

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Trabalho de Conclusão de Curso

Ciências Biológicas

CARLOS EDUARDO RODRIGUES

ANÁLISE E SEPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NATURAIS E
NÃO-NATURAIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)

Orientador: Prof. Dr. Tarso Benigno Ledur Kist

Porto Alegre
Dezembro/2012

Análise e Separação de Aminoácidos Naturais e Não-naturais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Carlos Eduardo Rodrigues

Laboratório de Métodos Biofísicos de Análise – Departamento de Biofísica – UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, Brasil.

Resumo

A separação dos aminoácidos mais comumente encontrados em proteínas (L-aspartato, L-glutamato, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, L-valina, L-cistina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina) e dos cinco mais citados na literatura científica (ácido γ -aminobutírico – GABA, homocisteína, taurina, nitro-L-arginina e beta-alanina), utilizando-se derivatização pré-coluna com ortoftaldialdeído/N-acetil-L-cisteína (OPA/NAC), foi avaliada neste estudo. A separação dos aminoácidos mais comuns foi satisfatória, com exceção do par glicina/treonina, enquanto que para os demais aminoácidos não foi eficaz. Cinco amostras de sucos concentrados comerciais (laranja, uva, abacaxi, pêsego e maçã) foram avaliadas para verificar a presença de aminoácidos livres como teste para a eficiência do método. Um bom sistema de bombas, assim como boas colunas e um detector mediano são suficientes para análises em CLAE, que, aliados a um sistema simples para aquisição de dados, utilizando softwares livres, surgem como alternativa para a modernização de equipamentos fora de uso e aos caros softwares e equipamentos modernos. A estabilidade de armazenamento dos aminoácidos por um período de nove anos em solução de água/metanol (80/20) foi positiva, visto que o processo de análise e derivatização não foi afetado significativamente. Como novidade, é relatada a formação de derivativo adicional para o aminoácido glutamato. A utilização de fases móveis compostas por baixa quantidade de solventes orgânicos empregando acetona como substituinte do tetraidrofurano (THF) representou uma ótima relação de custo/benefício e baixo índice de agressão ao meio ambiente.

Palavras-chave: Aminoácidos; Acetona; OPA/NAC; CLAE; Software livre

1. Introdução

Todas as proteínas, sejam das mais antigas linhagens de bactérias ou das mais complexas formas de vida, são construídas a partir do mesmo conjunto onipresente de 20 aminoácidos, covalentemente ligados em sequências lineares características, e que, devido às propriedades distintas das cadeias laterais, podem ser considerados o alfabeto no qual a linguagem proteica é escrita. Em acréscimo a esses 20 aminoácidos usuais, as proteínas podem conter resíduos criados por modificação de resíduos já incorporados a um polipeptídeo e desempenhar importantes papéis estruturais e metabólicos nos seres vivos [1]. Além de todas essas possibilidades, nos últimos anos, os estudos envolvendo a síntese e incorporação de aminoácidos não-naturais emergiram como uma importante ferramenta no desenvolvimento de novas drogas, terapias e aplicações nas mais diferentes áreas da biotecnologia [2, 3]. Estabelecer uma metodologia confiável para identificar e quantificar esses aminoácidos é de grande

interesse dos mais variados campos das biociências, além de grande aplicabilidade na indústria química, farmacêutica e alimentícia.

É de consenso geral para os pesquisadores que trabalharam ou trabalham no campo da análise de aminoácidos e já usaram diferentes técnicas de derivatização, que por simplicidade, seletividade, sensibilidade e para minimizar o tempo de trabalho nas análises por CLAE com derivatização pré-coluna, o método envolvendo ortoformaldeído (OPA) é a melhor escolha [4]. Desde sua introdução por Roth [5], o método de derivatização com OPA tem se popularizado e continua em nível constante de crescimento, representando, no período entre 1998 e 2004, 30.4 a 39.5% dos artigos publicados sobre todas as derivatizações em CLAE [4]. No entanto, a desvantagem de utilizar o OPA nas reações de derivatização, é que ele não reage com aminas secundárias, presentes em aminoácidos como a prolina e a hidroxiprolina. Já o fenilisotiocianato (PITC), que também tem sido muito estudado nas análises de aminoácidos com derivatização pré-coluna [6, 7, 8], possui a vantagem de reagir com aminas primárias e secundárias. Entretanto, o reagente é mais tóxico e mais sensível às condições de armazenamento quando comparado ao OPA; o processo de derivatização é mais lento e não tolera bem tampões aquosos; há a necessidade de maiores aparatos para remoção do excesso de reagente, além de atmosfera controlada para a reação; o sistema de eluição exige maior índice de solventes orgânicos.

A constante modernização dos equipamentos de CLAE leva alguns analistas a deixarem de utilizar equipamentos mais antigos, mas que ainda podem render muitos estudos interessantes em diversas áreas de pesquisas. Pequenos ajustes e alternativas para reativar esses equipamentos podem ser empregados para modernizá-los.

Este trabalho se focou nos seguintes pontos: (i) desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a separação dos aminoácidos comumente encontrados nas proteínas (L-aspartato, L- glutamato, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, L-valina, L-cistina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina) e dos aminoácidos incomuns e não-naturais mais citados na literatura (ácido γ -aminobutírico – GABA, homocisteína, taurina, nitro-L-arginina e beta-alanina) (tabela 1); (ii) utilização de reagentes químicos que privilegiam a melhor relação custo/benefício, com índices reduzidos de toxicidade e contaminação ambiental; (iii) utilização e busca de alternativas para realizar análises em equipamentos fora de uso, com baixo custo, através de sistemas independentes de aquisição de dados e softwares livres; (iv) análise de sucos comerciais para avaliação do método com amostras reais.

Tabela 1

Número de citações de aminoácidos incomuns e não-naturais nos principais portais de busca de periódicos científicos.

AMINOÁCIDOS	Citações	
	Web of Science	Pub Med
ácido γ -aminobutírico	22728	44253
homocisteína	20201	17746
taurina	10885	15144
nitro-L-arginina	13892	13952
beta-alanina	3088	12993

2. Material e Métodos (Experimental)

2.1. Materiais

N-acetil-L-cisteína (NAC) foi adquirida da Acros Organics; padrão de aminoácidos marca Fluka e acetona adquiridos da Sigma-Aldrich; metanol e acetonitrila graus HPLC, ortoftaldialdeído (OPA), ácido mercaptopropiônico (MPA), ácido bórico e acetato de sódio foram adquiridos da Merck Brasil. Sucos concentrados comerciais marca Suvalan de 200 mL.

2.2 Soluções padrão

As soluções de aminoácidos foram preparadas diluindo-se os padrões em água destilada contendo metanol (8:2), e o pH posteriormente ajustado com NaOH 2.5 M em 9, utilizando-se pHmetro. Foram acondicionados individualmente em tubos tipo Eppendorf de volume de 1 mL, na concentração final de 10 mM e mantidos congelados em freezer desde março de 2003, os seguintes aminoácidos: L-aspartato, L-glutamato, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina, glicina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina, além de GABA na concentração de 1 mM e DL-homocisteína (7.4 mM), taurina (7.8 mM), nitro-L-arginina (4.56 mM) e beta-alanina (11.22 mM). Também foi utilizada a solução padrão de aminoácidos da marca Fluka, na concentração de 1 mM cada, contendo: L-aspartato, L-glutamato, L-serina, L-histidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, L-valina, L-cistina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina, L-prolina. OPA e NAC eram pesados em balança analítica e diluídos, separadamente, em solução de água e etanol (1:1), variando a concentração de 3 a 15 mg mL⁻¹ (OPA) e de 9 a 45 mg mL⁻¹ (NAC), os quais eram utilizados por um período de até 15 dias.

