UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

USO DA P-BENZOQUINONA PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM DIVERSAS MATRIZES E AMINO GRUPOS LIVRES EM SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

DIMAS A. M. ZAIA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Dr. JAIM LICHTIG

SÃO PAULO

1996

"Uso da P-Benzoquinona para Determinação de Proteínas Totais em Diversas Matrizes e Amino Grupos Livres em Síntese de Peptídeos em Fase Sólida"

DIMAS AUGUSTO MOROZIN ZAIA

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

Aprovada por:

Prof. Dr. Jaim Lichtig
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda
IQ - USP

Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto
IQ - UNICAMP

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
FCF - USP

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor
FCF - USP

SÃO PAULO
21 DE JUNHO DE 1996

Ao meu pai e
à minha mãe
pelo incentivo, amor e oportunidade
que me proporcionaram,
meu muito obrigado.

Aos meus irmãos,
Zezé, Bebel e Cidinha,
pela amizade e carinho.

Aos meus sobrinhos,
por muitos momentos alegres.

À Thaïs, "Turquinha",
pela amizade, amor, incentivo
e muita paciência comigo.

Às minhas Luizas,
Laura "Magrela",
Sophia "Loira",
por agüentarem
as muitas atribulações e
pelas alegrias que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Jaim Lichtig, pela orientação, apoio, confiança e incentivo recebidos durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. R. Bruce Merrifield, pela oportunidade oferecida, confiança, incentivo e apoio recebido durante nossa estada em seu laboratório, na Rockfeller University, Nova York.

Ao Dr. Emil Kaiser, pelo exemplo de grande dedicação e entusiasmo pela Ciência aos 92 anos de idade.

À Dra. C. G. Unson, pela ajuda no meu aprendizado em SPFS, pela amizade e apoio durante nossa estada nos Estados Unidos da América.

Aos Drs P. Juvadi e Satyan, pela amizade, ajuda no trabalho e pelas muitas conversas que tivemos sobre nossos países e culturas.

À Cui-Rong, pela amizade, ajuda e infinita paciência com que me ensinou os testes biológicos dos peptídeos sintetizados.

À Elizabeth Merrifield, "Libby", pela amizade e carinho com que tratava a mim e a todos no laboratório.

Aos amigos Kevin, Barney, Leonor, Linda, Yan Yang, Ken, Connie e Dee, pela amizade e alegre convívio que tivemos.

Às professoras da Children's School of The Rockefeller University e P.S. 183, pelo carinho e compreensão com que sempre trataram a nós e às nossas filhas.

Aos amigos Liz/Moacir e filhos e Odete/Edgar e filhos, pela amizade e muitos bons momentos que tivemos juntos em Nova York.

Aos professores Dr. W. J. Barreto e Dr. L. C. J. Gaziri, pelo apoio, confiança e discussões durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. A. S. de Oliveira, por nos permitir o uso de alguns materiais e reagentes e pela confiança demonstrada quando do início de nosso trabalho.

À CONFEPAR e I. Bagatin, por permitirem a troca de amostras de leite em pó desnatado e uso das dependências da empresa para algumas determinações analíticas.

Ao professor Dr. R. Curi, por permitir o uso de seu laboratório, assim como fornecer as amostras de tecido de rato, e pela confiança e amizade em nós depositada durante muitos anos.

Ao professor Dr. O. Sala, pelo encorajamento durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. L. F. C. de Oliveira, pela amizade e discussões deste trabalho.

À professora Dra. A. S. Endo, pelo apoio e confiança em nós depositada.

À professora Dra. M. C. Hauly e Sr. L. C. Hauly, pela confiança em nós depositada.

Ao Sr. C. Magri, que em seu trabalho diário, muitas vezes tornou a realização deste trabalho mais fácil.

Ao Farmacêutico e Bioquímico C. Santilli, pela troca de amostras e resultados de análises de proteínas totais no plasma sangüíneo.

A todos os colegas do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, que de alguma maneira nos ajudaram.

À CAPES, pela Bolsa Deslocamento durante o período de agosto a dezembro de 1991, ao CNPq pela Bolsa Doutorado Sandwich, durante o período de março de 1993 a agosto de 1994, e à CAPES pela Bolsa de Doutorado, pelo programa PICD, de setembro de 1994 até os dias de hoje.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, e à Universidade Estadual de Londrina pela minha liberação pelo programa PICD.

ÍNDICE

Página

INTRODUÇÃO:

Importância do desenvolvimento de metodologias para a determinação de proteínas 1

Métodos utilizados para a determinação e identificação de proteínas totais 4

Métodos espectrofotométricos mais utilizados para a determinação de proteínas totais 8

Métodos de identificação e espectrofotométricos quantitativos mais utilizados para a determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida 19

Usos farmacológicos e aplicações analíticas de quinonas 23

Mecanismos de reação propostos entre quinonas e aminas, aminoácidos e proteínas 25

Metodologias propostas no presente trabalho para a determinação de proteínas totais e determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida 28

OBJETIVOS 31

MATERIAIS E MÉTODOS:

Materiais e métodos utilizados para a determinação de proteínas totais em plasma sangüíneo 32

Materiais e métodos utilizados para a determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato 35

Materiais e métodos utilizados para a determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado 38

Materiais e métodos utilizados para a determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida 42

TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO 51

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Determinação de proteínas totais em plasma sangüíneo 52

Determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato 63

Determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado 66

Determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida 72

CONCLUSÕES:

Determinação de proteínas totais em plasma sangüíneo 78

Determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato 78

Determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado 78

Determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida 79

PERSPECTIVAS DE TRABALHOS 79

SUMÁRIO 80

ABSTRACT 81

BIBLIOGRAFIA 82

CURRICULUM VITAE 92

INTRODUÇÃO

IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes em todos os processos biológicos verificando-se a participação delas como enzimas, hormônios, neurotransmissores, transportadores através das membranas celulares, dentre muitos outros.

O desenvolvimento de metodologias para determinar proteínas tem, cada vez mais, se tornado de fundamental relevância em várias áreas do conhecimento, como por exemplo na área de análises clínicas, favorecendo o diagnóstico de certas doenças correlacionadas com a alteração da quantidade de proteínas nos fluídos biológicos; em nutrição animal, ressaltando-se o aproveitamento racional de nutrientes e problemas relacionados à nutrição, como obesidade, anorexia nervosa, desnutrição, devendo as dietas ter teor balanceado de proteínas.

Em ciência e tecnologia de alimentos, em química fina de purificação de proteínas e enzimas, e em culturas de tecidos e de microrganismos, os mecanismos químicos e biológicos envolvidos apresentam direto envolvimento com proteínas (1, 2), tendo-se como exemplo: medidas de atividade enzimática máxima, de distribuição da atividade enzimática intracelular e de velocidade de produção e utilização de substratos em um microrganismo, que são dadas em reiação à quantidade total de proteínas do mesmo (2, 3), ou determinação da concentração de neuropeptídeos no cérebro, utilizando a técnica de "micropunch" para

microdissecção do tecido cerebral, que é tomada em relação à concentração de proteínas totais nos "micropunchs" em estudo (4).

Em análises clínicas, a mudança na concentração de proteínas totais nos fluídos biológicos pode ser correlacionada com diferentes doenças. Doenças renais e diabetes mellitus alteram a permeabilidade dos capilares glomerulares provocando, com isto, um aumento na concentração da proteína urinária, o que se denomina proteinúria ou, mais comumente, albuminúria. No líquido encéfalo raquidiano (líqüor), a concentração de proteínas pode estar aumentada devido a algum dano ocorrido nas meninges, como na meningite bacteriana. No caso do plasma sangüíneo, uma hipoproteinemia pode ser um indicativo de diversos problemas fisiológicos, tais como: hepático, com a síntese de proteína diminuída; renal, com perda de uma grande quantidade de proteínas pela urina; ou ainda, desnutrição quando o indivíduo passa por uma severa e prolongada fome. Outros fluídos biológicos tais como saliva e suco pancreático, também contém proteínas, porém em menor concentração (1, 5).

A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América (6), recomenda um consumo diário de 0,8 g de proteína por Kg de peso corpóreo; esta quantidade pode ser suprida por muitas fontes diferentes, sendo as mais importantes: carnes em geral (aves, gado, peixe, etc.), ovos, leite, produtos do leite (queijos, iogurtes, etc.) e sementes (feijão, milho, trigo, soja, etc.).

Obviamente, nos dias atuais, muitos alimentos são processados para prolongar o tempo de consumo ou facilitar o transporte, ou são transformados em algum tipo de produto de maior aceitação pelo público. Por exemplo, carnes em geral podem ser desidratadas e transformadas em muitos tipos de pratos (sopas, feijoadas, risotos, etc.) ou alimentos como linguiças, salsichas, presuntos etc. Sementes são transformadas em farinhas que por sua vez são transformadas em pães, bolos, bolachas, etc., enquanto o leite,

processado, se transforma em queijos, iogurtes, manteigas, etc. Em todos estes produtos, a concentração de proteínas é um item de grande relevância para o fabricante, tanto na compra da matéria prima como na venda do produto, pois a margem de lucro do mesmo está intimamente relacionada com a questão de quanto é possível fabricar a partir de uma quantidade de matéria prima utilizada. Para o consumidor, a quantidade de proteínas indica o valor nutritivo do alimento e também favorece a fiscalização deste alimento contra possíveis fraudes (7).

Na área de nutrição humana existe, nos dias de hoje, uma preocupação com relação ao que ingerir e o quanto ingerir, pois excessos na ingestão alimentar podem levar à obesidade e às doenças decorrentes da mesma; a ingestão inadequada de nutrientes, por outro lado, também pode ter conseqüências danosas para o organismo. Assim, em termos de valores energéticos, o conteúdo proteico é um item fundamental a ser considerado (1, 5, 8) tanto no planejamento de dietas para seres humanos como na pesquisa básica de diferentes dietas para animais.

Na área de purificação de proteínas ou de enzimas provenientes de animais, microrganismos ou plantas, a quantificação das mesmas em cada etapa do processo se faz necessária (9). Uma área que atualmente tem grande interesse em purificar enzimas, visando aplicação industrial, é a de bacteriologia (10), pois as condições de proliferação das bactérias, é muito variável; por exemplo, algumas bactérias proliferam somente a elevadas pressões e a temperaturas acima de 100°C, outras sobrevivem a temperaturas abaixo de 0°C, como as dos mares gelados do Ártico, e outras em condições de pH abaixo de 2 ou acima de 11.

A determinação de proteínas totais é também importante em zootecnia e áreas correlatas, pois a concentração de proteínas totais de leguminosas ou de gramíneas pode indicar quais são as mais aceitáveis e rentáveis para a alimentação animal (11).

A área de ecologia é mais uma das áreas beneficiadas com metodologias para a determinação de proteínas totais, pois, é possível entender vários aspectos da vida dos animais silvestres relacionando o comportamento alimentar com a quantidade de proteínas ingerida dos alimentos (12).

Estas são apenas algumas das mais importantes aplicações analíticas para metodologias de determinação de proteínas totais; obviamente, existem muitas outras de grande relevância.

MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Os métodos para a determinação da concentração de proteínas totais são muito variados. As metodologias mais utilizadas são as espectrofotométricas no ultra-violeta/visível (UV-Vis), que serão discutidas em detalhes no próximo item.

Além das metodologias espectrofotométricas no UV-Vis, muitas outras são propostas para a determinação e/ou identificação de proteínas totais, como por exemplo, baseadas no método de Kjeldahl, utilizando algumas das técnicas de cromatografia ou eletroforese, infra-vermelho e infra-vermelho próximo, espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear (RMN), métodos eletroanalíticos, etc.

O método de Kjeldahl (13), apesar dos inconvenientes de ser demorado e determinar não somente o conteúdo proteico, continua sendo, nos dias de hoje, a metodologia mais utilizada pelas áreas de ciências de alimentos, tecnologia de alimentos e áreas correlatas, para a determinação de proteínas totais. A base do método é a digestão de proteínas com ácido

sulfúrico na presença de um catalisador (cobre, selênio, mercúrio), dando como produto de reação o íon amônio; este é neutralizado com base gerando amônia que é destilada e recolhida num frasco contendo um excesso de ácido, sendo o restante deste ácido determinado volumetricamente com base.

De maneira geral, verifica-se maior utilização das metodologias cromatográficas para separação e purificação do que para determinação quantitativa de proteínas totais.

Das técnicas cromatográficas, devemos destacar que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta, em relação a outras técnicas cromatográficas, muitas vantagens: analisa uma grande variedade de substâncias, em uma ampla faixa de peso molecular; é uma excelente técnica preparativa e analítica, podendo identificar até 50 componentes numa mesma amostra; e utiliza equipamentos automatizados disponíveis no mercado. Assim, os equipamentos para CLAE são imprescindíveis em laboratórios envolvidos, dentre outras aplicações, com pesquisas de síntese, purificação e identificação de novas substâncias (fármacos, polímeros, etc.).

Observa-se, entretanto, alguns inconvenientes nas técnicas cromatográficas, quando da sua utilização para a determinação de proteínas totais, sendo estes: tempo de análise demorado, podendo levar horas (a espectrofotometria, no UV-Vis, leva poucos minutos); uso de grande quantidade de solventes de elevada pureza principalmente quando se usa CLAE (na espectrofotometria, no UV-Vis, a reação é em meio aquoso); equipamento de elevado custo, especialmente no caso da CLAE (os espectrofotômetros UV-Vis são relativamente baratos); portanto, as técnicas cromatográficas são, na maioria das vezes, mais adequadas para a separação e purificação de proteínas do que para a determinação quantitativa da mesmas (9, 14).

A eletroforese é, também, uma técnica que tem sido mais utilizada para separação e purificação do que para determinação quantitativa

de substâncias. A eletroforese capilar, desenvolvida nos últimos anos, apresenta diversas vantagens em relação às técnicas eletroforéticas tradicionais: diminuição do efeito Joule, uso de volume reduzido de amostra, automação da análise, compatibilidade com uma grande variedade de sistemas de detecção (9, 15). No entanto, com relação à determinação quantitativa de proteínas totais, observa-se para as técnicas eletroforéticas os mesmos inconvenientes relatados para as técnicas cromatográficas.

Das técnicas baseadas no infra-vermelho, destacamos a que utiliza o infra-vermelho próximo (700 a 1.100 nm) como sendo uma das metodologias mais promissoras para a análise quantitativa de diversas substâncias, e, conseqüentemente, de proteínas totais, além de atualmente apresentar muitas aplicações na área de robótica (16). Esta técnica não exige, em muitos casos, preparo das amostras, pois a determinação analítica pode ser efetuada sem nenhum tipo de extração ou purificação prévia e permite, no mesmo equipamento, a combinação de uma ampla faixa de comprimentos de onda, desde 200 até 1.100 nm. Contudo, comparada com os métodos espectrofotométricos no UV-Vis, fornece espectros relativamente complexos dificultando a interpretação dos resultados e utiliza equipamentos relativamente dispendiosos (16).

A espectroscopia de massa é mais uma importante ferramenta analítica para a identificação de proteínas, e inclusive sua aplicação em amostras biológicas, que era uma limitação do método, pois ocorria a destruição da amostra durante o processo de volatilização, foi superado pelo desenvolvimento da técnica volatilização por "eletrospray" (17). Na área de síntese de peptídeos e proteínas, assim como em muitas outras áreas que envolvem síntese e purificação de novas substâncias, o espectrômetro de massa tornou-se um equipamento indispensável. Entretanto, a espectroscopia de massa serve para identificação, não sendo utilizada para determinações quantitativas.

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é outra técnica espectroscópica que tem sido utilizada para a identificação e, principalmente, para estudos de conformação de proteínas e enzimas (18), visando compreender como funcionam sítios ativos de enzimas ou processos envolvendo a ligação de peptídeos e proteínas na superfície de enzimas (2, 3). Apesar de ser possível utilizar a técnica de RMN para determinações quantitativas, ela é somente utilizada para estudos de identificação, conformação, etc.

Diversas metodologias eletroanalíticas (potenciometria, polarografia, amperometria, etc.) têm sido utilizadas para a determinação quantitativa de substâncias de interesse biológico (metais, aminoácidos, proteínas, ácidos graxos, etc.) (19).

A aplicação mais conhecida da técnica de polarografia é para a determinação da concentração plasmática sangüínea de proteínas que não são precipitadas pelo ácido sulfossalicílico. Através desta análise, constatações de trocas na concentração proteica, quando comparado com um plasma sangüíneo normal, indicam a presença de doenças. Tumores, infecções e inflamações provocam um aumento na onda dupla devido a proteínas, enquanto que doenças do fígado provocam uma diminuição desta onda (20).

Atualmente uma grande revolução está ocorrendo na Química Analítica com a combinação de técnicas de separação e identificação; por exemplo, a espectroscopia de massa com a cromatografia gasosa, ou com a cromatografia líquida de alta eficiência ou com a eletroforese são exemplos destas combinações.

MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS MAIS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A espectrofotometria no ultra-violeta/visível (UV-Vis) tem sido uma das técnicas analíticas mais difundidas devido a alguns aspectos que a tornam muito atraente: a) os equipamentos são relativamente baratos, quando comparados com outras técnicas; b) os princípios envolvidos na espectrofotometria são relativamente simples, não sendo necessário despender um longo tempo no treinamento de pessoal técnico; c) o tempo de medida é rápido e as metodologias podem ser facilmente automatizadas; d) tem sido amplamente utilizada para a determinação de todos os tipos de substâncias (metais, semi-metais, não metais, bio-moléculas, substâncias orgânicas, etc.) em diversos tipos de meios (bioquímica, ciências dos alimentos, análise clínica, poluição, etc.); e) e, por fim, apresenta boa sensibilidade com ajuda dos métodos de pré-concentração ou uso adequado de corantes e/ou quelantes (21).

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios e, desta forma, vantagens e desvantagens de algumas das metodologias mais utilizadas serão discutidas a seguir.

O método baseado na reação de biureto (22), onde íons cobre formam um complexo quadrado planar com a ligação peptídica (figura 1), tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversas matrizes, sendo elas: soro ou plasma sangüíneo (23-25), líquido cérebro espinhal (líqüor) (26-31), urina (32-34), alimentos (35-38), saliva (39), fibrinogênio (40) e tecido animal (41). Apesar de ser rápido, utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absortividade específica para diferentes proteínas (22, 29, 30, 39), este método não é muito sensível,

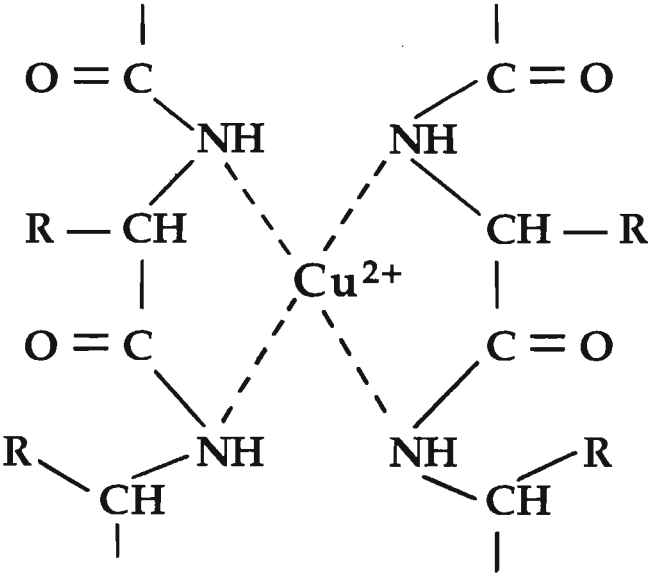


Figura 1. Complexo quadrado planar formado entre cobre (II) e a ligação peptídica (22).

como foi destacado por diversos autores (27, 29, 34, 39), o que o coloca em grande desvantagem, em relação a outras metodologias, e por isto tem sido, ao longo dos anos, substituído por métodos com maior sensibilidade.

Verifica-se que o método de biureto está sujeito às interferências de quaisquer substâncias que, de alguma forma, possam reagir com os íons cobre (II), sendo alguns destes interferentes a bilirrubina e hemoglobina (30), a ampicilina (34), o dextran (42-44) e a melanina (45). Mesmo assim, este método tem sido recomendado para a determinação da concentração de proteínas totais em plasma sangüíneo pela Associação Americana de Análises Clínicas e por diversos autores (23, 24, 42).

O método de Lowry é o mais utilizado para a determinação de proteínas (46). O método se baseia no princípio de que uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, compondo o reagente Folin-Ciocalteau, reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm, sendo a absorbância aproximadamente proporcional ao conteúdo de tirosina e triptofano das proteínas na reação.

Chou e Goldstein (47) mostraram que em hidrolisados de albumina ocorre uma redução de 2/3 da absorbância em relação ao original da proteína sem hidrolisar, e, também que, dos 20 aminoácidos proteicos, somente a tirosina, o triptofano, a cisteína e, em menor grau, a histidina resultam em significante troca na absorbância, após reação com o reagente Folin-Ciocalteau. Os autores verificaram que o cobre não tem nenhum efeito sobre a reação dos aminoácidos individuais (tirosina, triptofano e histidina) mas bloqueia a reação com cisteína (cobre (II) reage com o grupo sulfidril). Eles constataram, ainda, que os dipeptídeos estudados desenvolvem alguma coloração com o reagente Folin-Ciocalteau, e o mesmo não ocorre com os aminoácidos constituintes do dipeptídeo. Os autores também sintetizaram diversas séries de peptídeos com os aminoácidos glicina, alanina, valina e

leucina e descobriram que, quanto maior a cadeia de aminoácidos, maior a absorbância e que esta aumenta muito nas séries de peptídeos glicina e alanina, quando colocados os aminoácidos serina, treonina, metionina e asparagina.

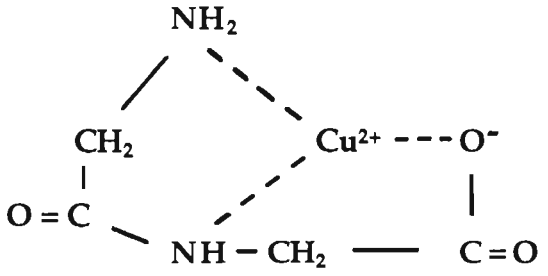
Os resultados obtidos por Chou e Goldstein (47) sugerem que a redução do reagente de Folin-Ciocalteau pode ocorrer diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína e histidina) ou através da retirada de elétrons das proteínas, que é facilitada com a formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas. Segundo estes autores (47), um dipeptídeo forma com o cobre (II) um quelato planar tridentado (figura 2A). Caso o dipeptídeo tenha um aminoácido, cuja cadeia lateral contenha nitrogênio, o quelato formado é quadridentado (figura 2B), enquanto para tri ou tetrapeptídeos o quelato quadridentado é formado mais facilmente, devido ao segundo nitrogênio da ligação peptídica.

Legler e cols. (48), após extensivos estudos, concluíram que a oxidação dos complexos de proteínas-cobre pelo reagente Folin-Ciocalteau é uma desidrogenação (oxidação com dois elétrons) que ocorre em cada unidade do tetrapeptídeo. Outros agentes redutores são as cadeias laterais dos aminoácidos tirosina e triptofano e, em menor grau, os aminoácidos histidina e asparagina os quais contribuem com quatro elétrons .

