a solução e as paredes do capilar. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de vários grupos silanóis, os quais, em média, apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados e, com a ionização, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta.

Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo a um fluxo de solução como um todo, na direção do cátodo, conhecido como fluxo eletrosmótico normal[11,12], conforme ilustrado na figura 1.6.

Figura 1.6. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.

É de grande importância que o fluxo eletrosmótico seja constante durante a separação. Se o fluxo variar, os tempos de migração irão variar, podendo causar identificações incorretas de picos ou erros na quantificação.

O fluxo eletrosmótico é causado por grupos silanoatos (Si-O^-) carregados negativamente na parede do capilar (figura 1.7), atraindo cátions carregados positivamente, formando a dupla camada elétrica, tendo-se no seio da solução um resíduo de cargas positivas, que sob a influência do campo elétrico, carregará camadas de hidratação, direcionando a solução como um todo para o cátodo.

Figura 1.7. Representação esquemática da parede interna do capilar.

A velocidade do fluxo eletrosmótico é dado pela equação 1.4:

$$v_{\text{EOF}} = -\varepsilon\varepsilon_0\zeta E/4\pi\eta \quad (1.4)$$

onde ε é a constante dielétrica do tampão, ε_0 é a permissividade do vácuo, ζ é o potencial zeta, E é o campo elétrico aplicado em V/cm e η é a viscosidade do tampão.

A mobilidade eletrosmótica, μ_{EOF} , do tampão é dada pela equação 1.5:

$$\mu_{\text{EOF}} = -\varepsilon\varepsilon_0\zeta /4\pi\eta \quad (1.5)$$

Note que a mobilidade eletrosmótica é dependente somente das características do tampão e da superfície do capilar, sendo independente do campo elétrico aplicado.

1.6.1 FLUXO ELETROSMÓTICO INVERTIDO

Em eletroforese capilar podemos não somente mudar a magnitude do fluxo eletrosmótico, como também sua direção. Quando analisamos somente ânions, é desejável que eles eluam rapidamente, para que se possa diminuir o tempo de separação.

Com a inversão do fluxo, seguida da inversão da polaridade, temos o fluxo eletrosmótico e a velocidade eletroforética na mesma direção, fazendo com que aumente-se a frequência de análise.

Para promover a inversão do fluxo, o método mais amplamente estudado e utilizado é o da adição de tensoativos catiônicos ao eletrólito condutor (figura 1.8), principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa.

Figura 1.8. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido.

Desta forma, uma camada de semi-micelas é adsorvida na superfície do capilar promovendo em solução, a organização de uma camada de ânions, que sob a ação do campo elétrico, migra na direção do ânodo, definindo o chamado fluxo eletrosmótico invertido[17].

1.7 MODOS DE ELETROFORESE CAPILAR

Vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica são possíveis: zona, isotacoforese e focalização isoeletrica.

A eletroforese capilar de zona (CZE) compreende a eletroforese capilar em solução livre, a cromatografia eletrocinética micelar capilar e a eletroforese capilar em gel.

A seguir estão descritos os modos mais utilizados em eletroforese capilar.

1.7.1 ELETROFORESE CAPILAR EM SOLUÇÃO LIVRE

Eletroforese capilar em solução livre (FSCE)[11,12] é o modo mais comumente usado em eletroforese capilar. Este modo é utilizado na separação de ânions e cátions, em uma análise considerada razoavelmente simples.

O capilar e os reservatórios (vials) são preenchidos com um tampão de composição constante. A amostra é injetada e, quando aplicada a tensão, os solutos migram através do capilar como zonas. A velocidade de cada analito dependerá da mobilidade eletroforética deste.

Em eletroforese capilar em solução livre pode-se eliminar o fluxo eletrosmótico, assim como também invertê-lo, como dito anteriormente.

Figura 1.9. Representação esquemática de uma separação de solutos via eletroforese capilar em solução livre. "+", "N" e "-" representam solutos catiônicos, neutros e aniônicos, respectivamente.

1.7.2 CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR CAPILAR

Dentre os métodos de separação que foram desenvolvidos para misturas contendo solutos neutros, a cromatografia eletrocinética micelar capilar (MEKC), introduzida por Terabe e colaboradores em 1984[18], tem recebido crescente atenção dos pesquisadores. Em MEKC, agentes tensoativos iônicos (SDS-dodecilssulfato de sódio), em condições apropriadas à formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando desta forma um sistema cromatográfico de duas fases.

O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletrosmoticamente sob a ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo estacionária, a qual é transportada por uma combinação de eletroforese e eletrosmose (este fenômeno está explicado um pouco mais adiante). A partição diferenciada de solutos neutros entre as duas fases é responsável pela seletividade da separação. A Figura 1.10 mostra o princípio de separação envolvida em MEKC.

Figura 1.10. Representação esquemática da cromatografia eletrocinética micelar capilar.

Outras variações da eletroforese capilar que exploram mecanismos de partição têm sido implementadas nos últimos anos, como a eletrocromatografia capilar (CEC) e a cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC).

A eletrocromatografia capilar (CEC)[19] é um híbrido da eletroforese capilar com a cromatografia líquida, utilizando-se de colunas recheadas, podendo assim promover separações de compostos neutros.

A cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC) utiliza-se de microemulsões para que haja partição entre o analito e a microemulsão. Normalmente utilizada para compostos altamente hidrofóbicos[20].

1.7.3 ELETROFORESE CAPILAR EM GEL

A eletroforese capilar em gel (CGE)[21], tem sido utilizada na separação de compostos de caráter iônico e alta massa molar. Na CGE os solutos migram através da estrutura polimérica sendo impedidos em seu percurso de acordo com o seu tamanho. O capilar é preenchido com uma matriz polimérica, conforme esquema na figura 1.11, sendo que há duas classes de matrizes utilizadas em CGE: géis químicos e géis físicos. Os géis químicos são covalentemente ligados ao capilar, consistindo de polímeros enovelados.

Os 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[22].

Figura 1.11. Representação da eletroforese capilar em gel ou matriz porosa.

1.7.4 ISOTACOFORESE CAPILAR

A principal diferença entre a isotacoforese e as outras técnicas em CE é que ela é realizada em um sistema de tampão descontínuo[11,12]. A amostra é condensada entre dois tampões diferentes, um deles possui íons com a mais alta mobilidade no sistema e é denominado líder, e um outro com íons com a mais baixa mobilidade no sistema, que é denominado terminador.

Na prática, o reservatório de tampão do lado mais próximo ao detector e o capilar são preenchidos com o eletrólito líder, o outro reservatório é preenchido com o outro eletrólito terminador e a amostra é injetada entre eles.

Quando um campo elétrico é aplicado, os componentes da amostra começam a se separar em zonas de acordo com suas mobilidades. Quando um estado de equilíbrio é atingido, os componentes da amostra são separados em zonas que estão em contato umas com as outras, pois não há eletrólito carreador, e todas se movem na mesma velocidade.

Nesta técnica o isotacoforograma obtido contém uma série de patamares (degraus), onde cada degrau representa uma zona de um analito. Ao contrário dos outros modos de EC, onde a quantidade de amostra presente pode ser determinada pela área do pico, como também em cromatografia, a quantificação em isotacoforese está baseada principalmente na medida do comprimento da zona, que é proporcional à quantidade de substância presente.

1.7.5 FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA CAPILAR

A focalização isoeletrica capilar (CIEF)[11,12] é o tipo de eletroforese capilar no qual os solutos, normalmente proteínas, são focalizados e separados com base nos diferentes pontos isoeletricos, pI 's.

Um capilar é preenchido com uma solução de anfólitos e proteínas, e quando um campo elétrico é aplicado, cria-se um gradiente de pH no capilar. As proteínas então focalizam em determinadas regiões, onde o pH é igual ao seu pI . A solução é forçada a passar pelo detector, gerando o eletroferograma.

1.8 RESINA DE TROCA IÔNICA

Resinas de troca iônica são polímeros iônicos que apresentam dois tipos de íons, um deles é ligado a rede polimérica e o outro de carga oposta (contra-íon) livre. A propriedade da troca iônica é consequência da exclusão de Donnan – quando a resina é imersa em um meio seu contra-íon pode ser trocado por outro íon de mesma carga que esteja no meio e que apresente maior afinidade pela resina. Resinas de troca iônica têm sido classificadas de acordo com a carga de seu contra-íon (troca catiônica ou troca aniônica) e na força iônica de ligação do íon (troca iônica forte e troca iônica fraca). Assim, podemos classificar os quatro tipos primários de resina de troca iônica:

- a- Resina de troca catiônica forte, contendo grupo ácido sulfônico ou o sal correspondente;
- b- Resina de troca catiônica fraca, contendo grupo ácido carboxílico ou o sal correspondente;
- c- Resina de troca aniônica forte, contendo grupo quaternário de amônio;
- d- Resina de troca aniônica fraca, contendo cloreto de amônio ou hidróxido.

Tipos adicionais de resinas de troca iônica incluem misturas de resinas de troca catiônica e aniônica, chamadas de anfólicas.

A estrutura interna da resina é importante na seleção da troca iônica. Resinas com macroporos, apresentam área superficial ativa alta, facilitando o processo de troca iônica. Elas também dão acesso ao sítio de troca aos íons maiores. Resinas com microporos oferecem outras vantagens, como menor fragilidade, requerem menor cuidado no manuseio.

Underwood e Deatherage demonstraram em 1952[23] que caseína e proteínas solúveis do café poderiam ser hidrolizadas utilizando resina de troca catiônica Dowex-50. Muitos trabalhos foram descritos na literatura desde então, utilizando-se diferentes resinas.

Apesar de não se conhecer ao certo o mecanismo como ocorre esta hidrólise, ela têm sido aplicada com êxito em matrizes complexas[24,25] e que apresentam uma pequena quantidade de amostra.

1.9 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são definidos como todo ácido carboxílico alifático, saturado ou insaturado, com um número de carbonos entre 4 a 24. Os ácidos graxos livres (FFAs, free fatty acids) de ocorrência natural nas gorduras, em geral, possuem um número par de átomos de carbono e apresentam uma cadeia alquílica reta, isto é, sem ramificações[26]. Os ácidos graxos incomuns apresentam número ímpar de átomos de carbono, ou ramificações, ou ainda, sustentam grupos funcionais distintos (-OH, -CO, etc). Os ácidos graxos são classificados de acordo com seu índice de saturação: ácidos graxos saturados (SAFAs), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs)[26]. Na tabela 1.1 estão compilados os principais ácidos graxos encontrados em óleos e gorduras.

