

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química

**Estudos cinéticos em reacções de hidrólise enzimática
de proteínas acelerada por ultrasons**

Por:

Diana Maria Patacas Viegas Vieira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Doutor José-Luis Capelo-Martínez

Co-orientador: Doutor Carlos Lodeiro Espiño

Lisboa

2008

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José-Luis Capelo-Martínez pela oportunidade de ingresso na alcateia Bioscope e por ter-me proporcionado o segundo ano consecutivo de investigação científica.

Ao Professor Carlos Lodeiro Espiño pela total disponibilidade.

Aos filhos científicos da Bioscope, especialmente ao Dr. Ricardo Carreira.
Obrigado pela tua ajuda e atenção!

À insubstituível Doutora Raquel Rial-Otero.

Aos meus amigos Sandra Piedade, Bruno Santos, Raquel Ramos, J.P. Inácio, Ana Almeida, Mário Ferreira, Carla Brito, Zé Ribeiro, Kátia Mesquita e Nuno Araújo por todos os bons e maus momentos que neste último ano passei convosco e que apesar de tudo sempre estiveram do meu lado.
Obrigado por partilharem o sorriso, o olhar, palavras e atitudes.
Tudo serve para aprender! Assim foi, assim é e assim sempre será.

Aos Tenente-Coronel Rouco, Major Quinta, Capitães Alves e Soares e ao restante *staff* do Curso de Liderança pela dedicação e pelas competências que nos permitiram adquirir.

Ao Sr. Zé Madeira por ser um exemplo de altruísmo, sem igual.

Às novas amizades que prometem liderar este mundo e o outro:
Rosária “calimero” Maia, Ana Caldeira, Filipa “Tipo A” Santos,
Adalgiza Fonseca, Inês Bernardes, Eva Sousa, Rita Guerreiro, Andreia Botelho,
Cátia Godinho, Filipe “Ílder” Grangeiro, Filipe “ninja” Silveira, André “Pilão” Eusébio,
Ricardo “Macambúzio” Coelho, Hugo Evaristo, Diogo “Azimute” Aurélio,
Luis Dias, Jerónimo Cunha, David Martins e José Ribeiro pelos melhores 12 dias
consecutivos que já vivi e pelas lições de amizade, companheirismo e espírito de equipa.
Pessoal: “ATERRO PROOOOONTO!”

Aos “meus miúdos” pela fonte inesgotável de energia e alegria.
Pelos sorrisos e por tudo o que as crianças nos ensinam.
Só é preciso estar disposto a aprender.

Em especial à minha mãe quanto mais os anos passam
mais difícil se torna expressar por palavras o meu infindável amor.
Obrigado por teres tornado possível grande parte da minha vida!

Ao meu pai por todas as oportunidades e por não ter limitado as minhas escolhas.

À minha segunda mãe, a minha irmã, por ser quem é e,
por fazer-me sentir mais do que realmente sou.

Ao meu irmão e cunhado por ter adoptado a “alínea A”
como parte integrante da sua vida.

“There's nothing ever wrong but nothing's ever right”
Obrigado por tudo o que se repete e por nada ser igual...

E, finalmente, à “fundação Vieira” pelo apoio logístico.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE IMAGENS.....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xxi
EPIGRAFE.....	xxiii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
OBJECTIVOS.....	3
OBJECTIVOS ESPECÍFICOS:.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
ANÁLISE DOS RESULTADOS CINÉTICOS.....	5
PROTEÍNAS.....	13
MÉTODOS PARA ESTIMATIVA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	16
ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL.....	16
Influência da estrutura terciária sobre o espectro de absorção dos cromóforos proteicos.....	18
Aplicações da espectroscopia de absorção UV-Visível ao estudo de proteínas.....	18
ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA.....	20
Características da emissão fluorescente.....	21
Intensidade de fluorescência.....	21
Medidas de concentrações. Fluorímetrias.....	22
MARCAÇÃO ISOTÓPICA.....	23
Reacção enzimática de marcação isotópica com ¹⁸ O.....	24
PARTE EXPERIMENTAL.....	27

