



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PEPTÍDICO DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS POR ELETROFORESE CAPILAR

Luiz Felipe Otavio **Miron**¹; Vera Sônia **Nunes da Silva**²; Lucia **de la Hoz**³ Maria Teresa **Bertoldo Pacheco**⁴

Nº 17219

RESUMO – Desde meados dos anos oitenta, a eletroforese capilar tem se mostrado um bom método de separação analítico para estudos em diversas áreas do conhecimento. Tratada inicialmente como uma alternativa mais rápida e eficiente às análises convencionais, vem sendo estudada, aprimorada e hoje possui uma grande importância econômica, pois é aplicada nas mais diferentes indústrias, por exemplo, química, farmacêutica e alimentícia. No presente estudo foram traçados e estudados os perfis peptídicos de diferentes hidrolisados e de isolados do soro do leite. Em busca da definição das melhores condições de separação, foram variados parâmetros como comprimento de onda, voltagem da corrida, pressão de injeção e concentração. Os resultados mostraram que os comprimentos de onda de 200 e 214 nm são mais absorvidos pelas amostras e a voltagem de 30 kV reduz o tempo de corrida. Em relação à concentração e pressão de injeção para as amostras analisadas, as melhores separações foram obtidas para soluções abaixo de 4 mg.L⁻¹ e pressão de injeção de 50mbar. Portanto, a aplicação desta técnica para a análise qualitativa de amostras digeridas por diferentes sistemas gástricos foi demonstrada.

Palavras-chaves: Hidrolisado proteico, proteína do soro de leite, eletroforese capilar, perfil eletroforético.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química Tecnológica, UNICAMP, Campinas-SP; lfo.miron@gmail.com

2 Colaboradora: Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, ITAL

3 Colaboradora: Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, ITAL

4 Orientadora: Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, ITAL, Campinas, SP, mtb@ital.sp.gov.br



ABSTRACT – *Since the eighties, capillary electrophoresis has been shown a good method of analytical separation for studies in several areas of knowledge. Initially, treated as a faster and more efficient alternative to conventional analyzes, it has been studied, improved and today has a great economic importance, because it is applied in different industries, for example, chemical, pharmaceutical and food. In this study were traced and studied the peptide profiles of hydrolysates and whey protein isolates. In order to define the best separation conditions, parameters were varied, such as wave-length, running voltage, injection pressure and sample concentration. The results showed that wavelengths in 200 and 214 nm are more absorbed by the samples and the voltage at 30 kV reduces runtime. In relation to the concentration and injection pressure for the analyzed samples, the best separations were obtained for solutions below 4 mg.L⁻¹ and injection pressure of 50mbar. Therefore, the application of this technique to the qualitative analysis of samples digested by different gastric systems has been demonstrated.*

Keywords: Protein hydrolysates, whey protein, capillary electrophoresis, electrophoretic profile.

1 INTRODUÇÃO

As proteínas são umas das mais importantes moléculas biológicas existentes. São macromoléculas bioquímicas formadas por aminoácidos e são fundamentais para a manutenção da vida de todos os seres vivos, pois estão presentes em todas as células e desempenham diversos e importantes papéis no organismo, como por exemplo, o transporte de oxigênio pelo sistema circulatório, a catálise de reações vitais para o metabolismo, replicação do DNA e funções estruturais. São diferenciadas entre si pela sequência dos aminoácidos e pelo seu formato em arranjo tridimensional (Lehninger et al., 2000)

A alimentação básica diária como o ovo, carnes, cereais e sementes são as principais fontes de proteínas e aminoácidos para o organismo. Um dos co-produtos da indústria de laticínios, com proteínas de alto valor nutricional e biológico, em especial é o soro de leite (Bertoldo Pacheco et al., 2005). Ele desperta grande o interesse industrial e acadêmico devido seu potencial tecnológico, biológico e econômico. Constituído de proteínas globulares de alto valor nutritivo, são amplamente utilizadas como suplementos alimentares para crianças e atletas de alto desempenho. As duas principais proteínas constituintes do soro de leite são a alfa-lactoalbumina (α -la) e a beta-lactoglobulina (β -lg).