SÍMBOLO	FÓRMULA	NOME SISTEMÁTICO	NOME TRIVIAL	PONTO DE FUSÃO °C
Ácidos graxos saturados				
C4:0	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	Butanóico	Butírico	-5,3
C6:0	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	Hexanóico	Caprónico	-3,2
C8:0	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	Octanóico	Caprílico	16,5
C10:0	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	Decanóico	Cáprico	31,6
C12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	Dodecanóico	Láurico	44,8
C14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	Tetradecanóico	Mirístico	54,4
C16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	Hexadecanóico	Palmitico	62,9
C18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	Octadecanóico	Estearico	70,1
C20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	Eicosanóico	Araquídico	76,1
C22:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	docosanóico	Behênico	80,0
C24:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	Tetracosanóico	Lignocérico	84,2
Ácidos graxos insaturados				
C16:1(9c)	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9c-Hexadecenóico	Palmitoléico	0,5
C18:1(9c)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9c-Octadecenóico	Oléico	16,3
C18:1(11t)	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH	11t-Octadecenóico	Vacênico	39,5
C18:2(9c, 12c)	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9c,12c-Octadecadienóico	Linoléico	5,0
C18:3(9c, 12c, 15c)	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9c, 12c, 15c-Octadecatrienóico	Linolênico	11,0
C20:4(5c, 8c, 11c, 14c)	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₃ COOH	5c, 8c, 11c, 14c-Eicosatetraenóico	Araquidônico	49,5
Ácidos graxos incomuns				
C17:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH	Heptadecanóico	Margárico	61,8
C18:1(9t)	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9t-octadecenóico	Elaidico	44,0
C18:3(9c, 11t, 13t)	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH=CHCH=CHCH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9t, 11t, 13t-octadecatrienóico	Eleosteárico	49,0
C5:0	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COOH	3- metil butanóico	Isovalérico	-35,5
C18:1(9c, 12OH)	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH(OH)CH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	9c, 12hid, octadecenóico	Ricinoléico	

Tabela 1.1. Principais ácidos graxos

Nesta tabela pode-se observar a notação de acordo com a padronização da IUPAC (*International Union of Pure Applied Chemistry*) utilizada para o ácido 9c-12c-octadecadienóico, conhecido como ácido linolêico (C18:2((9c,12c))), por exemplo, significa que tal ácido apresenta 18 carbonos e duas insaturações do isômero cis, nas posições 9 e 12 numerando-se a partir da carbonila.

Figura 1.12 Estrutura típica de um ácido graxo.

Os ácidos graxos são analisados normalmente por cromatografia a gás[27]. Esta permite a separação dos ácidos graxos de cadeia curta sem a necessidade de passos de derivatização. No entanto, para os ácidos graxos de cadeia longa, em função de apresentarem baixa volatilidade, de maneira geral, requerem etapa de derivatização, onde os grupos carboxílicos são convertidos em grupos mais voláteis como trimetilsilil-ésteres ou metil-ésteres[28,29,30].

Em princípio, os FA podem ser separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa, apesar da baixa absorvidade molar dos FA tornar a quantificação direta por detecção UV difícil em amostras reais. Detectores alternativos têm sido propostos na literatura, como índice de refração[32,33], detector de condutividade[33], fluorescência[34] e quimioluminescência[35]. Nas análises com detecção por absorvância, há necessidade de derivatização visando a formação de adutos ou derivados que apresentem alta absorvidade, como fenacil ésteres[36], naftacil ésteres[37], e 2-nitrofenilhidrazidas[38].

Recentemente, a eletroforese capilar têm sido largamente investigada na análise de ácidos graxos. Muitos cromóforos têm sido propostos, incluindo o p-anisato[39], dietilbarbiturato[40], e benzenosulfonato[41,42].

1.10 SACARÍDEOS

Sacarídeos como glicose, frutose, sacarose estão largamente distribuídos em vários alimentos e bebidas, embora estes compostos sejam frequentemente usados como aditivos, por causa do seu efeito sobre a conservação e sabor do alimento[43]. Por essa razão, o monitoramento de sacarídeos em amostras de alimentos é essencial e importante na área de nutrição, biologia e ciência dos alimentos.

Como os sacarídeos são compostos não voláteis, eles têm sido analisados por métodos de HPLC. Os métodos analíticos mais comumente empregados para sacarídeos utilizam-se da técnica HPLC acoplada com detector de índice de refração, porém embora o método seja simples, apresenta baixa seletividade e detectabilidade. Uma técnica alternativa, com detecção amperométrica fornece menores limites de detecção[44]. Ambos métodos cromatográficos envolvem longos tempos de análise, principalmente devido ao acondicionamento das colunas após a análise das amostras com matrizes complexas.

A eletroforese capilar é uma poderosa técnica de separação que está sendo aplicada na análise destes compostos. Técnicas de derivatização têm sido descritas na literatura[45,46,47]

A determinação de sacarídeos por eletroforese capilar de zona e cromatografia eletrocínética micelar com detecção direta após derivatização com 8-aminopireno-1,3,6-trissulfonato é possível de ser implementada, porém a complexidade da derivatização limita a utilização do método.

Alternativamente, métodos de análise de sacarídeos não derivatizados por detecção indireta foram desenvolvidos e aplicados a amostras de bebidas e algumas matrizes de alimentos[48]. Estes métodos incluem o uso de eletrólitos altamente alcalinos, com a finalidade de ionizar os sacarídeos e permitir a análise.

1.11 Método de Kjeldahl

O método de Kjeldahl é um dos métodos mais utilizados para determinação do teor de proteína total. O método baseia-se na digestão da amostra orgânica em meio ácido à quente, convertendo assim o nitrogênio em forma de amina em amônio.

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 mais o tempo de digestão, catalisadores são adicionados à solução reacional[49].

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

1.12 Método Fenol-sulfúrico

O método fenol-sulfúrico é um dos métodos mais utilizados para determinação de carboidratos totais. Este método foi descrito em 1956[50] por Michel Dubois et al., sendo um método de determinação espectrofotométrica.

Açúcares, oligossacarídeos, polissacarídeos, e seus derivados, incluindo metil-ésteres são convertidos a furfural, utilizando-se de uma solução de ácido sulfúrico concentrado, juntamente com 5% de fenol.

O furfural apresenta maior absorbância em 486 nm, comprimento de onda no qual as leituras são realizadas.

1.13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. www.freefoto.com acessado em 17/06/2004.
2. Mori, S., The Brazil nut industry-past, present and future, Island Press, Washington, **1992**.
3. Clay, J.W., Brazil nuts. The use of a keytone species for conservation and development, The John Hopkins University Press, Baltimore and London, **1997**.
4. USDA Nutrient database for standard reference, release 13, **1999**.
5. Melo, M.S.O.N., Antioxidantes naturais da castanha do Brasil, da castanha do caju e do fruto do dendezeiro, tese de mestrado da USP-FCF, **1989**.
6. Chang, J.C.; Gutenmann, W.H.; Reid, C.M.; Lisk, D.L., *Chemosphere*, **1995**, 30(4), 801.
7. Peterson, M.P., *Oat Science and Technology*, **1992**, 266.
8. Gutkoski, I.C.; Trombetta, C., *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1999**, 19, 387.
9. Walker, A.R.P., *Cereal Foods World*, **1993**, 38, 128.
10. Ren, Y.; Ellis, P.R.; Ross-Murphy, S.B.; Wang, Q.; Wood, P.J., *Carbohydrate Polymers*, **2003**, 53, 401.
11. Tavares, M.F.M; *Química Nova*, **1996**, 19(2), 173.
12. Baker, D.R., *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York, **1995**.
13. Tiselius, A., *Nova Acta regiae Societatis Scientiarum Uppsaliensis*, tese de doutorado, **1930**.
14. Tiselius, A., *Trans. Faraday Soc.*, **1937**, 33, 524.
15. Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, Th.P.E.M., *J. Chromatogr.*, **1979**, 169, 11.
16. Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.A., *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 1298.
17. Colombara, R.; Tavares, M.F.M.; Massaro, S., *Química Nova*, **1997**, 20, 512.
18. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T., *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 111.

19. Weinberger, R., *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, New York, **1993**.
20. Watari, H.; Ogawa, K.; Abe, M.; Monta, T.; Takahasho, I., *Anal. Sci.*, **1991**, 7, 245.
21. Cohen, A.s.; Karger, B.L., *J. Chromatogr.*, **1987**, 397.
22. Kuhn, R., Kuhn, S.H., *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, **1993**.
23. Underwood, G.E.; Deatherage, F.E., *Science*, **1952**, 115, 95.
24. Kenndler, E.; Schmidt-Beiw, K.; Mairinger, F.; Pohm, M., *Anal. Chem.*, **1992**, 342, 135.
25. Schneider, U.; Kenndler, E., *Anal. Chem.*, **2001**, 371, 82.
26. Curi, R.; Miyasaka, C.K.; Procopio, J., *Entendendo a Gordura: Os ácidos graxos*, Ed. Manole, São Paulo, **2002**.
27. Moretto, E.; Fett, R., *Óleos e Gorduras Vegetais: processamento e análises*, Ed. UFSC, Florianópolis, **1989**.
28. Herrich, K. (Ed.), *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry*, AOAC, Arlington, **1990**.
29. Martin-Hernandez, M.C.; Alonso, L.; Juarez, M.; Fontecha, J., *Chromatographia*, **1988**, 25, 87.
30. Shin, H.S.; Kim, S.; Myung, S.W., *Anal. Chem.*, **1995**, 67(11), 1853.
31. Liu K.S., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1994**, 71, 1179.
32. Tiselius, A.; Claesson *Arkiv Kem. Miner. Geol. B*, **1942**, 15, 18.
33. King, J. W.; Adams, E. C.; Bidlingmeyer, A. J. *Liq. Chromatogr.*, **1982**, 5, 275.
34. Tsuyama, Y.; Uchida, T.; Goto, T. *J. Chromatogr.*, **1992**, 596, 181.
35. Yoo, J. S.; McGuffin J. *Chromatogr.*, **1992**, 627, 87.
36. Kawasaki, H.; Maeda, N.; Yuki, H. *J. Chromatogr.*, **1990**, 516, 450.
37. Durst, H. D.; Milano, M.; Kikta, E. J.; Connelly, S. A.; Grushka, E. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1797.
38. Jordi, H .C. *J. Liq. Chromatogr.*, **1978**, 1, 215.
39. Miwa, H.; Yamamoto, M.; Nishida, T.; Nunoi, K.; Kikuchi M. *J. Chromatogr.*, **1987**, 416, 237.