2.3 Solução Tampão

Tampão borato 400 mM foi produzido pela dissolução de ácido bórico em água destilada, com ajuste do pH em 9.4.

2.4 Derivatização

O processo de derivatização foi modificado do modelo utilizado por Moldoveanu e David [9]. Em tubos Eppendorf, foram adicionados os reagentes na seguinte ordem: 35 µL de OPA, 35 µL de NAC, 150 µL de tampão borato de sódio 400 mM - pH 9.4 e 35 µL de solução padrão de aminoácidos ou amostras de suco. O tempo de reação aplicado era de, no mínimo, 7 minutos.

2.5 Preparação das amostras para derivatização

As amostras de sucos, recém abertos, foram primeiramente filtradas com papel-filtro para remoção de partículas maiores. Posteriormente, foram submetidas à filtração com filtro de 0.45 µm e acondicionadas em tubos Eppendorf. Sem ajuste do pH, o volume de 35 µL de cada amostra foi adicionada diretamente à solução de derivatização. Para verificar a eficiência da derivatização, o aminoácido metionina foi adicionado como controle nos sucos de laranja e de maçã.

2.6 Equipamentos

2.6.1 Sistema Cromatográfico

Os equipamentos utilizados consistem em sistema de bombas ternário, modelo HPLC System 525 e termostato de coluna, modelo HPLC 582 Column Thermostat (BioTek Instruments, Alemanha); coluna Hi-Chrom C18 (modelo HI-5C18-250A) de 25 cm de

comprimento, com diâmetro interno de 4.6 mm e partículas de 5µm (Hi-Crom, Reino Unido); detector UV-Vis, modelo UVV monitor 40 (IMA- Institut für Molekularbiologie und Analytik, Alemanha); módulo de aquisição de dados AutoMAC, modelo MAC 882 (ISB Indústria e Comércio Ltda., Brasil); seringa Hamilton com volume de 50 µL (Hamilton Company, Estados Unidos); válvula de injeção Valco Cheminert, modelo C1 (Valco Instruments Co. Inc., Estados Unidos) com loop de 10 µL.

2.6.2 Sistema de Detecção

O comprimento de onda escolhido situa-se dentro da faixa do ultravioleta e foi de 335 nm, já que o produto da reação de derivatização com OPA/NAC apresenta os maiores valores de absorção entre os comprimentos de 300 e 380 nm (figuras 1 e 2 - dados adquiridos por espectrofotômetro Femto (Femto Ind. e Com. de Equipamentos).

2.6.3 Sistema de Eluição

Utilizou-se sistema de eluição composto de duas soluções (A e B) baseado no sistema utilizado por Vasanits e colaboradores [11]: o eluente (A) composto de acetato de sódio 50 mM, pH 7.2, contendo 1% (v/v) de acetona e eluente (B) composto de acetato de sódio 100 mM-acetonitrila-metanol-acetona (46:43:10:1), misturados em volumes proporcionais e titulados com ácido acético glacial e hidróxido de sódio, 1M, para pH 7.2. Os programas de gradiente considerados ótimos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2
Programas do gradiente de eluição para fases móveis A e B considerados ideais. Temperatura da coluna de 40°C.

Etapa	Tempo (min)	Fluxo (mL)	A (%)	B (%)
1	0	1.5	98	2
2	10	1.5	70	30
3	13	1.5	60	40
4	15	1.5	55	45
5	21	1.5	25	75
6	22	1.5	5	95
7	26	1.5	5	95
8	28	1.5	98	2
9	38	1.5	98	2

2.6.4 Análise dos dados

AutoMAC, versão 1.0.0 para aquisição dos dados cromatográficos provenientes do detector; CHROMuLAN, versão 0.90 (Jindrich Jindrich PIKRON Ltda, 2002) para tratamento dos dados originados do módulo de aquisição; PAST – Paleontological Statistics software package for education and data analysis (Hammer, O., Harper, D.A.T. and Ryan, PD, 2001) para os cálculos estatísticos; Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2007) para transformação dos dados e cálculos estatísticos diversos.

3. Resultados e discussão

3.1 Teoria/Cálculo

A precisão foi avaliada pela reprodutibilidade de injeções dos padrões de aminoácidos (tabela 3), e o desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (DPR) calculados com base nas equações (1 e 2) sugeridas por [12]:

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (1)$$

$$DPR (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

Onde, s = desvio padrão; x_i = valor de uma determinação; \bar{x} = média aritmética das determinações; N = número de determinações, DPR = Desvio padrão relativo. O limite de detecção foi calculado conforme a equação (3):

$$LD = \frac{C \times 3DP_r}{SP - \bar{r}} \quad (3)$$

Em que LD = limite de detecção; C = concentração; DP_r = desvio padrão do ruído; SP = sinal do pico; \bar{r} = média do ruído. A resolução (Res) entre os picos seguiu a equação (4), modificada de [13]:

$$Res = \frac{T_{R2} - T_{R1}}{W_1 + W_2} \quad (4)$$

Onde Res = resolução; T_R = Tempo de retenção de um pico; W = Largura de um pico.

A curva de calibração para os aminoácidos que foram quantificados nas amostras de sucos apresentou os seguintes valores de R^2 : aspartato (0.999); asparagina (0.963); serina (0.994); glicina (0.991); alanina (0.990); GABA (0.887); arginina (0.993); tirosina (0.997); lisina 1 (0.995) lisina 2 (0.535). Os testes de reprodutibilidade apresentaram o $DPR \leq 4\%$, com exceção do glutamato que foi de 12%, pois foi constatada que a reação de derivatização, geralmente, era irregular, com a formação de um derivativo adicional para esse aminoácido (figuras 3 e 5). O limite de detecção (LD) para a histidina (menor pico) foi de 17.90 μM ; para a tirosina (pico médio) foi de 4.88 μM ; para o aspartato (maior pico) foi de 1.94 μM . Os valores calculados de resolução entre os picos são apresentados na tabela 4.

Tabela 3

Reprodutibilidade da análise dos padrões de aminoácidos. Concentração de cada aminoácido de 85,75 μM , fluxo de 1.5 mL min^{-1} e temperatura de 40°C.