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

A proteína alfa-lactoalbumina (α -la), também presente no leite humano, destaca-se por sua propriedade nutricional e funcional, como a capacidade emulsificante, formação de filmes e capas protetoras (Michela et al., 2015), gerando grande interesse da indústria alimentícia.

Assim como a cromatografia, a eletroforese capilar (CE) é um método de separação analítico. Estas se diferenciam quanto ao modo da separação e o formato das colunas. Enquanto a primeira se faz uso da interação química e física da amostra com a fase estacionária dentro de uma coluna, na eletroforese capilar a separação acontece pela migração diferenciada de amostras ionizáveis em um campo elétrico em uma coluna capilar, geralmente de sílica fundida. Desde o início de sua aplicação acadêmica, na década de oitenta, a técnica vem evoluindo consideravelmente. Modos diversos como a eletroforese capilar de zona (CZE), a cromatografia eletrocínética micelar (MECK), a eletrocromatografia capilar (CEC) e a eletroforese capilar em gel (CGE) exemplificam a variedade e o alcance da técnica. Grande parte da evolução e da grande gama de modos de utilização deve ser atribuída à elevada eficiência alcançada, ao baixo tempo de análise e a baixa geração de resíduos (Vaza et al., 2015).

O uso da eletroforese capilar para a análise de perfis de biopolímeros^[4], como as proteínas, é farto e vem demonstrando ser muito eficiente. A adsorção de proteínas nas paredes internas do capilar é um problema, mas pode ser evitado quando usado um capilar revestido hidrofílicamente (Molina et al., 1999) ou quando adicionado aditivos, como surfactantes, no tampão de corrida. O objetivo deste trabalho é estudar o perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos e isolados proteicos de soro de leite em uma coluna capilar de sílica fundida não revestida e alterar parâmetros importantes de corrida, como pressão de injeção, concentração da amostra, voltagem da corrida e comprimento de onda, para atingir as melhores condições de separação destas amostras.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados para se fazer as análises e os posteriores estudos das corridas foram os seguintes:

- Equipamento de Eletroforese Capilar, modelo G7100A - Agilent
- Vials de plástico
- Solução tampão de borato pH 9,3
- Capilar de 72 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno da marca Agilent



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

- Balões volumétricos de 10 mL
- Balança analítica modelo tal marca tal
- Seringas
- Filtros de membrana de éster celulose de 0,22 μm , da Merck Millipore
- Ultrassom da marca Thornton

Todas as preparações das amostras seguiram um modelo estabelecido. Pesou-se a massa das amostras para se chegar a uma concentração previamente calculada. Posteriormente, as massas pesadas foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, que foram posteriormente avolumados. A homogeneização foi feita a mão.

Com o auxílio de uma seringa, pegou-se cerca de 3 mL da solução, filtrou-se com o filtro de 0,22 μm e transferiu-se para dentro de um vial de plástico até atingir pouco mais da metade do volume. Após essa ação, todas as amostras foram dessonificadas colocando-se o vial num banho de ultrassom. Fez-se isso para garantir a ausência de micro-bolhas de ar que poderiam obstruir o capilar e atrapalhar a corrida. Após essas etapas, os vials foram colocados no equipamento de eletroforese capilar.

Todos os dias, no início do expediente, foi feita uma lavagem no capilar do equipamento de CE. Essas lavagens consistiram em um *flush* de 10 min de solução de NaOH 0,1 M, seguido de um *flush* de 10 min de água deionizada e, por fim, um *flush* da solução tampão que correria no dia. Todas essas soluções de lavagem foram previamente filtradas em filtros de 0,22 μm e dessonificadas.

As corridas de análise tiveram seus parâmetros constantemente mudados para se averiguar e tentar chegar na melhor condição de análise. As únicas partes em comum nas corridas foram o pré e o pós-condicionamento do capilar, que seguiu a seguinte ordem: 30 segundos de flush de solução de NaOH 0,1M; 30 segundos de espera; 30 segundos de flush de água deionizada; 30 segundos de espera; 30 segundos da solução tampão que seria utilizado na corrida. Todas as corridas tiveram um tempo de 20 min, sendo abortadas apenas as que tiveram percalços no caminho, como por exemplo, corridas que apresentaram quedas abruptas na corrente elétrica – evidencia de obstrução do capilar.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil de hidrolisados de concentrado proteico de soro de leite (CP)

O estudo da hidrólise de soro de leite foi feito em duas amostras diferentes, concentrado proteico de soro de leite (CP), oriundo de animais de diferentes sistemas de alimentação: intensivo (SI) e extensivo (SE). Para cada um desses dois tipos de CP, foram feitas análises das proteínas íntegras (não digeridas), e de amostras submetidas apenas a digestão gástrica e digestão gastrointestinal.