No entanto, Smith e cols. (49) sugerem a formação de cobre (I) quando da reação de cobre (II) em meio alcalino com proteínas ou peptídeos, que posteriormente reduz o reagente de Folin-Ciocalteu produzindo o composto de coloração azul. Esta reação é a base do método de Smith e cols. (49), porém Legler e cols. (48) não detectaram cobre (I), mas sim cobre (III) que estaria participando da desidrogenação de cada unidade do tetrapeptídeo.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade e por isto tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios, tais como: líqüor (27-29),

(a)



(b)

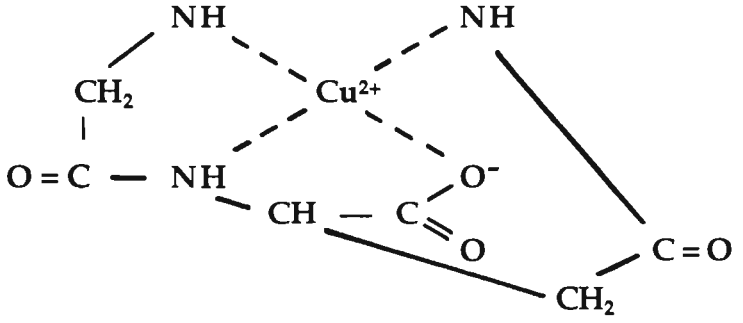


Figura 2. (**a**) Fórmula estrutural do complexo formado entre cobre (II) e o dipeptídeo Gly-Gly. (**b**) Fórmula estrutural do complexo formado entre cobre (II) e o dipeptídeo Gly-Asn (47).

plasma sangüíneo (24, 25), saliva humana (39), tecido animal (50-52), plantas (53-55), suco biliar (56), membranas (57, 58) e produtos alimentícios (59-61).

Devido ao extenso uso do método de Lowry e cols. (46), o mesmo tem sido automatizado (técnica de análise por injeção em fluxo - AIF) (62-64) e usado em "microtiter plates" (52, 65). No entanto, o mesmo possui algumas desvantagens, tais como: estar sujeito a muitos interferentes, apresentar longo tempo de análise, apresentar absortividade específica altamente variável para diferentes proteínas, e fornecer, apenas numa pequena faixa, uma relação linear entre os valores de absorbância e concentração de proteínas .

Vários autores propõem modificações no método de Lowry para resolver os problemas acima citados. Para aumentar a velocidade da reação, Shakir e cols. (66) recomendam três minutos de aquecimento da amostra, a 37°C, após a adição de sulfato de cobre alcalino, e mais três minutos após a adição do reagente de Folin-Ciocalteau. Larson e cols. (67) recomendam a adição de tri-1,4-dimercaptobutanodiol (DTT), 3 minutos após a adição do reagente Folin-Ciocalteau. Alam (68) sugere o controle do pH para a redução do tempo de análise.

Hartree (69) fez várias modificações no método de Lowry melhorando a faixa de linearidade, diminuindo o tempo de análise e uniformizando as absortividades específicas para algumas proteínas; estas modificações (69) são as mais utilizadas, apesar de tornar o método de Lowry mais trabalhoso no preparo dos reagentes.

Stauffer (70) recomenda a construção do gráfico de log Abs versus log microgramas de proteína e Hess e cols. (71) recomendam o uso de alta concentração do reagente Folin-Ciocalteau. Tais procedimentos, segundo estes autores, diminuem o tempo de análise, uniformizam as absortividades específicas para algumas proteínas e/ou aumentam a faixa de linearidade do método de Lowry e cols. (46).

Diversas substâncias interferentes no método de Lowry são citadas na literatura; estas normalmente causam aumento na absorbância do branco, diminuição da absortividade específica ou formação de algum tipo de precipitado.

Bensadoun e Weinstein (72) listaram as seguintes substâncias como interferentes: fenóis (exceto nitro fenóis), glicina (0,5%), hidrazina (acima de 0,5 mg/100 ml), sulfato de amônio (acima 0,15%), ditioeritritol, 2-mercaptoetanol, citrato, triton x-100, íons potássio (acima de 12 mM), ácido etilenodiamintetraacético (EDTA), tris-hidroximetil-aminometano/ácido clorídrico (Tris), ácido sulfônico 4-(2-hidroxietil)-piperazinaetano (Hepes), glutationa, penicilina, bicina, tricina, acetilacetona, sacarose, glucosamina, glicilglicina, ácido succínico, etileno glicol, glicerol, pirrolidina, polivinil, xilose, manose, glicose, frutose, sorbose, ramanose. Além destes citam-se: ciclodextrinas (73), 4-metilumbeliferona (56), melanina (45, 74), lipídeos (50), bilirrubina (29), taninos (53) e compostos de enxofre (75, 76).

Verifica-se que a reação de Lowry é fotossensível (77) recomendando-se a exposição dos tubos à mesma quantidade de luz. Para a eliminação da maioria dos interferentes usuais do método de Lowry, sugere-se a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético e co-precipitantes (51, 72, 78) ou misturas de metanol-clorofórmio-água (57) ou hexano-isopropanol (58). Aconselha-se, quando o interferente for composto de enxofre, como mercaptanas, por exemplo, o uso de iodo acetato (75) ou a secagem a vácuo da amostra (76) e no caso de lipídeos e melanina a adição de detergentes (50, 74 79). Sargent (80) propôs uma modificação no método de Lowry que possibilitou o aumento da sensibilidade em cinqüenta vezes.

Apesar de todos os esforços para melhorar o método de Lowry, este continua moroso e sujeito a inúmeros interferentes e, últimos anos, está sendo substituído pelo método de Comassie Blue, também conhecido por método de Bradford (81), que é baseado na interação entre a forma aniônica do

corante G-250 e macromoléculas de proteínas com aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas (figura 3) (82). Este método é rápido e tão sensível quanto o de Lowry e aplicável a diversos meios: plasma ou soro sangüíneo (24, 25), líqüor (28, 29, 83-86), saliva humana (39), produtos alimentícios (61, 87, 88), tecidos de plantas (53, 54), suspensões de células (89-91), avidina e estreptavidina (92), urina (32, 34, 84, 93-95) e detergentes (96). Algumas metodologias usando AIF (85, 97-99), "microtiter plates" (100) e "stopped flow" (101) estão tornando o método mais rápido.

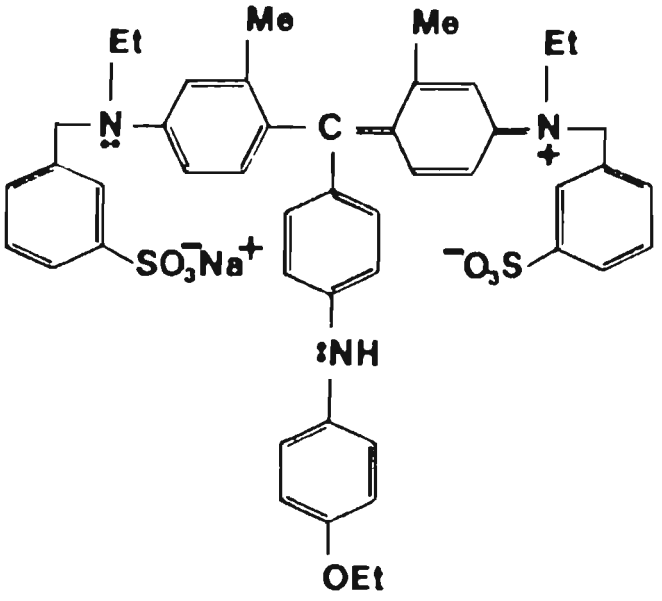
O método de Bradford (81) contudo, apresenta: variação da absortividade específica para diferentes proteínas, devido à pouca solubilização (102, 103) ou baixo peso molecular das mesmas (32, 93-95), fornece resultados nem sempre reprodutíveis devido ao corante e está sujeito a alguns interferentes.

Para tentar tornar mais uniforme a absortividade específica de diferentes proteínas, algumas alternativas foram sugeridas: aumentar a concentração do corante (104); aumentar a solubilização das proteínas que vão reagir com o corante, usando detergentes (34, 84, 89, 91, 105-107), hidróxido de sódio (108) ou fenol (109) e aquecendo com uréia e 2-mercaptoetanol (110). A falta de linearidade na lei de Beer (108, 111) tem sido observada, devido a uma variação do pH quando da adição do reagente BG-250.

Pande e Murthy (90) descrevem que detergentes e lipídeos interferem com o método de Bradford e recomendam a precipitação das proteínas antes da sua determinação analítica. Xu e cols. (73) verificaram sérias interferências por ciclodextrinas. Outros interferentes do método são: taninos, fenóis e polissacarídeos (53, 54, 112), flavanóides e SDS (82).

Um método proposto por Smith e cols. (49), ou também conhecido por método da BCA ("bichinchonic acid method"), se baseia na reação de cobre (II) com proteínas, em meio alcalino, produzindo cobre (I) e formando um complexo com BCA, que absorve fortemente na região de 560

(a)



(b)

ÂNION	OH^- <=> H^+	ESPÉCIE NEUTRA	OH^- <=> H^+	CÁTION
595 nm (azul)		650 nm (verde)		470 nm (vermelho)

(c)

PROTEÍNAS + CBBG → COMPOSTO

(595 nm)

Figura 3. (a) Fórmula estrutural do Comassie Brilliant Blue G-250 (CBBG); (b) formas do CBBG em solução; (c) reação do CBBG com proteínas (82).

nm (figura 4). Este método tem a vantagem de ser tão sensível quanto os métodos de Lowry e cols. (46) e Bradford (81) e ser relativamente rápido, sendo aplicado na determinação da concentração de proteínas totais em saliva (39), proteínas celulares (113), interferons (102) e determinação de grupos funcionais (114). Esta metodologia também tem sido adaptada para a determinação de proteínas totais por AIF (115) e "microtiter plates" (116). Porém, como desvantagens, é muito dependente da temperatura de incubação das amostras (49, 115), apresenta variação da absortividade específica para diferentes proteínas (39, 102, 115) e variação da absorbância com o tempo. Diversas substâncias, tais como: açúcares, quelantes e compostos de enxofre (49, 73, 102, 117), peróxido de hidrogênio (118), lipídeos (119), fenóis (120) e algumas drogas (121) interferem neste método.

Um método baseado na absorção das proteínas na região do ultra-violeta tem sido muito utilizado para quantificação das mesmas em experimentos de purificação e separação de proteínas (122). Este método é baseado no fato de que as proteínas mostram uma absorção na região de 280 nm e outra na região abaixo de 220 nm, sendo que a primeira é devido aos anéis aromáticos de alguns aminoácidos (fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina) e, a segunda, devido à ligação peptídica. Suas principais vantagens são não destruir a amostra e ser rápido, porém, está sujeito a muitos interferentes e é dependente de força iônica e pH (122, 123).

Os métodos acima discutidos são os mais utilizados, porém, como estão sujeitos a limitações, a todo o momento continuam aparecendo, na literatura, modificações das metodologias já existentes, além de propostas de novas metodologias baseadas em compostos do tipo prata-proteína (124, 125), ouro coloidal-proteína (126, 127) e eritrosina B-proteína (128).

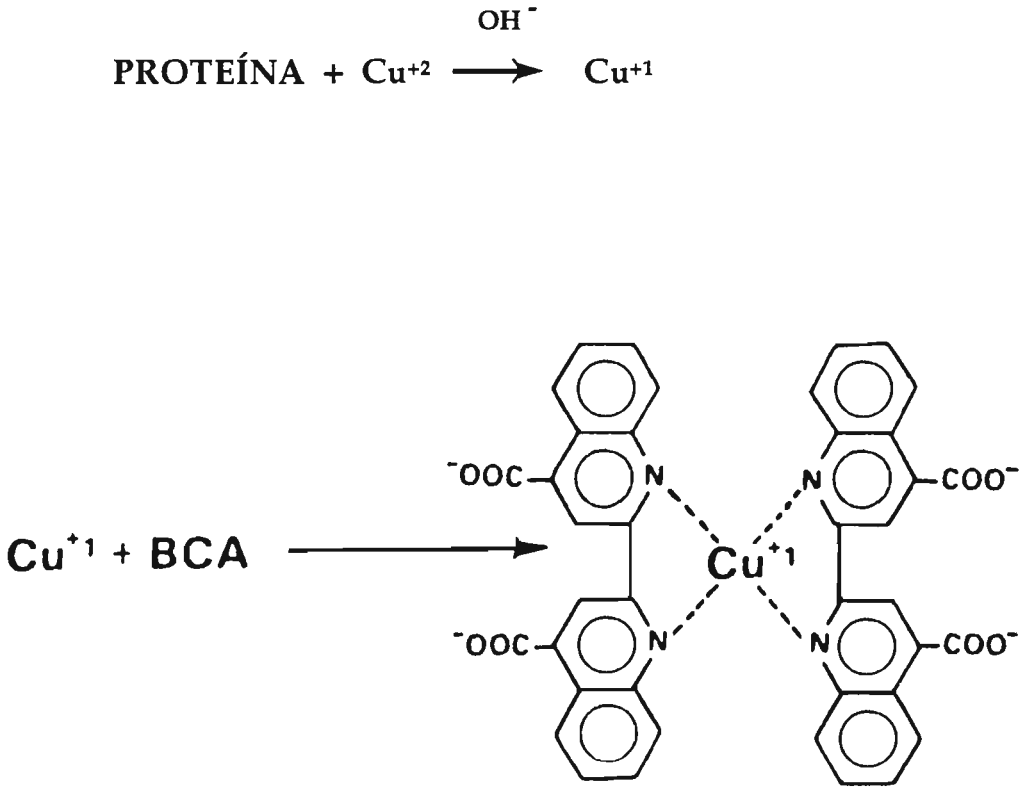


Figura 4. Formação de cobre (I) através da reação de biureto e do complexo púrpuro entre cobre (I) e ácido bichinchonico (BCA) (49).

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E ESPECTROFOTOMÉTRICOS QUANTITATIVOS MAIS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINO GRUPOS LIVRES EM SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

A figura 5 mostra as etapas necessárias para a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), desenvolvida por Merrifield (129, 130). Em cada etapa, o peptídeo que está crescendo sobre a resina deve ter cada aminoácido ligado com um rendimento de acoplamento de pelo menos 99% do valor original de amino grupos livres disponíveis. Alguns métodos analíticos espectrofotométricos e analíticos qualitativos têm sido propostos para monitorar a síntese de peptídeos, sendo os mais utilizados discutidos a seguir.

Gisin (131) propôs um método no qual ácido pícrico e amino grupos livres do peptídeo formam um sal que é deslocado por uma base e determinado espectrofotometricamente (figura 6). Posteriormente, foi utilizado para a determinação de amino grupos em síntese automatizada de peptídeos (132, 133). Apesar de ter a sensibilidade requerida para ser usado em SPFS e ser de fácil realização, o mesmo apresenta um sério inconveniente que é a necessidade de muitas lavagens para retirar o excesso do ácido pícrico.

Um método utilizando cloranil foi proposto por Christensen (134), mas apesar de ser rápido, possuir a sensibilidade requerida e ser sensível para todos os aminoácidos, não se verifica, na literatura, a sua utilização.

Kaiser e cols. (136) desenvolveram um método qualitativo, baseado na reação da ninhidrina (135) que é até hoje o mais utilizado. Este método tem a vantagem de ser rápido e sensível, porém, é pouco sensível à prolina e apresenta resultado falso positivo para histidina. Posteriormente, foi modificado por Sarin e cols. (137) para ser utilizado na determinação quantitativa de amino grupos livres. Na figura 7, observam-se as reações envolvidas.

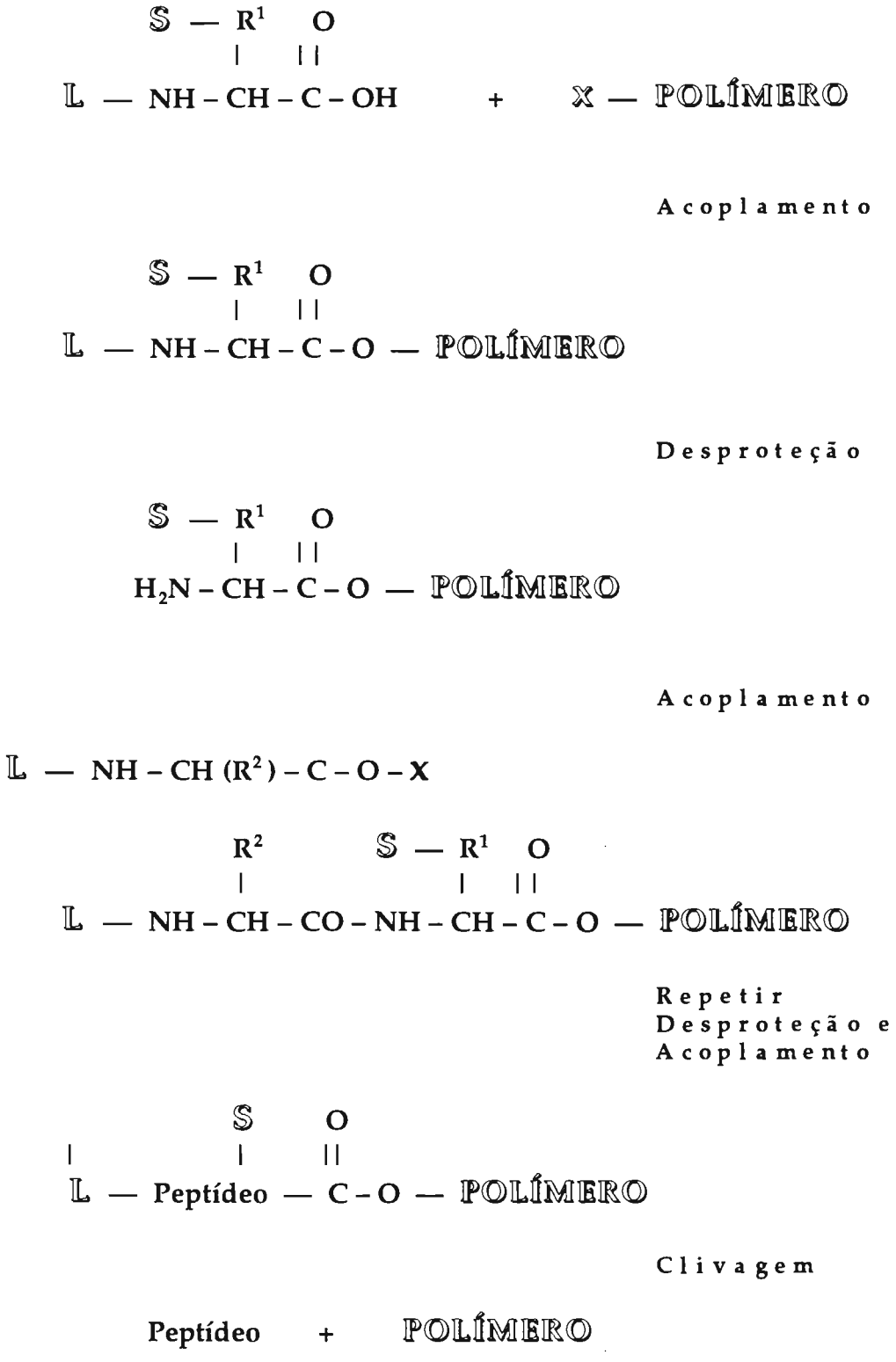


Figura 5. Etapas necessárias para a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (130).

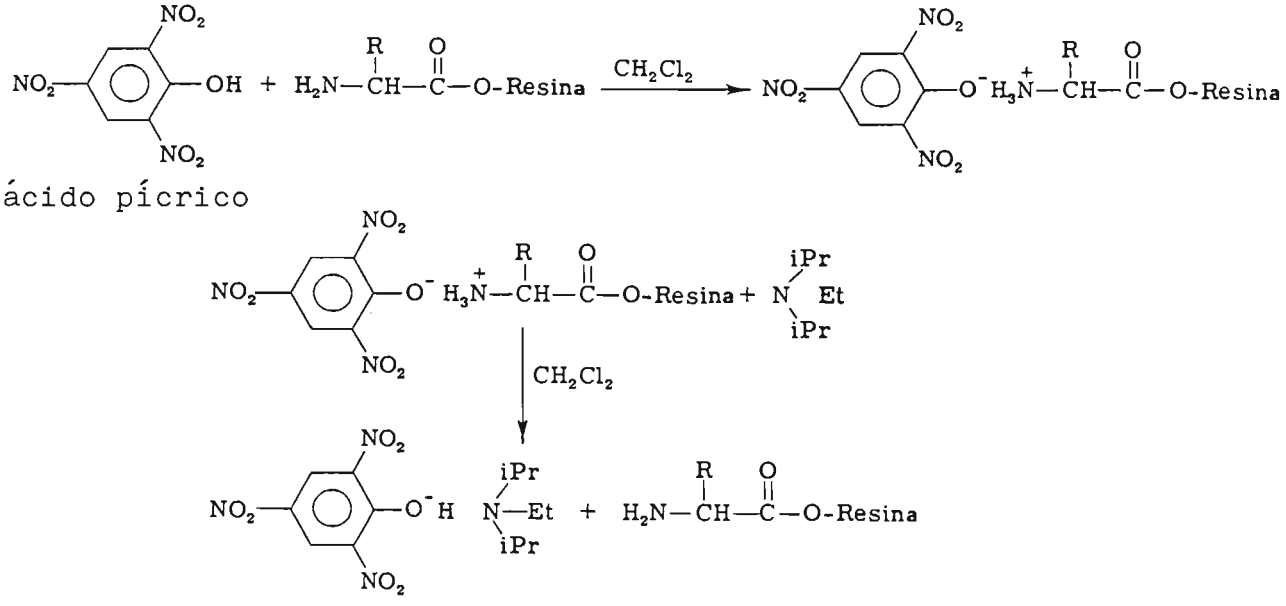


Figura 6. Reações envolvidas na determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) utilizando o ácido pícrico (132).

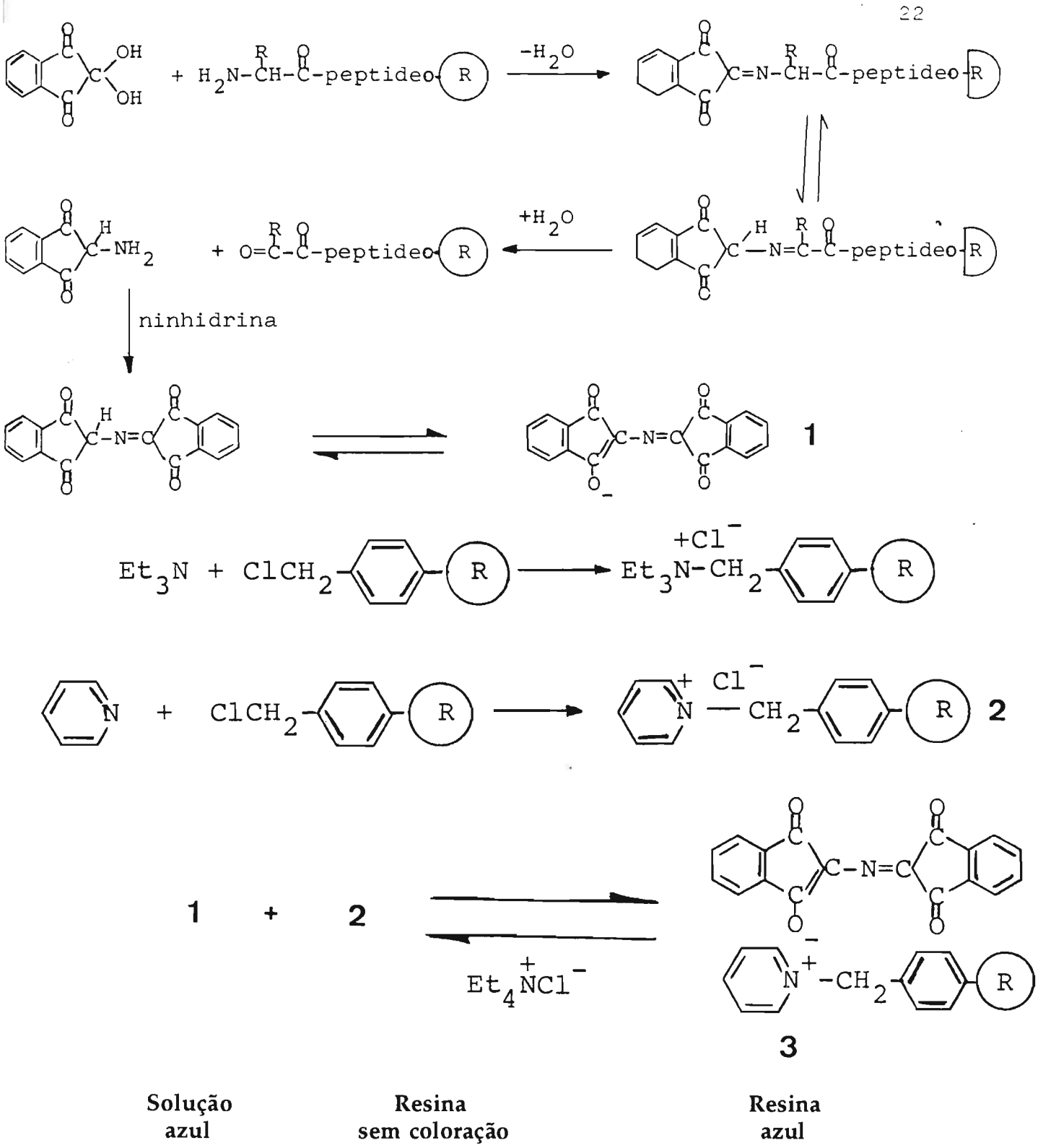


Figura 7. Reações envolvidas na determinação de amino grupos e grupamento livres nas resinas Pam e Merrifield em SPFS utilizando a ninhidrina (137).