40. Roldan-Assad, J.R.; Gareil, P., *J. Chromatogr. A*, **1995**, 708, 339.
41. Buehberger, W.; Winna, K., *Mikrochim. Acta*, **1996**, 122, 45.
42. Oliveira, M.A.L.; Micke, G.A.; Bruns, R.E.; Tavares, M.F.M., *J. Chromatogr. A*, **2001**, 924, 533.
43. Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O.; Química do processamento de alimentos, Varela, São Paulo, **1992**.
44. Soga, T.; Ionue, Y.; Yamaguchi, K.; *J. Chromatogr. A*, **1992**, 625, 151.
45. Guttman, A., *J. Chromatogr. A*, **1997**, 763, 271.
46. Honda, S.; Iwase, S.; Makino, A.; Fujiwara, S., *Anal. Biochem.*, **1989**, 176, 72.
47. Honda, S.; Suzuki, S.; Nitta, S.; Iwase, A.; kakechi, K., *A Companion to Methods in Enzymology*, **1992**, 4, 233.
48. Soga, T.; Serwe, M.; *Food Chem.*, **2000**, 69, 339.
49. Kane, P.F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, 70, 5, 907.
50. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F., *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 3, 350.

CAPÍTULO 2

**HIDRÓLISE UTILIZANDO RESINA DE TROCA
IÔNICA**

2.1 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

A hidrólise de proteínas e posterior análise da composição dos aminoácidos é um procedimento clássico de caracterização de proteínas, comumente utilizado pois a composição dos aminoácidos é uma característica de cada proteína ou peptídeo.

Muitos fatores podem afetar o processo de hidrólise de uma proteína, como temperatura, tempo, agente de hidrólise, e aditivos. A combinação destes fatores é crítica para a determinação do grau de hidrólise, interferentes e possível destruição de alguns analitos. O processo de hidrólise de uma proteína é realizado industrialmente pela ação de ácidos, bases ou processos enzimáticos[1].

Um grande número de artigos clássicos e de revisão descrevem o processo de hidrólise de proteínas em meio ácido[2-5]. O tratamento com ácido clorídrico é o mais comum entre todos eles. A hidrólise ácida convencional mais utilizada usa ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹ por 20-24 h a 110°C no vácuo[6,7]. Nestas condições convencionais, asparagina e glutamina são hidrolisadas a ácido aspártico e ácido glutâmico, respectivamente, o triptofano é completamente decomposto, tirosina é parcialmente decomposta 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, os hidrolisados ácidos são obtidos pelo tratamento da proteína com 4-6 mol.L⁻¹ HCl, a 100-130 °C, por 20-24 h seguido de neutralização.

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 decompostas e outros aminoácidos são racemizados. A hidrólise é usualmente feita com NaOH, KOH ou Ba(OH)₂[8,9].

A hidrólise enzimática apresenta vantagens em relação aos métodos de digestão química, não destrói aminoácidos como a asparagina e a glutamina, não gera resíduos da digestão e também não induz a racemização. 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 hidrólise de proteínas utilizando resina de troca iônica foi demonstrada por Underwood e Deatherage[10] já em 1952. Nestes primeiros trabalhos, seguia-se a hidrólise em meio de ácido clorídrico 0.05 mol.L⁻¹ [11], o que fazia com que a destruição dos aminoácidos fosse similar à obtida pela hidrólise ácida convencional.

Neste método a proteína ou um polipeptídeo é clivado por H⁺, presente em uma resina de troca catiônica[12]. A hidrólise é baseada na catálise ácida. Os produtos da hidrólise da proteína são retidos na resina e separados da matriz por filtração. Esta separação permite a determinação de sacarídeos, ácidos graxos e aminoácidos em várias matrizes diferentes, diminuindo relativamente os interferentes se comparada à hidrólise ácida convencional, que normalmente gera huminas como produto da reação que podem interferir no resultado e em muitos casos devem ser removidas[13-15], além da perda dos outros analitos para análises subsequentes.

Outra vantagem de se utilizar este processo para hidrólise é para evitar um sério problema em eletroforese capilar, a adsorção de proteínas na superfície de sílica fundida do capilar. Proteínas apresentam regiões não polares, polares e carregadas em sua superfície, e estas adsorvem fortemente na sílica, provavelmente pela combinação de ligações de hidrogênio e interações iônicas[16], fazendo com que o fluxo eletroosmótico seja alterado. Então, fazendo-se a hidrólise desta maneira pode-se retirar a fração protéica da matriz, o que facilita o trabalho nas determinações subsequentes.

2.2 A ELETROFORESE CAPILAR NA ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A eletroforese capilar é largamente aplicada na determinação de aminoácidos. A maioria dos aminoácidos não absorvem na região do UV, utilizando-se amplamente de derivatizantes [17-22]. A análise de aminoácidos não derivatizados sob detecção indireta não é usual, sendo aplicado no trabalho de Chen et. al na determinação de aminoácidos presentes em plantas[23].

Separações quirais de aminoácidos estão sendo intensamente estudadas, utilizando-se de seletores quirais como ciclodextrinas e seus derivados, interação com íons de metais de transição e ligantes quirais, antibióticos, tensoativos quirais e novas fases quirais[24,25].

A determinação de aminoácidos via eletroforese capilar tem sido aplicada em bioquímica, ciência dos alimentos, microbiologia, clínica e estudo de diagnósticos.

Analizadores automáticos de aminoácidos existem desde 1958[26] e existem muitos modelos comerciais atualmente.

A eletroforese capilar vem a contribuir com sua versatilidade e velocidade de análise, podendo-se conduzir uma separação em poucos minutos.

2.3 OBJETIVOS

Neste capítulo foram abordadas estratégias para análise de aminoácidos não derivatizados. Foram realizadas análises na forma catiônica em eletrólito com pH baixo e na forma aniônica em eletrólito com pH alto, utilizando nos dois casos detecção UV indireta com auxílio de cromóforos.

A outra parte constou de testes nas resinas disponíveis, para observar qual delas apresentava a melhor performance.

2.4 SEÇÃO EXPERIMENTAL

Instrumentação

Equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE da Beckman Instruments, equipado com fonte de alta tensão ($0 - \pm 30\text{kV}$), detector do tipo UV, controlador de temperatura e com programação de aquisição de dados System Gold software. Capilar de sílica fundida foi utilizado na análise, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 40 cm de comprimento (48,5 cm total), sendo montado em cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido à temperatura constante com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão de 0,5 psi.

Reagentes

Todos reagentes utilizados foram reagentes de grau analítico. Duas resinas foram utilizadas, a Amberlite IRA 120 da Vetec Química (Rio de Janeiro, BR) e a Dowex 50WX8-200 da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Aminoácidos utilizados foram obtidos junto a Aldrich (Milwaukee, EUA).

Ácido clorídrico, hidróxido de amônio e etanol absoluto foram obtidos junto a Merck (Darmstadt, Alemanha).

Ácido 3,5-dinitrobenzóico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e benzimidazol são da Aldrich (Milwaukee, EUA), imidazol da Merck (Darmstadt, Alemanha), fenol da Labsynth (Diadema, BR).

2.5 ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são íons dipolares. De acordo com o pH do meio, o aminoácido apresentará uma forma predominante, conforme podemos observar na figura 2.1. Nesta figura observa-se a forma predominante do aminoácido de acordo com o pH do meio, considerando-se que não há ionização no grupo R.

Figura 2.1. Estados de ionização de um aminoácido em função do pH.

Isto significa que em eletrólitos de corrida com o pH baixo, pode-se dizer que o aminoácido apresenta mobilidade efetiva positiva, ou seja, apresenta comportamento de cátion. Por outro lado, em eletrólitos de corrida com pH alto, o

Figura 2.2. Gráfico de mobilidade efetiva dos aminoácidos versus o pH do meio.

aminoácido apresenta mobilidade negativa, ou seja, apresenta comportamento de ânion. A figura 2.2 traz o gráfico da mobilidade efetiva dos aminoácidos em diferentes valores de pH revelando estas duas distintas regiões. Este gráfico foi construído utilizando-se de um software baseado em valores de pKa e que foi criado em nosso grupo[27], .

2.5.1 AMINOÁCIDOS NA FORMA CATIÔNICA

Dois eletrólitos foram escolhidos para análise dos aminoácidos na forma catiônica e que tipicamente são utilizados em eletroforese capilar na análise de cátions com detecção UV indireta, o imidazol e o benzimidazol.

A escolha de um eletrólito é crítica para se obter sucesso em separações de analitos por eletroforese capilar. Para a preparação do eletrólito deve-se atentar para a composição, pH e concentração. Para se obter picos simétricos deve-se fazer com que o eletrólito apresente mobilidade próxima dos analitos [28]. A figura 2.3 apresenta o gráfico de mobilidade versus pH dos dois possíveis eletrólitos, juntamente com dois aminoácidos, o ácido glutâmico e lisina. Os dois foram escolhidos porque entre as suas curvas encontram-se as curvas da maioria dos aminoácidos, ou seja, um eletrólito que apresente a mobilidade efetiva entre os dois poderia ser considerado um eletrólito ideal, sem provocar assimetria no formato do pico.

Figura 2.3. Gráfico de mobilidade efetiva versus pH.

Com o benzimidazol não obteve-se sucesso, não se tornou possível obter uma linha de base estável, o que deformava os picos durante a corrida (Figura 2.4), então descartou-se este eletrólito. Com o imidazol obteve-se uma linha de base estável, mas os picos apresentaram deformação, como pode-se observar na figura 2.5.

Figura 2.4. Eletroferograma da mistura padrão de 13 aminoácidos utilizando benzimidazol como cromóforo. Eletrólito de corrida: 7,5 mmol.L⁻¹ benzimidazol, pH 2,5. Condições de análise: inj 2s 3,4 kPa, tensão +22 kV, temperatura 25°C, detecção 214 nm.

Figura 2.5. Eletroferograma da mistura padrão de 13 aminoácidos (100 mg.L^{-1}) utilizando imidazol como cromóforo. Eletrólito de corrida: 5 mmol.L^{-1} imidazol, pH 2,5. Condições de análise: inj. 2s 3,4 kPa, tensão +25kV, temperatura 25°C , detecção 214 nm.

Pode-se observar na figura 2.3 que no pH 2,5 o imidazol apresenta uma mobilidade maior que os aminoácidos, o que faz com que a condutividade entre a zona de amostra e a zona do eletrólito sejam diferentes[17]. Isto gera assimetria de pico devido à eletrodispersão. A figura 2.6 ilustra este comportamento nos três modos possíveis. No caso dos aminoácidos na forma catiônica e do imidazol, a condutividade do eletrólito é maior que a da zona de amostra, o que faz com que observe-se assimetria do tipo cauda.

Figura 2.6. Eletrodispersão devido à diferença entre as condutividades do eletrólito e da amostra.

2.2.1 AMINOÁCIDOS NA FORMA ANIÔNICA

Dois eletrólitos foram escolhidos para análise dos aminoácidos na forma aniônica. Um deles, o ácido 3,5-dinitrobenzóico é tipicamente utilizado em eletroforese capilar na determinação de ânions com detecção UV indireta, o outro é o fenol[29], que está sendo proposto neste trabalho.