APARELHAGEM.....	27
PADRÕES E REAGENTES.....	27
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	29
PREPARAÇÃO DE GÉIS SDS-PAGE.....	29
TRATAMENTO DAS AMOSTRAS.....	30
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM MALDI-TOF-MS.....	44
ANÁLISE POR MALDI-TOF-MS.....	44
APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	45
ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).....	45
ABSORVÂNCIA A 400NM DE DIFERENTES PROTEÍNAS.....	55
Validação do método de Bradford no NanoDrop® ND-1000.....	60
ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA.....	70
MARCAÇÃO ISOTÓPICA.....	81
CONCLUSÕES.....	89
TRABALHOS FUTUROS.....	91
BIBLIOGRAFIA.....	93
OUTRAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS.....	95
ANEXOS.....	97
ANEXO A – VOLUMES DE SOLUÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DE UM GEL DE POLIACRILAMIDA.	97
ANEXO B – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES STOCK NECESSÁRIAS PARA A PREPARAÇÃO DE GÉIS DE POLIACRILAMIDA.....	98
ANEXO C – TABELA DAS ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS.....	99
ANEXO D – APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NO NANODROP®.....	102
APÊNDICES.....	103
APÊNDICE A – ESPECTROS MALDI-TOF-MS DA RECTA DE CALIBRAÇÃO.....	103
APÊNDICE B – TABELAS DAS INTENSIDADES RELATIVAS RETIRADAS DOS ESPECTROS DE MASSA DA RECTA DE CALIBRAÇÃO.....	116
APÊNDICE C – ESPECTROS MALDI-TOF-MS DAS AMOSTRAS – TESTE.....	119
APÊNDICE D – TABELAS DAS INTENSIDADES RELATIVAS RETIRADAS DOS ESPECTROS DE MASSA DAS AMOSTRAS-TESTE.....	131
COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS RESULTANTES DA PRESENTE MEMÓRIA DE INVESTIGAÇÃO	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da formação de ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos.....	13
Figura 2 – Espectro típico de uma proteína, cuja composição possui um número significativo de aminoácidos aromáticos, assim como um grupo prostético com uma banda intensa na região do visível. A banda sobre os 200nm corresponde à absorção da ligação peptídica. A banda nos 280nm resulta das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos e as bandas que aparecem acima dos 350nm são resultado da existência do grupo prostético. [4].....	17
Figura 3 – Esquema do mecanismo responsável pela incorporação de ¹⁸ O após digestão com tripsina, Glu-C (glucose oxidase) ou a endopeptidase Lys-C que permitem a incorporação de dois átomos de oxigénio no C-terminal dos péptidos originados. Adaptado de [9]	24
Figura 4 – Espectro de massa obtido para incorporação variável de ¹⁸ O (A) e para a incorporação completa de dois átomos de ¹⁸ O (B). [8].....	25
Figura 5 - Esquema de aplicações de amostra e padrão de calibração na placa MALDI-TOF. A calibração efectuada foi do tipo externa próxima.....	44
Figura 6 – Influência dos diferentes compostos presentes no protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerado por ultrasons. As medições foram efectuadas em 2µl de uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada sem adição de enzima e sem submeter a solução a ultrasons. A gota colocada no pedestal do espectrofotómetro ND-1000 foi reaproveitada, tendo sido efectuadas 33 repetições (n=34).	46
Figura 7 – Comportamento dos compostos utilizados ao longo do trabalho experimental, medido em absorvância, em função dos diferentes comprimentos de onda. Solução A) BSA a 0,2µg/µl em H ₂ O/ACN 50%. Solução B) Tripsina a 0,01µg/µl em H ₂ O/ACN 50%. Solução C) H ₂ O/ACN 50%, Ambic 12,5mM e ácido fórmico. Solução D) H ₂ O/ACN 50%. Solução E) Ácido fórmico 5%. As soluções A-C foram contra um branco de H ₂ O/ACN 50% e as soluções D e E contra um branco de H ₂ O MQ.	48

Figura 8 – Influência dos ultrasons nas diferentes soluções utilizadas no protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons. A) Solução contendo H₂O, ACN, DTT, IAA, Ambic e ácido fórmico. B) Solução com todos os solventes da solução A aos quais foi adicionada tripsina. C) Solução de BSA desnaturada, reduzida e alquilada, sem tripsina. D) Solução de BSA desnaturada, reduzida e alquilada, à qual foi adicionada tripsina. Todas as soluções foram preparadas conforme o descrito na *Parte Experimental – Tratamento de amostras – protocolo C*. 49

Figura 9 - Representação gráfica da absorvância medida a 400nm para uma solução de BSA desnaturada, reduzida e alquilada a 0,2µg/µl e digerida com tripsina a 0,01µg/µl (1:20 m/m) no sonoreactor a 50%. A) Regressão linear. B) Regressão exponencial. 52