AA	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5	Média	s	DPR (%)
Área (unidade de área.10 ³)								
Aspartato	12.32	14.79	11.03	11.39	14.39	12.78	0.232	1.8
Glutamato	3.46	5.54	4.65	3.88	5.76	4.66	0.601	12.9
Asparagina	10.30	11.02	10.83	9.49	10.06	10.34	0.021	0.2
Serina	12.87	14.50	15.67	13.42	13.19	13.93	0.532	3.8
Glutamina	9.00	9.50	10.00	8.55	8.68	9.15	0.074	0.8
Histidina	4.87	5.21	6.09	5.06	4.60	5.17	0.146	2.8
Glicina	12.47	13.34	16.13	13.41	12.51	13.57	0.552	4.1
Arginina	13.29	14.49	16.62	12.70	12.71	13.96	0.338	2.4
Alanina	12.66	12.02	14.20	11.88	11.54	12.46	0.101	0.8
Tirosina	13.71	12.45	15.65	11.74	11.85	13.08	0.317	2.4
Metionina	13.51	13.94	16.18	12.62	13.28	13.91	0.197	1.4
Isoleucina	15.43	15.43	15.54	14.15	14.78	15.06	0.181	1.2
Triptofano	9.51	8.99	10.72	8.41	9.72	9.47	0.017	0.2
Lisina	24.34	25.66	28.80	22.39	22.81	24.80	0.23	0.9
Fenilalanina	12.37	12.95	14.29	12.26	12.08	12.79	0.21	1.6
Leucina	19.39	20.29	22.04	18.12	18.30	19.63	0.118	0.6

3.2 Estabilidade

3.2.1 Aminoácidos

A preparação de padrões analíticos é importantíssima no desenvolvimento de qualquer metodologia, e com aminoácidos não é diferente. No entanto, como boa parte das análises envolvem algum passo de modificação desses aminoácidos, mecanismos que facilitem futuras reações são necessários (como ajuste do pH, por exemplo), o que torna sua preparação morosa e dependente de volumes relativamente grandes, que acabam perdendo a viabilidade sem que sejam totalmente utilizados. Além de dificultar passos para a concentração de amostras, a adição de tampões pode facilitar o desenvolvimento de microrganismos e gerar contaminação. Os ácidos, presentes nos padrões comerciais, podem dificultar o ajuste do pH. Nesse sentido, para otimizar a preparação e reduzir custos, foi testada a preparação de padrões em uma solução de água e metanol. Segundo Meyer [13], soluções aquosas com mais de 15% de solventes orgânicos têm a sua durabilidade média em torno de três meses em temperatura ambiente. A preparação das soluções de aminoácidos deste trabalho envolveu a solubilização em água com 20% metanol (v/v), sendo armazenadas congeladas, com uma pequena fração sendo retirada e descongelada em geladeira, e mantidas em temperatura ambiente por 1h antes das análises. A preparação dos padrões data de março de 2003, e o processo de derivatização ocorre como descrito para outros tipos de preparação, com exceção do glutamato, representando sucesso na sua conservação e nas suas propriedades originais.

3.2.2 Derivatização

Os estudos relativos à derivatização de aminoácidos com OPA e aditivos contendo grupos SH [4,10] e a simplicidade de preparação em pequenos volumes utilizada por Moldoveanu e David [9] foram o ponto de partida nos estudos de derivatização deste trabalho. A relação OPA/NAC/AA (20:60:1) foi parcialmente seguida, pois, em determinadas preparações, a concentração de aminoácidos variava. A análise de varredura do espectro durante a derivatização revelou que a presença de NAC confere maior velocidade e maior estabilidade que a que envolve o MPA (figura 1). Em concordância com os estudos de Molnár-Perl [4,10], 7 minutos de reação é o tempo ideal para derivatização de aminoácidos utilizando NAC como aditivo SH, ao passo que MPA obtém a maior resposta entre 10 e 30 minutos de reação (figura 2). Não foi realizada a neutralização antes da injeção na coluna cromatográfica devido a aceleração na transformação de aminoácidos com mais de um derivativo e devido ao aumento de até 16% na degradação total dos aminoácidos [4, 10]. Entre as vantagens na utilização de NAC na derivatização com OPA, além da velocidade da reação, está no odor forte do MPA, que exige trabalho em capela com sistema de exaustão.

3.3 Detecção

O comprimento de onda escolhido para as análises foi o UV a 335 nm como margem de segurança pelo fato de as fases móveis utilizarem acetona, que possui “corte UV” (UV Cutoff) por volta de 330 nm (10% em água) [13,14,15].

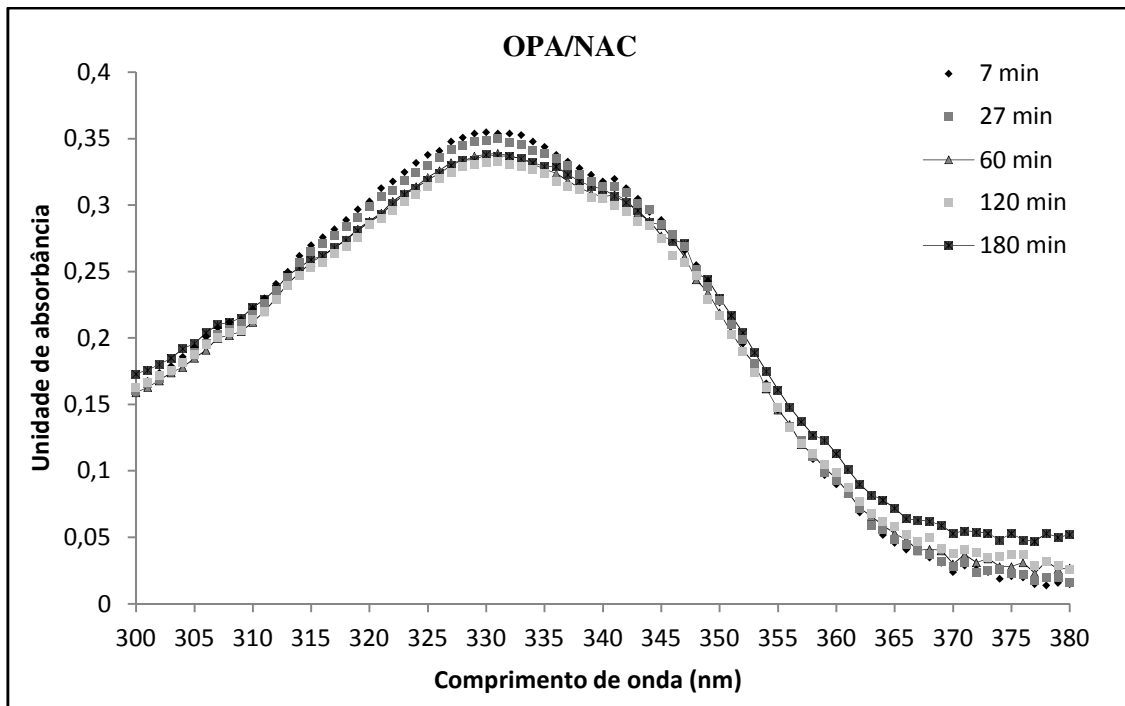


Fig. 1. Varredura por espectrofotômetro da reação de derivatização do padrão* de aminoácidos proteínogênicos com OPA/NAC em função do tempo. Aminoácidos constantes no padrão: L-aspartato, L- glutamato, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, L-valina, L-cistina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina. *Diluído em 100 vezes.