A figura 2.7 apresenta o gráfico de mobilidade versus pH dos dois possíveis eletrólitos, juntamente com dois aminoácidos, o ácido glutâmico e a lisina, pelo mesmo motivo dito anteriormente.

Figura 2.7. Mobilidade efetiva versus pH.

Optou-se por trabalhar com o fenol por ser cromóforo, apresentar mobilidade próxima a dos analitos, o que geraria picos simétricos, e apresentar uma região onde ele atua como tampão.

A figura 2.8 mostra um eletroferograma típico obtido da mistura padrão de 14 aminoácidos em uma corrida onde o eletrólito utilizado foi o fenol. Este método foi otimizado alterando quatro variáveis que apresentam grande influência nas separações eletroforéticas, o tempo de injeção, a tensão aplicada, a temperatura e a concentração do eletrólito.

Figura 2.8. Eletroferograma da mistura de 14 aminoácidos padrões (100 mg.L^{-1}). Eletrólito de corrida: 40 mmol.L^{-1} fenol, $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ CTAB, pH 10. Condições de análise: inj. 3s $3,4 \text{ kPa}$, tensão -20 kV , temperatura 25°C , detecção 200 nm .

Para esta otimização utilizou-se de um planejamento fatorial, ferramenta esta que apresenta grande aplicação na pesquisa científica pelo fato de englobar a presença ou não de efeitos sinérgicos, que se existirem levam a uma resposta errônea em uma otimização por métodos univariados[30].

Baseando-se em experimentos realizados anteriormente, observou-se as variáveis que mais influenciavam na separação, escolhendo-se quatro: injeção (6,9/17,2kPa.s), tensão aplicada (-17/-22 kV), temperatura (25/35°C), e concentração do eletrólito (20/40 mmol.L⁻¹). O planejamento dos experimentos encontra-se na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Planejamento fatorial dos experimentos para otimização do eletrólito fenol.

Corrida	Injeção kPa.s	Tensão kV	Temperatura C	Conc Eletrólito mmol.L-1	CRS
1	6,9	17	25	40	23,6
2	17,2	17	25	40	26,1
3	17,2	22	25	40	27,6
4	6,9	17	35	20	8,6
5	17,2	22	35	40	21,8
6	17,2	17	35	20	37
7	6,9	22	25	20	22,6
8	17,2	17	25	20	29,2
9	6,9	22	25	40	17,5
10	17,2	22	35	20	20,1
11	6,9	17	25	20	29,1
12	6,9	22	35	20	9,8
13	17,2	22	25	20	27,8
14	17,2	17	35	40	30,9
15	6,9	22	35	40	18
16	6,9	17	35	40	24,2

Depois de realizada a parte experimental, realizou-se o tratamento teórico matemático do sistema. Como fator resposta utilizou-se uma função muito utilizada em separações cromatográficas, conhecida como CRS (chromatographic resolution statistic)[31], descrita na equação 2.1:

$$CRS = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[\frac{(R_{i,j+1} - R_{opt})^2}{(R_{i,j+1} - R_{min})^2 R_{i,j+1}} \right] + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{R_{i,j+1}^2}{(n-1)R_{avg}^2} \right\} \cdot \frac{t_f}{n}$$

Onde $R_{i,j+1}$ representa a resolução entre pares de solutos de zonas adjacentes, R_{avg} a resolução média de todos pares de soluto, R_{opt} a resolução ótima desejada, que neste trabalho foi adotada com 1,5, R_{min} a resolução mínima aceitável, que neste trabalho foi adotada com 0,4, t_f o tempo de corrida e n o número de solutos na amostra. O cálculo da resolução entre picos obteve-se utilizando a equação 2.2:

$$R_{i,i+1} = \frac{2(t_{i+1} - t_i)}{w_i + w_{i+1}} \quad (2.2)$$

Definida como a razão entre a diferença entre os tempos de migração (t) pela soma da larguras médias da base (w).

Na tabela 2.1 pode-se observar também os resultados obtidos no cálculo da CRS. Quanto menor o valor da CRS, significa que melhor é a separação. Estes dados foram analisados utilizando-se o software Design-Expert 6.0.10 da Stat-Ease Inc.

A interação entre a temperatura e a injeção pode ser observada na figura 2.9, onde é revelado que o ótimo está apontando para maior temperatura e menor injeção.

DESIGN-EXPERT Plot

Sq ri(CRS)

X = A: Injeção

Y = C: Temperatura

Actual Factors

B: Tensão = 19.9 15.167 61

D: [E] = 36.22

Figura 2.9. Relação entre a Injeção, temperatura e CRS.

Já a figura 2.10 traz a relação entre temperatura e concentração do eletrólito[E], revelando que o ótimo aponta para uma menor concentração do eletrólito.

DESIGN-EXPERT Plot

Sqrt(CRS)
X = C: Temperatura
Y = D: [E]

Actual Factors
A: Injeção = 12.05
B: Tensão = 19.91

Figura 2.10. Relação entre temperatura, concentração do eletrólito e CRS.

O programa fatorial indicou como solução utilizar o quadrado da CRS, revelando 10 possíveis soluções, sendo que a tensão foi a variável que apresentou menor importância.

A figura 2.11 traz o eletroferograma de 13 aminoácidos padrões separados na melhor condição encontrada, a corrida número 5.

O planejamento fatorial apontou para as seguintes condições:

Injeção	6,9 kPa.s
Tensão aplicada	-17 kV
Temperatura	35°C
Concentração eletrólito	20 mmol.L ⁻¹

Figura 2.11. Eletroferograma da mistura de 13 aminoácidos padrões (100 mg.L^{-1}). Eletrólito da corrida 5: 20 mmol.L^{-1} fenol, $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ CTAB, pH 10. Condições de análise: inj. 2s $3,4 \text{ kPa}$, tensão -17 kV , temperatura 35°C , detecção 200 nm .

2.6 ESTUDO DO TIPO DE RESINA DE TROCA IÔNICA

Dois tipos de resina de troca catiônica foram estudadas, a Amberlite IRA 120 da Vetec Química (Rio de Janeiro, Brasil) e a Dowex 50WX8-200 (St. Louis, USA).

Para o teste de eficiência das resinas, adicionou-se seguindo o descrito no procedimento para hidrólise, quatro aminoácidos (ácido glutâmico, alanina, leucina e lisina) 10 mg de cada a cada uma das resinas, como descreve o quadro 2.1.

Quadro 2.1. Teste de recuperação.

A eluição dos aminoácidos é realizada utilizando como íon trocador o amônio, que apresenta maior afinidade pela resina e também por ser facilmente eliminado após evaporação deste na forma de amônia. O processo do teste de recuperação foi realizado em duplicata para cada resina.

Para determinação dos aminoácidos preparou-se um eletrólito que consistiu de 7,5 mmol.L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrobenzóico, 0,2 mmol.L⁻¹ de CTAB, ajustando o pH em 11,0 com adição de hidróxido de sódio[32]. A injeção consistiu de 3 segundos a 3,4 kPa, a tensão aplicada foi de -20 kV com detecção UV em 254 nm e temperatura de 25°C.

A figura 2.12 apresenta o eletroferograma obtido na retenção de aminoácidos realizada com a resina de troca catiônica Amberlite, onde nota-se um sinal analítico que revela a eficiência pobre desta resina quando aplicada para esta finalidade. A figura 2.13 apresenta o eletroferograma obtido na retenção de aminoácidos realizada com a resina de troca catiônica Dowex, onde nota-se que apresentou um sinal analítico muito maior quando comparado com a primeira resina Amberlite.

Figura 2.12. Eletroferograma da resina Amberlite IRA 120. Eletrólito de corrida: 7,5 mmol.L⁻¹ ácido 3,5-dinitrobenzóico, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 11. Condições de análise: inj. 3s 3,4 kPa, tensão +20 kV, temperatura 25 °C, detecção 254 nm.

Realizou-se o teste de recuperação das duas resinas utilizadas, comparando-se a área dos picos, com uma mistura de padrões de concentrações conhecidas. Fez-se o mesmo processo descrito no esquema anterior (Quadro 2.1), analisando-se os aminoácidos retidos nas duas resinas. Os valores obtidos para cada aminoácido estão descritos na tabela 2.2. Os resultados demonstram um bom nível de recuperação para a resina Dowex, enquanto que para a resina

Amberlite os dados foram insatisfatórios. Ernst Kenndler[12] e co-autores publicaram um artigo em 1992 onde o teste de recuperação foi feito utilizando-se a caseína e não uma mistura de aminoácidos, o que ilustra não só a retenção dos aminoácidos na resina de troca catiônica, como também a catálise da hidrólise de uma proteína.

Figura 2.13. Eletroferograma da resina Dowex. Eletrólito de corrida: 7,5 mmol.L⁻¹ ácido 3,5-dinitrobenzóico, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 11. Condições de análise: inj. 3s 3,4 kPa, tensão +20 kV, temperatura 25°C, detecção 254 nm.

Tabela 2.2. teste de recuperação de aminoácidos.

Aminoácido	% Recuperação Amberlite	% Recuperação Dowex
Ácido Glutâmico	1,2	91,7
Alanina	0,4	96,8
Leucina	0,6	94,4
Lisina	1,3	90,6

2.7 CONCLUSÕES

Para determinação de aminoácidos, é preferível analisá-los na forma aniônica quando comparada à forma catiônica, pois nesta não obtém-se uma linha de base estável, e também por se tratar de um pH muito baixo, o fluxo eletrosmótico é muito baixo também, o que faz a corrida se tornar bastante lenta.

Já na forma aniônica é preferível utilizar o fenol, pois ele apresenta capacidade tamponante nesta região (pH 10), mobilidade muito próxima a dos aminoácidos, o que ajuda na simetria de pico e ainda trata-se de um cromóforo.

Com relação à resina de troca catiônica, a melhor a ser utilizada é a Dowex 50WX8-200, pois apresentou uma recuperação muito boa quando comparada a outra resina utilizada.