Fez-se primeiramente a análise para a amostra de concentrado proteico de soro de leite sistema intensivo (CPSI). Pesou-se 50 mg da amostra não digerida, 50 mg da amostra de digestão gástrica e 50 mg da amostra de digestão gastrointestinal. Colocou-se cada massa de amostra em balões volumétricos de 10 ml. Avolumaram os balões com água, formando soluções de 5 g.L⁻¹. Optou-se por fazer o estudo na voltagem de 25 kV, em comprimento de onda de 214 nm, que são as condições mais citadas pela literatura (Heck et al., 2008.). Os eletrofereogramas estão à seguir, na Figura 1.

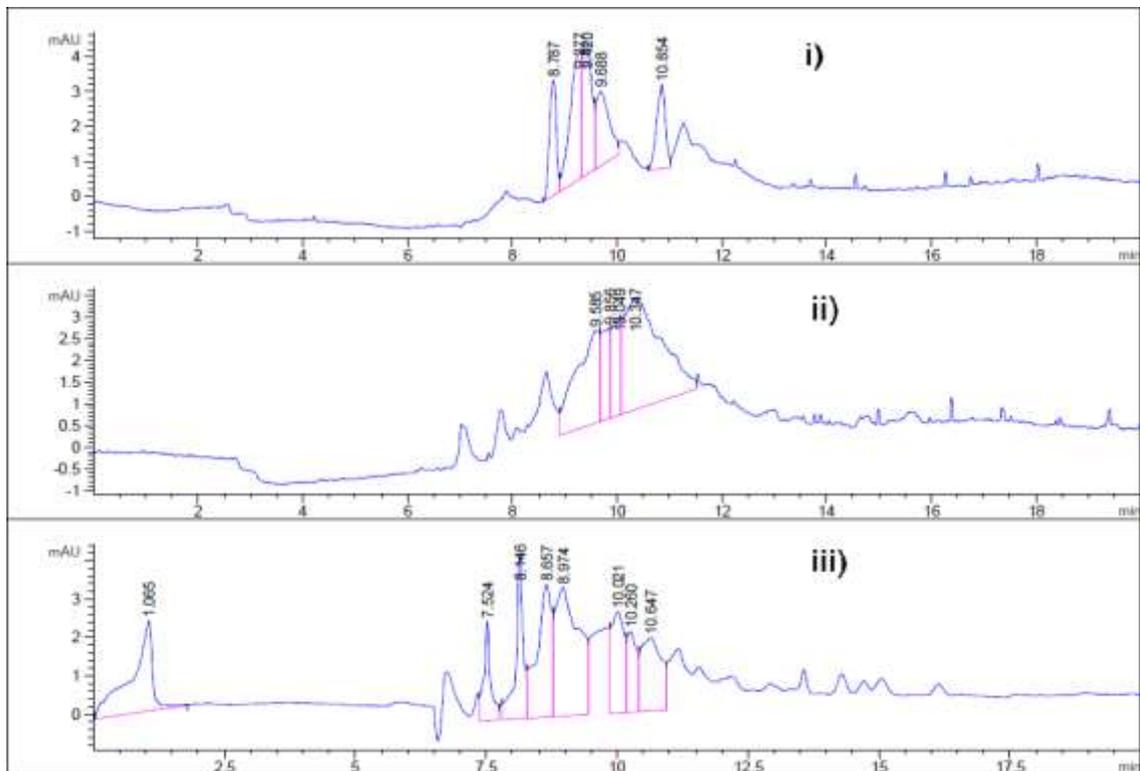


Figura 1. Perfil eletroforético de concentrado proteico de soro de leite de sistema intensivo (CPSI) de concentração 2,5 g.L⁻¹. i) Não digerido, ii) digestão gástrica e iii) digestão gastrointestinal



Na análise para a amostra de soro de leite do sistema extensivo (CPSE)), pesou-se 25 mg da amostra não digerida, 25 mg da amostra de digestão gástrica e 25 mg da amostra de digestão gastrointestinal. Essas massas foram colocadas com balões volumétricos de 10 mL, que foram avolumandos com solução tampão de borato de pH 9,3, obtendo-se soluções de concentração 2,5 g.L⁻¹. Semelhantemente às análises de soro de leite em caprinos confinados, optou-se pela voltagem de 25 kV e comprimento de onda de 214 nm. Os perfis das análises estão abaixo, na Figura 2.