Figura 10 – Recta de calibração para quantificação da proteína BSA em função da absorvância medida a 400nm após tratamento da solução de acordo com o protocolo B. 52

Figura 11 - Representação gráfica dos valores de concentração para uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada, e digerida com tripsina a 0,01µg/µl (1:20 m/m) no sonoreactor a 50% a partir da equação da recta de calibração $y = 0,961x + 0,003$. A) Regressão linear que também representa a cinética de ordem zero. B) Regressão exponencial. 54

Figura 12 - Simulação de duas ordens de cinética de reacção. A) Representação gráfica do logaritmo neperiano da concentração de BSA em função do tempo de digestão em segundos para simulação de uma cinética de 1ª ordem. B) Representação gráfica do inverso da concentração de BSA em função do tempo de digestão em segundos para simulação de uma cinética de 2ª ordem. 54

Figura 13 – Efeito do tempo de sonicação numa solução de BSA a 10µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada, submetida a digestão enzimática com tripsina em procedimento acelerado por ultrasons no sonoreactor a 50% de amplitude, de acordo com o protocolo A, medido em valores de absorvância a 400nm. 55

Figura 14 - A) Espectro de varrimento para uma solução de α-lactoalbumina 10µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com tripsina em sonoreactor a 50% de amplitude. B) Absorvâncias a 400nm medidas a cada tempo de sonicação. 56

Figura 15 - A) Espectro de varrimento para uma solução de anidrase carbónica 10µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com tripsina em sonoreactor a 50% de amplitude. B) Absorvâncias a 400nm medidas a cada tempo de sonicação. 56

Figura 16 - A) Espectro de varrimento para uma solução de ovalbumina 10µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com tripsina em sonoreactor a 50% de amplitude. B) Absorvâncias a 400nm medidas a cada tempo de sonicação. 56

Figura 17 – Influência do tempo de sonicação na degradação da agarose a 97% e respectiva influência na absorvância da solução a 400nm. A) Solução de agarose a 97%

preparada em H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic 12,5mM e submetida a ultrasons no sonoreactor a 50% de amplitude. B) Solução de agarose a 97% em H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic 12,5mM à qual foi adicionada a enzima tripsina. Esta solução foi submetida igualmente a US no sonoreactor a 50% de amplitude.57

Figura 18 – A) Influência da variação da proporção de reagente de Bradford numa solução de quantidade fixa de proteína (0,6µg de BSA desnaturada, reduzida e alquilada). B) Influência da variação da quantidade de proteína (BSA desnaturada, reduzida e alquilada) numa solução com proporção fixa de reagente de Bradford (1:10). C) Influência da variação da proporção de reagente de Bradford numa solução de H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic, com quantidade fixa de enzima (0,0002µg). D) Influência da variação da quantidade de enzima numa solução de H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic contendo proporção fixa de reagente de Bradford (1:10).62

Figura 19 – Estudo do efeito dos diferentes reagentes utilizados no protocolo de digestão enzimática de proteínas e o método de Bradford. Ensaio I) Solução aquosa de BSA. Ensaio II) BSA em solução de desnaturação H₂O/ACN 50%. Ensaio III) BSA em solução de desnaturação (H₂O/ACN 50%), redução (DTT) e alquilação (IAA) em meio tamponizado (Ambic 12,5mM) a pH≈8.64

Figura 20 – Efeito dos US (sonoreactor 50%) numa solução de BSA e Protease *Type XIV* (alíquotas independentes) e medição da absorvância a 595nm de acordo com o método de Bradford.65

Figura 21 - Efeito dos US (sonoreactor 50%) numa solução de BSA e Protease *Type XIV* e medição da absorvância a 595nm de acordo com o método de Bradford.67

Figura 22 - Absorvância a 595nm (método de Bradford) em função do tempo de sonicação em sonoreactor a 50% de amplitude, relativamente a tempos teste do protocolo I contemplando a secagem das amostras.68

Figura 23 - Absorvância a 595nm (método de Bradford) em função do tempo de sonicação em sonoreactor a 50% de amplitude, para uma solução de BSA 40µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com *Protease Type XIV* (1:20 m/m), de acordo com o descrito no protocolo I.68

Figura 24 – Efeito da amplitude dos ultrasons no passo de digestão para uma solução de BSA a 40µg/µl digerida com *Protease type XIV* 1:20 (m/m), de acordo com o protocolo I.69

Figura 25 – Influência da proporção do corante SYPRO® Orange nas diferentes soluções indicadas na tabela 12, cuja concentração de proteína BSA é 0,5µg/µl 71