USOS FARMACOLÓGICOS E APLICAÇÕES ANALÍTICAS DE QUINONAS

A classe das substâncias chamadas quinonas é definida como "dicetonas cíclicas que, em virtude da sua estrutura, podem se transformar, por meio de redução, em hidroquinonas ou fenóis e por serem altamente conjugadas, têm cor (ex: p-benzoquinona amarela)" (138).

Muitas quinonas são utilizadas para a determinação analítica de diversas substâncias em diversos meios e algumas quinonas desempenham importantes papéis nos organismos vivos, sendo, portanto, importante a determinação analítica das mesmas.

Na literatura estão descritas determinações analíticas de quinonas que agem como vitaminas (139, 140), drogas anticancerígenas, antimaláricas (141-143) e antidiarréicas (144), assim como métodos de determinação de quinonas em geral (145, 146).

Algumas quinonas são utilizadas nas determinações analíticas de drogas e metabólitos, tais como: adrenalina (147), drogas cardiovasculares (148), drogas usadas no tratamento do hipotireoidismo (149), antimicrobianos antibióticos (150-152), antimicrobianos quimioterápicos (153, 154) e anfetaminas (155-158). Outras são utilizadas para a determinação de metais em diversos meios: magnésio em água potável e plasma sangüíneo (159) e amostras sem aplicação específica (160-162); molibdênio em tecidos vegetais (163); vanádio em água do mar (164); titânio em amostras geoquímicas e ligas metálicas (165); alumínio em água do mar (166); e paládio em amostras sintéticas de minérios (167).

Quinonas são também utilizadas para a determinação de: aminas alifáticas primárias e secundárias (158, 168); poluentes atmosféricos devido a aminas (169) e aminas aromáticas (170); aminoácidos em plasma sangüíneo e em urina (171, 172); proteínas (173); determinação simultânea de aminoácidos e proteínas (174); compostos orgânicos bromados e iodados (175); cianeto (176);

dióxido de cloro em água potável (177); além de indicador eletroquímico indireto em CLAE para aminas (178); e como pré-concentrador de metais (179).

A produção de quinonas em diversas reações bioquímicas é utilizada para fins analíticos, como por exemplo, para medir a oxidação de glicose (180) ou a concentração de glicose (181) através de um eletrodo feito de glicose oxidase-benzoquinona-pasta de carbono.

Hasebe e cols. (182) determinaram, espectrofotometricamente, catecol e diversas catecolaminas (L-dopa, dopamina, noradrenalina e adrenalina) baseado no fato de que polifenóis são enzimaticamente convertidos a ortoquinonas pela tirosinase e são quimicamente regenerados a fenóis pelo ácido ascórbico; este ciclo provoca um aumento do pH que pode ser medido, em espetrofotômetro, com azul de bromotimol. Rzpecki e Waite (183) utilizaram a reação entre prolina e quinonas, que é produto de reação de catecóis, para a determinação de catecoloxidases. Roy e Archibald (184) descreveram um método para a determinação de quinona oxiredutase.

A maioria das metodologias acima citadas utiliza a espectrofotometria UV-Vis (144-158, 165, 167-172, 175, 177, 182-184), algumas utilizam a fluorometria (140, 142, 143, 152, 156, 159-163, 176) e metodologias eletroanalíticas também são descritas (164, 166, 177, 180, 181).

Na presente tese utilizamos a p-benzoquinona (PBQ), via espectrofotometria, para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios e para monitorar a quantidade de amino grupos livres em SPFS. Devemos ressaltar, no entanto, que PBQ já foi anteriormente utilizada para diversos fins analíticos, tais como: determinação de tiroxina (149), cicloserina (152), antimicrobianos à base de sulfa (154), aminas primárias e secundárias (168), aminas aromáticas (170), aminoácidos (171, 172), cianeto (176) e determinação simultânea de aminoácidos e proteínas (174).

MECANISMOS DE REAÇÃO PROPOSTOS ENTRE QUINONAS E AMINAS, AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

A interação entre quinonas e aminas, aminoácidos e proteínas é objeto de controvérsia na literatura. Slifkin (185) e Birks e Slifkin (186), sugerem a formação de um complexo de transferência de carga (CTC), no qual ocorre uma transferência de carga do par de elétrons **n** do doador nitrogênio, para o aceptor quinona. A transferência de carga ocorre mesmo estando quase todo o aminoácido na forma zwitteriônica e em pH 7,0, porém, cerca de 1,0 % do aminoácido é neutro e age como uma amina primária. A forma positivamente carregada do nitrogênio não é apropriada para o complexo de transferência de carga em pH na região alcalina.

Birks e Slifkin (186) observaram que a reação entre cloranil e diversas proteínas ocorre em pH alcalino, mas não em pH neutro ou ácido. Em pH básico ocorre aumento da velocidade de reação provavelmente por facilitar a desnaturação das proteínas expondo os grupos amínicos, os quais podem estar neutros favorecendo a formação de CTC.

Foster (187), dentre outros, discorda da formação de CTC e propõe a formação de quinonas mono e dissubstituídas dependendo da relação aminoácido/quinona. Hassan e cols. (168) e Iskander e cols. (170), estudando a reação de PBQ e aminas alifáticas primárias e secundárias e aminas aromáticas, respectivamente, isolaram compostos mono e dissubstituídos. Hassan e cols. (168) propuseram um mecanismo de reação entre a piperidina e PBQ (figura 8) e Iskander e Medien (172), isolando compostos monossubstituídos da reação entre PBQ e aminoácidos, propuseram um mecanismo de reação (figura 9). Segundo diversos autores, a formação de compostos mono ou dissubstituídos depende da relação de concentração entre as substâncias envolvidas (ex. PBQ/amina).

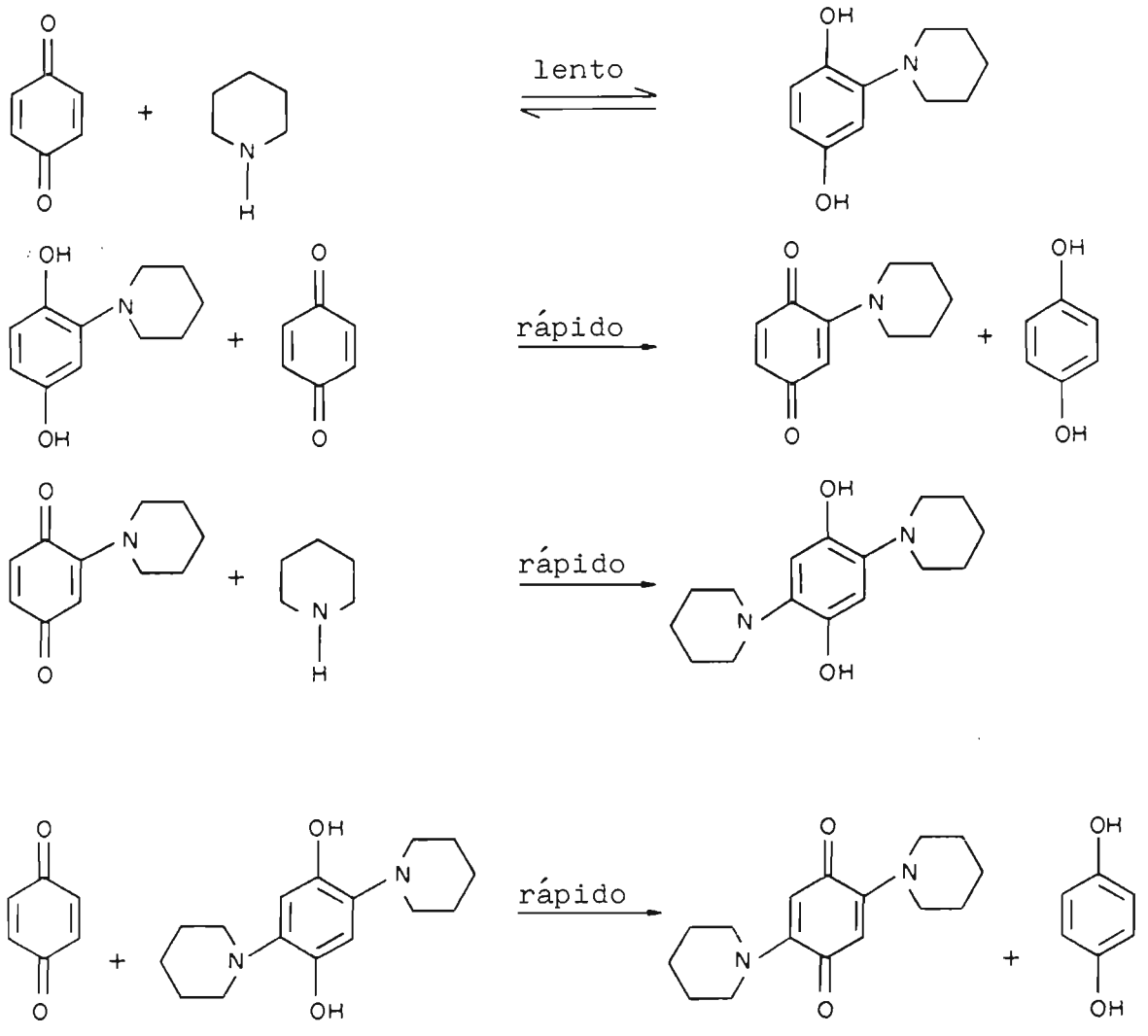


Figura 8. Mecanismo de reação entre p-benzoquinona e piperidina (168).

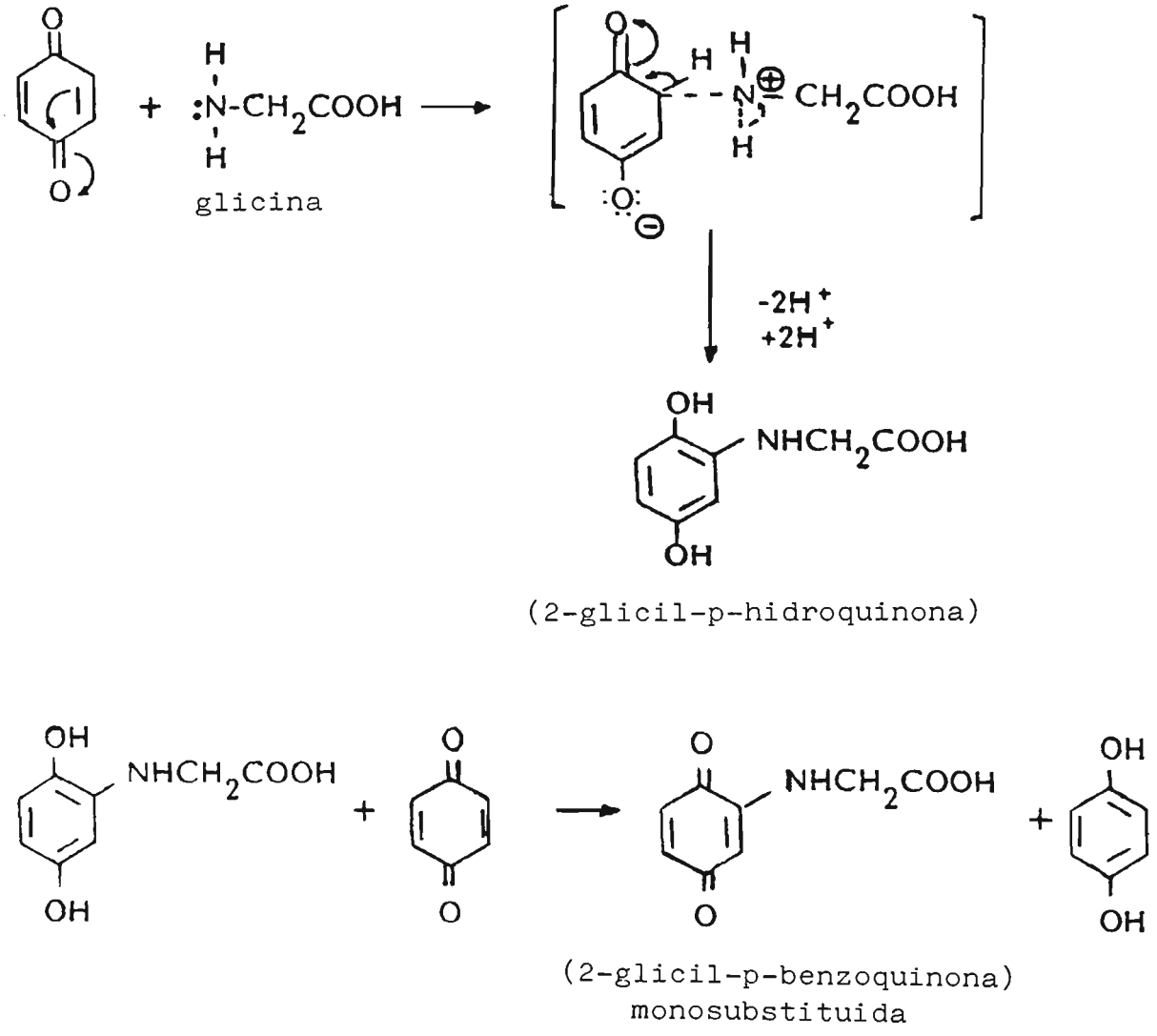


Figura 9. Mecanismo de reação entre p-benzoquinona e glicina (172).

Apesar de todas as evidências experimentais, Slifkin (185) e outros sugerem a formação de CTC e, dependendo das condições de reação (pH, aquecimento, concentração relativa dos reagentes, etc.), a posterior transformação deste composto numa quinona mono ou dissubstituída.

A reação entre quinonas e aminas, aminoácidos ou proteínas pode, portanto, resultar em complexo de transferência de carga (CTC), compostos mono ou dissubstituídos e compostos chamados bases de Schiff. Porém, os mecanismos envolvidos nestas reações não estão ainda bem estabelecidos necessitando-se maiores estudos.

Na presente tese, também utilizamos a PBQ para identificar amino grupos livres em SPFS, já que a PBQ e aminoácidos reagem em estado sólido (188) formando compostos púrpuros que se tornam marrons, sendo o provável mecanismo a formação de um radical livre, como mostrou o sinal de EPR, e em seguida a decomposição para quinonas substituídas ou CTC (figura 10).

METODOLOGIAS PROPOSTAS NO PRESENTE TRABALHO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E DETERMINAÇÃO DE AMINO GRUPOS LIVRES EM SPFS

A presente tese propõe metodologias utilizando a PBQ para determinar a concentração de proteínas totais em leite em pó desnatado, plasma sangüíneo e em diversos tecidos de rato, considerando o mecanismo proposto por Slifkin (185), onde a reação entre quinonas e aminas ou aminoácidos é uma reação de CTC cujos elétrons dos amino grupos seriam utilizados pelas quinonas para formar o complexo. Todas as metodologias propostas foram comparadas com as recomendadas ou com as mais utilizadas.

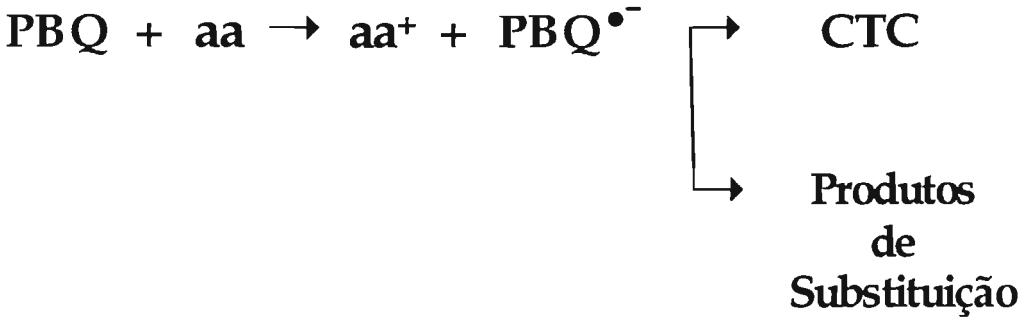


Figura 10 Mecanismo de reação entre p-benzoquinona e aminoácido em estado sólido (188).

Para determinar a concentração de proteínas totais em diversos tecidos de rato, o método da PBQ foi comparado com o método de Lowry e cols. (46) modificado por Hartree (69) e com o FFDW (free fat dry weight) (189). Para determinar a concentração de proteínas totais em plasma sangüíneo, o método proposto foi comparado com o método de biureto (22), que é o recomendado pela Associação Americana de Análises Clínicas (23, 24, 42). O método desenvolvido para determinar a concentração de proteínas totais em leite em pó desnatado foi comparado com os métodos de Kjeldahl (13, 190) e de Lowry e cols. (46). Para a determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) o método da PBQ foi comparado com o mais utilizado, que é baseado na reação de Kaiser e cols. (136).

OBJETIVOS

A presente tese teve por objetivos:

a) desenvolver metodologia para a determinação de proteínas totais em várias matrizes;

b) aplicar a metodologia desenvolvida na determinação de proteínas totais em diversas matrizes;

c) comparar a metodologia desenvolvida nas matrizes com as metodologias recomendadas ou mais utilizadas;

d) desenvolver uma metodologia para a determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS);

e) comparar a metodologia desenvolvida com a metodologia mais utilizada na determinação de amino grupos livres em SPFS.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM PLASMA SANGÜÍNEO

MATERIAIS

EQUIPAMENTOS:

Foi utilizado o espectrofotômetro Varian UV-Vis DMS-80 para obtenção dos espectros e o espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 100-02 para as determinações analíticas.

SOLUÇÕES:

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em plasma sangüíneo pelo método da p-benzoquinona (PBQ) :

- **proteínas:** padrões contendo 1,500 g/l das proteínas albumina de soro bovino (BSA, fração V, INLAB, São Paulo), ovoalbumina (OA, grau II, Sigma), tripsina (tipo I, Sigma), caseína (tipo Hammarsten, Merck), albumina de soro humano (HSA, fração V, Sigma) e pepsina (Sigma) foram usados.

- **p-benzoquinona (PBQ):** foi preparada, em dimetil sulfóxido, uma solução 0,1 M de PBQ (Riedel, Hannover, GE) (purificada por sublimação), podendo ser utilizada por no máximo uma semana. Cuidado foi tomado com a sublimação de PBQ, pois exposição crônica ao seu vapor pode causar danos à córnea.

- **interferentes:** como interferentes no método da PBQ foram estudados o citrato de sódio, a heparina e o ácido etilenodiamintetraacético (EDTA), que são usados como anticoagulantes do sangue. Foram usados heparina em solução aquosa (Liquemine 50 mg/mL, Roche, Rio de Janeiro, RJ), e soluções de EDTA e citrato de sódio 1,000 g/L (Reagen, Rio de Janeiro, RJ) preparadas em água destilada. Momentos antes do uso, as soluções foram diluídas em água destilada em diversas concentrações.

- **tampão:** foi usada uma solução 0,1 M de fosfato (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4), pH 6,0 como tampão.

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em plasma sangüíneo pelo método de biureto (22):

- **reagente de biureto:** foram dissolvidos 3,00 g de sulfato de cobre penta-hidratado em cerca de 500 mL de água destilada e adicionados 9,0 g de tartarato de sódio e potássio e 5,0 g de iodeto de potássio. Após a solução estar clara, foram adicionados 100 mL de hidróxido de sódio e completado o volume para 1 litro com água destilada.

- **proteína:** albumina de soro bovino (BSA, fração V, INLAB, São Paulo), contendo 20 g/L foi preparada com água destilada.

MÉTODOS

Amostras de plasma sangüíneo:

Foram utilizados 40 ratos machos, adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 220 g. Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, foram mantidos no Biotério do

Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas individuais, em ambiente de temperatura (23°C) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas e com livre acesso ao alimento (ração comercial Purina) e à água. Os ratos foram sacrificados por decapitação, o sangue foi colhido em tubos contendo heparina (0,2 mg/mL de concentração final) e imediatamente centrifugado (3.000 r.p.m., por 30 minutos). Todo o plasma obtido foi separado em alíqüotas de 0,5 mL e armazenado a -18°C até utilização.

Método de Biureto (22):

Foram transferidos 100 µL de plasma para um tubo de ensaio e adicionados 900 µL de água destilada. Uma alíqüota de 200 µL desta solução foi transferida para outro tubo e 4,0 mL do reativo de biureto adicionados. A curva padrão foi preparada pela diluição de BSA (20,0 g/L) nas concentrações 0,0; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g/L, com volume final de 4,2 mL, após a adição do reativo de biureto. As amostras foram mantidas, por 20 minutos, em temperatura ambiente e as leituras feitas em 560 nm contra o branco (0,0 g/L).

Método da PBQ:

Foram transferidos 100 µL de plasma para um tubo de ensaio e 1,0 mL de tampão fosfato (pH 6,0) foi adicionado. Alíqüota de 100 µL desta solução foi transferida para outro tubo de ensaio e o volume completado para 5,0 mL com tampão fosfato (pH 6,0). A curva padrão foi preparada pela diluição de albumina de soro bovino (1,500 g/L) com tampão fosfato (pH 6,0) nas concentrações de 0, 60, 120, 180 e 240 µg/mL, sendo 5,0 mL o volume final para cada tubo. Foram adicionados 50 µL do reagente PBQ (0,1 M) em todos os tubos, os quais foram agitados, cobertos com pérolas de vidro e aquecidos em banho-maria, por 20 minutos, a 100°C. Após resfriamento, na temperatura ambiente, as leituras foram feitas em 350 nm contra o branco (0,0 µg/mL).

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM DIVERSOS TECIDOS DE RATO

MATERIAIS

EQUIPAMENTOS:

Os espectros foram obtidos com o espectrofotômetro Varian UV-UV-Vis 100-02. Centrífugas: Incibras, model spin VI e Sorvall e homogeneizador de tecidos.