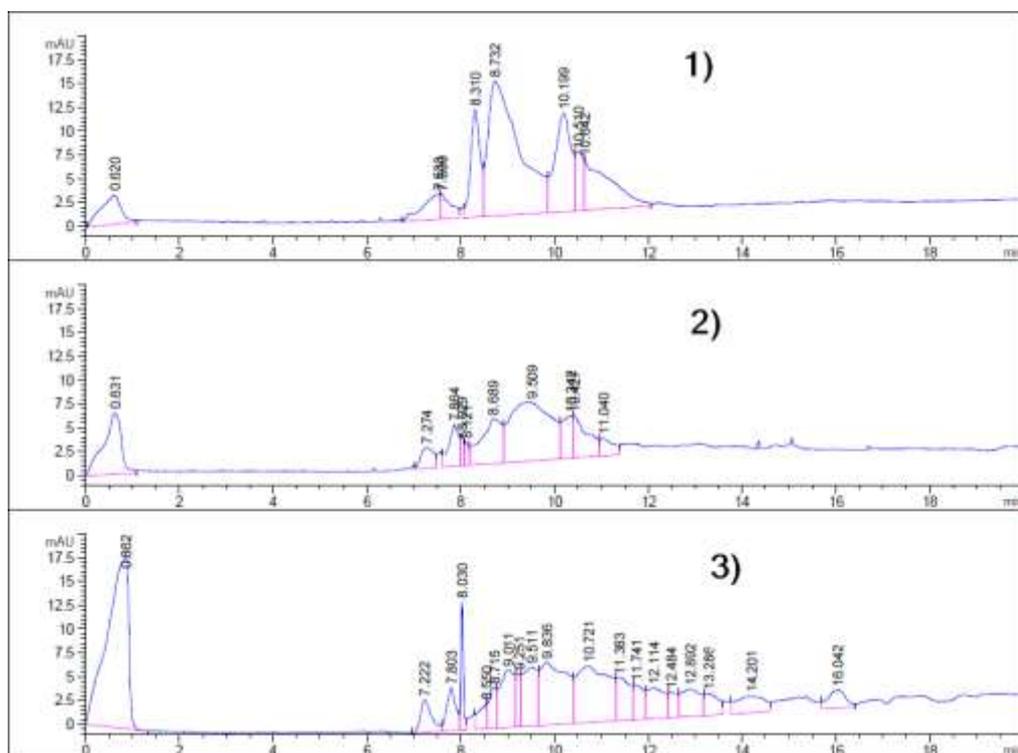


Figura 2. Perfil eletroforético de amostras de concentrado proteico de soro de leite de sistema extensivo (CPSE) de concentração 2,5 g.L⁻¹. i) Não digerido, ii) digestão gástrica e iii) digestão gastrointestinal

Nos dois perfis de hidrólise, dos sistema CPSI e CPSE, observa-se um aumento da quantidade de picos quando se comparam as amostras não digeridas com as amostra digeridas. Observa-se o mesmo quando se comparam as digestões gástricas e gastrointestinais. Esse padrão é intuitivo e ocorre porque quanto maior for o grau de digestão, maior é a quantidade de espécies hidrolisadas (polipeptídios) presente na amostra. Com uma maior quantidade de espécies, maior é a quantidade de picos.



3.2 Estudo das melhores condições de separação

O primeiro parâmetro no presente estudo foi o comprimento de onda (λ). O critério na avaliação desse parâmetro foi analisar a corrida em relação à resolução e à intensidade do sinal.