Figura 26 – Influência da quantidade de SDS numa solução de BSA a 0,5µg/µl e SYPRO® Orange a 1:5000. As soluções foram preparadas conforme o descrito na tabela 12 e o procedimento experimental descrito no protocolo M. 72

Figura 27 – Influência da agarose no sinal de fluorescência numa solução a 97% em tampão tris-glicina sem SDS e com adição de tripsina, em função do tempo de utilização dos US (sonoreactor 50%). 74

Figura 28 – Influência de diferentes tratamentos de amostra em função do tempo de utilização dos US no protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons. Ensaio I) protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerada por US. Ensaio II) incorporação do corante SYPRO® Orange na solução antes do passo de digestão. Ensaio III) desnaturação da proteína por acção do calor e sem etapas de redução e alquilação. O corante SYPRO® Orange é incorporado na solução após a digestão. Ensaio IV) repetição do ensaio III mas com a introdução do corante SYPRO® Orange antes da etapa de digestão. 74

Figura 29 – Verificação da existência de fluoróforos intrínsecos na proteína anidrase carbónica numa solução a 2µg/µl desnaturada por acção do calor e digerida com tripsina a 1:20 (m/m) em função do tempo de sonicação no sonoreactor a 50% de amplitude. ... 76

Figura 30 – Influência da utilização dos ultrasons numa solução de anidrase carbónica a 2µg/µl com SYPRO® Orange e sem tripsina, em função do tempo de sonicação em minutos..... 77

Figura 31 – Efeito da utilização de ácido fórmico para inactivação da enzima, numa solução de anidrase carbónica digerida com tripsina e com Sypro® Orange. As proteínas foram preparadas em soluções aquosas ao invés do tampão tris-glicina sem SDS. 78

Figura 32 – Influência dos ultrasons na digestão de uma solução de anidrase carbónica 0,5µg/µl em tampão tris-glicina com tripsina 0,05µg/µl numa solução incubada com Sypro® Orange. 79

Figura 33 – Influência do tempo de incubação em banho termostaticado a 37°C de uma solução aquosa de anidrase carbónica 0,5µg/µl com tripsina a 0,05µg/µl e posterior medição do sinal de fluorescência através do corante SYPRO® Orange. 80

Figura 34 – Representação da placa de 96 poços utilizada para tratamento das amostras e respectiva disposição das mesmas. As amostras foram denominadas de acordo com as posições que ocupam na placa. Amostras A1 – A4 correspondem a 10µg de BSA (¹⁶O). B1 – B4: 20µg BSA (¹⁶O). C1 – C4: 30µg BSA (¹⁶O). D1 – D4: 40µg BSA (¹⁶O). E1 – E4: 50µg BSA (¹⁶O). F1 – F4: 60µg BSA (¹⁶O). G1 – G4: amostra BSA de quantidade desconhecida (¹⁶O). H1 - H2: Padrões BSA 40µg (¹⁸O)..... 82

Figura 35 – Representação gráfica da quantidade de proteína BSA (µg) em função do rácio de ¹⁶O/¹⁸O obtido após análise das intensidades relativas obtidas para o péptido m/z de 927,49. 84

Figura 36 - Representação gráfica da quantidade de proteína BSA (µg) em função do rácio de ¹⁶O/¹⁸O obtido após análise das intensidades relativas obtidas para o péptido m/z de 1439,81. 84

Figura 37 - Representação gráfica da quantidade de proteína BSA (μg) em função do rácio de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtido após análise das intensidades relativas obtidas para o péptido m/z de 1479,80.....85

Figura 38 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A1G: 10 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 103

Figura 39 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A2G: 10 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 104

Figura 40 - Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A3G: 10 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 104

Figura 41 - Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A4G: 10 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 105

Figura 42 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B1G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 105

Figura 43 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B2G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 106

Figura 44 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B3G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 106

Figura 45 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B4G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O).. 107

Figura 46 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C1G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O) . 107

Figura 47 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C2G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O) . 108

Figura 48 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C3G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O) . 108

Figura 49 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C4G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 109

Figura 50 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D1G: 40 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 109

Figura 51 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D2G: 40 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 110

Figura 52 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D3G: 40 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 110

Figura 53 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D4G: 40 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 111

Figura 54 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E1G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 111

Figura 55 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E2G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 112

Figura 56 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E3G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 112

Figura 57 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E4G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 113

Figura 58 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F1G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 113

Figura 59 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F2G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 114

Figura 60 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F3G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O). 114