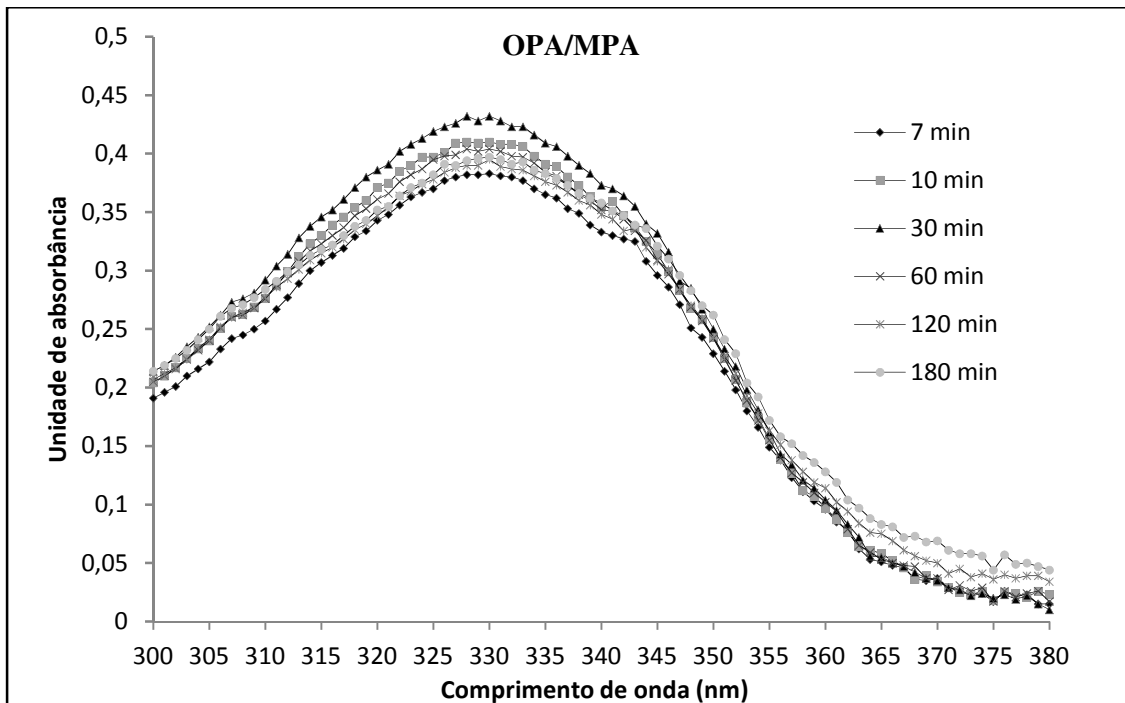


Fig.2. Varredura por espectrofotômetro da reação de derivatização do padrão* de aminoácidos proteínogênicos com OPA/MPA em função do tempo. Aminoácidos constantes no padrão: L-aspartato, L- glutamato, L-asparagina, L-serina, L-glutamina, L-histidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirosina, L-valina, L-cistina, L-metionina, L-isoleucina, L-triptofano, L-lisina, L-fenilalanina, L-leucina. *Diluído em 100 vezes.

3.4 Estudo dos solventes utilizados na eluição

O sistema de eluição utilizado apresenta a acetona como solvente não convencional para detecção em UV, mas que possui excelentes propriedades como baixa viscosidade, alta solubilidade em todos os outros solventes e boa força de eluição (superior a da acetonitrila) [13,14,15]. Neste trabalho a acetona foi utilizada como aditivo em substituição ao THF, que apresenta maior toxicidade, baixa estabilidade (degrada rápido após aberto devido a formação de peróxidos, que podem reagir com os analitos), alto custo e risco de acidentes, além de fazer com que o reequilíbrio da coluna seja mais demorado se comparado a fases móveis contendo metanol e acetonitrila [13]. Os cromatogramas (figuras 3 a 10) mostram o perfil de eluição utilizando acetona, demonstrando um tempo de análise dentro dos melhores parâmetros encontrados na literatura. O reequilíbrio da coluna também foi mais curto, uma grande vantagem em relação ao THF (não mostrado), além de uma boa resolução (Res) entre os picos dos aminoácidos mais encontrados em proteínas (Tabela 4), com exceção do par glicina/treonina.

3.5 Estudo da separação

A separação dos aminoácidos foi realizada em duas fases: na primeira foi desenvolvida a metodologia para a separação dos aminoácidos mais comumente encontrados em proteínas (figura 3). Como são os mais abundantes, a opção por uma metodologia de separação que envolva apenas esse grupo de aminoácidos, com um sistema de eluição otimizado para que sejam resolvidos em um tempo relativamente curto, já providencia suporte a diversas áreas de pesquisas no campo dos aminoácidos. Na segunda fase, houve a adição dos aminoácidos não-naturais e não-proteinogênicos para verificar o perfil de eluição e se o mesmo método também era capaz de separá-los (figura 4). Como teste para a verificação da aplicabilidade do método foi realizada a quantificação de aminoácidos livres em cinco amostras de sucos comerciais concentrados (figuras 6 a 10 e tabela 5).

3.5.1 Eficiência da separação

Para os aminoácidos proteinogênicos, a separação foi relativamente boa. Os testes de reprodutibilidade mostraram que o DPR foi baixo (≤ 4), estando em conformidade com a literatura consultada. O tempo total de eluição menor que 21 minutos e o tempo de reequilíbrio da coluna (totalizando 38 minutos por análise) também se encontram entre os melhores parâmetros para CLAE. A resolução entre os aminoácidos (com exceção do par glicina/treonina) próximos de 1 também é considerada boa (o ideal é 1.25) [13]. Contudo, quando iniciada a adição dos aminoácidos não-proteinogênicos e não-naturais, a separação não se mostrou eficiente (figura 4) mesmo testando-se vários padrões de eluição por gradiente. No entanto, GABA e taurina, quando presentes individualmente, são quantificáveis, já que eluem separadamente dos aminoácidos proteinogênicos.

Tabela 4

Perfil de separação dos aminoácidos mais comuns encontrados em proteínas, utilizando acetona como aditivo. Fluxo de 1.5 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 40°C.

AA	Resolução	TR (min)	Largura (min)
Aspartato		2.60	0.72
	1.61		
Glutamato		3.90	0.89
	5.28		
Asparagina		7.73	0.56
	0.88		
Serina		8.23	0.58
	1.27		
Glutamina		9.01	0.65
	0.95		
Histidina		9.62	0.63
	1.30		
Glicina + Treonina		10.44	0.63
	0.78		
Alanina		11.00	0.80
	2.00		
Arginina		12.43	0.63
	2.22		
Tirosina		14.31	1.06
	1.30		
Cistina		15.31	0.48
	0.93		
Valina		16.00	1.00
	0.95		
Metionina		16.87	0.84
	1.97		
Isoleucina		18.06	0.37
	1.04		
Triptofano		18.42	0.32
	0.89		
Lisina 1		18.71	0.33
	1.08		
Fenilalanina		19.10	0.39
	0.76		
Leucina		19.49	0.63
	1.20		
Lisina 2		20.26	0.65

3.5.2 Aminoácidos que eluem com mais de um pico

Vários estudos relatam e descrevem o comportamento de alguns aminoácidos que eluem com mais de um pico (glicina, GABA, histidina, β -alanina, ornitina e lisina) [4,10,11]; porém Molnár-Perl [19] faz uma bela revisão, relatando estudos com espectrometria de massas que identificam os átomos vizinhos ao carbono ligado ao grupo amina primária como principal responsável pela derivatização com uma molécula adicional de OPA (o hidrogênio mobilizável do grupo CH₂, próximo ao nitrogênio isoindol inicializa a reação).