Optou-se por utilizar neste parâmetro a corrida de Isolados proteicos do soro de leite. Pesando-se 2,5 mg deste isolado proteico, posteriormente transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, fez-se uma solução de 2,5 g.L⁻¹. Após as etapas de filtragem e sonificação, descritas na seção 2, colocou-se a amostra no equipamento. As análises foram feitas em uma única voltagem 25 kV, em temperatura controlada de 25°C e em um capilar da marca Agilent de sílica fundida não revestida de 72 cm de comprimento efetivo e 75 μ m de diâmetro interno. O resultado da corrida está abaixo, na Figura 3.

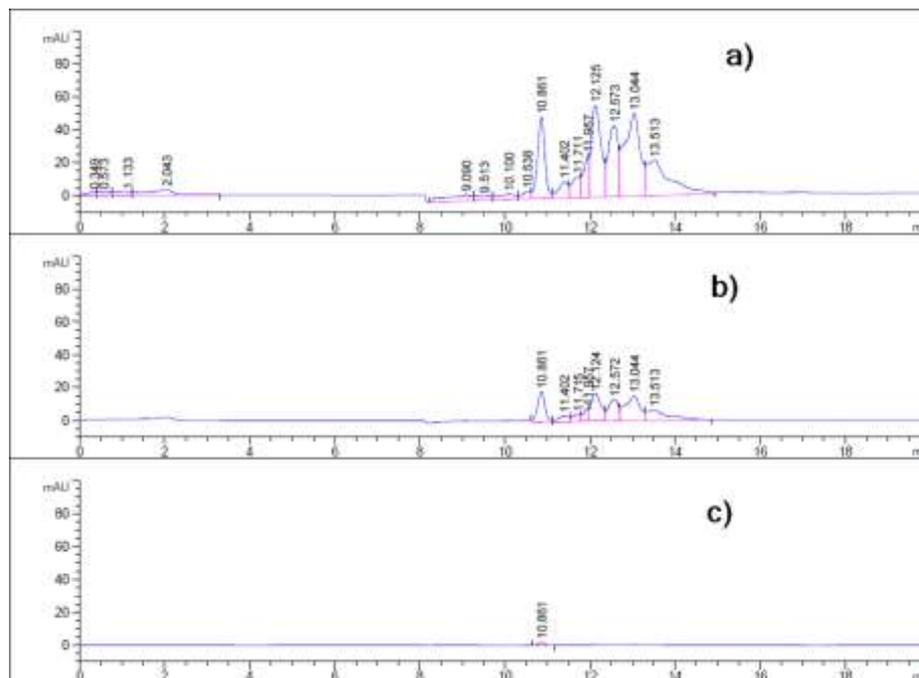


Figura 3. Perfil eletroforético de isolado proteico de soro de leite (IPS) na concentração 2,5 g.L⁻¹ nos diferentes comprimentos de onda: a) 200 nm, b) 214 nm e c) 280 nm.

Observa-se que praticamente não há mudança na resolução das amostras, nas análises de comprimento de onda de a) e b), ou seja 200 e 214 nm, respectivamente, e ocorre perda de resolução apenas em c), 280 nm. Porém observaram-se nítidas mudanças quanto à intensidade dos sinais. Nota-se a maior intensidade no menor comprimento de onda (200 nm), evidenciando que a amostra absorve mais radiação nessa faixa do espectro eletromagnético. Em 214 nm, a intensidade de sinal é satisfatória e não ocorre perda de resolução no eletrofereograma, podendo



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

ser utilizadas em posteriores análises sem nenhum problema. Em 280 nm, o maior comprimento de onda, a intensidade do sinal é tão pequena que acaba se confundindo com a linha de base, mostrando que a amostra absorve pouco nessa faixa do espectro e, portanto, não é aconselhável para a análise do eletrofereograma.

O segundo parâmetro de análise foi voltagem da corrida. O critério da escolha da melhor voltagem foi avaliá-las criticamente de acordo com as principais vantagens oferecidas pela técnica e equipamento, ou seja, tempo de corrida, resolução e eficiência. As voltagens analisadas foram 20, 25 e 30 kV.

Os melhores resultados obtidos nessa etapa foram para a amostra de hidrolisados de isolados proteicos de soro de leite (IPS) estão mostrados na Figura 4.. A amostra, que estava na forma líquida, foi diluída 20 vezes em água. A análise foi feita no comprimento de onda 214 nm, seguindo a maior parte das análises encontradas na literatura, o capilar utilizado foi o mesmo da análise de comprimento de onda.