Figura 61 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F4G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)..	115
Figura 62 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A1D1)	119
Figura 63 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A1D2)	119
Figura 64 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A2D1)	120
Figura 65 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A2D2)	120
Figura 66 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A3D1)	121
Figura 67 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A3D2)	121
Figura 68 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A4D1)	122
Figura 69 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A4D2)	122
Figura 70 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B1D1)	123
Figura 71 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B1D2)	123
Figura 72 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B2D1)	124

Figura 73 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B2D2).....	124
Figura 74 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B3D1).....	125
Figura 75 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B3D2).....	125
Figura 76 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B4D1).....	126
Figura 77 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B4D2).....	126
Figura 78 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C1D1).....	127
Figura 79 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C1D2).....	127
Figura 80 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C2D1).....	128
Figura 81 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C2D2).....	128
Figura 82 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C3D1).....	129
Figura 83 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C3D2).....	129
Figura 84 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C4D1).....	130

ÍNDICE DE IMAGENS

Imagem 1 – Fotografia do gel SDS-PAGE 12,5% poliacrilamida, cuja electroforese foi realizada a 120V, 400mA e durante 60 minutos e posterior coloração com *Coomassie Brilliant Blue*. Nos 5 poços foi aplicada 15µl de amostra numa diluição 1:1 com *sample buffer*. 1) Solução BSA para t=0s. 2) Solução BSA após 30s. 3) Solução BSA após 60s. 4) Solução BSA após 90s. 5) Solução BSA após 120s. A solução de BSA foi digerida utilizando o sonoreactor a 50% de acordo com o descrito no protocolo B..... 50

Imagem 2 – Esquema da reacção de ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* à proteína, de acordo com o método de Bradford. [Adaptado de [25]]..... 59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Volumes das soluções utilizados na preparação dos géis de poliacrilamida 12,5% e SDS 0,1% para posterior coloração com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> . Os valores a negrito correspondem à preparação de dois géis. A solução I corresponde ao tampão utilizados para o <i>Running Gel</i> e a solução II corresponde ao tampão utilizado no <i>Stacking Gel</i> . Em anexo encontram-se as tabelas contendo os volumes utilizados na preparação de géis de poliacrilamida com várias percentagens, bem como a constituição das soluções utilizadas.....	29
Tabela 2 – Volumes necessários à preparação das diferentes soluções para a realização da recta de calibração.	33
Tabela 3 – Volumes necessários à preparação das diferentes soluções do protocolo G e respectivo cálculo da proporção de reagente de Bradford e concentração de BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).	35
Tabela 4 – Volumes necessários à preparação das diferentes soluções para a realização do estudo 1 de acordo com o protocolo F.	35
Tabela 5 - Soluções preparadas para testar a reprodutibilidade do NanoDrop® de fluorescência (ND-3300) e a resposta do mesmo às soluções a utilizar no procedimento experimental. As soluções de SYPRO® Orange e de BSA $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ foram preparadas em SDS 0,01%. O sinal foi medido contra soluções sem proteína.	38
Tabela 6 – Soluções preparadas para verificar qual a influência da quantidade de SDS em solução.	39
Tabela 7 – Influência do tempo de ligação do espectrofotómetro ND-1000 tendo em conta as absorvâncias a 400nm medidas para as seis amostras respeitantes a uma solução de BSA a $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ desnaturada (1-6) reduzida (4-6) e alquilada (4-6). Foram efectuadas três réplicas a diferentes tempos de ligação do NanoDrop® (0, 50 e 100 minutos) para verificar se existe alguma interferência do tempo de ligação da lâmpada de UV.	47
Tabela 8 – Valores lidos de absorvância a 400nm de uma solução de BSA $0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ desnaturada, reduzida e alquilada com posterior digestão com tripsina acelerada por ultrasons em sonoreactor a 50% de amplitude, de acordo com o protocolo A.	51