Neste trabalho foi bem clara a reação da lisina com uma molécula adicional de OPA. Pouco tempo depois dos 7 minutos de reação, ou com a temperatura ambiente mais elevada, já era nítida a formação de um segundo pico da lisina (figura 3, cromatograma inferior). Em relação aos outros aminoácidos que fizeram parte do estudo foi verificada a formação discreta de derivativo adicional com GABA (figura 5), talvez pelo fato de a concentração final desse aminoácido ter sido baixa (115,4 μ M). Uma novidade (que não foi relatada na literatura consultada) foi a formação irregular de um segundo derivativo para o glutamato (figuras 3 e 5), o que gerou interferência na sua derivatização e nos testes de reprodutibilidade. Por se tratar de um aminoácido com características ácidas, a formação do derivativo adicional pode ter sido

acelerada [4, 10], já que na preparação dos padrões não foi utilizado tampão, foi feito apenas o ajuste do pH, que pode ter sido alterado pelo longo período de armazenamento. Essa observação abre uma porta para futuras investigações sobre as condições que influenciam a formação de derivativos adicionais também para outros aminoácidos. Com relação às amostras de suco, a concentração de todos os aminoácidos presentes foi baixa, mas alguns aminoácidos livres ainda permanecem em solução, o que cofere com o rótulo do produto, que apresenta quantidade zero de proteínas. Apesar de baixa, lisina era detectável, e, mesmo com o tempo de reação rigorosamente controlado em sete minutos, havia a formação irregular do segundo derivativo – lisina 2 (figura 6), provavelmente devido ao pH ácido dos sucos (entre 5 e 6), o que dificultou a sua quantificação (tabela 5).

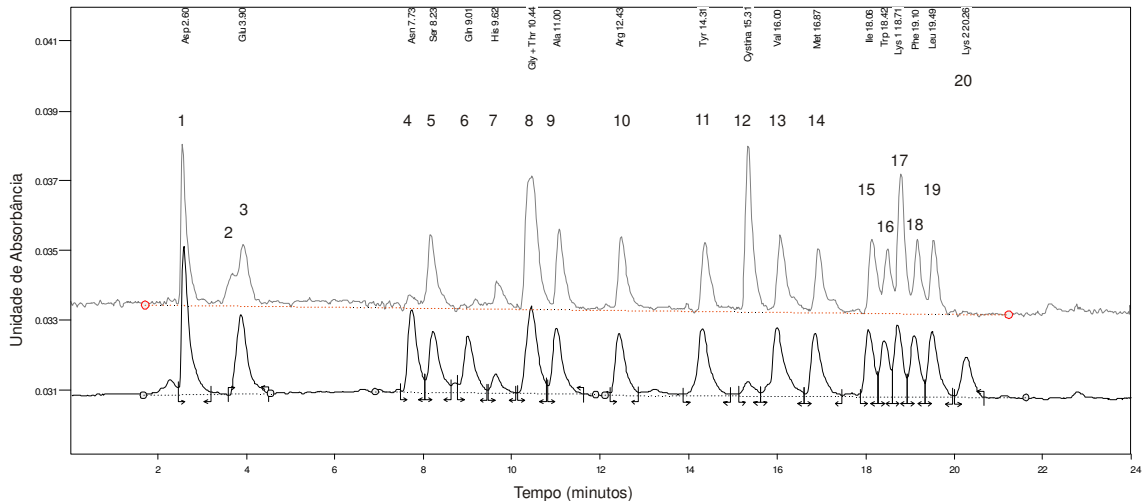


Fig. 3. Cromatogramas dos aminoácidos mais comuns das proteínas: 1-aspartato; 2-glutamato 1; 3-glutamato 2*; 4-asparagina; 5-serina; 6-glutamina; 7-histidina; 8-glicina+treonina; 9-alanina; 10-arginina; 11-tirosina; 12-cistina; 13-valina; 14-metionina; 15-isoleucina; 16-triptofano; 17-lisina; 18-fenilalanina; 19-leucina; 20-lisina 2. Cromatograma superior sem adição de asparagina e glutamina e injeção após 7 min de derivatização; inferior com Asn e Gln e injeção com tempo de derivatização superior a 7 min. *Glutamato 2 (inferior).

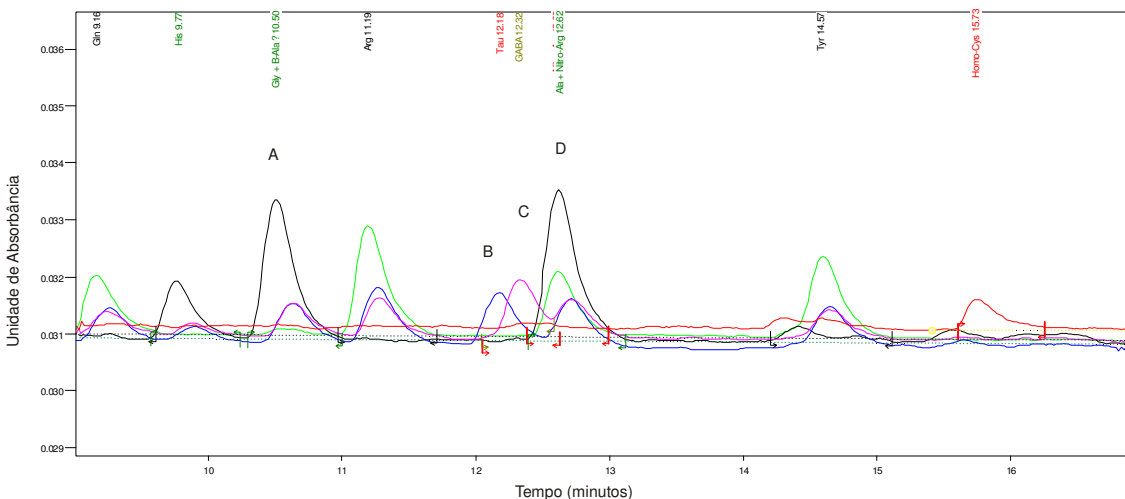


Fig. 4. Sobreposição dos cromatogramas em detalhe dos aminoácidos em que não foi satisfatória a separação: A (preto), glicina+β-alanina; B (azul), taurina; C (rosa), GABA; D (preto), alanina+nitro-arginina.