SOLUÇÕES:

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato pelo método da p-benzoquinona (PBQ):

- **proteínas:** solução padrão de 1,500 g/L de albumina de soro bovino foi preparada em água destilada.

- **p-benzoquinona (PBQ):** foi preparada, em dimetil sulfóxido, uma solução 0,1 M de PBQ (Riedel, Hannover, GE) (purificada por sublimação), podendo ser utilizada por no máximo uma semana. Cuidado foi tomado com a sublimação de PBQ, pois exposição crônica ao seu vapor pode causar danos à córnea.

- **tampão:** uma solução 0,2 M de fosfato (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4), pH 6,5, foi usada como tampão.

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato pelo método de Lowry (46) modificado por Hartree (69):

- **solução A:** foram pesados 2,0 g de tartarato de sódio e potássio e 100 g de carbonato de sódio e dissolvidos em 500 mL de hidróxido de sódio 1,0 M; a solução foi diluída para 1.000 mL com água destilada. A solução deve ser armazenada em frasco de polietileno e à temperatura ambiente.

- **solução B:** foram pesados 2,0 g de tartarato de sódio e potássio e 1,0 g de sulfato de cobre penta-hidratado, dissolvidos em 90 mL de água destilada e 10 mL de hidróxido de sódio 1 M foram adicionados. A solução deve ser armazenada em frasco de polietileno e à temperatura ambiente.

- **solução C:** foi diluído, um pouco antes do início da análise, 1 volume do reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma) com 15 volumes de água destilada. Esta solução contem entre 0,15 e 0,18 M de ácido, quando titulada até pH 10 com hidróxido de sódio 1,0 M. Caso a concentração de ácido ultrapasse 0,18 M, a mesma deve ser ajustada com hidróxido de sódio.

- **proteína:** albumina de soro bovino (BSA, fração V, INLAB, São Paulo), contendo 0,10 g/L foi preparada com água destilada.

MÉTODOS

Homogeneização dos tecidos:

Os ratos foram sacrificados por decapitação, removendo-se: coração, fígado, rim esquerdo, baço, todo o cérebro, músculo gastrocnêmio e tecido gorduroso epididimal. Os tecidos foram homogeneizados em solução salina fria (4°C) na proporção de 1/10 (massa/volume), usando um

homogeneizador de alta velocidade. As amostras foram subdivididas, sendo uma parte centrifugada em baixa velocidade de rotação (2.000 r.p.m.) e a outra em alta velocidade de rotação (18.000 r.p.m.), por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante separado em alíqüotas, com pipeta Pasteur, armazenadas em tubos Eppendorf de 0,5 mL a -18°C até o uso.

Determinação de proteínas totais pelo método de FFDW (free fat dry weight) (189):

O material graxo foi extraído do tecido e o peso seco medido foi considerado como a quantidade de proteínas totais do tecido. Para extrair o material graxo, acetona e éter etílico foram usados. Acetona a 4°C foi adicionada ao tecido homogeneizado, na proporção de 10 mL de homogeneizado de tecido e 67 mL de acetona, sendo a mistura agitada por 10 minutos. O precipitado formado foi sedimentado por centrifugação, a 2.000 r.p.m., por 10 minutos, a 4°C. A acetona foi cuidadosamente retirada com uma pipeta Pasteur e o sedimento foi homogeneizado e extraído mais duas vezes, sendo uma das extrações com acetona e outra com éter etílico. O precipitado foi seco em estufa a 60°C até peso constante.

Determinação de proteínas totais pelo método de Lowry modificado por Hartree (69):

Para os tecidos fígado, rim, baço, coração, músculo gastrocnêmio e cérebro, 100 µL dos homogeneizados foram diluídos para 1 mL com água destilada e uma alíqüota de 100 µL foi utilizada para a análise; para gordura epididimal foram utilizados 20 µL sem diluição. Todas as amostras foram posteriormente diluídas para 1 mL com água destilada e 0,9 mL da solução A foi adicionado. Os tubos foram colocados em banho-maria, a 50°C, por 10 minutos, e depois resfriados em temperatura ambiente; então 0,1 mL da solução B foi adicionado; após repouso por 10 minutos, foram adicionados 3,0

mL da solução C e os tubos aquecidos em banho-maria, a 50°C, por 10 minutos. As amostras foram resfriadas e as absorbâncias lidas em 650 nm, contra o branco (0,0 g/L), em cubetas de 1 cm de caminho ótico. A curva padrão foi preparada com BSA nas concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μg/mL e submetidas aos mesmos procedimentos das amostras.

Determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato pelo método da p-benzoquinona:

Para a gordura epididimal foram usados 100 μL do homogeneizado e para todos os outros tecidos foram utilizados 25 μL dos homogeneizados; a seguir o volume foi completado para 5,0 mL com tampão fosfato (pH 6,5). A curva padrão foi preparada pela diluição de albumina de soro bovino (1,500 g/L) com tampão fosfato (pH 6,5) nas concentrações de 0, 30, 60, 90 e 120 μg/mL, sendo 5,0 mL o volume final para cada tubo. Foi adicionado 50 μL do reagente PBQ (0,1 M) em todos os tubos os quais foram agitados, cobertos com pérolas de vidro e aquecidos em banho-maria, por 20 minutos, a 100°C. Após resfriamento, à temperatura ambiente, as leituras foram efetuadas em 350 nm contra o branco (0,0 μg/mL).

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM LEITE EM PÓ DESNATADO

MATERIAIS

EQUIPAMENTOS:

Os espectros foram obtidos com o espectrofotômetro Varian UV-Vis DMS-80 e as determinações analíticas com o espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 100-02.

SOLUÇÕES:

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método da p-benzoquinona:

- **proteínas:** uma solução de 0,5 g/L de caseína (Riedel) foi preparada em água deionizada e usada como padrão em todas as determinações analíticas espectrofotométricas.

- **p-benzoquinona:** p-benzoquinona (PBQ) (Riedel, Hannover, GE) foi purificada por sublimação e uma solução 0,1 M da mesma foi preparada em dimetil sulfóxido, podendo ser esta utilizada por uma semana no máximo. Cuidados devem ser tomados com a sublimação de PBQ, pois exposição crônica ao seu vapor pode causar danos à córnea.

- **tampão:** soluções 0,2 M de fosfato (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) combinados , com pH 6,0 e 6,5, foram usados como tampões.

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método de Lowry (46):

- **proteínas:** uma solução de 0,10 g/L de caseína (Riedel) foi preparada em água deionizada e usada como padrão em todas as determinações analíticas espectrofotométricas.

- **solução A:** uma solução 2,0 % de carbonato de sódio foi preparada em 0,10 M de hidróxido de sódio.

- **solução B:** uma solução 0,5 % de sulfato de cobre penta-hidratado foi preparada em 1,0 % de tartarato de sódio ou potássio.

- **solução C:** 50 mL da solução A foi misturado com 1,0 mL da solução B (solução válida por 1 dia).

- **solução D:** foi preparado pela diluição (2 vezes) do reagente de Folin-Ciocalteau (sigma).

Soluções utilizadas para a determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método de Kjeldahl (190):

- **solução padrão de hidróxido de sódio (0,10 M):** foram dissolvidos 4,0 g de hidróxido de sódio em 200 mL de água destilada previamente fervida e completado o volume para 1 litro. Esta solução foi padronizada com a solução padrão de ácido clorídrico no dia do uso e sempre mantida em frasco de polietileno.

- **solução padrão de ácido clorídrico:** foram adicionados 6,2 mL de ácido clorídrico concentrado P.A. em 200 mL de água destilada e o volume completado para 1 litro. A solução foi padronizada com carbonato de sódio previamente seco a peso constante.

- **solução 30 % de hidróxido de sódio:** foram dissolvidos 30 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada e a solução mantida em frasco de polietileno.

- **solução 0,6 M de tiossulfato de sódio:** foram dissolvidos 9,5 g de tiossulfato de sódio em 200 mL de água destilada e o volume completado para 1 litro.

MÉTODOS

Determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método da p-benzoquinona (curva padrão):

Foi preparada uma solução de 0,5 g/L de leite em pó desnatado em tampão fosfato (pH 6,0) e 3,0 mL transferidos para balão volumétrico de 10 mL e completado o volume com tampão. As concentrações de caseína da curva padrão foram: 0; 25; 50; 100; 150; 200 e 250 µg/mL. Foram transferidos 3,0 mL de cada ponto da curva padrão e da amostra problema para tubos de ensaio e 20 µL de PBQ (0,1 M) adicionados; os tubos foram selados, aquecidos a 100°C, por 10 a 20 minutos, resfriados e a leitura das absorbâncias feita em 350 nm contra o branco (0,0 µg/mL de caseína).

Determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método da p-benzoquinona (adição de padrão):

Foi preparada uma solução de 0,5 g/L de leite em pó desnatado, em tampão fosfato (pH 6,0), seis alíqüotas de 3,0 mL desta transferidas para seis balões volumétricos de 10 mL, adicionado caseína nas concentrações de 0; 25; 50; 75; 100 e 125 µg/mL e o volume completado com tampão fosfato. Foram retirados 3,0 mL de cada solução, colocados em tubos de ensaios (3,0 mL de tampão fosfato foi usado como branco), adicionados, em cada tubo, 20 µL de PBQ (0,1 M), selados, aquecidos a 100°C, por 10 minutos, resfriados e a leitura feita em 350 nm contra o branco (0,0 µg/mL de caseína).

Determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método de Lowry (46):

Foi preparada uma solução de 0,500 ou 1,000 g/L de leite em pó desnatado em água destilada, 100 µL desta solução pipetados para um tubo de ensaio, adicionado 1,0 mL da solução C, misturado, deixado em repouso por

10 minutos à temperatura ambiente, 100 µL da solução D adicionados, misturado e deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. As concentrações de caseína da curva padrão foram: 0,0; 25; 50; 75 e 100 µg/mL. As leituras foram feitas em 650 nm contra o branco (0,0 µg/mL de caseína).

Determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado pelo método de Kjeldahl (190):

Foi pesado 1,000 g de leite em pó desnatado, colocado no frasco de digestão, adicionado 0,5 g de sulfato de cobre, 15 g de sulfato de potássio e 25 mL de ácido sulfúrico, misturado, aquecido por 2 h e esfriado; 25 mL de tiossulfato 0,6 M, em 200 mL de hidróxido de sódio, foram adicionados (balão sempre mantido em banho de gelo), o frasco conectado imediatamente ao sistema de destilação (a saída do condensador sempre mantida imersa em 200 mL da solução padrão de ácido clorídrico), agitado e o aquecimento iniciado. Foram colocadas de 5 a 7 gotas de indicador vermelho de metila na solução padrão de ácido clorídrico. Amônia foi destilada até o volume mínimo de 150 mL e o excesso de ácido titulado com a solução padrão de hidróxido de sódio.

MATERIAIS E MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINO GRUPOS LIVRES EM SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

MATERIAIS

EQUIPAMENTOS:

Espectrofotômetro UV-Vis Kontroy, placa de aquecimento e Shaker para síntese foram utilizados.

REAGENTES E SOLUÇÕES:

Reagentes utilizadas para a determinação de aminogrupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pelo método da p-benzoquinona (PBQ):

- **quinonas:** p-benzoquinona (PBQ) [Matheson Coleman e Bell] e 2,6 dicloro-p-benzoquinona (2,6 dicloro-PBQ) [Eastman Kodak Company] foram purificadas por sublimação. As quinonas: 2,5 dicloro-p-benzoquinona (2,5 dicloro-PBQ) [Kodak]; tetracloro-p-benzoquinona (p-cloranil) [Sigma]; 2,5 dicloro-o-benzoquinona (o-cloranil) [Sigma]; indole-2,3 diona (isatin) [Sigma] e benz(a)antraceno-7,12 diona [Kodak] foram usadas sem prévia purificação.

Reagentes e soluções utilizadas para a síntese de peptídeos estudados (130):

- **resina:** 4 metil benzilhidralamino (MBHA) adquirida da Bachem (Califórnia)

- **Boc-aminoácidos:** ter-butiloxicarbonil-aminoácidos (Boc-AA) adquiridos da Peptide Institute Inc., sendo eles: Boc-Ala-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Arg (Tos)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-His (Tos)-OH, Boc-Asp (OcHex)-OH e Boc-Met-OH.

- **Fmoc-aminoácidos:** 9-fluorenil-metoxicarbonil-aminoácidos (Fmoc-AA) adquiridos da Peptides International, sendo eles: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Arg (Tos)-OH, Fmoc-Asp (oBzl)-OH; e Fmoc-Pro-OH adquirido da Bachem (Califórnia).

- **solução de ácido trifluroacético (TFA):** solução 50% TFA/50% diclorometano (V/V) utilizada para remover o grupo BOC.

- **solução de ácido acético anidro:** solução 50% ácido acético anidro/50% piridina (V/V) utilizada para acetilação.

- **solução de piperidina:** solução 50% de piperidina/50% de dimetilformamida (V/V) utilizada para remoção do grupo Fmoc.

- **solução de diisopropiletilamina:** uma solução 5% de diisopropiletilamina foi preparada com diclorometano.

Soluções utilizadas para a determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pelo método da ninhidrina (137):

- **solução 1:** foram misturados 40 g de fenol com 10 mL de etanol, aquecido até dissolver, adicionados 4 g de resina Amberlite MB-3, a solução agitada por 45 minutos e filtrada.

- **solução 2:** foram dissolvidos 65 mg de cianeto de potássio em 100 mL de água. Foram diluídos 2 mL da solução de cianeto de potássio para 100 mL com piridina, adicionados 4 g de resina Amberlite MB-3, a solução agitada por 45 minutos e filtrada.

- **solução a:** as soluções 1 e 2 foram misturadas.

- **solução b:** foram dissolvidos 2,5 g de ninhidrina em 50 mL de etanol absoluto e a solução armazenada em frasco âmbar.

MÉTODOS

Metodologia utilizada na preparação das amostras de Boc-aminoácido (Boc-AA) e Fmoc-aminoácidos-Resina (Fmoc-AA-Resina) e peptídeos-Resina (130):

No preparo das amostras de Boc-AA e Fmoc-AA-Resina foi utilizada a resina MBHA (0,5 g, 650 μmoles/g de resina), que foi colocada em um frasco apropriado (15 mL) para SPFS e o mesmo fixado num "shaker", utilizando-se para o acoplamento as misturas de Boc-AAs e Fmoc-AAs, como segue: Boc-AA; Boc-AA(10 eq) e Fmoc-AA(1 eq); Boc-AA(100 eq) e Fmoc-AA(1 eq); Boc-AA(100 eq) e Fmoc-AA(0.5 eq) na resina. No caso da síntese dos peptídeo-Resina também foi utilizada a resina MBHA (650 μmoles/g de resina), mas variando a massa de acordo com o peptídeo a ser sintetizado. Em todos os casos, foi utilizada, para o acoplamento, a seguinte relação equimolar: 2,5 AA: 2,5 DCC: 2,5 HOBt, considerando a quantidade de amino grupos livres da resina igual a um. A utilização da mistura DCC/HOBt tem mostrado uma aceleração das reações evitando a racemização (130).

Os acoplamentos foram realizados em diclorometano (DCM) ou misturas de DCM/DMF (dimetilformaamida) dependendo da solubilidade do aminoácido a ser acoplado. Foram efetuados dois acoplamentos de duas horas cada, porém para alguns aminoácidos (Val, Thr, Ile) foi necessário um maior número de acoplamentos. Os aminoácidos acima citados são β-ramificados, o que provoca impedimento estérico dificultando o acoplamento (130).

A tabela 1 mostra o esquema usado para acoplar, lavar e neutralizar o peptídeo-Resina, assim como para retirar o grupo Boc no caso da síntese dos peptídeos-Resina mostrados na tabela 10. Após cada acoplamento e lavagem do peptídeo-Resina, o teste da ninhidrina, desenvolvido por Kaiser e cols. (136, 137), foi utilizado para verificar se algum grupamento amino permanecia livre. Para a síntese de Boc-AA e Fmoc-AA-Resina (tabela 9), as etapas de 1 a 5 foram seguidas e, em caso de teste de ninhidrina positivo,

TABELA 1

Procedimento utilizado para a síntese de Boc-AA e Fmoc-AA-Resina e peptídeo-Resina.

Etapa	Procedimento	Nº de vezes	Tempo (minutos)
1	Acoplamento; AA 2,5/DCC 2,5/HOBt 2,5	1	120
2	lavar com DCM	3	1
3	lavar com propanol-2	2	1
4	lavar com DCM	5	1
5	teste da ninhidrina	–	–
6	retirar grupo Boc; 50 % TFA/50 % DCM	1	1
7	retirar grupo Boc; 50 % TFA/50 % DCM	1	24
8	lavar com DCM	2	1
9	lavar com metanol	2	1
10	lavar com DCM	2	1
11	lavar com metanol	2	1
12	lavar com DCM	2	1
13	neutralizar com 5 % de DIEA em DCM	3	3
14	lavar com DCM	1	1
15	lavar com metanol	1	1
16	lavar com DCM	3	1

DCM: diclorometano; TFA: ácido trifluroacético; DIEA: diisopropiletilamino; DCC: N, N' diciclohexilcarbodiimida; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; AA: aminoácido; Boc: terc-butiloxicarbonil; Fmoc: N, α-fluorenilmetiloxicarbonil; R: 4-metil-benzilidralamina (MBHA).

executadas as etapas de 13 a 16 e, mais uma vez, as etapas de 1 a 5. Para a síntese dos peptídeos-Resina da tabela 10, após cada acoplamento (etapa 1), e teste de ninhidrina positivo, foram feitas as etapas de 13 a 16 voltando à etapa 1, porém, se negativo, repetidas as etapas de 6 a 16 e então para a etapa 1 com o novo aminoácido a ser ligado ao peptídeo-Resina. A resina, em todos os casos, passou por um tratamento prévio antes do primeiro aminoácido ser ligado à mesma, isto é, foi submetida às etapas de 6 a 16.

Acetilação das amostras Fmoc-AA e Boc-AA-Resina (130):

No caso do preparo destas amostras, mesmo com teste de Kaiser e cols. (136, 137) negativo, a acetilação foi feita utilizando o esquema mostrado na tabela 2. Todas as amostras mostradas na tabela 9 foram submetidas à acetilação, que foi efetuada no frasco onde a amostra foi sintetizada.

Retirada do grupo Fmoc, das amostras Fmoc-AA e Boc-AA-Resina (130):

Após a acetilação, foi retidado o grupamento Fmoc das amostras da tabela 9, conforme protocolo mostrado na tabela 3. O procedimento foi realizado no mesmo recipiente em que a amostra foi sintetizada e acetilada, sendo esta uma das grandes vantagens da técnica de SPFS, pois não é necessário transferir as amostras de um recipiente para outro e, portanto, não há perda da amostra. Após este procedimento, as amostras foram secadas a vácuo, por 12 h, e armazenadas em câmara fria para futuro uso.

Determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pelo método da p-benzoquinona:

Foram pesados em torno de 4 a 6 mg de peptídeo-Resina e colocados em tubo de ensaio de 10 x 75 mm. Foram adicionados 15 mg de PBQ misturando com uma espátula e aquecendo, a 100°C, por 20 minutos (o trabalho foi sempre executado dentro da capela). O tubo de ensaio foi esfriado

TABELA 2

Procedimento utilizado para a acetilação das amostras da tabela 9.

Etapa	Procedimento	N° de vezes	Tempo (minutos)
1	50 %piridina/50 % ácido acético anidro	1	1
2	50 %piridina/50 % ácido acético anidro	1	120
3	lavar com ácido acético	5	1
4	lavar com diclorometano	5	1

TABELA 3

Procedimento utilzado para a retirada do grupo Fmoc.

Etapa	Procedimento	N° de vezes	Tempo (minutos)
1	retirar o grupo Fmoc com 50% DMF/50% piperidina	2	2
2	lavar com DMF	3	2
3	lavar com DCM	3	2
4	retirar o grupo Fmoc com 50% DMF/50% piperidina	3	2
5	lavar com DMF	3	2
6	lavar com DCM	3	2

DMF: dimetilformamida; DCM: diclorometano.

à temperatura ambiente e comparado com o branco. O teste foi considerado positivo quando a coloração da amostra era vermelha ou amarelo-escura. O branco, podendo ser PBQ ou Boc-Ala-Resina, foi submetido ao mesmo procedimento da amostra (a determinação prévia da ninhidrina não pode conter acima de 0,380 μmoles/g de resina de amino grupos livres pois, neste caso, o teste da PBQ poderá apresentar resultado positivo e a resina não poderá ser usada como branco).

Determinação qualitativa de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pelo método da ninhidrina (137):

Foram aquecidos 2 a 6 mg de amostra de peptídeo-Resina com 100 μL do reagente **a** e 25 μL do reagente **b** num tubo de ensaio de 10 x 75 mm, por 10 minutos, a 100°C. Esfriou-se A solução foi esfriada em temperatura ambiente. O teste qualitativo foi considerado positivo quando o peptídeo-Resina ou a solução era azul.

Determinação quantitativa de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) pelo método da ninhidrina (137):

- baixa concentração de amino grupos (0-0,1 μ moles):

Foram pesados de 2 a 5 mg de amostra em um tubo de ensaio e adicionados 100 μL da solução **a** e 25 μL da solução **b**. Ao branco foram adicionados somente os reagentes. Os tubos foram agitados e colocados em uma placa de aquecimento a 100°C, por 10 minutos. Após resfriados, foi adicionado 1,0 mL de 60% de etanol em água e agitados. A mistura foi filtrada. em uma pipeta Pasteur contendo lã de vidro, e lavada duas vezes com 0,2 mL de Et4NCl 0,5 M em diclorometano. O volume foi completado para 2,0 mL com 60% de etanol e a absorbância do filtrado medida contra o branco em 570 nm.

- elevada concentração de amino grupos (0,1-2,0 μ moles):

A amostra foi tratada como descrito no item anterior, porém diluída com 2,0 mL de 60% de etanol. A mistura foi lavada duas vezes com 0,5 mL de Et4NCl 0,5 M em diclorometano. O volume foi completado para 25 mL com 60% de etanol e a absorbância do filtrado medida contra o branco em 570 nm.

TESTES ESTATÍSTICOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO (191)

As diferenças entre as médias foram testadas em significância pelo método de variância "ANOVA-one way" e os valores de **F** obtidos foram dados. A comparação específica entre as médias individuais foram testadas através dos testes de múltipla faixa, Student-Newman Keuls ou Dunnett, e as médias foram consideradas estatisticamente diferentes para $p<0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM PLASMA SANGÜÍNEO

Diversos métodos têm sido propostos para determinar proteínas totais e alguns têm sido aplicados em plasma sangüíneo baseando-se nos métodos de biureto (23, 24, 42-44), Lowry (192), Bradford (89) e infra-vermelho próximo (193), sendo que o recomendado é o de biureto (23, 24, 42).

No presente estudo, utilizamos a p-benzoquinona (PBQ) para a determinação da concentração de proteínas totais em plasma sangüíneo, sendo que o espectro de absorção devido ao produto de reação entre PBQ e albumina de soro bovino (BSA) ou plasma sangüíneo, apresenta duas bandas, uma com máximo de absorção em 280 nm e outra em 350 nm, sendo esta última a banda utilizada para fins analíticos (figura 11). A banda de absorção com máximo em 350 nm segue a lei de Beer na faixa de 4-240 μg/mL de BSA (tabela 4), de acordo com o critério de Ringbom (194). A absorção em 350 nm deve-se, provavelmente, a uma transição eletrônica por transferência de carga (185), pois em todas as concentrações de PBQ ou BSA/proteínas plasmáticas e tempos de aquecimento estudados (figuras 12 e 13), não observamos a formação de um precipitado marrom, o qual, segundo Slifkin e outros (185), deixaria de ser CTC e passaria a ser um composto mono ou dissubstituído (de cor marrom) em quinonas. Tal composto marrom foi por nós observado em pH 7,0, com tempos de aquecimento superiores à 20 minutos, a 100°C, ou com caseína em pH 6,5 com tempo de aquecimento acima de 60 minutos, a 100°C.