Tabela 9 - Valores lidos de absorvância a 400nm de uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada com posterior digestão com tripsina acelerada por ultrasons em sonoreactor a 50% de amplitude e respectiva conversão em concentração de BSA de acordo com a equação da recta de calibração $y = 0,961x + 0,003$	53
Tabela 10 – Volumes necessários à preparação das várias soluções para validação do método de Bradford. A solução de BSA foi preparada de acordo com os passos de desnaturação, redução e alquiação descritos no protocolo A.	61
Tabela 11 – Soluções preparadas para testar a reprodutibilidade do NanoDrop® de fluorescência (ND-3300) [17] e a resposta do mesmo às soluções a utilizar no procedimento experimental. As soluções de SYPRO® Orange e de BSA 2µg/µl foram preparadas em SDS 0,01%. O sinal foi medido contra soluções sem proteína.	70
Tabela 12 – Soluções preparadas para verificar qual a influência da quantidade de SDS em solução.	72
Tabela 13 – Rácios $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtidos para o ião correspondente ao péptido YLYEIAR, cuja razão m/z é de 927,49.	83
Tabela 14 - Rácios $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtidos para o ião correspondente ao péptido RHPEYAVSVLLR, cuja razão m/z é de 1439,81.	83
Tabela 15 - Rácios $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtidos para o ião correspondente ao péptido LEGYGFQNALIVR, cuja razão m/z é de 1479,80.	83
Tabela 16 – Equações das rectas de calibração obtidas para os três picos correspondentes a três péptidos resultantes da hidrólise da BSA pela enzima tripsina após terem sido marcados isotopicamente e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF.	85
Tabela 17 – Valores obtidos para os rácios de três péptidos resultantes da hidrólise da BSA pela enzima tripsina em função da quantidade de proteína. Os valores de massa $[M+H]^+$ admitidos estão em concordância com os escolhidos para as rectas de calibração (tabela17).	86
Tabela 18 – Quantidade de BSA (µg) calculada através das equações das rectas de calibração e respectivos valores médios e desvios padrões. A cada solução foram feitas duas amostragens.	87
Tabela 19 – Volumes e respectivas soluções necessárias à preparação de géis SDS-PAGE em função da percentagem de acrilamida.	97
Tabela 20 – Composição das soluções necessárias para preparar géis de poliacrilamida.	98
Tabela 21 – Tabela resumo da simbologia, abreviaturas e estruturas de cada aminoácido.	99

Tabela 22 – Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras A da recta de calibração.	116
Tabela 23 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras B da recta de calibração.	116
Tabela 24 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras C da recta de calibração.	117
Tabela 25 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras D da recta de calibração.	117
Tabela 26 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras E da recta de calibração.	118
Tabela 27 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras F da recta de calibração.....	118
Tabela 28 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste A com o padrão interno 1.....	131
Tabela 29 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste A com o padrão interno 2.....	131
Tabela 30 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste B com o padrão interno 1.....	132
Tabela 31 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste B com o padrão interno 2.....	132
Tabela 32 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste C com o padrão interno 1.....	133
Tabela 33 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste C com o padrão interno 2.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Proteína Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)

Ambic – Tampão bicarbonato de amónia (*Ammonium bicarbonate*)

ACN - Acetonitrilo

DTT – DL-ditioneitol

IAA - Iodoacetamida

US - Ultrasons

SDS – Dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulphate*)

MALDI-TOF-MS – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

UV – Radiação Ultravioleta

UV-Vis – Radiação ultravioleta-visível

IV – Radiação Infravermelha

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPE – Ressonância Paramagnética Electrónica

BCA – Ácido Bicinconínico (*Bicinchoninic Acid*)

TFA – Ácido tri-fluoroacético (*Trifluoroacetic Acid*)

CHCA – Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

RFU – *Relative Fluorescence Units*

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ - Coeficiente de extinção molar ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

λ – Comprimento de onda (nm)

Estuda sempre.

*O estudo liberta da ignorância e favorece a
criatura com discernimento.*

*O estudo e o trabalho são as asas que
facilitam a evolução do ser.*

*O conhecimento é um bem que, por mais
que seja armazenado, jamais toma qualquer
espaço. Pelo contrário, faculta mais ampla
facilidade para novas aquisições.*

*O homem que ignora, caminha às
escuras.”*

Joanna de Ângelis

RESUMO

No decorrer do trabalho experimental que originou esta dissertação efectuaram-se vários estudos com o intuito de estudar cineticamente a reacção de hidrólise enzimática de proteínas acelerada por ultrasons.

Utilizaram-se quatro proteínas diferentes: albumina sérica bovina (BSA), anidrase carbónica, ovalbumina e α -lactoalbumina que foram digeridas com tripsina.

No sentido de monitorizar em tempo real a reacção de hidrólise recorreu-se a espectrofotometria ultravioleta-visível, utilizando tecnologia NanoDrop® ND-1000, com base nas características físico-químicas das cadeias polipeptídicas, bem como à incorporação de um corante extrínseco através do ensaio de Bradford.