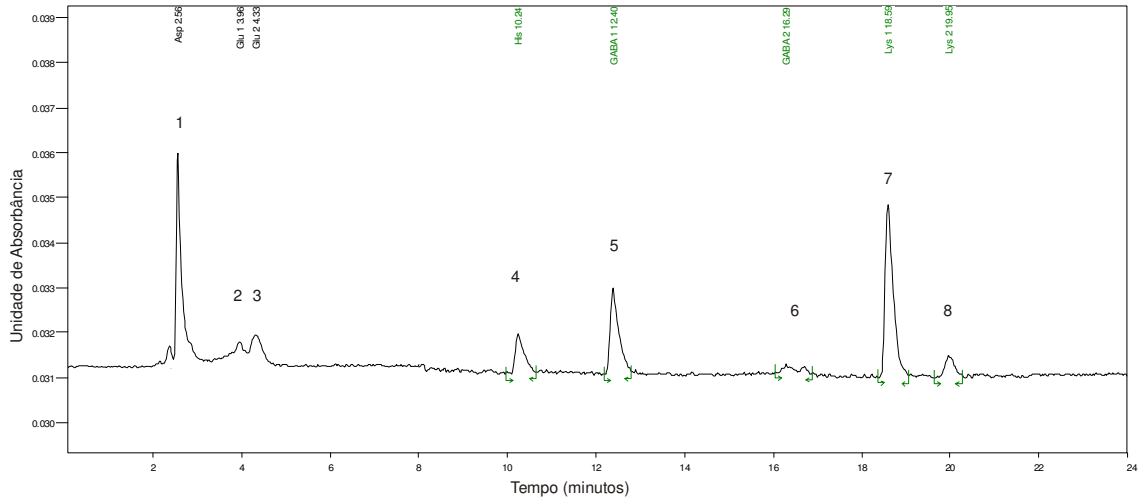


Fig. 5. Cromatograma dos padrões de aminoácidos com mais de um derivativo: 2-glutamato 1; 3-glutamato 2; 5-GABA 1; 6-GABA 2; 7-lisina 1; 8-lisina 2. Concentração dos aminoácidos: glutamato, 82,4 μ M; GABA, 115,4 μ M; aspartato, histidina e lisina, 192,3 μ M.

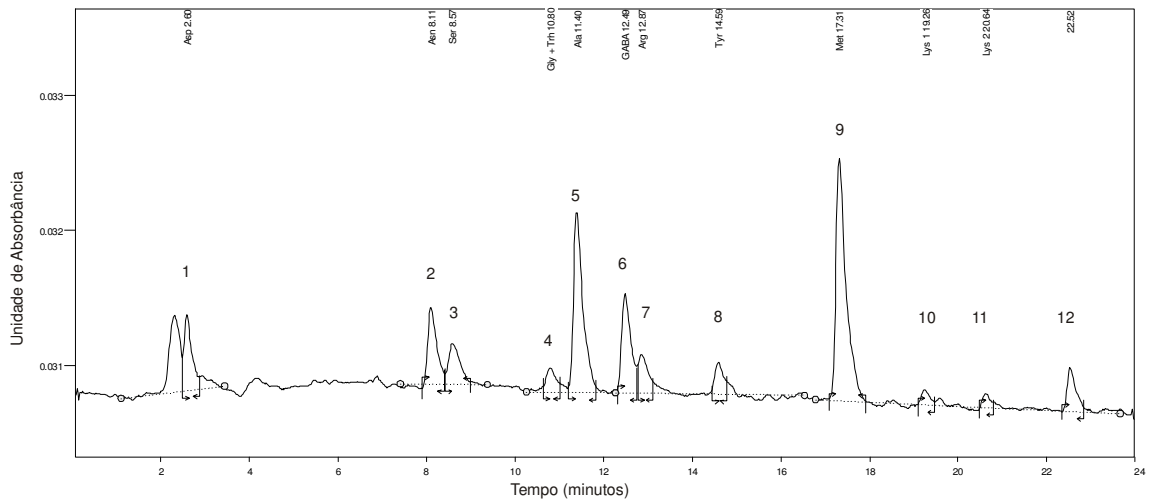


Fig. 6. Cromatograma de amostra de suco de laranja: 1-aspartato; 2-asparagina; 3-serina; 4-glicina+treonina; 5-alanina; 6-GABA; 7-arginina; 8-tirosina; 9-metionina (padrão adicionado); 10-lisina 1; 11-lisina 2; 12-não identificado.

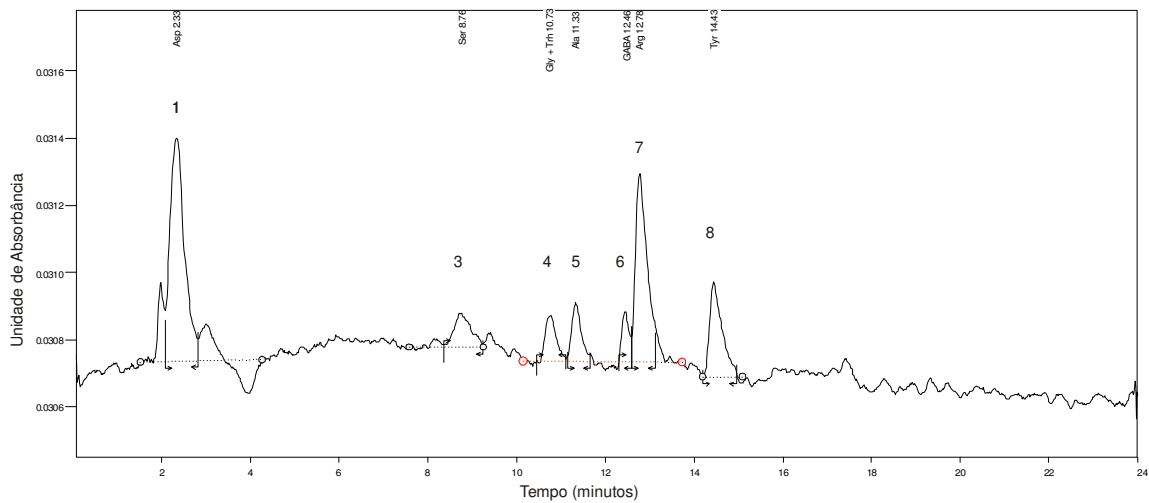


Fig. 7. Cromatograma de amostra de suco de uva: 1-aspartato; 3-serina; 4-glicina+treonina; 5-alanina; 6-GABA; 7-arginina; 8-tirosina.

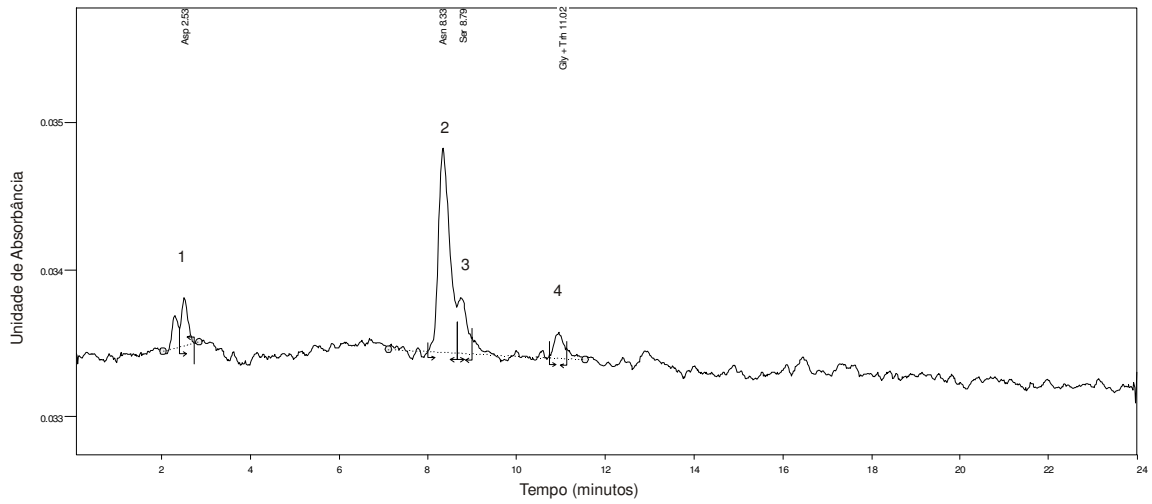


Fig. 8. Cromatograma de amostra de suco de abacaxi: 1-aspartato; 2-asparagina; 3-serina; 4-glicina+treonina.