2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gallagher, K.F., *Drugs and Cosmetic Industry*, **1991**, 66, 34.
2. Hirs, C.H.W.; Stein, W.H.; Moore, S., *J. Biol. Chem.*, **1954**, 211, 941.
3. Roach, D., *J. Chromatogr.*, **1970**, 52, 393.
4. Smith, A.J.; *Methods Enzymol.*, **1997**, 289, 419.
5. Weiss, M.; Manneberg, M.; Juranville, J.F.; Lahm, H.W.; Fountoulakis, M., *J. Chromatogr. A*, **1998**, 795, 263.
6. Blackburn, S., *Amino acid determination*, Marcel Dekker, New York, **1978**.
7. Hugli, T.E.; Moore, S., *J. Biol. Chem.*, **1972**, 247, 2828.
8. Noltmann, E.A.; Mahowald, T.A.; Kuby, S.A., *J. Biol. Chem.*, **1962**, 237, 1146.
9. Huet, J.C.; Pernollet, J.C., *J. Chromatogr.*, **1986**, 355, 451.
10. Underwood, G.E.; Deatherage, F.E., *Science*, **1952**, 115, 95.
11. Whitaker, J.R.; Deatherage, F.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 3360.
12. Kenndler, E.; Schmidt-Beiwl, K.; Mairinger, F.; Pohm, M., *Anal. Chem.*, **1992**, 342, 135.
13. Schneider, U.; Kenndler, E., *Anal. Chem.*, **2001**, 371, 81.
14. White, R., *Nat. Gallery Tech. Bull*, **1984**, 8, 5.
15. Karpowicz, A., *Stud. Conserv.*, **1981**, 26, 153.
16. Mairinger, F., *Anal. Chem.*, **1986**, 324, 147.
17. Green, J. G.; Jorgenson, J.W., *J. Chromatogr.*, **1989**, 478, 63.
18. Kelly, M.T.; Fabre, H.; Perret, D., *Electrophoresis*, **2000**, 21, 699.
19. Guzman, N.A.; Moschera, J.; Bailey, C.A.; Iqbal, K.; Malik, A.W., *J. Chromatog.*, **1992**, 598, 123.
20. Wan, H.; Andersson, P.E.; Engström, A. Blomberg, L.G., *J. Chromatogr. A*, **1995**, 704, 179.
21. Liu, J.; Cobb, K.A.; Novotny, M., *J. Chromatogr.*, **1990**, 519, 189.
22. Deyl, Z.; Miksik, I.; Struzinsky, R., *J. Chromatogr.*, **1990**, 516, 287.
23. Chen, Z.L.; Warren, C.R.; Adams, M.A., *Chromatographia*, **2000**, 51, 180.
24. Wan, H. Blomberg, L.G.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 875, 43.
25. Karbaum, A.; Jira, T.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 874, 285.

26. Spackman, D.H.; Stein, W.H.; Moore, S., *Anal. Chem.*, **1958**, 30, 1190.
27. Micke, G.A., Oliveira, M.A.L., Tavares, M.F.M., 24^a SBQ, **2001**, Poços de Caldas, MG, QA-146.
28. Mikkers, F.E.P.; Everaerts, F.M.; Verheggen, Th.P.E.M., *J. Chromatogr.*, **1979**, 169, 11.
29. Tavares, M.F.M. et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 14, 281.
30. Neto, B.B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Unicamp, **1995**.
31. McGuffin, V.L., Tavares, M.F.M., *J. Chromatogr. A*, **1997**, 69, 152.
32. Fujiya, N.M., *Análise de hidrolisados de proteína de uso cosmetológico por eletroforese capilar*, dissertação de mestrado da USP-IQ, **2001**.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA HIDRÓLISE

3.1 ESTUDO DA EVOLUÇÃO DA HIDRÓLISE

Definido o tipo de resina a ser utilizado no trabalho (figura 3.1), o próximo passo concentrava-se em estudar a evolução da hidrólise e definir para cada uma das matrizes deste trabalho, qual era o tempo no qual a hidrólise já havia atingido seu máximo.

Figura 3.1. Resina de troca catiônica forte Dowex 50WX8-200 da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Como já foi dito anteriormente, o mecanismo como ocorre esta hidrólise ainda é desconhecido[1]. A figura 3.2 mostra as duas trocas iônicas que ocorrem durante o processo. A resina de troca catiônica Dowex 50WX8-200 é uma resina de grupo sulfônico, e a troca iônica segue o princípio de exclusão de Donnan e de exclusão dielétrica[2], onde a troca iônica ocorre de acordo com a maior afinidade pela resina.

Figura 3.2. Retenção dos aminoácidos na resina (A) e Eluição dos aminoácidos retidos na resina (B).

O procedimento de monitoramento da hidrólise durou aproximadamente 50 horas, como será descrito neste capítulo.

3.2 OBJETIVOS

Verificar quanto tempo é necessário para se atingir a hidrólise total das proteínas presentes nas amostras de castanha-do-Pará, aveia e trigo.

Observar qual dos métodos de análise, detecção direta da fenilalanina na forma aniônica, detecção direta de histidina na forma catiônica ou detecção indireta dos aminoácidos, é o mais adequado para o monitoramento da evolução da hidrólise.

Traçar o perfil da hidrólise, tomando-se como hidrólise total o resultado obtido através da hidrólise ácida convencional.

3.3 SEÇÃO EXPERIMENTAL

Instrumentação

Equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE da Beckman Instruments, equipado com fonte de alta tensão ($0 - \pm 30\text{kV}$), detector do tipo UV, controlador de temperatura e com programação de aquisição de dados System Gold software. Capilar de sílica fundida foi utilizado na análise, com dimensões de 75 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo e 40 cm de comprimento (48,5 cm total), sendo montado em cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido a temperatura constante com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão de 0,5 psi.

Reagentes

Todos reagentes utilizados são reagentes de grau analítico. A resina utilizada foi Dowex 50WX8-200 da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

Amostras moídas de castanha-do-Pará, aveia e trigo foram obtidas junto à PharmaService Bioextract (São Paulo, BR).

Ácido clorídrico, hidróxido de amônio e etanol absoluto foram obtidos junto à Merck (Darmstadt, Alemanha).

Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi obtido da Aldrich (Milwaukee, USA) e fenol da Labsynth (Diadema, BR).

Procedimento para estudo da evolução da hidrólise

O procedimento adotado está descrito no quadro 3.1.

Quadro 3.1. Procedimento para estudo da evolução da hidrólise.

Em cada tubo de ensaio adicionou-se a amostra, a resina e a solução etanol/água. O frasco era então fechado e levado a estufa à 110°C, retirando-se em tempos pré-estabelecidos um tubo de ensaio de cada vez. Após esfriar, lava-se a resina com duas porções de água (1,5 mL).

Para a eluição dos aminoácidos, adiciona-se à resina 5 mL de hidróxido de amônio 5 mol.L⁻¹. Então, eliminou-se a amônia por evaporação, depois diluiu-se a amostra em um balão de 10 mL.

O monitoramento foi realizado de 3 maneiras diferentes: monitorando a fenilalanina na forma aniônica sob detecção direta; monitorando a histidina na forma catiônica sob detecção direta; aminoácidos sob detecção indireta.

3.4 EVOLUÇÃO DA HIDRÓLISE DA CASTANHA-DO-PARÁ

Quando uma amostra contendo proteínas é suspendida em solução etanol-água juntamente com a forma protonada da resina de troca catiônica e temperatura elevada, ocorre degradação hidrolítica dos constituintes proteínicos presentes na amostra[1]. Depois de retido, os aminoácidos são eluídos utilizando-se íons amônio como substituintes.

Monitorou-se a hidrólise durante 48 horas, retirando-se alíquotas em intervalos de uma hora e quarenta minutos aproximadamente. A figura 3.3 ilustra a evolução da hidrólise das proteínas da castanha-do-pará, analisando os aminoácidos na forma aniônica sob detecção indireta.

Figura 3.3. Eletroferogramas da evolução da hidrólise da castanha-do-Pará. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ fenol, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 10. Condições de análise: inj. 2s 3,4 kPa, tensão -17 kV, temperatura 35°C, detecção 200 nm.

Para o acompanhamento desta hidrólise, escolheu-se ainda dois aminoácidos que absorvem na região do UV, para se analisar sob detecção direta. A figura 3.4 traz o gráfico de mobilidade efetiva versus pH dos possíveis candidatos.

Figura 3.4 Gráfico de mobilidade efetiva dos aminoácidos versus o pH do meio.

Na forma aniônica optou-se por monitorar a fenilalanina sob detecção direta. Para esta análise utilizou-se como eletrólito o tetraborato de sódio, pois trata-se de um eletrólito que não interfere na região do ultravioleta e apresenta capacidade tamponante no pH 9,2. A figura 3.5 traz um eletroferograma e as condições utilizadas para análise da fenilalanina.

Figura 3.5. Eletroferograma do acompanhamento da formação de fenilalanina durante a hidrólise da castanha-do-Pará após 10 horas. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ tetraborato de sódio, pH 9,2. Condições: injeção 2s a 3,4 kPa, tensão +20 kV, temperatura 25°C, detecção 220 nm.

Como não colocou-se um tensoativo catiônico para inversão de fluxo[3], a fenilalanina foi analisada no contra fluxo, pois em pH 9,2 ela têm mobilidade negativa (Figura 3.4), e o fluxo eletrosmótico é o responsável pela alta velocidade nesta condição. Como fez-se a injeção pelo vial de saída (*outlet*), diminuiu-se ainda mais o tempo para esta determinação.

A evolução também foi acompanhada, determinando-se a formação de histidina na forma catiônica sob detecção direta. Escolheu-se a histidina pois ela apresenta mobilidade positiva abaixo do pH 7, podendo ser analisada em diversos tampões, enquanto os outros aminoácidos apresentam mobilidade positiva abaixo de pH 3. O eletrólito escolhido foi o acetato de sódio, que apresenta alta capacidade tamponante em pH 4,2 e também absorve muito pouco na região ultravioleta. A figura 3.6 traz o eletroferograma da hidrólise da castanha-do-Pará após 10 horas, assim como as condições utilizadas para estas corridas.

Figura 3.6. Eletroferograma do acompanhamento da formação de histidina durante a hidrólise da castanha-do-Pará após 10 horas. Eletrólito de corrida: 50 mmol.L⁻¹ tampão acetato, pH 4,2. Condições: injeção 2s a 3,4 kPa, tensão +25 kV, temperatura 25°C, detecção 214 nm.

Das três maneiras como foram determinados os aminoácidos, obteve-se resultados muito próximos sobre como ocorre esta hidrólise, mostrando que pode-se monitorar esta hidrólise por qualquer um dos três métodos. Na figura 3.7 têm-se o perfil da hidrólise com base na evolução da porcentagem (m/m) de fenilalanina em função do tempo. Utilizando-se o software Curve Expert 1.3 obteve-se um modelo matemático que descreve o comportamento da evolução da hidrólise.

Richards Model: $y = a / (1 + \exp(b - cx)^{1/d})$

Coefficient Data:

a = 92.46231

b = 5.774664

c = 0.39496246

d = 1.5169824

Figura 3.7. Perfil da hidrólise com base na evolução da porcentagem (m/m) de fenilalanina em função do tempo. Software – Curve Expert 1.3.

O processo de hidrólise atinge seu máximo após 23 horas e, considerando a hidrólise ácida convencional como 100%, temos que monitorando a fenilalanina atingiu-se 92.1%, monitorando a histidina atingiu-se 94.3% e monitorando os demais aminoácidos atingiu-se 93.8% de rendimento.