A reação entre PBQ e BSA foi estudada em diversos tampões (tabela 5), sendo que seus espectros mostram que os tampões fosfato, fosfato/citrato e citrato apresentam idênticos resultados ou seja, os espectros obtidos possuem uma banda com máximo em 350 nm e outra com máximo

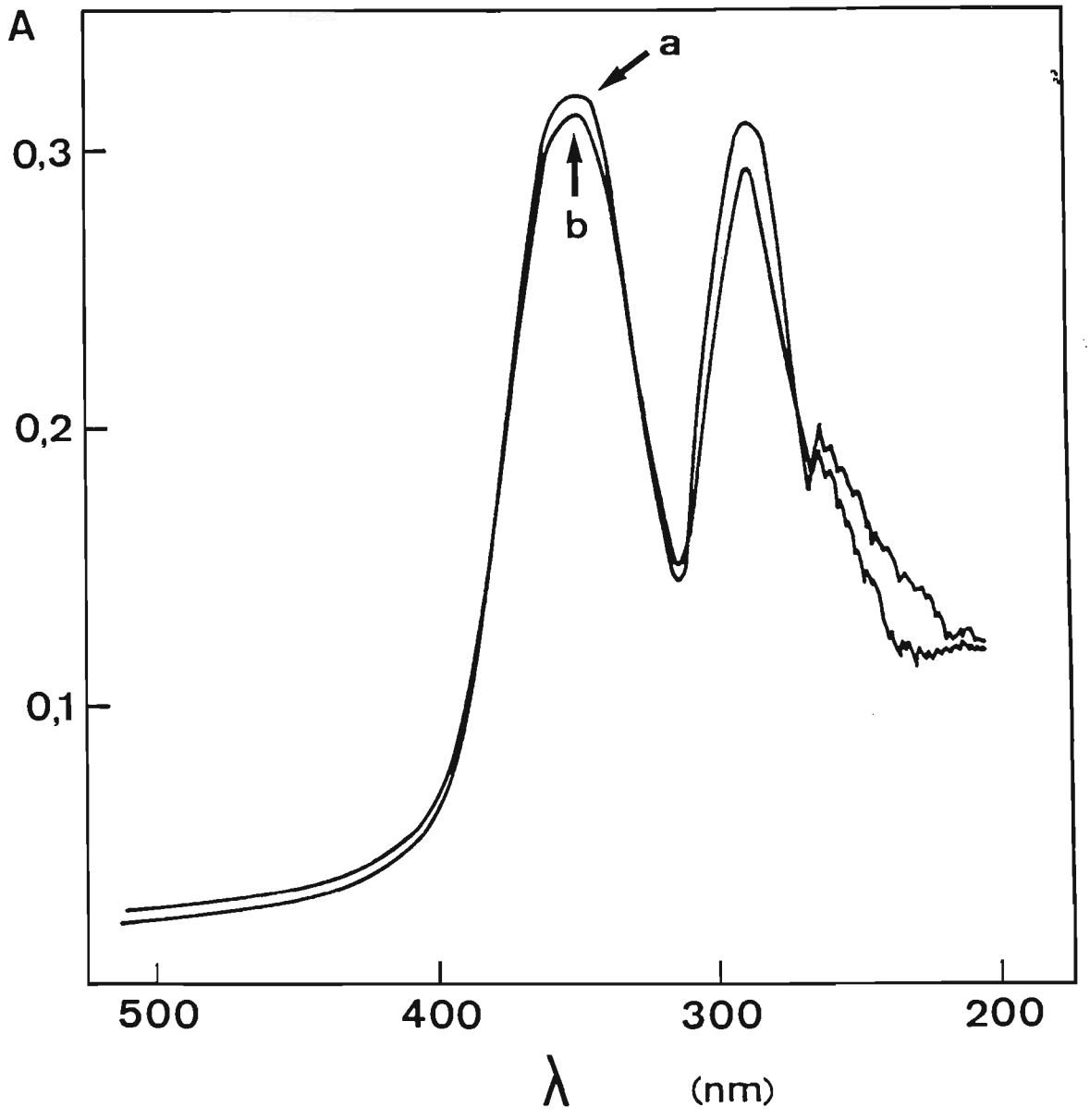


Figura 11. Espectro de absorção dos produtos de reação entre 1 mM de PBQ e BSA (**a**: 120 μg/ml) ou plasma sangüíneo (**b**: 2 μl/ml). As amostras foram aquecidas à 100°C, por 20 minutos, em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,0 e volume final de 5,0 ml.

TABELA 4

Absorbância específica a 350 nm dos produtos de reação entre p-benzoquinona e proteínas.

	BSA	OA	HSA	CASEÍNA	TRIPSINA	PEPSINA
Absorbância Específica ($cm^2\ \mu g^{-1}\ 10^3$)	2,61	2,59	3,05	2,11	5,33	1,89
Desvio Padrão	0,31 (8)	0,26 (8)	0,28 (3)	0,09 (8)	0,24 (8)	0,15 (8)
Limite de Detecção (μg/mL)	3,8	3,9	3,3	4,7	1,9	5,3

As curvas padrão, para cada uma das proteínas, foram efetuadas na faixa de 0 à 240 μg/mL e as absortividades específicas (350 nm) calculadas a partir da inclinação das curvas, sendo o caminho ótico igual a 1,0 cm. O coeficiênte de correlação para todas as curvas foi sempre maior do que 0,98. Valores expressos como média, em $cm^2\mu g^{-1}\ 10^3$, e desvio padrão. O número de curvas é dado entre parênteses. Cada curva foi construída com cinco diferentes concentrações de proteínas. BSA = albumina de soro bovino; OA = ovoalbumina; HSA = albumina de soro humano.

TABELA 5

Estudo do efeito do tampão sobre a absorbância dos produtos de reação entre p-benzoquinona (PBQ) e albumina de soro bovino (BSA).

Concentração de BSA (µg/mL)	Absorbância			
	Tampão fosfato	Tampão fosfato e citrato	Tampão citrato	Tampão ftalato
120	0,321 ± 0,020 (4)	0,495 ± 0,020 (4)	0,306 ± 0,009 (4)	0,446 ± 0,017 (4)
180	0,510 (1)	ppt	0,468 (2)	0,583 (2)
240	0,704 ± 0,019 (4)	ppt	0,662 ± 0,004 (5)	0,832 ± 0,016 (5)
absortividade específica ($cm^2\ \mu g^{-1}\ 10^3$)	3,19	–	2,97	3,22

As amostras foram aquecidas por 20 minutos, a 100°C, com 1 mM de PBQ em pH 6,0. () número de amostras.

em 280 nm, porém, o espectro das amostras no tampão ftalato apresentou apenas uma banda com máximo em 350 nm. O tampão fosfato/citrato não foi utilizado, pois nas concentrações de 180 e 240 μg/mL de BSA, o produto de reação precipitou. Os outros três tampões apresentaram resultados de absortividades específicas semelhantes e, portanto, optamos pelo tampão fosfato por ser um dos mais utilizados nesses casos.

A figura 12 mostra o efeito de diferentes concentrações de PBQ sobre a absorbância de plasma sangüíneo e de BSA. Para a concentração mais elevada de BSA testada (240 μg/mL), a absorbância aumentou quase que linearmente com o aumento da concentração, que foi de até 2,0 mM de PBQ. Acima de 4,0 mM ocorreu apenas um pequeno aumento da absorbância. Para as concentrações de 60 e 120 μg/mL de BSA, bem como de plasma sangüíneo, ocorreram pequenos aumentos das absorbâncias nas concentrações de PBQ maiores do que 2,0 mM. A lei de Beer foi seguida para todas as concentrações de PBQ testadas, até mesmo para as tão baixas como 0,2 mM. Deslocamentos da banda, com máximo em 350 nm, não foram observados para quaisquer das concentrações de PBQ testadas. No entanto, para concentrações de PBQ maiores do que 2,0 mM, observou-se um significativo aumento da banda com máximo em 280 nm e o surgimento de uma banda com máximo em 520 nm (efeitos observados tanto para o plasma sangüíneo como para a BSA).

As absorbâncias dos produtos de reação entre PBQ (1,0 mM) e proteínas aumentaram acentuadamente durante os primeiros 20 minutos de aquecimento, a 100°C, porém, pouco aumento foi observado após este tempo (figura 13) e, portanto, o tempo de 20 minutos, a 100°C, foi utilizado para determinar proteínas totais em plasma sangüíneo. O tempo de aquecimento, das amostras testadas na figura 13, não mudou os espectros de absorção.

Os produtos de reação entre PBQ e BSA ou plasma sangüíneo (figura 14) e reativo de biureto com BSA ou plasma sangüíneo são estáveis por diversas horas. Amostras aquecidas por 20 minutos, a 100°C, e mantidas

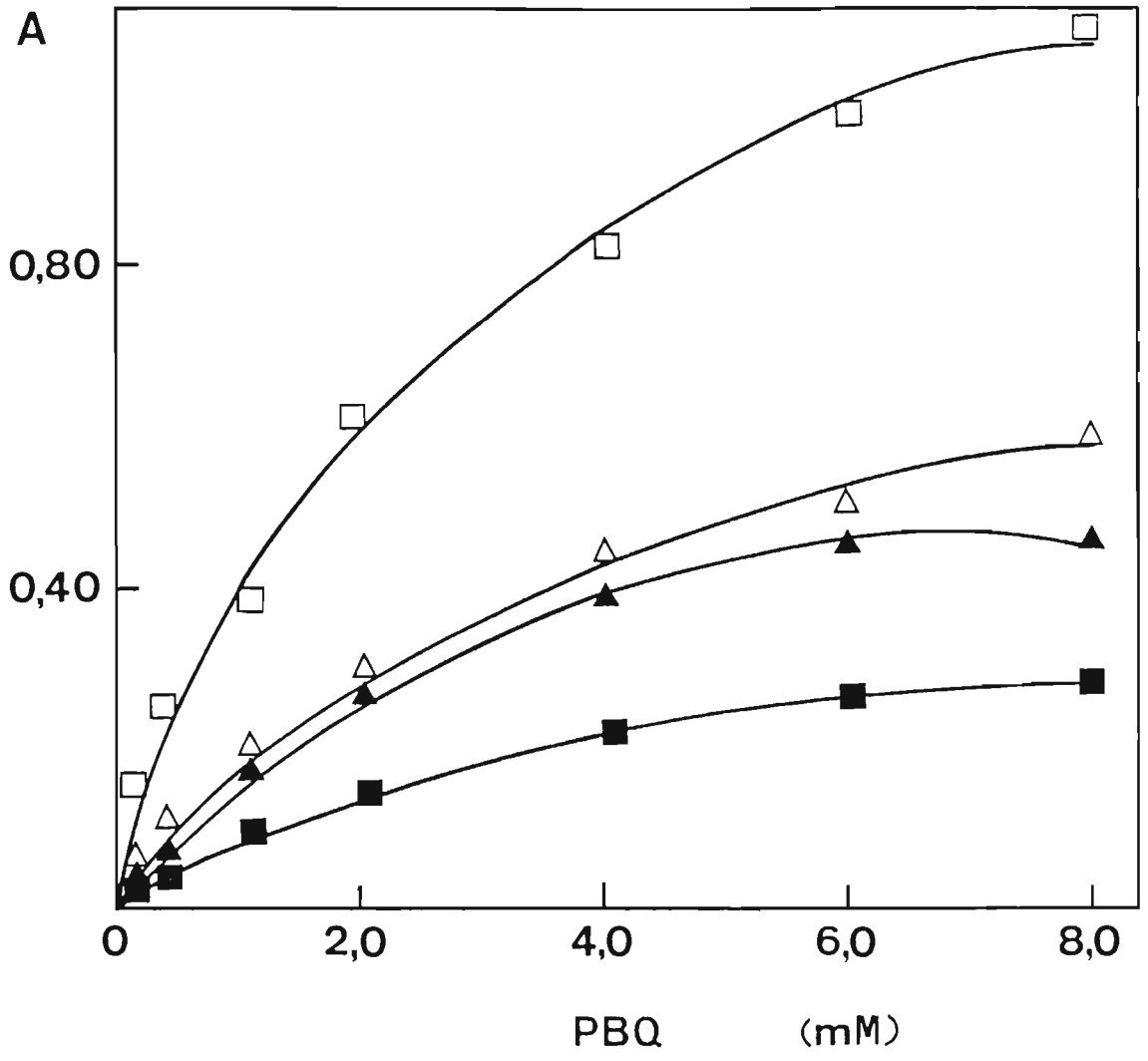


Figura 12. Dependência da absorbância com a concentração de PBQ. As amostras de plasma sangüíneo (▲ = 2 µl/ml) ou BSA (■ = 60 µg/ml; Δ = 120 µg/ml; ❑ = 240 µg/ml) foram aquecidas à 100°C, por 10 minutos, em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,0.

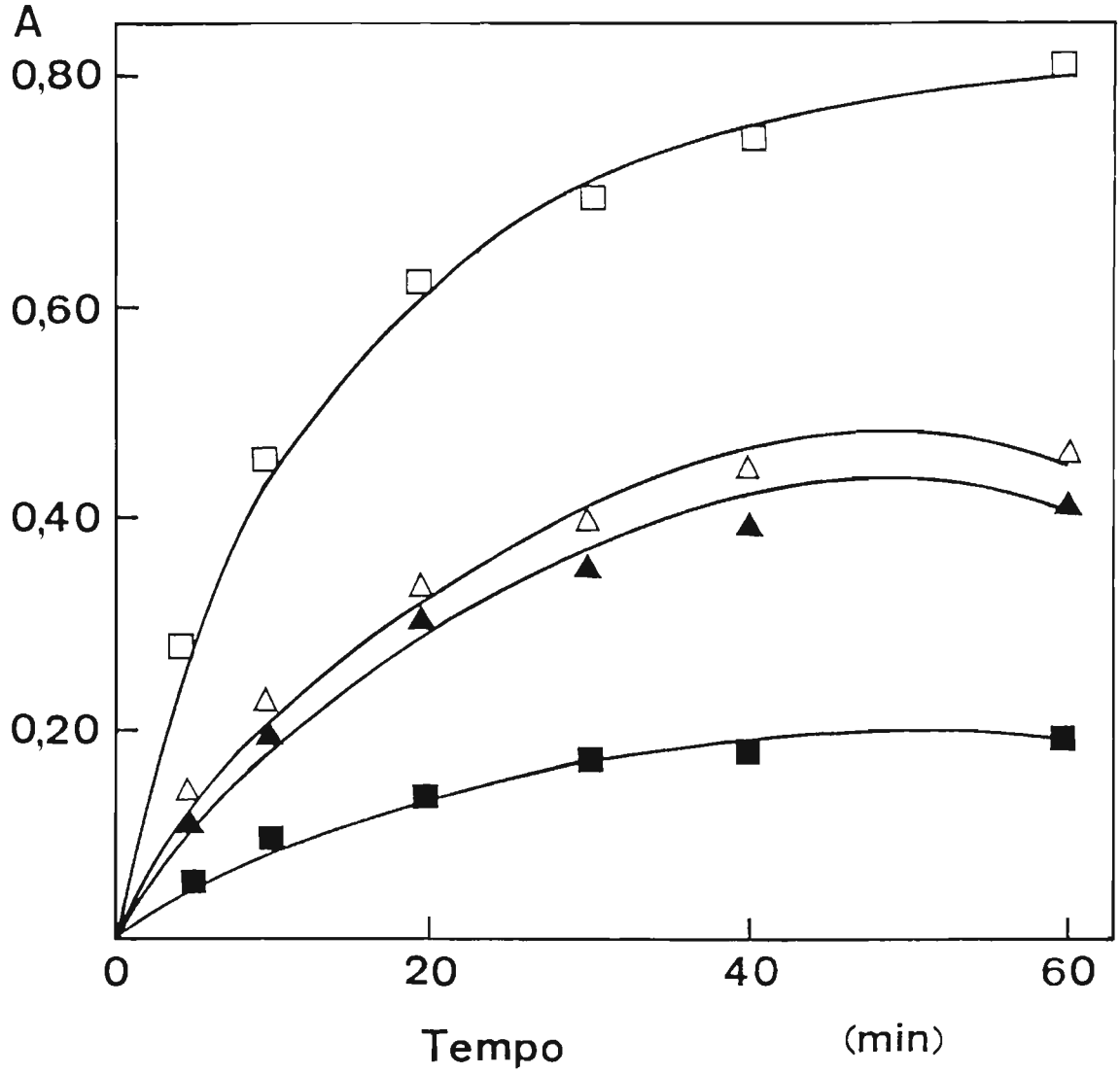


Figura 13. Dependência da absorbância com o tempo de aquecimento. As amostras de plasma sangüíneo (▲ = 2 µl/ml) ou BSA (■ = 60 µg/ml; Δ = 120 µg/ml; ❑ = 240 µg/ml) foram aquecidas à 100°C, em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,0 e contendo 1 mM de PBQ.

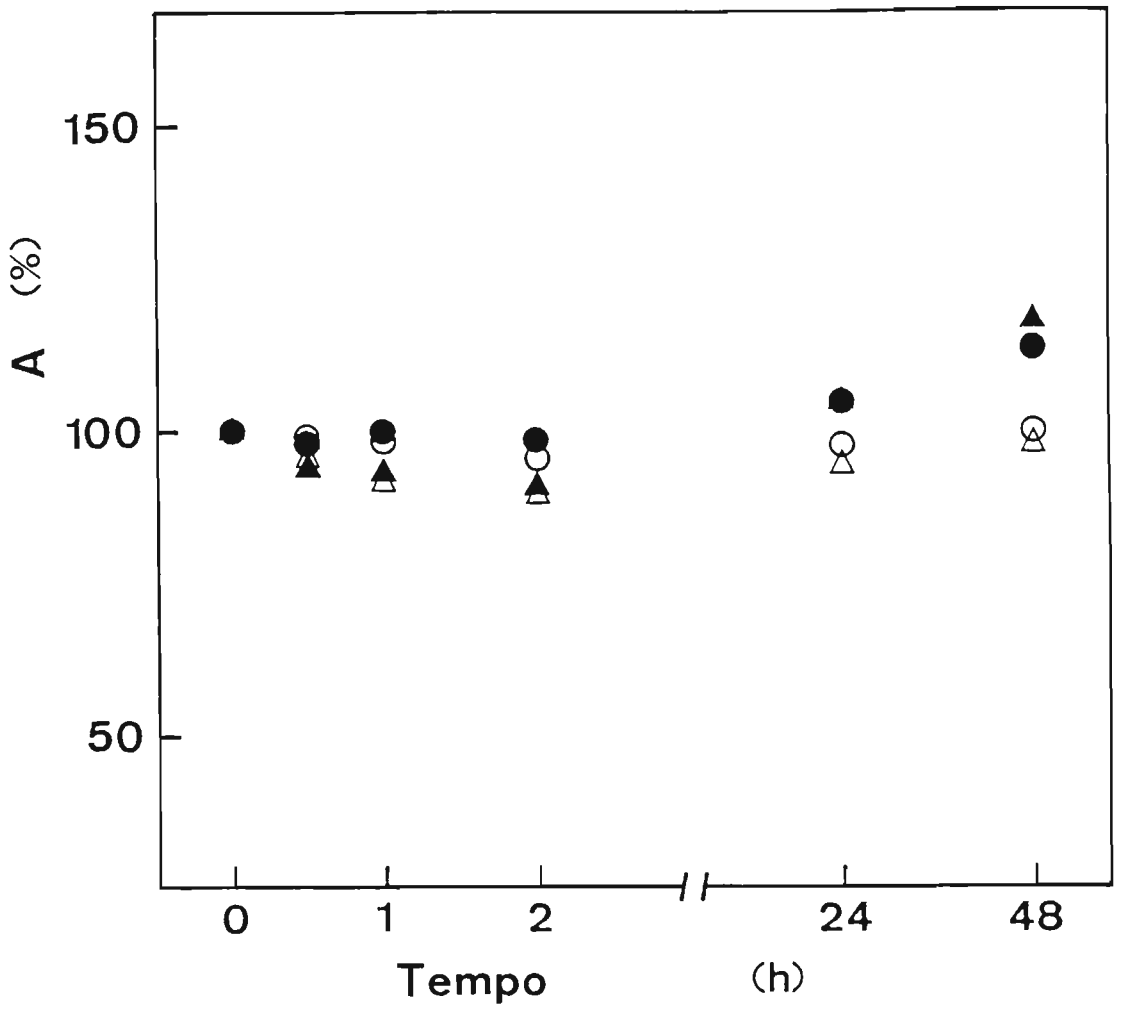


Figura 14. Estabilidade dos produtos de reação entre PBQ e BSA (120 μg/ml) ou plasma sangüíneo (2 μl/ml). As amostras foram mantidas à 4°C (Δ = BSA; O = plasma sangüíneo) ou à 30°C (▲ = BSA; ● = plasma sangüíneo). As amostras, em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,0, 1,0 mM de PBQ, foram aquecidas à 100°C, por 20 minutos, e as absorbâncias, no tempo zero, foram consideradas como 100%.

tanto a 4 como a 30°C, mostraram, após 2 horas, somente uma pequena diminuição da absorbância, seguida de um pequeno aumento nas próximas 48 horas; para o método de biureto, observamos, após 2 horas, um pequeno aumento nas absorbâncias das amostras mantidas tanto a 4°C como a 30°C.

Para o método da PBQ, os espectros de absorção, obtidos nos mesmos tempos da figura 14, não mostraram nenhum tipo de alteração. Portanto, o tempo de espera após o aquecimento não é um fator crítico para determinar proteínas totais no plasma sangüíneo pelo método da PBQ. A reação entre PBQ e soro e PBQ e plasma sangüíneo apresentaram o mesmo comportamento com relação à estabilidade (resultados não mostrados).

A figura 15 mostra que a determinação de proteínas totais do plasma sangüíneo, pelo método da PBQ, não é susceptível à interferência dos anticoagulantes mais comumente usados e nas concentrações recomendadas. Após diluição, pelo procedimento da PBQ, a concentração final de heparina é cerca de 0,2-0,4 mg/mL. Esta concentração de heparina, ou mesmo uma concentração 10 a 20 vezes maior, não interfere com o método da PBQ; o mesmo é válido para o EDTA e citrato (figura 15).