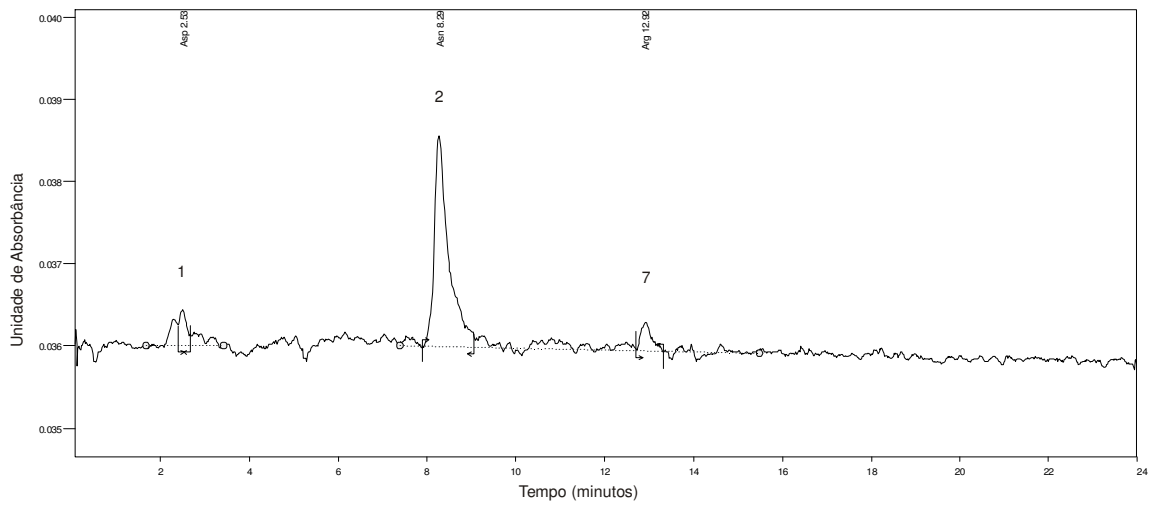


Fig. 9. Cromatograma de amostra de suco de pêsego: 1-aspartato; 2-asparagina; 7-arginina.

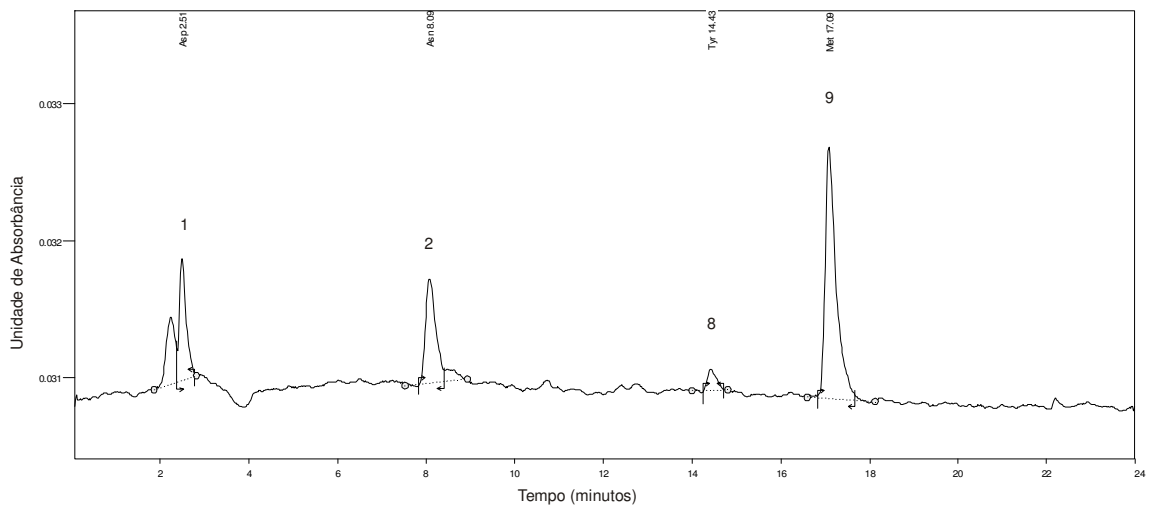


Fig. 10. Cromatograma de amostra de suco de maçã: 1-aspartato; 2-asparagina; 8-tirosina; 9-metionina (padrão adicionado).

Tabela 5

Identificação e quantificação de aminoácidos livres presentes em amostras de sucos. Fluxo de 1.5 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 40°C.

AA	Concentração de aminoácidos nos sucos (µM)				
	Laranja	Uva	Abacaxi	Pêssego	Maçã
Aspartato	146.83	150.68	28.92	43.21	105.72
Asparagina	209.34	-	295.02	669.50	185.08
Serina	135.76	30.81	54.53	-	-
Glicina	93.14	37.34	35.56	-	-
Alanina	728.77	42.48	-	-	-
GABA	195.17	15.09	-	-	-
Arginina	91.66	103.21	-	53.46	-
Tirosina	98.56	77.14	-	-	33.03
Metionina ¹	192.30	-	-	-	192.30
Lisina 1	26.71	-	-	-	-
Lisina 2	NQE ²	-	-	-	-

¹ Padrão utilizado como referência; ² NQE (não quantificado eficientemente).

3.6 Sistema de análise

3.6.1 Características gerais

Todo o sistema de análise contou com equipamentos que não eram mais utilizados por seus respectivos laboratórios, os quais foram doados ao nosso laboratório. Como a proposta do nosso laboratório é desenvolver métodos de análise, avaliar e desenvolver metodologias que possam utilizar e modificar esses equipamentos é uma questão relevante.