3.5 EVOLUÇÃO DA HIDRÓLISE AVEIA

O mesmo procedimento realizado para a castanha-do-Pará foi realizado para a aveia. A figura 3.8 traz os eletroferogramas dos aminoácidos detectados indiretamente durante a evolução da hidrólise das proteínas da aveia. O eletrólito utilizado não é o otimizado ainda, pois estes experimentos foram realizados antes da otimização do eletrólito.

Figura 3.8. Eletroferograma do acompanhamento da evolução da hidrólise da aveia. Eletrólito de corrida: 30 mmol.L⁻¹ fenol, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 10,0. Condições: injeção 2s a 3,4 kPa, tensão -15 kV, temperatura 35°C, detecção 200 nm.

O acompanhamento desta evolução foi realizado também, analisando a fenilalanina sob detecção direta. Para esta análise utilizou-se como eletrólito o tetraborato de sódio, pois trata-se de um eletrólito que não interfere na região do ultravioleta e apresenta capacidade tamponante no pH 9,2. A figura 3.9 traz um eletroferograma e as condições utilizadas para determinação da fenilalanina.

Figura 3.9. Eletroferograma do acompanhamento da formação de fenilalanina durante a hidrólise da aveia após 6 horas. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ tetraborato de sódio, pH 9,2. Condições: injeção 3s a 0.69 kPa, tensão +17 kV, temperatura 25°C, detecção 220 nm.

Como não colocou-se um tensoativo catiônico para inversão de fluxo[3], a fenilalanina foi analisada no contra fluxo, sendo este o responsável pela alta velocidade desta análise.

A evolução também foi acompanhada, analisando-se a formação de histidina na forma catiônica sob detecção direta. O eletrólito escolhido foi tampão

acetato, devido aos mesmos motivos descritos anteriormente. A figura 3.10 traz o eletroferograma da hidrólise da aveia após 06 horas, assim como as condições utilizadas para estas corridas.

Figura 3.10. Eletroferograma do acompanhamento da formação de histidina durante a hidrólise da aveia após 06 horas. Eletrólito de corrida: 50 mmol.L⁻¹ acetato, pH 4,2. Condições: injeção 2s a 3,4 kPa, tensão +25 kV, temperatura 25°C, detecção 214 nm.

Das três maneiras como foram analisados os aminoácidos, obteve-se resultados muito próximos sobre como ocorre esta hidrólise, mostrando que pode-se monitorar esta hidrólise por qualquer um dos três métodos. Na figura 3.11 têm-se o perfil da hidrólise com base na evolução da concentração de fenilalanina em função do tempo. Utilizando-se o software Curve Expert 1.3 obteve-se um modelo matemático que descreve o comportamento da evolução da hidrólise.

Richards Model: $y = a / (1 + \exp(b - cx)^{1/d})$

Coefficient Data:

a = 93.772544
b = 11.396845
c = 0.70648114
d = 3.514742

Figura 3.11. Perfil da hidrólise com base na evolução da concentração de fenilalanina em relação a hidrólise ácida convencional. Software – Curve Expert 1.3.

O processo de hidrólise atinge seu máximo após 24 horas e, considerando a hidrólise ácida convencional como 100% de rendimento, temos que monitorando a fenilalanina atingiu-se 94.6%, monitorando a histidina atingiu-se 94.1% e monitorando os demais aminoácidos atingiu-se 93.2% de rendimento.

3.6 EVOLUÇÃO DA HIDRÓLISE TRIGO

O mesmo procedimento realizado para a castanha-do-Pará e para a aveia, foi realizado também para o trigo. A figura 3.12 traz os eletroferogramas dos aminoácidos detectados indiretamente durante a evolução da hidrólise do trigo. Aqui o eletrólito utilizado não é o otimizado, pois estes experimentos foram realizados antes da otimização do eletrólito.

Figura 3.12. Eletroferograma do acompanhamento da evolução da hidrólise do trigo. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ fenol, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 10,0. Condições: injeção 2s a 3,4 kPa, tensão -25 kV, temperatura 25°C, detecção 200 nm.

O acompanhamento desta evolução foi realizado também, analisando a fenilalanina sob detecção direta. A figura 3.13 traz um eletroferograma e as condições utilizadas para análise da fenilalanina.

Figura 3.13. Eletroferograma do acompanhamento da formação de fenilalanina durante a hidrólise do trigo após 10 horas. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ tetraborato de sódio, pH 9.2. Condições: injeção 3s a 3.44735 kPa, tensão +20 kV, temperatura 25°C, detecção 220 nm.

A evolução também foi acompanhada, analisando-se a formação de histidina na forma catiônica sob detecção direta. A figura 3.14 traz o eletroferograma da hidrólise das proteínas do trigo após 10 horas, assim como as condições utilizadas para estas corridas.

Figura 3.14. Eletroferograma do acompanhamento da formação de histidina durante a hidrólise do trigo após 10 horas. Eletrólito de corrida: 50 mmol.L⁻¹ acetato, pH 4,2. Condições: injeção 2s a 3,4 kPa, tensão +25 kV, temperatura 25°C, detecção 214 nm.

Das três maneiras como foram analisados os aminoácidos, obteve-se resultados muito próximos sobre como ocorre esta hidrólise, mostrando que pode-se monitorar esta hidrólise por qualquer um dos três métodos. Na figura 3.15 têm-se o perfil da hidrólise com base na evolução da concentração de histidina em função do tempo. Utilizando-se o software Curve Expert 1.3 obteve-se um modelo matemático que descreve o comportamento da evolução da hidrólise, obtido para as outras matrizes.

Richards Model: $y = a / (1 + \exp(b - cx)^{1/d})$

Coefficient Data:

a = 97.813281

b = 5.9109383

c = 0.3950326

d = 1.5941046

Figura 3.15. Perfil da hidrólise com base na evolução da concentração de histidina em relação à hidrólise ácida convencional. Software – Curve Expert 1.3.

O processo de hidrólise atinge seu máximo após 24 horas e, considerando a hidrólise ácida convencional como 100%, temos que monitorando a fenilalanina atingiu-se 95.3%, monitorando a histidina atingiu-se 93.9% e monitorando os demais aminoácidos atingiu-se 94.4% de rendimento.

3.7 CONCLUSÕES

A hidrólise utilizando resina de troca catiônica pode ser monitorada seguindo qualquer um dos três protocolos, detecção direta de fenilalanina, detecção direta de histidina ou detecção indireta dos demais aminoácidos.

Para as três matrizes escolhidas, castanha-do-Pará, aveia e trigo, o tempo necessário para hidrólise total é de 24 horas.

Não foi possível até o momento encontrar uma equação com parâmetros cinéticos que descreva o comportamento desta hidrólise, apenas uma equação matemática que relaciona a formação do produto em relação ao tempo.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kenndler, E.; Schmidt-Beiw, K.; Mairinger, F.; Pohm, M., *Anal. Chem.*, **1992**, 342, 135.
2. Vezzani, D.; Bandini, S., *Desalination*, **2002**, 149, 477.
3. Harrold, M.P.; Wajtusik, M.J.; Riviello, J.; Henson, P., *J. Chromatogr.*, **1993**, 640, 463.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS, ÁCIDOS GRAXOS E SACARÍDEOS

4.1 ESQUEMA PARA CARACTERIZAÇÃO SEQUENCIAL

O objetivo principal deste trabalho foi a caracterização sequencial de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos, podendo-se dispor de pequena quantidade de amostra, aliada com a potência da técnica de eletroforese capilar. A figura 4.1 traz o esquema montado para atingir este objetivo.

Em um primeiro momento é separada a fração protéica da matriz, a qual é hidrolizada e seus aminoácidos são quantificados na forma aniônica sob detecção indireta, utilizando como cromóforo o fenol.

Em um segundo momento é separada a fração lipídica da matriz, a qual é saponificada em solução metanólica de hidróxido de sódio e os ácidos graxos são determinados sob detecção indireta no contra fluxo, utilizando como cromóforo o dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS).

Por final são hidrolizados os carboidratos utilizando-se o ácido trifluoracético e os monossacarídeos presentes são determinados sob detecção indireta, utilizando como cromóforo o ácido piridinodicarboxílico.

4.2 OBJETIVOS

Caracterização sequencial de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos presentes nas amostras de castanha-do-Pará, aveia e trigo.

Quantificação dos aminoácidos e comparação com resultado obtido através do método de Kjeldahl para teor de proteína total, somando-se as massas obtidas para cada aminoácido.

Quantificação dos monossacarídeos e comparação com o resultado obtido através do método fenol-sulfúrico para determinação de carboidratos totais, somando-se as massas obtidas para cada monossacarídeo.

4.3 SEÇÃO EXPERIMENTAL

Instrumentação

Equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE 5510 da Beckman Instruments, equipado com fonte de alta tensão ($0 - \pm 30\text{kV}$), detector do tipo UV, controlador de temperatura e com programação de aquisição de dados System Gold software. Capilar de sílica fundida foi utilizado na análise, com dimensões de $75\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno, $375\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro externo e 40 cm de comprimento (até o detector), sendo montado em cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido a temperatura constante com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão.

Equipamento de eletroforese capilar modelo Agilent CE, equipado com fonte de alta tensão ($0 - \pm 30\text{kV}$), detector DAD (*diode array detector*), controlador de temperatura e com programação de aquisição de dados Chemstation 6.0 software. Capilar de sílica fundida foi utilizado na análise, com dimensões de $75\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno, $375\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro externo e 40 cm de comprimento (até o detector), sendo montado em cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido a temperatura constante com a circulação de ar ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão.

Equipamento de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ da Beckman Instruments, equipado com fonte de alta tensão ($0 - \pm 30\text{kV}$), detector do tipo UV, controlador de temperatura e com programação de aquisição de dados 32 Karat 4.0 software. Capilar de sílica fundida foi utilizado na análise, com dimensões de $75\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno, $375\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro externo e 40.2 cm de comprimento (até o detector), sendo montado em cartucho. Durante a eletroforese, o capilar foi mantido a temperatura constante com a circulação de um líquido (refrigerante) ao redor do capilar. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão.

Procedimento

Parte-se de uma amostra sólida, aproximadamente 30 mg, junta-se em um tubo de ensaio uma solução etanol/água (80/20 V/V), 1,2 gramas de resina de troca catiônica previamente tratada como anteriormente, fecha-se o tubo e coloca-se na estufa durante 24 horas a 110°C.

Separa-se a resina e o líquido por filtração, lavando-se a resina com duas porções de água (1,5 mL). O filtrado é reservado para posterior determinação de ácidos graxos e sacarídeos. A resina então é tratada com hidróxido de amônio 7 mol.L⁻¹ (5 mL). Evapora-se o excesso de amônia do eluato e completa-se o volume para um balão de 10 mL. Esta é a fração onde os aminoácidos são analisados.

No filtrado é realizada uma extração líquido/líquido com hexano (5ml). Separa-se a fase aquosa (sacarídeos) da fase orgânica (triglicerídeos).