A tabela 6 mostra uma comparação entre os métodos da PBQ e biureto (22). O erro padrão da média (EPM) observado com o método da PBQ, usando volumes de plasma sangüíneo de 10 ou 20 μL, foi menor do que o observado com o método de biureto. Os resultados mostrados na tabela 6 não são significativamente diferentes entre si; com isto podemos concluir que a metodologia proposta está em boa concordância com a metodologia mais utilizada (22). A equação da reta relacionando absorbância (Y) e concentrações de proteína no plasma (X), considerando-se de zero a 1.500 μg/mL após a diluição, foi $Y = 0{,}00233\ X + 0{,}0222$ (N=4; coeficiente de correlação r=0,9987) para o método da PBQ e $Y= 0{,}000217\ X - 0{,}00819$ (N=4; coeficiente de correlação r=0,9996) para o método de biureto (22). Embora a relação entre absorbância e

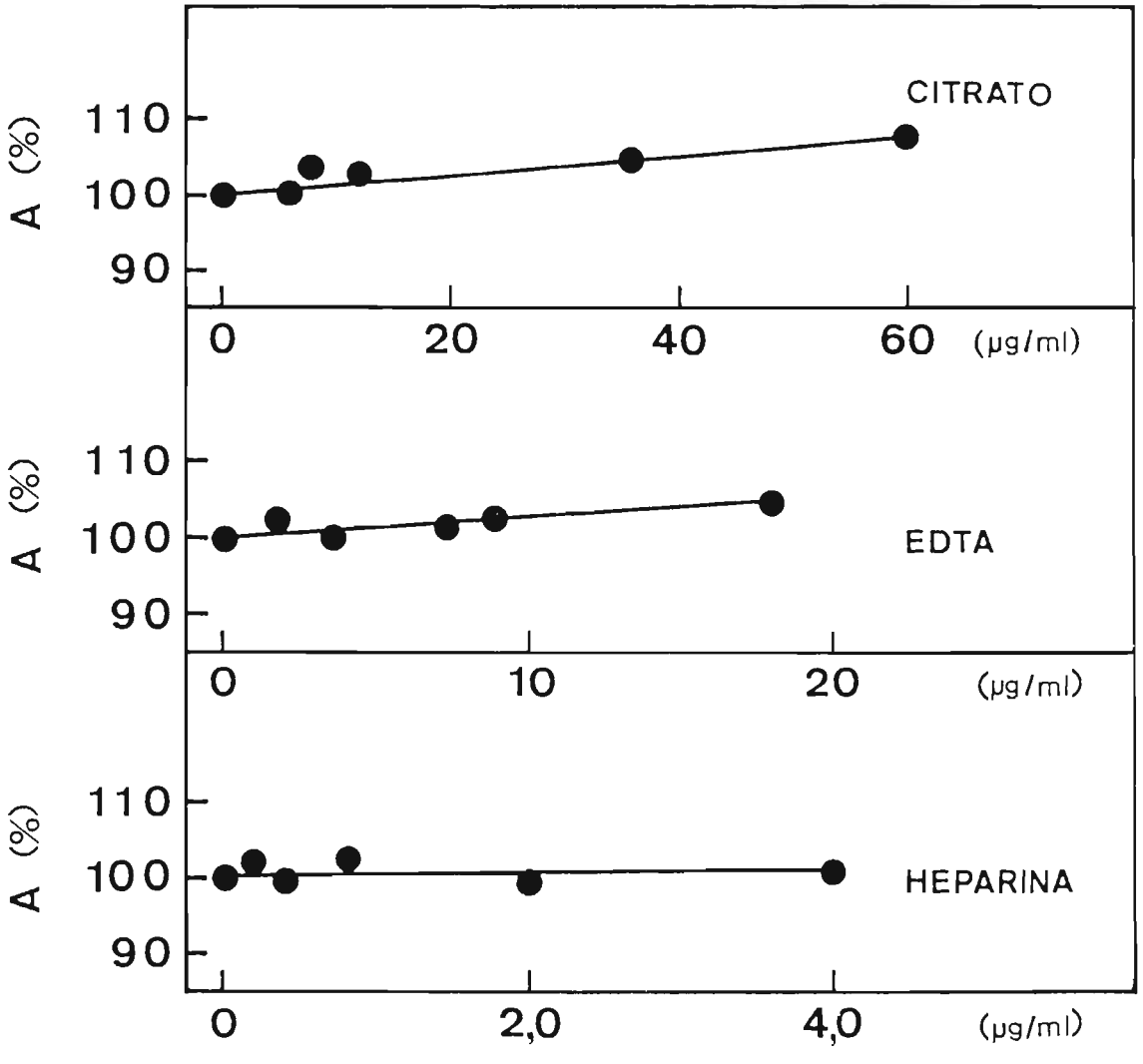


Figura 15. Efeito de anticoagulantes sobre as absorbâncias dos produtos de reação entre PBQ e BSA (120 µg/ml). As amostras foram aquecidas à 100°C, por 20 minutos, em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,0, contendo 1,0 mM de PBQ, e as absorbâncias foram normalizadas com relação às absorbâncias obtida com amostra sem anticoagulante (considerada como sendo 100%).

TABELA 6

Proteínas totais em plasma sangüíneo de ratos pelo método da p-benzoquinona (PBQ) e do biureto (22).

	PBQ				BIURETO
	Plasma de rato (μL)				Plasma de rato (μL)
	2,0	5,0	10,0	20,0	20,0
média	66,6	65,6	63,1	65,1	64,0
erro padrão da média	2,8	2,3	1,3	1,4	2,3
	(10)	(12)	(11)	(12)	(6)

Os volumes de plasma de rato (μL) correspondem aos volumes utilizados no volume total de reação, o qual foi de 5 mL para o método da PBQ e 4,2 mL para o do biureto. Valores expressos como média, em g/L, e erro padrão da média. O número de ensaios é dado entre parênteses. BSA foi usada como padrão. F=1,05 e p=0,399.

concentração, obtidos para ambos os métodos, seja linear, a maior inclinação obtida pelo método da PBQ indica sua maior sensibilidade.

A tabela 4 mostra a absortividade específica dos produtos de reação entre PBQ e diversas proteínas. O limite de detecção, com o uso do método da PBQ (4 μg/mL), é cerca de dez vezes maior do que com o método de biureto, (45 μg/mL, limites por nós obtido). Algumas modificações têm sido propostas para aumentar a sensibilidade do método de biureto, como a adição do reagente de Folin-Ciocalteu (40) e a utilização da técnica de "stopped-flow" (195); estas metodologias melhoraram o limite de detecção do método de biureto em cerca de dez vezes, o que atribui a ele a mesma sensibilidade da metodologia aqui proposta, porém, com a desvantagem de utilizar o reativo de Folin-Ciocalteu (40), que é sujeito a muitas interferências (29, 43, 62-69) e utilizar um equipamento que não é comum em laboratórios de análises clínicas, como o usado na técnica de "stopped-flow" (195), cujo uso dependeria do controle de diversos fatores para ser eficiente.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM DIVERSOS TECIDOS DE RATO

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas para determinar proteínas totais em tecidos ou partes de células; tais métodos são baseados nos métodos de Lowry (50, 51, 196), Bradford (90) e turbidimetria (197), sendo o método de Lowry o mais utilizado.

Observamos que o método de Lowry e cols. (46), modificado por Hartree (69), é linear para concentrações de BSA entre 5 e 115 mg (69), e o limite de detecção é de 0,58 μg/mL, nas nossas condições experimentais; o método da PBQ é linear de 4 a 450 μg/mL e seu limite de detecção é de 2,63 μg/mL. Apesar do método de Hartree (69) ter maior limite de detecção, o método da PBQ é linear numa ampla faixa de concentração de proteína.

Observamos que (tabela 7) pelo método de Hartree (69), elevada (18.000 r.p.m.), em relação à baixa (2.000 r.p.m.) velocidade de centrifugação do homogeneizado, reduziu, acentuadamente, a quantidade de proteínas totais do fígado (25%), rim (24%), baço (45%), coração (33%), músculo gastrocnêmio (18%), cérebro (39%) e gordura epididimal (13%). Pelo método da PBQ, por outro lado, elevada velocidade de centrifugação do homogeneizado provocou menor redução da quantidade de proteínas totais do fígado (3,0%), rim (17%), baço (46%) e coração (27%) e aumento nas concentrações do músculo gastrocnêmio (7%), cérebro (17%) e gordura epididimal (24 %). Pelo método da PBQ, os valores de proteínas totais, com baixa e alta velocidade de centrifugação, não foram estatisticamente diferentes para fígado, músculo gastrocnêmio e cérebro, o mesmo acontecendo somente para o músculo gastrocnêmio pelo método de Hartree (69).

Os resultados indicam que elevada velocidade de centrifugação pode causar, por precipitação por exemplo, uma substancial remoção das proteínas ricas em tirosina e/ou triptofano do homogeneizado e, conseqüentemente, mudar acentuadamente o conteúdo de proteínas totais. Estes resultados mostram mais uma vez a grande inconveniência de se utilizar o método de Lowry e cols. (46) modificado por Hartree (69).

Com exceção do cérebro e gordura epididimal, a quantidade de proteína, após baixa velocidade de centrifugação do homogeneizado, foi sempre menor pelo método de Hartree (69) do que pelo método da PBQ para fígado (34%), rim (47%), baço (42%), coração (38%) e músculo gastrocnêmio (31%). Os resultados obtidos mostram que o método proposto forneceu resultados muito mais próximos do método FFDW (189), adotado como padrão, do que o método de Hartree (69). Para o rim e coração, com baixa centrifugação e para a gordura epididimal, em alta velocidade de centrifugação, a concentração de proteínas totais pelos métodos FFDW (189) e PBQ não foram estatisticamente diferentes entre si. Porém, o método de

TABELA 7

Conteúdo de proteína, em mg/g de tecido fresco, pelos métodos da p-benzoquinona (PBQ), Hartree (69) e FFDW (189).

	MÉTODO DA PBQ		MÉTODO DE LOWRY		FFDW
Tecidos	LSC	HSC	LSC	HSC	LSC
fígado	173 ± 11	168 ± 9	115 ± 2 *	86 ± 5,0 *	205 ± 8 *
rim	155 ± 9	128 ± 8 #	82 ± 2 #	62 ± 0,8 #	165 ± 2
baço	183 ± 13 *f*	99 ± 4	107 ± 2	59 ± 3,0 *f*	142 ± 4 *f*
coração	162 ± 12 †	118 ± 8 §	101 ± 3 §	68 ± 1,0 § †	142 ± 6 †
músculo gastrocnêmio	72 ± 4 ξ	77 ± 5 ξ	50 ± 2 ‡	41 ± 1,0 ‡	128 ± 8 ‡ ξ
cérebro	42 ± 5	49 ± 4 £	36 ± 2 •	22 ± 1,0 •£	101 ± 5 •£
gordura epididimal	25 ± 3 Δ'	31 ± 1+' "	23 ± 1 Δ +	20 ± 0,5 Δ"	31 ± 2 +' "

A quantidade de proteína dos homogeneizados foi determinada pelos métodos de Hartree (69) e da PBQ após baixa velocidade de centrifugação (LSC) ou alta velocidade de centrifugação (HSC) das amostras e pelo método FFDW (peso seco livre de gordura) (189). Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média de sete e dez determinações para LSC e HSC, respectivamente, e seis determinações para FFDW. * significativamente diferentes ($F=38,48$; $p<0,0001$); # significativamente diferentes ($F=58,48$; $p<0,0001$); *f* significativamente diferentes ($F=61,83$; $p<0,0001$); † § significativamente diferentes ($F=28,39$; $p<0,0001$); ξ ‡ significativamente diferentes ($F=54,75$; $p<0,0001$); • £ significativamente diferentes ($F=62,04$; $p<0,0001$); Δ + ' " significativamente diferentes ($F=11,11$; $p<0,0001$);

Hartree (69), em nenhum dos casos, apresentou resultados estatisticamente iguais (figura 16). Analisando o princípio dos dois métodos, podemos sugerir uma explicação para os resultados obtidos. Apesar da discordância (47, 48, 49) sobre os tipos de intermediários formados pela reação do método de Lowry, os grupos laterais dos aminoácidos tirosina e triptofano, que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteau, podem contribuir significativamente para a absorbância final da solução.

Estes aminoácidos conseguem reduzir uma mistura ácido-metal do reagente, pela remoção de átomos de oxigênio do molibdato, e produzir um composto de cor azul com leitura no visível (46). Assim, a quantificação de proteínas totais nos tecidos pode variar conforme a quantidade dos aminoácidos tirosina e triptofano das proteínas a serem determinadas.

Esta é uma desvantagem do método de Lowry e cols. (46) que as modificações de Hartree (69) não corrigiram. Em contraste com o reagente de Folin-Ciocalteau, PBQ reage com todos os aminoácidos proteicos (171, 172, 174), o que torna a PBQ um reagente ideal para detectar proteínas com baixos teores de tirosina, triptofano, cistina, cisteína e histidina. Portanto, as medidas de proteínas totais dos tecidos, pelo método da PBQ, são mais exatas do que as obtidas pelo método de Hartree (69).

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM LEITE EM PÓ DESNATADO

O método de Kjeldahl (13, 190), devido à sua simplicidade, continua sendo, até os dias de hoje, o mais utilizado nas áreas de ciências de alimentos, tecnologia de alimentos e áreas afins, porém, outras metodologias têm sido estudadas. Para determinar proteínas totais em leite, o método de Kjeldahl (13) é utilizado como referência.

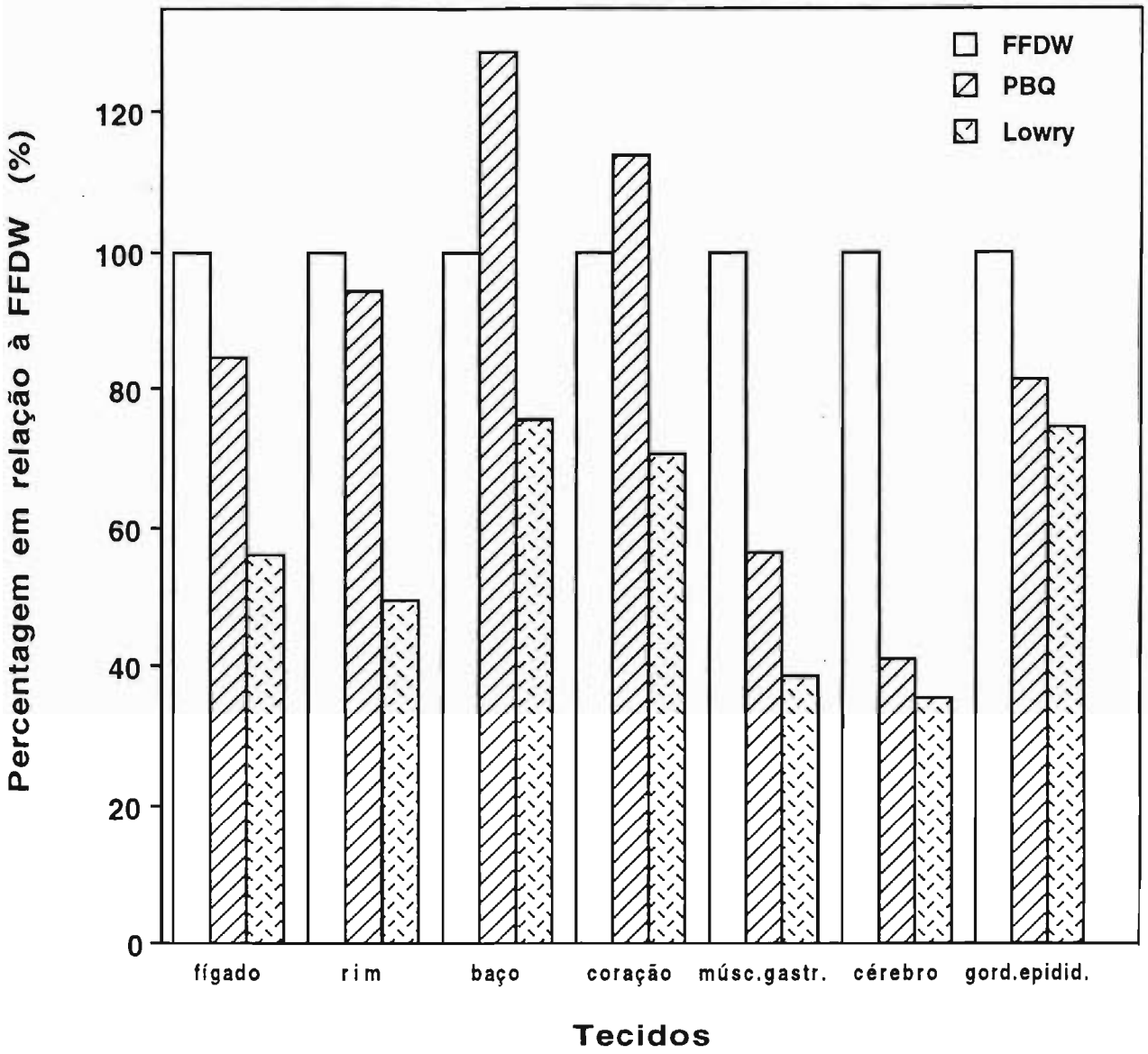


Figura 16. Concentração de proteínas totais em diversos tecidos de rato. Valores calculados a partir dos resultados de baixa velocidade de centrifugação dos homogeneizados de fígado, rim, baço, coração, músculo gastrocnêmio, cérebro e gordura epididimal, como mostrado na tabela 7. A concentração de proteínas foi determinada pelos métodos da PBQ e de Lowry (46) modificado por Hartree (69), sendo considerado como 100% o método de FFDW (189).

Keller e Neville (61) compararam os métodos de Kjeldahl (13), Lowry e cols. (46), Bradford (81) e Smith e cols. (49), concluíndo ser o método da BCA o mais aceitável para determinar proteínas totais no leite. Verheul e Cornelissen (198) sugeriram a utilização do método de biureto, Bergqvist (87) o método de Bradford (81); e Lönnerdal e cols. (199) o método de Lowry e cols. (46). Não existe, portanto, um concordância sobre qual o melhor método espectrofotométrico para determinar proteínas totais em leite.

Church e cols. (200) estudaram a aplicação de uma metodologia baseada na reação entre aminoácidos, o-ftaldialdeído e β-mercaptoetanol formando um aduto que absorve fortemente em 340 nm, após hidrólise das proteínas do leite. O método de biureto (22) também foi usado por Owen e Andrews (38), assim como o de Lowry e cols. (46) por Patton e Hutson (60).

A figura 17 mostra o espectro de absorção dos produtos de reação entre a PBQ e a caseína. A banda com máximo em 350 nm, segue a lei de Beer até o limite superior de 250 μg/mL de caseína, podendo então ser utilizada para fins analíticos. Para análise das amostras, pelo método da adição de padrão, o período de aquecimento foi de 10 minutos, podendo ser extendido até 40 minutos (pH 6,0), sem ocorrer destruição do composto formado. Pelo método de curvas padrão, o período de aquecimento foi de 20 minutos devido à maior concentração de proteínas na amostra.

Pela figura 18 observa-se um grande aumento da absorbância nos primeiros 20 minutos de aquecimento, seguido de um pequeno aumento após mais 20 minutos; a reação se completa em 25 minutos, a 100°C. Se aquecermos todas as amostras, inclusive o branco, em tempos iguais, as absorbâncias seguem a lei de Beer. O fator tempo de aquecimento suplanta o ganho na sensibilidade, pois apenas 10 minutos de aquecimento fornece 0,12 de absorbância e 20 minutos fornece 0,20.

A figura 19 mostra o efeito da concentração de PBQ sobre a absorbância, onde a lei de Beer foi obedecida e as mesmas bandas observadas

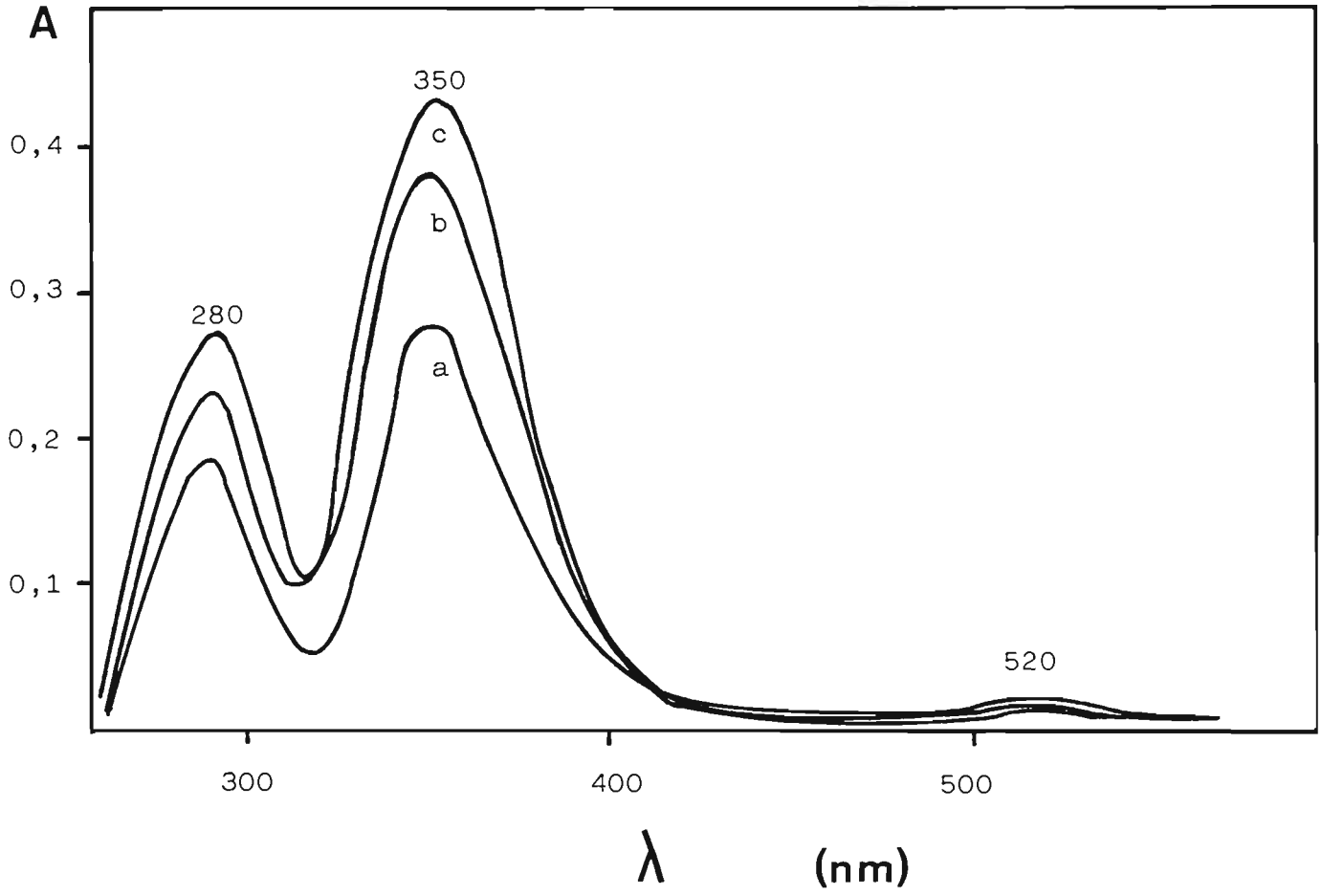


Figura 17. Espectro de absorção dos produtos de reação entre 50 (**a**), 100 (**b**) ou 125 (**c**) µg/ml de caseína e 20 µl de PBQ (0,1 M), 10 minutos de aquecimento, à 100°C, em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0.