Efectuaram-se igualmente estudos de espectrofotometria de fluorescência, também através da tecnologia NanoDrop® ND-3300, por incorporação de um fluoróforo extrínseco, SYPRO® Orange, à estrutura proteica.

Para além dos ensaios espectrofotométricos, recorreu-se a uma nova metodologia de quantificação proteica através da marcação isotópica com oxigénio ^{18}O acoplada a jusante com espectrometria de massa MALDI-TOF-MS.

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que através do protocolo testado de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons não foi possível monitorizar em tempo real a reacção, quer por espectrofotometria de UV-Vis, quer por espectrofotometria de fluorescência através do fluoróforo SYPRO® Orange.

No que diz respeito à marcação isotópica por ^{18}O também não foi possível efectuar qualquer estudo cinético, uma vez que esta metodologia apenas permite a quantificação relativa das amostras proteicas.

Palavras-chave: Ultrasons, UV-Vis, Bradford, Fluorescência, SYPRO® Orange, NanoDrop®, Marcação isotópica, Oxigénio-18, MALDI-TOF-MS.

ABSTRACT

During the experimental work that resulted in this dissertation several studies took place with the aim of kinetic studying the reaction of hydrolysis of proteins accelerated by ultrasound.

The following four proteins were studied: bovine serum albumin (BSA), carbonic anhydrase, ovalbumin and α -lactalbumin digested with trypsin.

In order to monitor the hydrolysis reaction in real-time, we have used ultraviolet-visible spectrophotometry with NanoDrop® ND-1000 technology, based on the physical and chemical characteristics of the polypeptide chains as well as the incorporation of a dye through the Bradford method.

Different studies using fluorescence spectrometry based on NanoDrop® ND-3300 technology were also done by the addition of an extrinsic fluorophore, SYPRO® Orange, to the protein structure.

In addition to the spectrophotometric tests, a new methodology was experienced to quantify protein by labeling proteins with oxygen isotope ^{18}O coupled downstream with mass spectrometry MALDI-TOF-MS.

Based on the results, we concluded that through the protocol used for enzymatic digestion of proteins accelerated by ultrasound technology was not possible to real-time monitor the reaction, either by UV-Vis spectrophotometry or by fluorescence spectrophotometry through the fluorophore SYPRO® Orange.

Regarding the labeling with ^{18}O isotope was also not possible to make any kinetic study, since this method only allows a relative quantification of protein samples.

Keywords: *Ultrasound, UV-Vis, Bradford, fluorescence, SYPRO® Orange, NanoDrop®, ^{18}O -labeling, oxygen-18, MALDI-TOF-MS.*

OBJECTIVOS

Esta dissertação teve como principal objectivo efectuar estudos cinéticos em reacções de hidrólise enzimática de proteínas acelerada por ultrasons.

OBJECTIVOS ESPECÍFICOS:

Desenvolver metodologias rápidas que permitissem a monitorização em tempo real da reacção.

Verificar qual a influência da utilização de protocolos acelerados de digestão enzimática de proteínas, recorrendo a tecnologia de ultrasons, na velocidade da reacção e consequentemente na cinética da mesma.

INTRODUÇÃO

A cinética química é o estudo da velocidade das reacções químicas, ou seja, a velocidade com que a composição química de um sistema é alterada no tempo. É uma área da Química que já foi galardoada com alguns prémios Nobel, como sejam Hishelwood e Semenov (1956), Norrish, Potter e Eigen (1967), Herschlbach, Lee e Polanyi (1986) e Zewail (1999). [1]

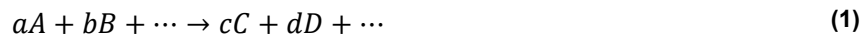
A primeira caracterização da cinética de uma reacção poderá passar pela medição de uma propriedade macroscópica que seja alterada ao longo do tempo e que esteja relacionada com uma concentração de produtos ou reagentes, tais como a absorção de radiação electromagnética (UV/Vis, IR, RMN, RPE,...), índice de refração, pressão, calorimetria, potenciometria, condutimetria, etc. É uma descrição do sistema e serve para relacionar acontecimentos macroscópicos com leis matemáticas. Numa segunda aproximação tentar-se-á fazer uma caracterização microscópica, ou seja, tentar identificar o passo ou passos reaccionais envolvidos. Para isso há que definir um mecanismo de reacção e ver se o mecanismo proposto vai de encontro aos dados experimentais obtidos. [1]