Na fase orgânica evapora-se o solvente e trata-se com hidróxido de sódio 0,5 mol.L⁻¹ em solução metanólica (2 mL). Deixa-se em banho-maria 75-80°C durante 25 minutos sob refluxo. Completa-se o balão com metanol para 5 mL, para posterior análise dos ácidos graxos.

A fase aquosa é tratada com ácido trifluoracético (TFA) 10 % a 100°C durante 1 hora para hidrólise completa dos sacarídeos. Transfere-se para um balão de 10 mL completando o volume com água, para posterior análise dos monossacarídeos.

Quadro 4.1. Esquema para análise sequencial de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO SEQUENCIAL DA CASTANHA-DO-PARÁ

A figura 4.2 nos mostra um eletroferograma típico dos aminoácidos presentes na castanha-do-Pará.

Figura 4.2. Eletroferograma típico dos aminoácidos presentes na castanha-do-Pará. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ fenol, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 10,0. Condições de análise: inj. 2 s 3,4 kPa, tensão -17 kV, temperatura 35°C, detecção 200 nm.

A porcentagem destes aminoácidos está descrita na tabela 4.1. Somando-se a massa dos aminoácidos encontrados na castanha-do-Pará obtém-se $17,9 \pm 0,3$ %. Como método comparativo utilizou-se o método de Kjeldahl[1], o qual converte o nitrogênio da amina em amônio. O valor encontrado por este método foi $18,43 \pm 0,37$ %. É importante salientar que amostras contendo alto teor de gordura podem resultar em dados não tão satisfatórios por este método.

Tabela 4.1. Concentração de aminoácidos presentes na castanha-do-Pará.

AMINOÁCIDO	% (m/m)	C.V. (%)
ác. glutâmico	3,15	1,4
ác. aspártico	1,95	1,8
glicina	0,658	0,9
serina	0,281	2,1
alanina	0,589	1,1
metionina	4,81	1,8
histidina	0,502	2,4
glutamina	0,316	2
fenilalanina	1,34	1,1
leucina/isoleucina	2,38	1,6
valina	1,21	0,6
triptofano	0,267	0,9
prolina	0,764	1,5
lisina	1,65	1,7

Para a realização da determinação sequencial destes componentes na castanha-do-Pará utilizou-se de uma amostra de aproximadamente 500 g que foi moída até se transformar em pó. Desta amostra retirou-se uma alíquota a qual foi aplicada o esquema descrito no quadro 4.1. O coeficiente de variação na tabela 4.1 revela o desvio encontrado ao executar-se 3 injeções consecutivas de uma mesma amostra. Para a quantificação foram criadas curvas de calibração externas de cada aminoácido, utilizando-se de cinco pontos para cada curva.

Destacado na tabela 4.1 estão os aminoácidos em vermelho, que são os aminoácidos que seriam destruídos se fosse utilizada a hidrólise ácida e, portanto, não poderiam ser detectados[2] e em azul, são os aminoácidos que provavelmente teriam seus picos aumentados, devido à transformação dos outros aminoácidos neles.

Sequenciamente foi realizada a determinação dos ácidos graxos. A figura 4.3 mostra um eletroferograma de uma mistura de 10 padrões de ácidos graxos. Utilizou-se como eletrólito o fosfato (pH 7.0) na função de tampão,

dodecilbenzenossulfonato de sódio como cromóforo, Brij 35 e n-octanol como aditivos na separação[3].

Figura 4.3. Eletroferograma da mistura de 10 padrões de ácidos graxos. Eletrólito de corrida: 15 mmol.L⁻¹ fosfato, 4 mmol.L⁻¹ SDBS, 10 mmol.L⁻¹ Brij 35, 45% acetonitrila, 2% n-octanol, pH 7,0. Condições de análise: inj. 6s a 1,25 kPa, tensão 20kV, temperatura 25°C, detecção 224 nm.

Assim analisou-se os ácidos graxos presentes na castanha-do-Pará. A figura 4.4 mostra o eletroferograma dos ácidos graxos encontrados na castanha-do-Pará. Neste eletroferograma, apesar da detecção ter sido indireta, os picos encontram-se para cima pois foi selecionado no software para inverter os picos.

A tabela 4.2 traz as porcentagens encontradas dos ácidos graxos na castanha-do-Pará, onde o coeficiente de variação descreve o erro encontrado quando realizada três injeções consecutivas. Curvas de calibração com cinco pontos distintos foram criadas para quantificação de cada ácido graxo.

Figura 4.4. Eletroferograma dos ácidos graxos da castanha-do-Pará. Eletrólito de corrida: 15 mmol.L⁻¹ fosfato, 4 mmol.L⁻¹ SDBS, 10 mmol.L⁻¹ Brij 35, 45% acetonitrila, 2% n-octanol, pH 7,0. Condições de análise: inj. 6s a 1,25 kPa, tensão 20kV, temperatura 25°C, detecção 224 nm.

Tabela 4.2. Concentração de ácidos graxos (massa/massa) presentes na castanha-do-Pará.

ÁCIDO GRAXO	% (m/m)	C.V. (%)
ácido palmítico (C16:0)	8,1	3,7
ácido esteárico (C18:0)	2,2	4,5
ácido olêico (C18:1)	17,6	5,1
ácido linolêico (C18:2)	22,3	3,5
ácido linolênico (C18:3)	1,9	4,3

Por final analisou-se sequencialmente os monossacarídeos presentes na amostra. A figura 4.5 traz o eletroferograma de uma mistura de quatro padrões de sacarídeos.

Figura 4.5. Eletroferograma de uma mistura de quatro padrões. Eletrólito de corrida: 10 mmol.L⁻¹ ácido piridinodicarboxílico, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 12,1. Condições de análise: inj. 5s a 1,4 kPa, tensão -15kV, temperatura 25°C, detecção 280 nm.

A estratégia básica para análise de carboidratos é utilizar sua dissociação em base forte, gerando ânions[4], assim pode-se promover a separação por eletroforese em solução livre baseada nas diferentes constantes de dissociação. Utilizando-se eletrólitos que apresentem pH>11 os grupos hidroxilas são ionizados e é possível realizar a análise.

Nestas condições analisou-se os sacarídeos presentes na castanha-do-Pará após hidrólise com ácido trifluoracético, demonstrados na figura 4.7.

Figura 4.7. Eletroferograma dos monossacarídeos encontrados na castanha-do-Pará. Eletrólito de corrida: 10 mmol.L⁻¹ ácido piridinodicarboxílico, 0.2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 12.1. Condições de análise: inj. 5s a 1.379 kPa, tensão -12kV, temperatura 25°C, detecção 280 nm.

A tabela 4.3 traz as porcentagens encontradas para glicose e frutose, onde encontra-se o coeficiente de variação encontrado quando realizada três injeções consecutivas. Para o cálculo da concentração de cada monossacarídeo criou-se uma curva de calibração externa com cinco pontos.

Tabela 4.3. Concentração de monossacarídeos (massa/massa) presentes na castanha-do-Pará.

MONOSSACARÍDEO	% (m/m)	C.V. (%)
Frutose	5,71	2,6
Glicose	6,95	1,4

Para efeito comparativo, fez a análise de carboidratos totais através do método do fenol-sulfúrico[5], um método espectrofotométrico que consiste em transformar cada anel de carboidrato em furfural, que apresenta absorvância máxima em 486 nm.

Assim, obteve-se através do método do fenol-sulfúrico $13.2 \pm 0.2\%$ e, somando-se os resultados obtidos por eletroferese capilar, obteve-se $12.66 \pm 0.16\%$.

4.5 CARACTERIZAÇÃO SEQUENCIAL DA AVEIA

A figura 4.8 nos traz um eletroferograma típico dos aminoácidos presentes na aveia. A metodologia utilizada nas quantificações seguintes foi a mesma utilizada na castanha-do-Pará.

Figura 4.8. Eletroferograma típico dos aminoácidos presentes na aveia. Eletrólito de corrida: 30 mmol.L⁻¹ fenol, 0.2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 10. Condições de análise: inj. 2s 3.447kPa, tensão -15kV, temperatura 25°C, detecção 200 nm.

A porcentagem massa/massa destes aminoácidos está descrita na tabela 4.4. Somando-se a massa dos aminoácidos encontrados na aveia obtém-se 13.48 ± 0.25 %. Como método comparativo utilizou-se o método de Kjeldahl, e o valor encontrado por este método foi 14.64 ± 0.28 %.

Tabela 4.4. Concentração de aminoácidos (massa/massa) presentes na aveia.

AMINOÁCIDO	% (m/m)	C.V. (%)
ác. glutâmico	4,96	1,8
ác. aspártico	1,96	2,1
glicina	0,65	1,2
serina	0,91	2,3
alanina	0,65	0,5
metionina	1,35	1,7
valina	0,86	0,4
lisina	0,71	1,3

Assim como na tabela para os aminoácidos da castanha-do-Pará, nesta tabela para a aveia, os aminoácidos em vermelho são os aminoácidos que se fosse utilizado a hidrólise ácida, seriam destruídos e não poderiam ser detectados[2] e em azul são os aminoácidos que provavelmente teriam seus picos aumentados, devido a transformação dos outros aminoácidos neles.

Sequencialmente foi realizada a determinação dos ácidos graxos presentes na aveia. A figura 4.9 mostra o eletroferograma da corrida para ácidos graxos da aveia. Neste eletroferograma, nota-se que não houve êxito nesta análise, talvez devido ao baixo teor de lipídios da amostra.

Por final analisou-se sequencialmente os monossacarídeos presentes na amostra de aveia. Como pode-se observar na figura 4.10, o pico referente a frutose é muito maior que o da glicose, impossibilitando a quantificação deste último.

Figura 4.9. Eletroferograma dos ácidos graxos da aveia. Eletrólito de corrida: 15 mmol.L⁻¹ fosfato, 4 mmol.L⁻¹ SDBS, 10 mmol.L⁻¹ Brij 35, 45% acetonitrila, 2% n-octanol, pH 7,0. Condições de análise: inj. 6s a 1,25 kPa, tensão 20kV, temperatura 25°C, detecção 224 nm.

Figura 4.10. Eletroferograma dos monossacarídeos encontrados na aveia. Eletrólito de corrida: 10 mmol.L⁻¹ ácido piridinodicarboxílico, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 12,1. Condições de análise: inj. 5s a 1,4 kPa, tensão -12kV, temperatura 25°C, detecção 280 nm.

A porcentagem massa/massa encontrada de glicose foi de $26,5 \pm 0,3\%$. O resultado obtido através do fenol-sulfúrico indica $39,7 \pm 0,6\%$, o que mostra uma grande disparidade entre os resultados. Uma das causas para esta diferença pode ser a presença de furfural, o analito detectado espectrofotometricamente no método fenol-sulfúrico, estar presente na aveia[6].