Observa-se que a resolução dos picos é praticamente a mesma nas três voltagens selecionadas. Porém o tempo de corrida foi variável. Em 20 kV, observou-se o maior tempo de corrida e o eletrofereograma pareceu incompleto após os 20 min, mostrando ausência de 2 picos em comparação com os outros eletrofereogramas. Aumentando-se a voltagem para 25 kV, observou-se uma melhora no tempo da corrida e em 30 kV atingiu-se o menor tempo para eluir o último pico, cerca de 12,5 minutos. Isso acontece porque quanto maior a voltagem aplicada, maior é campo elétrico e, conseqüentemente, mais rápido migram os íons da amostra. Porém, é preciso cautela com as voltagens elevadas, que não devem ser aumentadas indiscriminadamente, pois pode ocasionar um superaquecimento do capilar e conseqüentemente provocar um efeito Joule (Tavares et al., 1996), podendo danificar o danificar o capilar.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

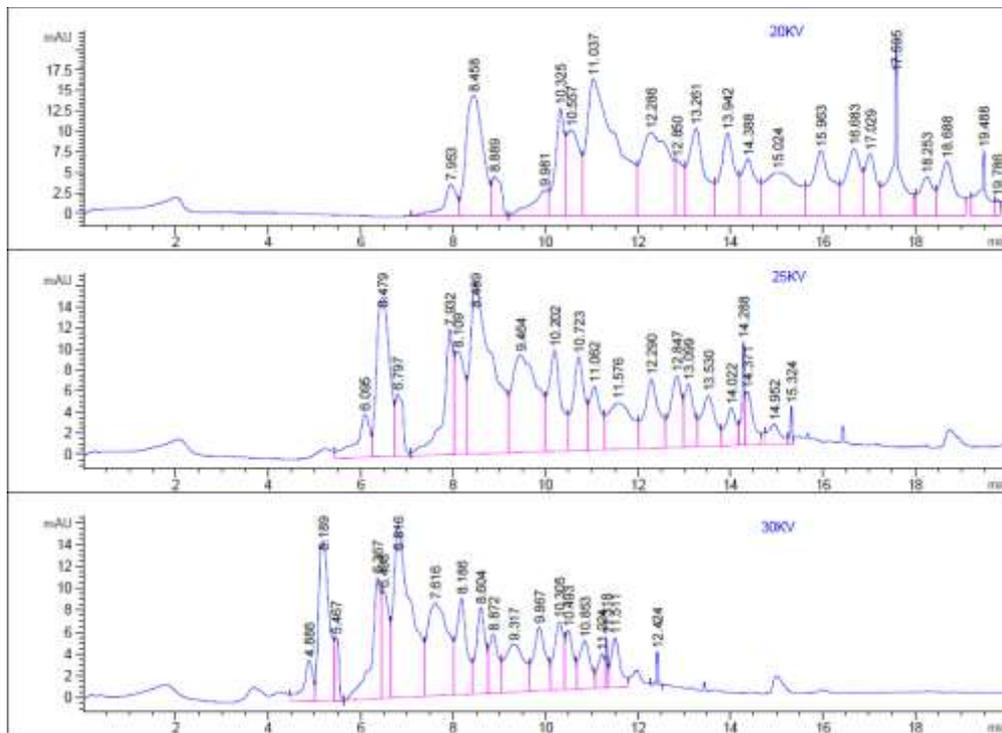


Figura 4. Perfil eletroforético de hidrolisados de isolados proteicos de soro de leite (IPS) em diferentes voltagens: 20, 25 e 30 kV.

A etapa seguinte da análise consistiu na avaliação de pressão de injeção da amostra. Analisou-se uma amostra de hidrolisado de IPS de concentração $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ em uma mesma voltagem, e mesmo comprimento de onda, 214 nm. O eletrofereograma pode ser visto na Figura 5 abaixo:

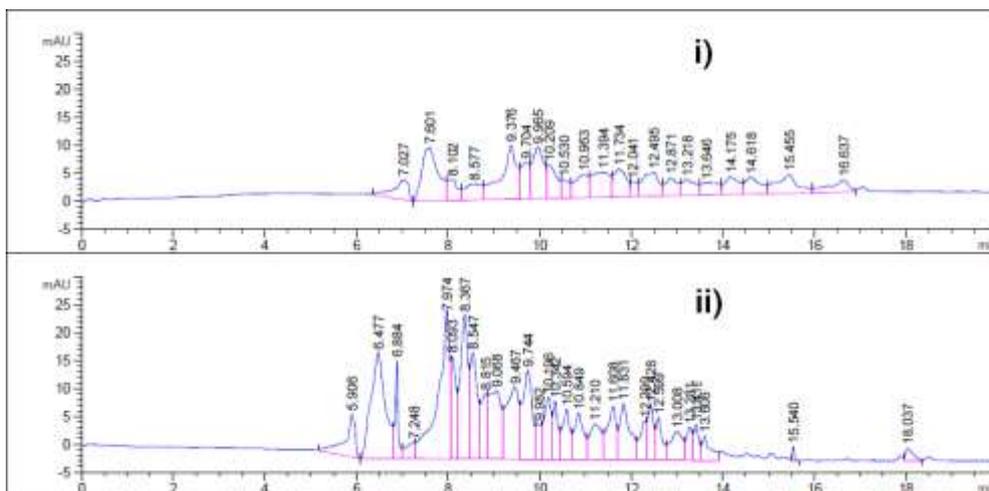


Figura 5. Perfil eletroforético da influência da pressão de injeção de amostra de hidrolisado de IPS na concentração $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ sobre o eletrofereograma. i) 50 mbar e ii) 100 mbar.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Pode-se analisar que, nas mesmas condições de voltagem e comprimento de onda, no eletrofereograma i), 50 mbar, há uma melhor separação e distribuição dos picos em relação ao gráfico ii), 100 mbar. Observa-se também que o aumento da pressão resulta em aumento da intensidade do sinal, que parece ocorrer devido a uma maior quantidade de amostra correndo no capilar.

A última etapa analisada consistiu no estudo do efeito da concentração da amostra na resolução do eletrofereograma. A amostra analisada foi de um conteúdo IPS com alto grau de pureza (maior que 95%). Foram pesadas massas dessa amostra, em seguida diluiu-se com solução tampão de borato fazendo-se soluções de concentração 0,2; 1,0; 2,0 e 4,0 g.L⁻¹.

As análises foram feitas em voltagem de 25 kV, 214 nm, em temperatura controlada de 25°C e na mesma coluna de sílica fundida dos parâmetros anteriores. Os resultados estão apresentados abaixo, na Figura 6.