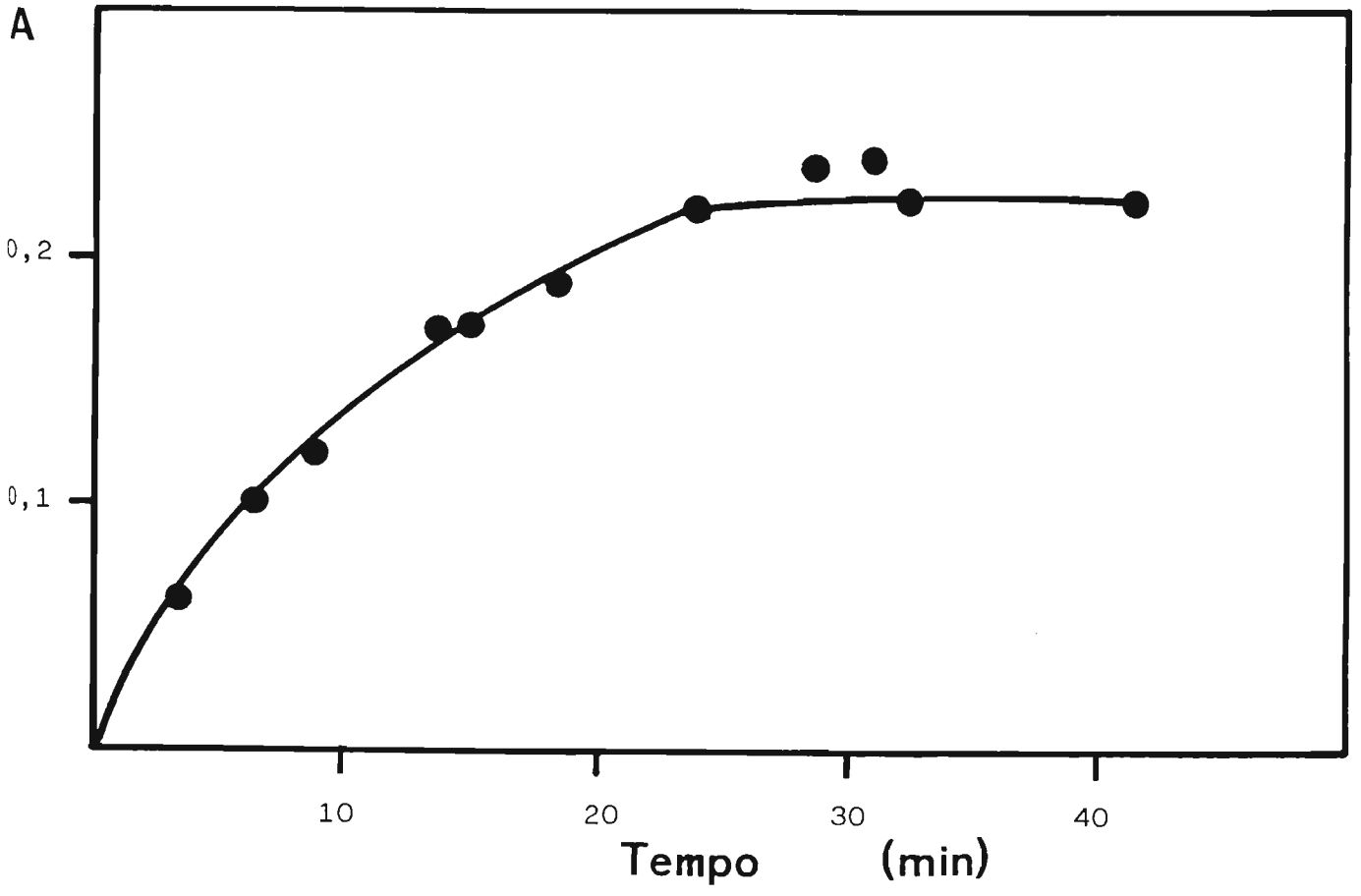


Figura 18. Dependência da absorbância com o tempo de aquecimento. As amostras (caseína, 100 µg/ml) foram aquecidas com 20 µl de PBQ (0,1 M) em tampão fosfato, pH 6,0, à 100°C.

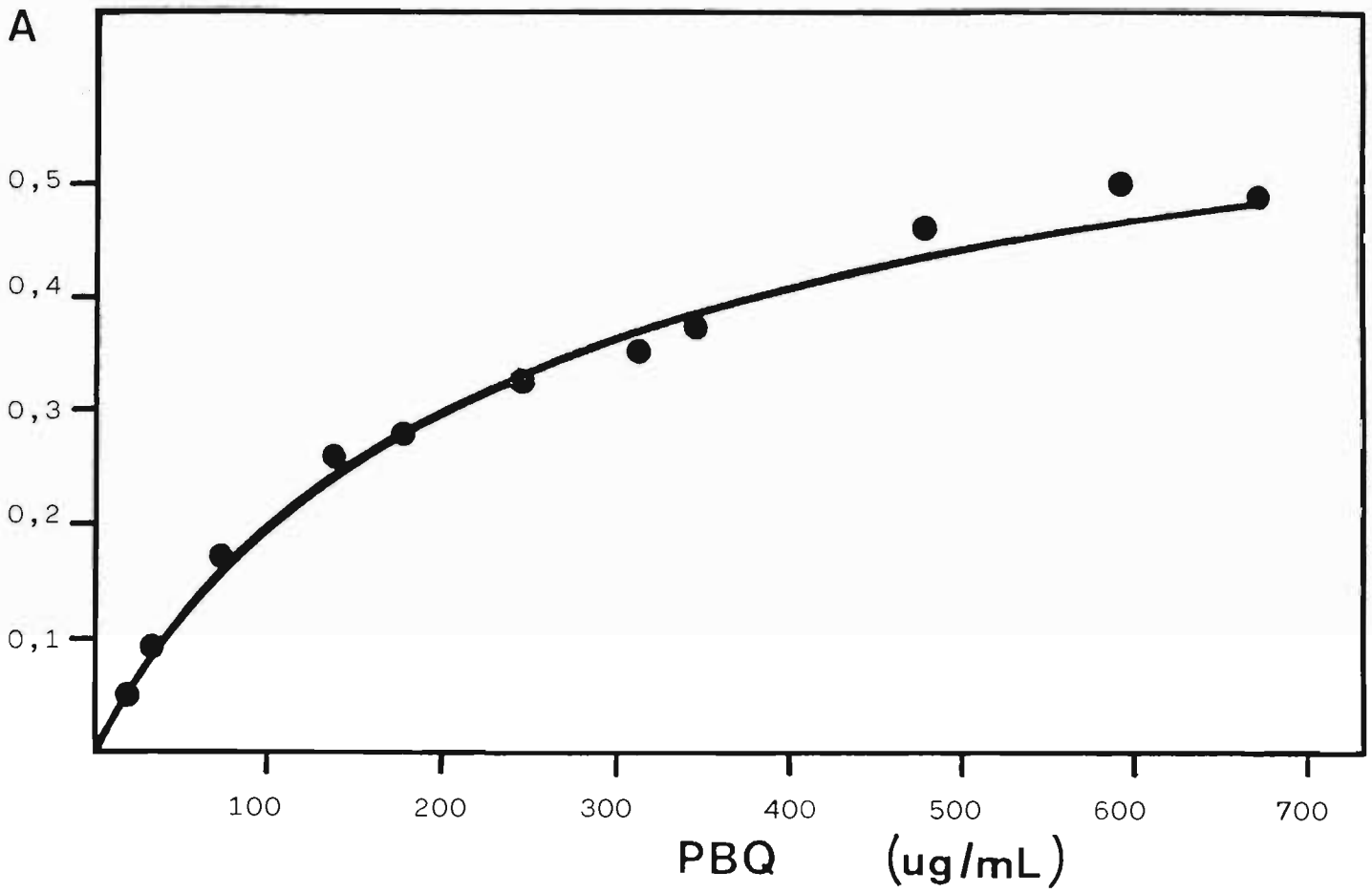


Figura 19. Dependência da absorbância com a concentração de PBQ. As amostras (caseína, 100 μg/ml) foram aquecidas com diferentes quantidades de PBQ (0,1 M) em tampão fosfato, pH 6,0, à 100°C, por 10 minutos.

para todas as concentrações de PBQ utilizadas. A reação entre PBQ e caseína foi realizada em pH 6,0 e 6,5, porém, acima de pH 7,0 forma-se um precipitado marrom, devido à destruição de CTC, tornando a reação inaceitável para fins analíticos, como preconizado por Slifkin (185).

Os dados obtidos com o método da PBQ foram comparados com os métodos de Lowry e cols. (46) e Kjeldahl (13, 190) (tabela 8). Os melhores resultados com o método da PBQ foram obtidos com a adição de padrão, em pH 6,0; o método de Lowry (46) apresentou um desvio comparável ao da PBQ, e pelo de Kjeldahl (190) obteve-se o menor desvio padrão. O método de Kjeldahl (190), portanto, forneceu os menores valores de proteínas totais, sendo estatisticamente diferentes de quaisquer outros valores de proteínas totais. Em relação às metodologias espectrofotométricas, com exceção da adição de padrão (pH 6,0; 0,5 g/l) e Lowry 1,0 g/l, todos os outros valores são iguais entre si. Como o método da adição de padrão não é prático para analisar um grande número de amostras, a curva padrão pode ser utilizada (tabela 8).

Possivelmente o leite, embora desnatado, ainda deveria conter pequena concentração de gordura o que pode ter ocasionado interferência. Diversos autores (61, 199) observaram que metodologias espectrofotométricas superestimam a concentração de proteínas totais quando comparadas com o método de Kjeldahl (13, 190).

DETERMINAÇÃO DE AMINO GRUPOS LIVRES EM SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA (SPFS)

A quinona, 2,3,5,6-tetracloro-p-benzoquinona (cloranil), foi utilizada por Christensen (134), para monitorar a síntese de peptídeos pela técnica de SPFS e o método mostrou sensibilidade igual a do método de Kaiser e cols. (136), o mais utilizado. No presente trabalho, desenvolvemos

TABELA 8

Determinação da concentração de proteínas totais em leite em pó desnatado por diferentes métodos analíticos.

	Curva Adição de Padrão (% m/m)		Curva Padrão (% m/m)				Lowry (% m/m)		Kjeldahl (% m/m)
	pH = 6,0	pH = 6,5	pH = 6,0		pH = 6,5				
	0,5 g/L	0,5 g/L	0,5 g/L	1,0 g/L	0,5 g/L	1,0 g/L	0,5 g/L	1,0 g/L	
M	34,84 ‡	36,08	36,87	35,55	37,11	37,58	37,67	38,38 ‡	31,46 *
SD	1,92	2,46	2,19	2,47	4,61	2,65	1,73	1,18	0,67
EPM	0,60	0,78	0,69	0,78	1,46	0,84	0,55	0,37	0,21

Os valores estão expressos como média (M), desvio padrão (SD) e erro padrão da média (EPM). Número de análises igual a dez. As soluções preparadas foram de 0,5 e 1,0 g/L de leite em pó desnatado. Os métodos de Lowry e Kjeldahl foram efetuados como descritos na literatura (46, 190). * estatiscamente diferente de qualquer outro valor, ‡ estatiscamente diferentes entre si, $F=7,29$ e $p<0,0001$

uma metodologia, para tal, baseada na reação em estado sólido entre a PBQ e o peptídeo ligado à resina; essa reação foi observada em estado sólido entre PBQ e aminoácidos livres sendo o composto formado um radical livre (188).

A tabela 9 mostra os resultados dos testes qualitativos para amino grupos livres com oito quinonas, além dos resultados da análise quantitativa pelo método baseado na reação da ninhidrina (137), indicando que a PBQ é sensível a todos os aminoácidos e a todas as concentrações de amino grupos livres estudados (10% a 0,5%).

As quinonas 2,6-dicloro-PBQ e 2,5-dicloro-PBQ foram sensíveis a todos os aminoácidos testados, mas não para concentrações de 1,0% de imino grupos livres da prolina, mesmo aquecendo por 50 minutos (cor vermelha após 24 horas).

As quinonas indicadas por **nc** (p-cloranil, ácido cloranílico, o-cloranil, isatin e benz[a]antraceno-7,12-diona) não apresentaram nenhuma troca na coloração, mesmo quando aquecidas por 24 horas, exceto o p-cloranil que apresentou reação com Boc-Asp[10 eq.]-Fmoc-Asp[1 eq.]-Resina, após 72 horas (cor vermelha), e com Boc-Met[10 eq.]-Fmoc-Met[1 eq.]-Resina, após 48 horas (cor amarelo escuro). Mas, ocorrência de reação não é descartada já que a própria cor de algumas delas pode ter obscurecido qualquer outra cor formada.

Assim, foi realizada a reação das quinonas **nc** com as substâncias MBHA-Resina (625,5 ± 12,6 μmoles/g), Boc-Ala-Resina (0,732 ± 0,025 μmoles/g), Boc-Pro[10 eq.]-Fmoc-Pro[1 eq.]-Resina e Boc-Ala[100 eq.]-Fmoc-Ala[1 eq.]-Resina (9,45 ± 0,03 μmoles/g), a 100°C, por 30 minutos, e o excesso de quinona que não reagiu foi dissolvido: em dicloro-metano, para o-cloranil e benz[a]antraceno-7,12-diona; em 2-propanol, para ácido cloranílico e isatin; e em dimetil-sulfóxido, para p-cloranil.

O benz[a]antraceno-7,12-diona não reagiu com qualquer das substâncias estudadas; isatin reagiu somente com Boc-Pro[10 eq.]-Fmoc-Pro[1 eq.]-Resina, o que era esperado, pois, é um reagente específico para prolina

TABELA 9

Determinação qualitativa de amino grupos livres com quinonas.

aminoácido-resina	Grupos protetores nos aminoácidos-resina			
	Boc	Boc 10 eq. Fmoc 1 eq.	Boc 100 eq. Fmoc 1 eq.	Boc 100 eq. Fmoc 0,5 eq.
	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D
Ala-R	a/a/a/nc	v/ve/vc/nc	vc/v/ae/nc	ae/ae/ae/nc
	0,343 ± 0,044	58,5 ± 0,4	9,45 ± 0,03	3,33 ± 0,08
	0,055%	9,35%	1,51%	0,53%
Met-R	a/a/a/nc	v/ve/v/nc	vc/v/vc/nc	ae/ae/ae/nc
	0,384 ± 0,025	64,7 ± 0,1	6,98 ± 0,12	3,80 ± 0,03
	0,061%	10,3%	1,12%	0,61%
Pro-R	a/a/a/nc	ve/ve/ve/nc	v/a/a/nc	v/a/a/nc
Asn-R	a/a/a/nc	v/ve/v/vc/nc	vc/v/ae/nc	vc/v/ae/nc
	0,337 ± 0,107	75,0 ± 0,1	6,06 ± 0,09	2,74 ± 0,05
	0,054%	12,0%	0,97%	0,44%
Arg-R	a/a/a/nc	v/v/v/nc	v/v/vc/nc	v/v/vc/nc
	0,324 ± 0,018	60,7 ± 1,2	7,46 ± 0,27	4,26 ± 0,06
	0,052%	9,7%	1,19%	0,68%
Asp-R	a/a/a/nc	v/v/v/nc	vc/v/v/nc	vc/v/vc/nc
	0,566 ± 0,042	111,2 ± 0,8	10,00 ± 0,2	4,55 ± 0,10
	0,090%	17,8%	1,60%	0,73%

Os aminoácidos-resina protegidos foram tratados com uma solução de 50% de piperidina/50% de dimetilformamida para remover o grupo Fmoc. Após, em estado sólido, uma mistura entre quinona e amostra (4,0 - 6,0 mg) foi aquecida por 20 minutos, à 100°C, e a cor da amostra foi observada. a = amarelo, ae = amarelo escuro, v = vermelho, ve = vermelho escuro, vc = vermelho claro, nc = nenhuma troca na coloração. **A** (p-benzoquinona), **B** (2,6-dicloro-PBQ), and **C** (2,5-dicloro-PBQ); and **D** (p-cloranil, ácido cloranílico, o-cloranil, isatin, ou benz[a]antraceno-7,12-diona). A determinação quantitativa dos amino grupos livres foi feita pelo método da ninhidrina (137). Todos os valores são médias de três análises e as unidades são expressas em μmoles/g. As porcentagens dos valores das aminas foram calculados considerando o teste de ninhidrina para a resina como 100% (625,5 ± 12,6 μmoles/g).

(130); o-cloranil, p-cloranil e ácido cloranílico reagiram com MBHA-Resina, mas somente o o-cloranil foi sensível a concentrações de amino grupos livres do Boc-Ala[100 eq.]-Fmoc-Ala[1 eq.]-Resina, o-cloranil e ácido cloranílico foram sensíveis para Boc-Pro[10 eq.]-Fmoc-Pro[1 eq.]-Resina.

A cor vermelha permaneceu, em qualquer das concentrações de amino grupos, mesmo com aquecimento por 24 horas, indicando que a substância vermelha da reação com amino-acil-resina é estável, mas não para aminoácidos livres, pois a coloração mudou de púrpura para marrom, à temperatura ambiente (188).

A reação de PBQ com a histidina (His) foi testada, pois o teste de Kaiser (136, 137) apresenta reação falso positivo para His. Boc-His(Tos)-Resina foi preparado pelo acoplamento de Boc-His(Tos) com DCC (por três vezes, 3 horas cada). A concentração de amino grupos livres, pelo teste da ninhidrina (137), foi 8,77 ± 0,41 μmoles/g e a PBQ não mostrou troca na coloração após 20 minutos de aquecimento, porém, após 30 e 40 minutos de aquecimento a cor apresentada foi amarelo escuro e vermelho, respectivamente.

O Boc-His(Tos)-Resina foi, então, acetilado e a concentração de amino grupos livres foi de 5,75 ± 0,18 μmoles/g, porém, a amostra tornou-se marrom escuro devido à acetilação, porém, quando a amostra foi aquecida com PBQ, obteve-se a cor amarelo escura. Entretanto, mesmo com o aquecimento de 3 horas, a cor vermelha não foi observada. Com estes resultados podemos concluir que PBQ não apresenta teste falso positivo para histidina, durante o período de até 20 minutos de aquecimento.

A tabela 10 mostra os resultados dos testes da ninhidrina e PBQ para peptídeos e aminoácidos ligados à resina MBHA. Estes resultados indicam que a metodologia proposta tem sensibilidade suficiente para ser usada em SPFS e que esta sensibilidade depende do aminoácido envolvido, pois, para Boc-Ala-Resina foi possível conseguir um resultado positivo, mas o mesmo não ocorreu para Boc-Asn-Resina.

TABELA 10

Determinação qualitativa de amino grupos livres com PBQ.

amostra	teste da PBQ	teste da ninhidrina (μmoles/g)
Glucagon des(1-20)	vermelho escuro	681,5 ± 23,7 A * = 0,217
VIP des(1-11)	vermelho claro	5,29 ± 0,38 A = 0,014
Glucagon des(1-10)	vermelho	8,88 ± 0,35 A = 0,018
Boc-Gly-Pro-R ‡	vermelho	1,34 ± 0,01 A = 0,009
Boc-Ala-Ala-Ala-R	amarelo	0,267 ± 0,060 A = 0,002
Boc-Ala-R †	vermelho	0,626 ± 0,036 A = 0,004
Boc-Asn-R †	amarelo	1,13 ± 0,11 A = 0,005
Boc-Arg-R	amarelo	0,352 ± 0,028 A = 0,002

A mistura da amostra com PBQ, em estado sólido, foi aquecida por 20 minutos, à 100°C, e a cor foi observada após o resfriamento. A determinação quantitativa dos amino grupos livres foi feita pelo método da ninhidrina (137). Os valores são médias de três análises. A: absorbância (A/1 mg de amostra x 2 ml; para A* o volume final foi de 25 ml). † Depois que as amostras foram mantidas por 15 semanas em câmara fria (em dessecador); a concentração de amino grupos livres, que foi feita pelo teste da ninhidrina, se apresentou aumentada (veja tabela 9 para comparação) e o teste da PBQ para Boc-Ala-R tornou-se positivo. ‡ teste da ninhidrina após dois acoplamentos de Boc-Gly com DCC (primeiro acoplamento de 2 minutos e segundo de 3 minutos).

CONCLUSÕES

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM PLASMA SANGÜÍNEO

Pelos dados apresentados conclui-se que o método da PBQ é 10 vezes mais sensível do que o método de biureto; que os produtos de reação entre PBQ e proteínas do plasma são estáveis por várias horas; que as absorbâncias específicas são similares para diferentes proteínas; e que as substâncias comumente usadas como anticoagulantes, não interferem com a reação da PBQ. Portanto, o método da PBQ é sensível, simples e conveniente para determinar proteínas totais no plasma sangüíneo.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM DIVERSOS TECIDOS DE RATO

Diversas vantagens podem ser citadas para a utilização do método da PBQ, apesar de ser 4 a 5 vezes menos sensível que o de Lowry (46), modificado por Hartree (69): 1) PBQ reage com todos os aminoácidos proteicos quantificando proteínas com maior precisão; 2) tem custo quase três vezes menor (cálculo a partir de catálogos Sigma e Aldrich); 3) utiliza menor período de tempo para fazer o ensaio; 4) é muito fácil de ser conduzido.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM LEITE EM PÓ DESNATADO

Comparando o método da PBQ com os de Lowry (46) e Kjeldahl (13, 190), concluímos que, apesar dos desvios padrões serem um pouco maiores, o método da PBQ é muito mais simples e de rápida execução; é feito

basicamente numa única etapa (aquecimento da PBQ com proteína); utiliza reagentes de menor custo que os outros dois métodos; pode ser usado em análise de rotina para determinar proteínas totais em leite em pó desnatado.

DETERMINAÇÃO DE AMINO GRUPOS LIVRES EM SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA (SPFS)

Diversas vantagens podem ser citadas para justificar o uso do método da PBQ ao invés do método de Kaiser (136), em SPFS: 1) não é necessário preparar nenhuma solução; 2) não mostra reação falso positiva para histidina; 3) é sensível à prolina; 4) possui a sensibilidade para ser usado em SPFS. Portanto, podemos concluir que a metodologia proposta é adequada para detecção de amino grupos livres em SPFS.

PERSPECTIVAS DE TRABALHOS

A utilização da PBQ para determinação de proteínas pela espectrofotometria resultou em uma metodologia que demonstra rapidez e sensibilidade, sugerindo ser possível sua utilização na determinação de proteínas em outras matrizes; em outros estudos sistemáticos avaliando, como por exemplo, a causa de resultados com 15% a menos de proteínas no método de Kjeldahl; ou a utilização do método da PBQ em AIF.

SUMÁRIO

O presente trabalho apresenta metodologias utilizando a p-benzoquinona (PBQ) para a determinação de proteínas totais em diversas matrizes. As metodologias propostas foram comparadas com os métodos recomendados ou os mais utilizados, conforme o caso.

O método aqui proposto, para determinação de proteínas totais em plasma sangüíneo, foi comparado com o método de biureto, mostrando-se adequado e com sensibilidade dez vezes maior que a do biureto.

Para a determinação de proteínas totais em diversos tecidos de rato, o método proposto foi comparado com os métodos de Hartree e FFDW, e apresentou resultados mais próximos do FFDW do que o método de Hartree e, também, mostrou ser mais rápido, barato e de fácil realização.

O método desenvolvido para determinação de proteínas totais em leite em pó desnatado foi comparado com os métodos de Kjeldahl e Lowry e cols., sendo mais simples e rápido que as metodologias de Lowry e Kjeldahl.

Para determinação de amino grupos livres em síntese de peptídeos em fase sólida, a metodologia proposta foi comparada com o método de Kaiser e cols. O método proposto apresentou diversas vantagens sobre o método de Kaiser, sendo estas: o método é sensível a prolina, não precisa preparar nenhuma solução, não apresenta falso positivo para histidina e é rápido.

ABSTRACT

The present thesis describes the utilization of p-benzoquinone (PBQ) for assay of total protein in several samples. The methods presented here were compared with those mostly used or recommended depending on the case.

For determination of total proteins in the blood plasma, the proposed method was compared with biuret method, and it was 10 times more sensitive than biuret method and convenient method for determination of total proteins in plasma.

The assay of total proteins in several rat tissues with the proposed method, was compared with Hartree and FFDW methods, and it shows closer proteins content to FFDW method than Hartree method, besides it was faster, less expensive and easier to be used than Hartree method.