4.6 CARACTERIZAÇÃO SEQUENCIAL DO TRIGO

A figura 4.11 nos traz um eletroferograma típico dos aminoácidos presentes no trigo.

Figura 4.11. Eletroferograma típico dos aminoácidos presentes no trigo. Eletrólito de corrida: 20 mmol.L⁻¹ fenol, 0,2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 10. Condições de análise: inj. 2s 3,4kPa, tensão -20kV, temperatura 25°C, detecção 200 nm.

A porcentagem massa/massa destes aminoácidos está descrita na tabela 4.5. Somando-se a massa dos aminoácidos encontrados na aveia obtém-se $9,4 \pm 0,2$ %. Como método comparativo utilizou-se o método de Kjeldahl, e o valor encontrado por este método foi $11,56 \pm 0,23$ %.

Tabela 4.5. Concentração de aminoácidos (massa/massa) presentes no trigo.

AMINOÁCIDO	% (m/m)	C.V. (%)
ác. glutâmico	2,84	1,3
ác. aspártico	0,94	2
glicina	1,38	1,4
metionina	0,57	0,8
fenilalanina	0,54	0,9
leucina/isoleucina	1,17	1,9
prolina	0,97	0,6
lisina	0,93	1,8

Assim como na tabela para os aminoácidos da castanha-do-Pará e da aveia, nesta tabela para o trigo, os aminoácidos em azul são os aminoácidos que provavelmente teriam seus picos aumentados, devido a transformação dos outros aminoácidos neles.

Sequencialmente foi realizada a análise para detectar os ácidos graxos presentes no trigo. A figura 4.12 mostra o eletroferograma da corrida para ácidos graxos do trigo. Neste eletroferograma, nota-se que não houve êxito nesta análise, talvez devido ao baixo teor de lipídios da amostra.

Por final analisou-se sequencialmente os monossacarídeos presentes na amostra de trigo.

Figura 4.12. Eletroferograma dos ácidos graxos do trigo. Eletrólito de corrida: 15 mmol.L⁻¹ fosfato, 4 mmol.L⁻¹ SDBS, 10 mmol.L⁻¹ Brij 35, 45% acetonitrila, 2% n-octanol, pH 7,0. Condições de análise: inj. 6s a 1,25 kPa, tensão 20kV, temperatura 25°C, detecção 224 nm.

Figura 4.13. Eletroferograma dos monossacarídeos encontrados no trigo. Eletrólito de corrida: 10 mmol.L⁻¹ ácido piridinodicarboxílico, 0.2 mmol.L⁻¹ CTAB, pH 12,1. Condições de análise: inj. 5s a 1,4 kPa, tensão -12kV, temperatura 25°C, detecção 280 nm.

A tabela 4.6 traz os resultados obtidos para os monossacarídeos presentes no trigo após hidrólise. Somando-se os resultados obtêm-se 39,0±0,4%, contra 51,3±0,7% obtido pelo método do fenol-sulfúrico para carboidratos totais.

Tabela 4.6. Concentração (massa/massa) de monossacarídeos presentes no trigo.

MONOSSACARÍDEO	% (m/m)	C.V. (%)
Frutose	7,1	2,1
Glicose	31,9	1,2

4.7 CONCLUSÕES

Para a castanha-do-Pará, a investigação sequencial é possível, podendo-se obter uma formulação nutricional de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos, condizendo com métodos oficiais como o método Kjeldahl e o método fenol-sulfúrico.

Para a aveia e o trigo, a análise dos ácidos graxos não foi conclusivamente fetiva, devido ao baixo teor de lípideos presentes nas amostras.

4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kane, P.F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1987**, 70, 5, 907.
2. Galagher, k.F.; jones, R.T.; *Drugs and Cosmetic industry*, **1992**, 26.
3. Oliveira, M.A.L.; Micke, G.A.; Bruns, R.E.; Tavares, M.F.M., *J. Chromatogr. A*, **2001**, 924, 533.
4. Honda, S., *J. Chromatogr. A*, **1996**, 720, 337.
5. Dubois, M.; Gilles, k.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F., *Anal. Chem.*, **1956**, 28, 350.
6. www.ars-grin.gov/duke/

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho realizou-se estudo sistemático para viabilizar a análise sequencial de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos por eletroforese capilar em solução livre, com aplicação das metodologias em amostras reais como a castanha-do-Pará, aveia e trigo. Trata-se de amostras sólidas que revelam matrizes bastante complexas.

Adicionalmente, a análise sequencial apresenta sua real importância quando aplicada às amostras em que se dispõe de pouco material. Associada a eletroforese capilar, pode-se analisar essas três classes de compostos, dispondo de pouca quantidade de amostra.

A utilização de resina de troca catiônica provou ser compatível com outros métodos de hidrólise já existentes, com uma grande diferença que é a de retirar a fração protéica da matriz, fazendo assim um *clean-up* da amostra. E para a eletroforese capilar uma outra vantagem é que retirando-se a fração protéica, elimina-se o problema de adsorção de proteína que poderia interferir na determinação dos ácidos graxos e sacarídeos.

A determinação de aminoácidos utilizando-se detecção indireta UV não é comumente utilizada em eletroforese capilar. Os métodos mais utilizados baseiam-se na derivatização dos aminoácidos, sendo que hoje já existem muitos derivatizantes à disposição no mercado. A vantagem de analisar-se sob detecção indireta está na simplicidade do processo que, aliada com a versatilidade da técnica de eletroforese capilar, permite que uma análise seja feita em poucos minutos, eliminando o passo da derivatização.

Existem trabalhos na literatura que descrevem aminoácidos analisados como ânions sob detecção indireta, mas muito pouco foi produzido analisando-os como cátions. Neste trabalho também não foram atingidos grandes êxitos analisando-os nesta forma, o que deixa um espaço a ser suprido.

Analisando os aminoácidos na forma de ânions, obteve-se sucesso na análise destes utilizando como eletrólito o fenol. Na região entre o pH 9 e 11, o

fenol apresenta mobilidade eletroforética muito próxima a dos aminoácidos, o que resulta em picos simétricos.

A completa separação de todos aminoácidos existentes torna-se inviável utilizando-se um sistema simples como o deste trabalho. Separações quirais têm sido estudadas, utilizando-se de seletos quiais, ligantes metálicos e outros, tornando-se sistemas muito mais complexos do que o apresentado.

A determinação de ácidos graxos via eletroforese capilar mostrou-se eficiente e muitos trabalhos têm sido publicados na área. É uma análise extremamente simples e com a rapidez da eletroforese capilar. Assim como na análise dos aminoácidos, uma outra grande vantagem é a análise dos ácidos graxos não derivatizados, o que se torna impossível através da técnica mais utilizada na análise de ácidos graxos que é a cromatografia a gás.

Assim como para os aminoácidos e ácidos graxos, a análise de sacarídeos pode ser feita indiretamente com algumas vantagens, como a preparação da amostra que elimina o passo da derivatização e boa reprodutibilidade.

A tabela 5.1 traz as vantagens e desvantagens observadas na análise destes três grupos que foram observadas durante a produção deste trabalho.

Tabela 5.1 Comparação das vantagens e desvantagens na análise de aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos.

GRUPO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Aminoácidos	Não derivatização Frequência de análise Baixo custo	Detectabilidade Coeluição
Ácidos graxos	Não derivatização Frequência de análise	Detectabilidade Precisão
Sacarídeos	Não derivatização Simples	Detectabilidade

Por fim destaca-se as vantagens da eletroforese capilar em relação às técnicas correlatas. A maior vantagem concentra-se na versatilidade da técnica, sendo que é possível, utilizando-se da mesma coluna, realizar não só a separação dos três grupos, aminoácidos, ácidos graxos e sacarídeos, mas também analisar qualquer outro grupo, bastando simplesmente alterar o eletrólito de corrida, o que nas técnicas cromatográficas acarretaria em troca de colunas, de fase móvel, etc.

Outra grande vantagem é a frequência de análise, levando-se em consideração que as corridas em eletroforese capilar normalmente terminam em poucos minutos. O recondicionamento também ocorre em poucos minutos, podendo-se mudar até de eletrólito e, por consequência o tipo de análise neste pequeno período.

5.2 TRABALHOS FUTUROS

A dissertação em questão abre perspectivas para o estudo dos aminoácidos sem derivatização na forma catiônica, uma vez que existiram problemas com o método. Um trabalho interessante neste aspecto seria utilizar outro tipo de detector, como o detector condutométrico sem contato, analisando os aminoácidos diretamente, entretando sem derivatizar.

A análise sequencial mostrou-se de grande relevância, podendo ser aplicada a matrizes complexas e que apresentem pequena quantidade de amostra para efetuar-se as análises.

No entanto, o mecanismo da hidrólise de resina de troca iônica ainda necessita de elucidação. Esperava-se neste trabalho, adequar os dados experimentais às equações cinéticas existentes, mas obteve-se apenas uma equação matemática que relaciona a formação do produto com o tempo. Aqui concentra-se um trabalho interessante, pois os parâmetros cinéticos poderiam ajudar na elucidação do mecanismo de hidrólise.

CURRICULUM VITAE

EDGAR PERIN MORAES

edmoraes@iq.usp.br

Rua Ramiro Barcelos, 74 apto 26

CEP 04311-050 - São Paulo - S.P.

Data de nascimento – 12 de novembro de 1974

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Universidade de São Paulo - USP

Conjunto das Químicas - 2001

Bacharel em Química

Universidade de São Paulo - USP

Conjunto das Químicas - 2004

Mestre em Química Analítica (Eletroforese Capilar)

TRABALHOS PUBLICADOS

1. Tavares, M.F.M.; Moraes, E. P. et. al.; *Applications of capillary Electrophoresis to Analysis of Compounds of Clinical, Forensic, Cosmetological, Environmental, Nutritional and Pharmaceutical Importance*; Journal Braz. Chemical Soc.; 14; 281-290; 2003.
2. Micke, G.A.; Moraes, E.P.; Farah, J.P.S.; Tavares, M.F.M.; *Assessing the Separation of Neutral Plant Secondary Metabolites by Micellar Electrokinetic Chromatography*; Journal of Chromatography A; 1004; 131-143; 2003.
3. Moraes, E.P.; Micke, G.A.; *Química Ensino Médio*; Frase Editora; 2001.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

12º Encontro Nacional de Química Analítica – UFMA 2003.

Estudo Cinético da Hidrólise de Proteínas da Castanha-do-pará em Resina de troca iônica.

Desenvolvimento de Metodologia para Análise de Ácidos Graxos de cadeia Curta e Média por Eletroforese Capilar.

26ª Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas 2003

Análise de Peptídeos em Hidrolisados de Proteína por Eletroforese capilar

25ª Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas 2002

Otimização da Separação de Compostos Neutros por Cromatografia Eletrocínética Micelar