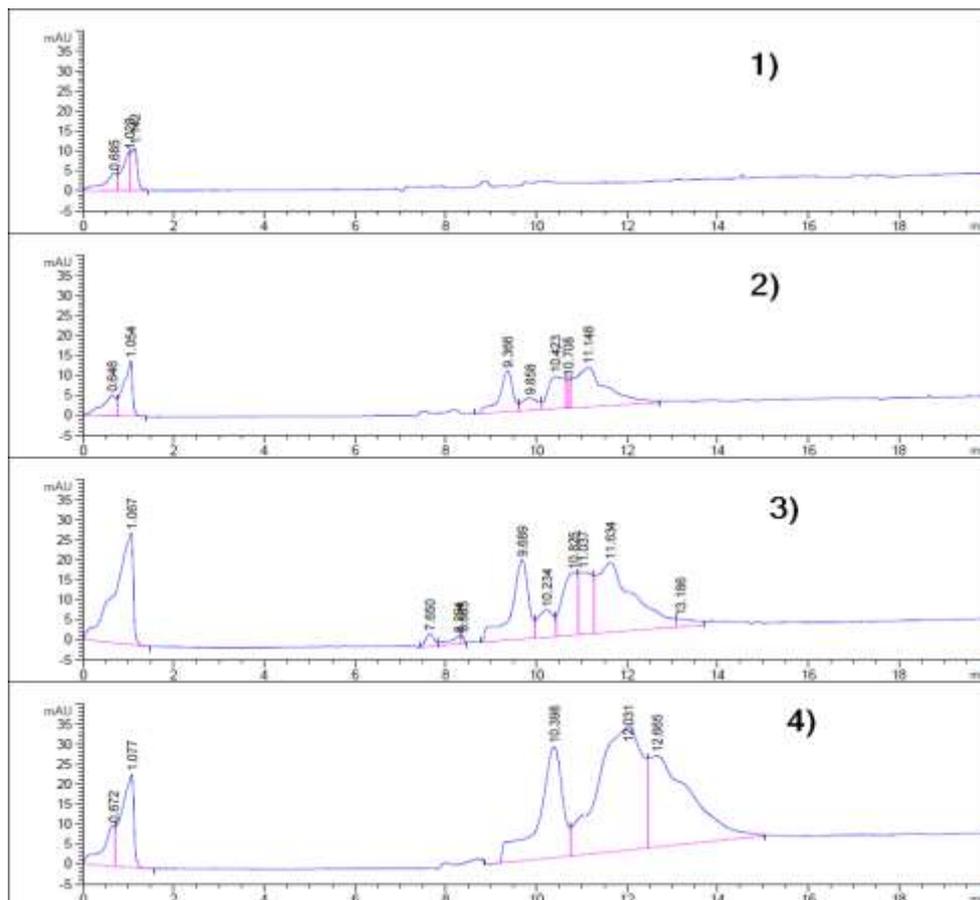


Figura 6. Perfil eletroforético da influência da concentração da amostra de IPS na análise por eletroforese capilar. 1) 0,2 g.L⁻¹, 2) 1,0 g.L⁻¹, 3) 2,0 g.L⁻¹, 4) 4,0 g.L⁻¹.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Observa-se, como esperado, que na concentração de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ a intensidade do sinal é baixa e com o aumento da concentração a intensidade do sinal aumenta. Este é o resultado esperado e intuitivo, porque em menores concentrações há uma menor quantidade de amostra presente para absorver a radiação eletromagnética. Em maiores concentrações, há maior quantidade de amostra, maior absorção, resultando em maior intensidade de sinal. Observa-se também que na maior concentração não há uma boa resolução, pois os picos confundem-se entre si. Dessa maneira, entende-se que para uma boa separação de picos não é conveniente traçar o perfil eletroforético em grandes concentrações.

4 CONCLUSÃO

Nos perfis de hidrólise de dois concentrados proteicos de soro de leite, submetidos a diferentes tipos de digestão, concluiu-se o método é sensível para mostrar que as hidrólises de fato ocasionaram a quebra das proteínas predominantes, porque houve um aumento da quantidade de picos, evidenciando a presença de novos peptídeos hidrolisados à medida que aumentou a intensidade de digestão. Na busca para as melhores condições de análise e separação, concluiu-se que o comprimento de onda mais absorvido pelas amostras são de 200 a 214 nm e quanto maior a voltagem, no caso 30 kV, maior é a otimização do tempo de corrida. Por fim, observou-se, pelas análises de concentração e pressão de injeção, que quanto maior a quantidade de amostra analisada, maior é a intensidade de sinal, contudo para obter uma separação dos picos, não é viável analisar soluções de grandes concentrações.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida, à professora Maria Teresa pela oportunidade concedida e por acreditar em meu potencial, à professora Lucia pela atenção, paciência e pela generosidade em seu trato pessoal e aos meus pais, minhas eternas referências de amor.

6 REFERÊNCIAS

BERTOLDO-PACHECO, M.T., AMAYA-FARFAN, J., SGARBIERI, V.C. Partial characterization of a whey protein concentrate and its enzyme hydrolysates. **Journal of Food Biochemistry**, v. 26, p. 327-338, 2005.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

HECK, J.M.L., OLIEMAN, C., SCHENNINK, A., VAN VALENBERG, H.J.F., VISKER, M.H.P.W., MEULDIJK, R.C.R., VAN HOOIJDONK, A.C.M. Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *International Dairy Journal*, v.18, p. 548–555, 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

MICHELA, B.; NEVESA, M.; DE SOUSA, R.; CHAGASA, M; MARTINSA, B.; DOS REIS, J. Partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1148-1152, 2015.

MOLINA, E; JESUS MARTÍN-ALVAREZ, P., RAMOS, M. Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cows', ewes' and goats' milks. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 99-105, 1999.

TAVARES, M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 02, p. 173 – 181, 1996.

VAZA, F.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, M. Fundamentos de eletroforese capilar: uma abordagem por animações. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732-737, 2015.