The method developed for determination of total proteins in skin milk powder, was compared with Kjeldahl and Lowry methods and showed to be more simple and faster than these methods.

For determination of free amino groups in solid phase peptide synthesis, the proposed method was compared with Kaiser method. The proposed method showed several advantages than Kaiser method, such as: it is sensitive for proline, it is not necessary to prepare any solution and it does not show a false positive test for histidine.

BIBLIOGRAFIA *

1) W. F. Ganong, *Review of Medical Physiology*, Prentice-Hall Inc., 10ª ed., San Francisco (1991)

2) J. Darnell, H. Lodish e D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, 2ª ed., New York (1990).

3) R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique*, John Wiley & Sons Inc., 3ª ed., New York (1994).

4) M. Palkovits, *Brain Res., 59*, 449 (1973).

5) R. M. Berne, M. N. Levy, *Fisiologia*, Ed.Guanabara, 2ª ed., Rio de Janeiro (1990).

6) National Academy of Sciences-National Research Council, *Recommended Dietary Allowwances*, 8ª ed., Publ. 0-309-02216-9, Washington-DC (1974).

7) O. R. Fennema (Editor), *Principles of Food Science*, vol. 4, parte 1, Marcel Dekker Inc., New York (1976).

8) B. M. King, *Neurosc. Biobehav. Rev., 12*, 29 (1988).

9) E. Heftmann, *Chromatography: A laboratory handbook of chromatografic and electrophoretic methods*, Van Nostrand Reinhold Company, 3ª ed., New York (1975).

10) M. W. W. Adams e R. M. Kelly, *Chemical & Engineering News, 18*, 32 (1995).

11) P. Mcdonald, R. A. Edwards e J. F. D. Greenhalgh, *Animal Nutrition*, Longman Scientific & Technical, 4ª ed., Hong Kong (1987).

12) C. Robbins, *Wildlife Feeding and Nutrition*, Academic Press, New York (1983).

13) J. Kjeldahl, *Z. Anal. Chem., 22*, 366 (1883).

14) C. H. Collins, G. L. Braga e P. S. Bonato (ed.), *Introdução a métodos cromatográficos*, cap. 9; LFL Guimarães e CH Collins, 6ª ed., UNICAMP, Campinas (1995).

* Organizada de acordo com os critérios adotados pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Abreviaturas de títulos de periódicos de acordo com o Chemical Abstracts Service Index, Columbus, 1975.

15) M. F. M. Tavares, *Química Nova, 19,* 173 (1996).

16) W. F. McClure, *Anal. Chem., 66,* 43A (1994).

17) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong e G. M. Whitehouse, *Science, 246,* 64 (1989)

18) B. F. Chmelka e A. Pines, *Science, 246,* 71 (1989)

19) L. Meites (Editor), *Handbook of Analytical Chemistry,* McGraw-Hill Book Company, primeira edição, New York (1963).

20) J. Heyrovsky e J. Kuta, *Principles of Polarography,* Academic Press, New York (1966).

21) J. A. Howell e L. G. Hargis, *Anal. Chem., 66,* 445 R (1994).

22) A. G. Gornall, C. J. Bardawill e M. M. David, *J. Biol. Chem., 177,* 751 (1949).

23) B. T. Doumas, D. B. Bayse, K. Borner, R. J. Carter, *Clin. Chem., 27,* 1651 (1981).

24) J. B. Hunn e I. E. Greer, *J. Fish Biol., 36,* 617 (1990).

25) H. H. Nishi, J. Kestner e R.J. Elin, *Clin. Chem., 31,* 95 (1985).

26) O. Meulemans, *Clin. Chim. Acta, 5,* 757 (1960).

27) L. M. S. Vermes, R. G. Ferri e J. M. Marlet, *Rev. Inst. Adolfo Lutz, 37,* 11 (1977).

28) M. Macart e L. Gerbaut, *Clin. Chim. Acta, 122,* 93 (1982).

29 E. A. H. Hische, H. J. Van der Helm, M. Th. Van Meegen e H. I. G. Blanken, *Clin. Chem., 28,* 1236 (1982).

30) P. R. Finley e R. J. Williams, *Clin. Chem., 29,* 126 (1983).

31) M. P. Goren e S. Osborne, *Clin. Chem., 33,* 711 (1987).

32) M. P. Goren e J. T. L. Li, *Clin. Chem., 32,* 386 (1986).

33) N. A. Morozova e T. A. Baryshnikova, *Lab. Delo, 40,* 23 (1991).

34) M. Macart e L. Gerbaut, *Clin. Chim. Acta, 141,* 77 (1984).

35) W. Reichadt e B. Eckert, *Nahrung, 35,* 731 (1991).

36) T. Mitsunaga e H. Ando, *Kinki-Daigaku-Nogaku-Kiyo, 23,* 63 (1990).

37) M. Ramachandran, A. Grover, B. D. Banerjee e Q. Z. Hussain, *J. Food Sci. Tecnol.*, *21*, 99 (1984).

38) A. J. Owen e A. T. Andrews, *J. Dairy Res.*, *51*, 307 (1984).

39) J. W. Jenzano, S. L. Hogan, C. M. Noyes, G. L. Featherstone e R. L. Lundblad, *Anal. Biochem.*, *159*, 370 (1986).

40) E. M. Tzvetanova e R. K. Gotzev, *Clin. Chem.*, *34*, 430 (1988).

41) R. E. Beyer, *Anal. Biochem.*, *129*, 483 (1983).

42) C. P. Flack e J. W. Woollen, *Clin. Chem.*, *30*, 559 (1984).

43) D. B. Barnes, G. F. Pierce, D. Lichti, M. Landt, J. Koenig e K. M. Chan, *Clin. Chem.*, *31*, 2018 (1985).

44) E. Sykes, C. Grzych, E. Epstein e F. L. Kiechle, *Clin. Chem.*, *33*, 1073 (1987).

45) J. Borovansky, I. Melezínek e A. Budesínská, *Anal. Biochem.*, *159*, 249 (1986).

46) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr e R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, *193*, 265 (1951).

47) S. C. Chou e A. Goldstein, *Biochem. J.*, *75*, 109 (1960).

48) G. Legler, C. M. Müller-Platz, M. Mentges-Hettkamp, G. Pflieger e E. Jülich, *Anal. Biochem.*, *150*, 278 (1985).

49) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson e D. C. Klenk, *Anal. Biochem.*, *150*, 76 (1985).

50) G. C. Upreti, R. A. Ratcliff e P. C. Riches, *Anal. Biochem.*, *168*, 421 (1988).

51) K. C. Retz e W. J. Steele, *Anal. Biochem.*, *79*, 457 (1977).

52) C. R. Harrington, *Anal. Biochem.*, *186*, 285 (1990).

53) D. L. Marks, R. Buchsbaum e T. Swain, *Anal. Biochem.*, *147*, 136 (1985).

54) R. L. Mattoo, M. Ishaq e M. Saleemuddin, *Anal. Biochem.*, *163*, 376 (1987).

55) J. M. O. Eze e E. B. Dumbroff, *Can. J. Bot.*, *60*, 1046 (1982).

56) R. A. Marinelli, M. G. Luquita e E. A. R. Garay, *Clin. Chem.*, *33*, 1475 (1987).

57) D. Wessel e U. I. Flügge, *Anal. Biochem.*, *138*, 141 (1984).

58) F. Rodríguez-Vico, M. Martínez-Cayuela, E. García-Peregrín e H. Ramírez, *Anal. Biochem., 183,* 275 (1989).

59) B. Sebecic, *Nahrung, 31,* 817 (1987).

60) S. Patton e G. E. Huston, *Nutr. Rep. Int., 30,* 1041 (1984).

61) R.P. Keller e M. C. Neville, *Clin. Chem., 32,* 120 (1986).

62) G. M. Oosta, N. S. Mathewson e G. N. Catravas, *Anal. Biochem., 89,* 31 (1978).

63) H. Lüdi e A. Bärtschi, *Anal. Chim. Acta, 217,* 359 (1989).

64) P. M. Clifton, L. Chang e A. M. Mackinnon, *Anal. Biochem., 172,* 165 (1988).

65) H. J. L. Fryer, G. E. Davis, M. Manthorpe e S. Varon, *Anal. Biochem., 153,* 262 (1986).

66) F. K. Shakir, D. Audilet, A. J. Drake III e K. M. M. Shakir, *Anal. Biochem., 216,* 232 (1994).

67) E. Larson, B. Howlett e A. Jagendorf, *Anal. Biochem., 155,* 243 (1986).

68) A. Alam, *Anal. Biochem., 203,* 121 (1992).

69)E. F. Hartree, *Anal. Biochem., 48,* 422 (1972).

70) C. E. Stauffer, *Anal. Biochem., 69,* 646 (1975).

71) H. H. Hess, M. B. Lees e J. E. Derr, *Anal. Biochem., 85,* 295 (1978).

72) A. Bensadoun e D. Weinstein, *Anal. Biochem., 70,* 241 (1976).

73) P. P. Xu, C. M. Troupe e A. Sharma, *Microchem. J., 49,* 85 (1994).

74) E. Vedralová, J. Borovansky e J. Duchoň, *J. Biochem. Biophys. Meth., 14,* 343 (1987).

75) E. Ross e G. Schatz, *Anal. Biochem., 54,* 304 (1973).

76) H. P. S. Makkar, O. P. Sharma e S. S. Negi, *Anal. Biochem., 104,* 124 (1980).

77) J. M. Dawson e P. L. Heatlie, *Anal. Biochem., 140,* 391 (1984).

78) I. Polacheck e E. Cabib, *Anal. Biochem., 117,* 311 (1981).

79) M. L. Kashyap, B. A. Hynd e K. Robinson, *J. Lipid Res., 21,* 491 (1980).

80) M. G. Sargent, *Anal. Biochem., 163,* 476 (1987).

81) M. M. Bradford, *Anal. Biochem., 72,* 248 (1976).

82) S. J. Compton e C. G. Jones, *Anal. Biochem., 151,* 369 (1985).

83) C. K. Cheung, K. W. Chan e A. Y. W. Chan, *Clin. Chem., 36,* 2011 (1990).

84) M. Macart e L. Gerbaut, *Clin. Chem., 34,* 998 (1988).

85) C. M. Huang, *Clin. Chem., 34,* 980 (1988).

86) M. Stahl, *Clin. Chem., 30,* 1878 (1984).

87) Y. Bergqvist, L. Karlsson e L. Fohlln, *Clin. Chem., 35,* 2127 (1989).

88) J. P. Richard e P. Paquin, *Milchwissenschaft, 45,* 92 (1990).

89) G. O. Gogstad e M. B. Krutnes, *Anal. Biochem., 126,* 355 (1982).

90) S. V. Pande e M. S. R. Murthy, *Anal. Biochem., 220,* 424 (1994).

91) B. O. Fanger, *Anal. Biochem., 162,* 11 (1987).

92) H. K. Sharma e C. Tihon, *Anal. Biochem., 170,* 135 (1988).

93) K. S. Shiba, K. Kanamori, T. Harada, M. Nakao, K. Nakajima, T. Kodaira e H. Nakagawa, *Clin. Chem., 31,* 1215 (1985).

94) J. A. Lott, V. A. Stephan e K. A. Pritchard Jr., *Clin. Chem., 29,* 1946 (1983).

95) D. K. Wimsatt e J. A. Lott, *Clin. Chem., 33,* 2100 (1987).

96) K. S. Rosenthal e F. Koussale, *Anal. Chem., 55,* 1115 (1983).

97) P. Gillery, F. Locre, A. Malgras e J. P. Borel, *Clin. Chem., 31,* 1092 (1985).

98) T. Korenaga, X. Zhou, M. Izawa, T. Takahashi, e T. Moriwake, *Anal. Chimica Acta, 261,* 67 (1992).

99) W. A. Joern e L. Schmoele, *Clin. Chem., 27,* 1305 (1981).

100) M. G. Redinbaugh e W. H. Campbell, *Anal. Biochem., 147,* 144 (1985).

101) K. I. Kanaya e K. Hiromi, *Agric. Biol. Chem., 52,* 2615 (1988).

102) M. Fountoulakis, J. F. Juranville e M. Manneberg, *J. Biochem. Biophys. Meth., 24,* 265 (1992).

103) T. Marshall e K. M. Williams, *Anal. Biochem., 204,* 107 (1992).

104) S. M. Read e D. H. Northcote, *Anal. Biochem., 116,* 53 (1981).

105) S. Friedenauer e H. H. Berlet, *Anal. Biochem., 178,* 263 (1989).

106) R. C. Duhamel, E. Meezan e K. Brendel, *J. Biochem. Biophys. Meth., 5, 67* (1981).

107) B. M. Löffler e H. Kunze, *Anal. Biochem., 177,* 100 (1989).

108) C. M. Stoscheck, *Anal. Biochem., 184,* 111 (1990).

109) T. Marshall e K. M. Williams, *J Biochem. Biophys. Meth., 13,* 145 (1986).

110) S. M. Gotham, P. J. Fryer e W. R. Paterson, *Anal. Biochem., 173,* 353 (1988).

111) A. G. Splittgerber e J. Sohl, *Anal. Biochem., 179,* 198 (1989).

112) M. A. Godshall, *J. Food Sci., 48,* 1346 (1983).

113) R. C. Goldschmidt e H. K. Kimelberg, *Anal. Biochem., 177,* 41 (1989).

114) P. E. Tyllianakis, S. E. Kakabakos, G. P. Evangelatos e D. S. Ithakissios, *Anal. Biochem., 219,* 335 (1994).

115) L. C. Davis e G. A. Radke, *Anal. Biochem., 161,* 152 (1987).

116) M. G. Redinbaugh e R. B. Turley, *Anal. Biochem., 153,* 267 (1986).

117) R. E. Brown, K. L. Jarvis e K. J. Hyland, *Anal. Biochem., 180,* 136 (1989).

118) W. L. Baker, *Anal. Biochem., 192,* 212 (1991).

119) R. J. Kessler e D. D. Fanestil, *Anal. Biochem., 159,* 138 (1986).

120) P. Kamath e T. N. Pattabiraman, *Biochem. Arch., 4,* 17 (1988).

121) T. Marshall e K. M. Williams, *Anal. Biochem., 198,* 352 (1991).

122) M. P. Deutscher (Editor), *Guide to protein purification,* (in Methods in Enzymology, vol. 182), CM Stoscheck cap. II, item 6, Academic Press Inc., New York (1990).

123) J. R. Little e H. Donahue, *Meth. Immunol. Immunochem., 2,* 163 (1960).

124) G. Krystal, C. Macdonald, B. Munt e S. Ashwell, *Anal. Biochem., 148,* 451 (1985).

125) G. Krystal, *Anal. Biochem., 167,* 86 (1987).

126) C. M. Stoscheck, *Anal. Biochem., 160,* 301 (1987).

127) J. B. Hunter e S. M. Hunter, *Anal. Biochem., 164,* 430 (1987).

128) H. S. Soedjak, *Anal. Biochem., 220,* 142 (1994).

129) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc., 85,* 2149 (1963).

130) J. M. Stewart e J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis,* cap. I, 2ª ed., Pierce Chemical Company, Rockford IL (1984).

131) B. F. Gisin, *Anal. Chim. Acta, 58,* 248 (1972).

132) R. S. Hodges e R. B. Merrifield, *Anal. Biochem., 65,* 241 (1975).

133) W. S. Hancock, J. E. Battersby e D. R. K. Harding, *Anal. Biochem., 69,* 497 (1975).

134) T. Christensen, *Peptides Structure and Biological Function,* Proceedings of the Sixth American Peptide Symposium, 385 (1979).

135) W. Troll e R. K. Cannan, *J. Biol. Chem., 200,* 803 (1953).

136) E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger e P. I. Cook, *Anal. Biochem., 34,* 595 (1970).

137) V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam e R. B. Merrifield, *Anal. Biochem., 117,* 147 (1981).

138) R. T. Morrison e R. N. Boyd, traduzido por M Alves da Silva, *Química Orgânica,* 12 ed., fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (1995).

139) J. R. Poulsen e J. W. Birks, *Anal. Chem., 61,* 2267 (1989).

140) J. J. Aaron, J. E. Villafranca, V. R. White e J. M. Fitzgerald, *Appl. Spectrosc., 30,* 159 (1976).

141) S. Sharanov, I. Chourpa, H. Morjani, I. Nabiev, M. Manfait e A. Feafanor, *Anal. Chim. Acta, 290,* 40 (1994).

142) J. M. Finkel e S. D. Harrison Jr., *Anal. Chem., 41,* 1854 (1969).

143) S. K. B. Alcanfor, S. V. Cardoso e C. G. de Lima, *Anal. Chim. Acta, 289,* 273 (1994).

144) M. M. Amer, M. F. El-Tarras, S. A. El-Fattah e F. H. Metwally, *Anal. Letters, 21,* 773 (1988).

145) M. T. M. Zaki e A. G. A. Rehiem, *Microchem. J., 29,* 44 (1984).

146) M. T. M. Zaki, M. H. Fawzy e M. M. Assey, *Mikrochim. Acta [wien], III,* 321 (1986).

147) A. Besada, *Anal. Letters, 20,* 427 (1987).

148) M. S. Mahrous, A. S. Issa, M. A. A. Salam e N. Soliman, *Anal. Letters, 19,* 901 (1986).

149) S. Z. El-Khateeb, *Anal. Letters, 22,* 2223 (1989).

150) S. M. Galal, S. M. Blaih e M. E. Abdel-Hamid, *Anal. Letters, 25,* 725 (1992).

151) M. Rizk e F. Younis,*Anal. Letters, 17,* 1803 (1984).

152) L. El-Sayed, Z. H. Mohamed e A. A. M. Wahbi, *Analyst, 111,* 915 (1986).

153) Y. M. Issa e A. S. Amin, *Anal. Letters, 27,* 1147 (1994).

154) M. L. Iskander, H. A. A. Medien e S. Nashed, *Microchem. J., 39,* 43 (1989).

155) P. C. Falcó, F. B. Reig, A. S. Cabeza e C. M. Legua, *Anal. Chim. Acta, 287,* 41 (1994).

156) T. Gürkan, *Mikrochim. Acta [wien], I,* 165 (1976).

157) P. C. Falcó, A. S. Cabeza e C. M. Legua, *Anal. Letters, 27,* 531 (1994).

158) A. S. Cabeza, P. C. Falcó e C. M. Legua, *Anal. Letters, 27,* 1095 (1994).

159) R. Matíes, F. Jiménez, M. Román e J. J. Arias, *Anal. Letters, 27,* 131 (1994).

160) M. R. Ceba, A. Fernández-Gutiérrez e C. M. Sánchez, *Anal. Letters, 15,* 1621 (1982).

161) M. R. Ceba, A. Fernández-Gutiérrez e M. C. Mahedero, *Mikrochim. Acta [wien], II,* 85 (1983).

162) F. Salinas, A. M. de la Peña e F. M. de la Peña, *Mikrochim. Acta [wien], III,* 361 (1985).

163) A. M. G. Campaña, F. A. Barrero, M. R. Ceba e A. F. Gutierrez, *Analyst, 119,* 1903 (1994).

164) M. Vega e C. M. G. Van den Berg, *Anal. Chim. Acta, 293,* 19 (1994).

165) M. C. M. Andrey, M. D. G. Riaño, J. A. M. Leyva e M. G. Vargas, *Anal. Letters, 26,* 2649 (1993).

166) J. J. H. Brito, M. D. G. Caballero, J. P. Peña e J. A. H. Melián, *Analyst, 119,* 1593 (1994).

167) A. Wasey, R. K. Bansal, B. K. Puri, G. Kano, *Mikrochim. Acta [wien], III,* 417 (1984).

168) S. S. M. Hassan, M. L. Iskander e N. E. Nashed, *Talanta, 32,* 301 (1985).

169) D. H. Rosenblatt, P. Hlinka e J. Epstein, *Anal. Chem., 27,* 1290 (1955).

170) M. L. Iskander, H. A. A. Medien e S. Nashed, *Microchem. J., 36,* 368 (1987).

171) K. Lorentz e B. Flatter, *Clin. Chem., 20,* 1553 (1974).

172) M. L. Iskander e H. A. A. Medien, *Microchem. J., 41,* 172 (1990).

173) S. A. Rahim e T. S. Al-Ghabsha, *Egypt J. Chem., 20,* 627 (1977).

174) D. A. M. Zaia, W. J. Barreto, N. J. dos Santos e A. S. Endo, *Anal. Chim. Acta, 277,* 89 (1993).

175) M. Q. Al-Abachi, T. S. Al-Ghabsha e M. S. Al-Hafidh, *Microchem. J., 41,* 372 (1990).

176) G. G. Guilbault e D. N. Kramer, *Anal. Chem., 37,* 1395 (1965).

177) F. Quentel, C. Elleouet e C. Madec, *Anal. Chim. Acta, 295,* 85 (1994).

178) Y. Nakahara, A. Ishigami e Y. Takeda, *J. Chrom., 489,* 371 (1989).

179) R. Saxena, A. K. Singh e S. S. Sambi, *Anal. Chim. Acta, 295,* 199 (1994).

180) T. Ikeda, H. Hamada e M. Senda, *Agric. Biol. Chem., 50,* 883 (1986).

181) T. Kaku, H. I. Karan e Y. Okamoto, *Anal. Chem., 66,* 1231 (1994).

182) Y. Hasebe, Y. Tanaka e S. Uchiyama, *Anal. Letters, 27,* 41 (1994).

183) L. M. Rzepecki e J. H. Waite, *Anal. Biohem., 179,* 375 (1989).

184) B. P. Roy e F. Archibald, *Anal. Biohem., 216,* 291 (1994).

185) M. A. Slifkin, *Molecular Interactions,* vol. 2, cap. 6, pag. 271, Ed. H Ratajczak e WJ Orville-Thomas, John Wiley & Sons Ltda, N. Y. (1980).

186) J. B. Birks e M. A. Slifkin, *Nature, 197,* 42 (1963).

187) R. Foster, In: *Molecular Complexes,* R Foster, vol. 2, 251, Elek Science, London.

188) W. J. Barreto, D. A. M. Zaia e L. F. C. de Oliveira, *Spectrochim. Acta, 50A,* 1031 (1994).

189) W. R. Wilson e J. P. Hanner, *J. Biol. Chem., 106,* 323 (1934).

190) W. Horwitz, *Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists,* 12 ed., pag. 15, Association of Official Analytical Chemists, Washington (1975).

191) J. M. Zar, *Biostatistical Analysis,* Prentice-Hall Inc., New Jersey (1974).

192) R. B. Macfarlane e P. E. Benville, *Mar. Biol., 92,* 245 (1986).

193) A. W. Van-Toorenenbergen, B. G. Blijenberg e B. Leijnse, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 26,* 209 (1988).

194) N. T. Gridgeman, *Anal. Chem., 24,* 445 (1952).

195) K. I. Kanaya e K. Hiromi, *Agric. Biol. Chem., 51,* 1885 (1987).

196) W. E. Groves, F. C. Davis Jr. e B. H. Sells, *Anal. Biochem., 22,* 195 (1968).

197) J. O. Karlsson, K. Ostwald, C. Kåbjörn e M. Andersson, *Anal. Biochem., 219,* 144 (1994).

198) F. E. A. M. Verheul e P. J. H. C. Cornelissen, *Clin. Chem., 32,* 2003 (1986).

199) B. Lönnerdal, L. R. Woodhouse e C. Glazier, *J. Nutr., 117,* 1385 (1985).

200) F. C. Church, H. E. Swaisgood, D. H. Porter e G. L. Catignani, *J. Dairy Sci., 66,* 1219 (1983).