3.6.2 Softwares

Os softwares utilizados nesse trabalho, com exceção do Microsoft Excel, são todos gratuitos e estão disponíveis na internet. Dentre as vantagens de se utilizar sistemas livres e softwares abertos encontram-se o valor do programa; não exigência de treinamento sempre que um equipamento de fabricante diferente é adquirido ou um novo software é lançado (ganho de tempo e familiaridade do analista com a interface de análise); as atualizações são gratuitas; no caso dos softwares de código aberto, com algum conhecimento de programação pode-se adaptar o software a usos específicos dentro da realidade do laboratório. Na análise cromatográfica deste trabalho foi utilizado o software CHROMuLAN [16], que é simples de usar e permite que, através de pequenos ajustes, se obtenha os principais parâmetros cromatográficos em uma análise, além de possibilitar que programadores modifiquem o software para que ele receba e trate os dados diretamente da fonte de aquisição disponível (tabelas 3 e 4 e figuras 3 a 10). Outra possibilidade é o software OpenCrhom [17], que é muito versátil e importa os dados de diversos fabricantes dos equipamentos de CLAE mais utilizados comercialmente, além de possibilitar uma gama muito grande de tratamento dos dados cromatográficos e também de espectrometria de massas. Para diversos tipos de análises estatísticas, muitas de alta complexidade, o software PAST [18] é uma boa ferramenta. Ele possui uma interface agradável, o sistema de inclusão de dados e os cálculos são simples de serem executados, além de dispor de vasto material explicativo sobre o programa. O Microsoft Excel, que é o único software pago, está disponível na maioria dos computadores utilizados no mundo todo e, além de ser

amplamente utilizado na confecção de tabelas, proporciona a inserção relativamente simples de cálculos matemáticos. Os cálculos baseados nas fórmulas matemáticas apresentadas (seção 3.1, eq. 1, 2, 3, 4) foram realizados em Excel, o que mostra a versatilidade do programa, além de proporcionar maior embasamento teórico sobre os cálculos utilizados na técnica de CLAE. O módulo de aquisição de dados Automac é independente do equipamento, bastando a ligação de apenas dois fios à saída de sinal do detector, sem necessidade de placas ou cabos específicos para interligá-la ao computador (um cabo USB simples é suficiente). O software de gerenciamento do módulo é extremamente simples de usar e os dados de saída são gerados em arquivos do tipo “CSV” (Comma Separated Values - valores separados por vírgula), que são salvos automaticamente em planilhas do Excel para posterior utilização em softwares de integração para cromatografia.

4. Conclusões

Procurou-se demonstrar com esse trabalho que não são necessários equipamentos de alto valor para se realizarem análises em CLAE. Um bom sistema de bombas e colunas de qualidade são suficientes para diversos tipos de análises; não são indispensáveis detectores extremamente sofisticados (e caros) como DAD (detector de arranjo de diodos) e fluorescência; sistemas simples de aquisição de dados aliados a softwares livres, ou de uso comum, são alternativas simples e baratas para reativação e modernização de equipamentos antigos e fora de uso. A derivatização com OPA/NAC é uma excelente escolha para derivatização de aminoácidos, pois possibilita ganho de tempo e boas análises em fases móveis com alto índice de solventes aquosos. O preparo das amostras de sucos foi extremamente simples, envolvendo apenas o processo de filtração, o que diminui as perdas que normalmente ocorrem nos processos de manipulação das amostras. Mesmo sem ajuste do pH, houve a derivatização eficiente dos aminoácidos livres constantes nos cinco sucos analisados, evidenciando o ótimo poder tamponante do borato na concentração e no pH utilizados para a reação .

4.1 Limitações e perspectivas

Como o estudo foi realizado utilizando-se apenas uma coluna, futuramente pretende-se realizar novos estudos utilizando diferentes colunas, com comprimentos, diâmetros e partículas com diferentes tamanhos e características, já que na pesquisa realizada por Vasani e colaboradores [11] foi avaliada a performance de separação em 6 tipos diferentes de colunas, que demonstraram diferentes perfis de eluição. Maiores estudos da composição das fases móveis utilizadas como eluentes devem ser realizados para otimizar os parâmetros a fim de obter a separação dos aminoácidos não-proteinogênicos e dos aminoácidos não-naturais. A preparação de novas soluções-padrão de aminoácidos, em concentração mais elevada, deve ser testada a fim de avaliar se há diferenças significativas relativas ao tempo de armazenamento e à reação de incorporação da molécula adicional de OPA aos aminoácidos que eluem com mais de um pico. A identificação de um derivativo adicional para o glutamato (que não está descrito na literatura) abre uma porta para mais estudos que envolvam diferentes tipos de preparação da reação de derivatização, pois é possível que outros aminoácidos, para os quais ainda não se tem registro de um derivativo adicional, também possam sofrer essa transformação.

Agradecimentos

Ao Lanagro (Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul) pela doação dos equipamentos BioTek; prof. Carlos Termignoni pela doação do detector, sensor de pressão e seringa; ISB Ind. e Com. Ltda. pela doação do módulo de aquisição de dados; ao Gabriel

Rübensam pelos conhecimentos compartilhados nos meses de convívio no laboratório de métodos; ao professor Tarso Kist pela orientação na elaboração deste trabalho.

Referências

- [1] D. L. Nelson, M. M. Cox, princípios de Bioquímica de Lehninger, Quinta Edição, Artmed, Porto Alegre, 2011
- [2] J. Xie, P. G. Schultz, An expanding genetic code, *Methods* 36 (2005) 227–238.
- [3] K. Jeong, M. Y. Pavlov, M. Kwiatkowski, A. C. Forster, M. Ehrenberg, Inefficient Delivery but Fast Peptide Bond Formation of Unnatural L-Aminoacyl-tRNAs in Translation, *J. Am. Chem. Soc* 134 (2012) 17955–17962.
- [4] I. Molnár-Perl, HPLC of Amino Acids as *o*-Phthalaldehyde Derivatives, *Journal of Chromatography – Volume 70*, Elsevier, 2005- pp 163-198.
- [5] M. Roth, Fluorescence Reaction for Amino Acids, *Anal. Chem.* 43 (1971) 880-882.
- [6] R. Checa-Moreno, E. Manzano, G. Mirón, L. F. Capitán-Vallvey, Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV, *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3817–3828.
- [7] B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen, T. L. Tarvin, Rapid Analysis of Amino Acids Using pre-column derivatization, *J. Chromatogr.* 336 (1984) 93-104.
- [8] S. A. Cohen, D. J. Strydom, Amino Acid Analysis Utilizing Phenylisothiocyanate Derivatives, *Anal. Biochem.* 174 (1988) 1-16.
- [9] S. C. Moldoveanu, V. David, Sample Preparation in Chromatography, *Journal of Chromatography Library – Volume 65*, Elsevier, 2002, pp. 711.
- [10] I. Molnár-Perl, Derivatization and chromatographic behavior of the *o*-phthalaldehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 283–302.
- [11] A. Vasánits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl, Retention/quantitation properties of the *o*-phthalaldehyde–3-mercaptopropionic acid and the *o*-phthalaldehyde–N-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 870 (2000) 271–287
- [12] N. M. Cassiano, J. C. Barreiro, L. R. R. Martins, R. V. Oliveira, Q. B. Cass, Validação em Métodos Cromatográficos para Análises de Pequenas Moléculas em Matrizes Biológicas, *Química Nova* 4, volume 32 (2009) 1021-1030.
- [13] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Ltd, London, 2004.
- [14] P. C. Sadek, *The HPLC Solvent Guide*, Second Edition, John Wiley and Sons, New York, 2002.
- [15] L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1979.

[16] <http://www.chromulan.org> – acessado em de 01/06 a 29/11 de 2012

[17] <http://www.openc.net> - acessado em de 01/06 a 29/11 de 2012

[18] <http://palaeo-eletronica.org> - acessado em de 01/01 a 29/11 de 2012

[19] I. Molnár-Perl, Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents, J. Chromatogr. B 879 (2011) 1241–1269.