ANÁLISE DOS RESULTADOS CINÉTICOS

As reacções, ou passos reaccionais, são classificadas segundo a sua molecularidade como unimoleculares, bimoleculares, trimoleculares, etc., se resultam da reactividade de uma só molécula, ou da colisão de duas, três, ou mais moléculas, respectivamente. [1]

No entanto, a caracterização cinética de uma reacção obtém-se através da dependência da concentração dos reagentes e/ou produtos da reacção com o tempo, o que poderá não ter relação com a molecularidade da reacção. [1]

Seja uma reacção hipotética



define-se velocidade da reacção como

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt} \quad (2)$$

onde $d[X]/dt$ representa a variação da concentração de cada espécie no tempo e é chamada velocidade da reacção em ordem à espécie X. A velocidade de uma reacção pode igualmente ser dado pelo produto de uma constante cinética k pela concentração dos reagentes envolvidos

$$v = k[A]^\alpha [B]^\beta \dots \quad (3)$$

podendo por vezes estar presentes concentrações de produtos da reacção ou de catalisadores envolvidos. [1]

Aos parâmetros α, β, \dots , inteiros, positivos ou negativos, dá-se o nome de ordem parcial da reacção de A, B, ... e à soma $\alpha + \beta + \dots$ chama-se ordem global da reacção. A constante cinética k para um conjunto de condições experimentais só depende da temperatura. [1]

Existem numerosos métodos de determinação da lei de velocidade de uma reacção. Estes métodos podem ser agrupados em: método de integração, método de isolamento, método das velocidades iniciais, método de diferenciação e o método do tempo de semi-reacção. A aplicação de cada um destes métodos visa a obtenção de uma lei matemática que represente a variação da concentração dos reagentes ao longo do tempo, de modo a se poder calcular, quer a ordem da reacção de cada reagente quer a constante cinética da reacção. [1]

Método de integração

Este método consiste em admitir previamente uma ordem para a reacção, ou seja, definir um valor de α, β , etc. e, integrar a equação de velocidade obtida. A equação integrada é testada com valores experimentais. Se a equação se ajustar aos dados experimentais a ordem arbitrada é a real, caso contrário procede-se a uma nova tentativa para outra ordem de reacção. É talvez o método mais usado, pois na maior parte dos casos há indícios de qual é a ordem da reacção. [1]

Para uma reacção do tipo



Reacção de ordem zero

Uma reacção de ordem zero ($\alpha = 0$) indica que a velocidade da reacção não depende da concentração do reagente, ou seja, é constante ao longo do tempo. [1]

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k \quad (5)$$

Integrando em $[A]$ e t , tendo em conta que para $t=0$ a concentração de A é a inicial, $[A] = [A]_0$, vem:

$$\int_{[A]_0}^{[A]} d[A] = -k \int_0^t dt \quad (6)$$

o que implica uma dependência linear da concentração no tempo. [1]

$$[A] = [A]_0 - kt \quad (7)$$

Da análise dimensional da equação 7 mostra-se que as unidades da constante cinética k para a ordem zero serão $M. [tempo]^{-1}$. [1]

Reacção de ordem 1

São reacções onde a velocidade depende da concentração de um só reagente, elevado a um coeficiente unitário. [1]

Assim, pode escrever-se para uma reacção de 1ª ordem

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \quad (8)$$

o que por integração

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{dt} = -k \int_0^t dt \quad (9)$$

correspondendo a uma relação linear do $\ln [A]$ no tempo

$$\ln[A] = \ln [A]_0 - kt \quad (10)$$

Da análise dimensional da equação 10, mostra-se que as unidades da constante cinética para a ordem 1 serão $[\text{tempo}]^{-1}$. [1]

Reacção de ordem 2

As reacções com cinética global 2 podem ser agrupadas em cinéticas de dois tipos: do tipo $v = k[A]^2$, o que equivale a uma ordem parcial 2 para a espécie A e do tipo $v = k[A][B]$, o que equivale a uma ordem parcial 1 para a espécie A e uma ordem parcial 1 para a espécie B. [1]

Cinéticas do tipo $v = k[A]^2$

A velocidade é proporcional ao quadrado da concentração do reagente.

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k [A]^2 \quad (11)$$

pelo que integrando vem

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]^2} = -k \int_0^t dt \quad (12)$$

o que equivale a uma dependência linear de $1/[A]$ no tempo

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \quad (13)$$

As unidades da constante cinética para a ordem 2 serão $M^{-1}[\text{tempo}]^{-1}$. [1]

Cinética do tipo $v = k[A][B]$

A concentração de A e de B podem ser dadas no tempo por

$$[A] = [A]_0 - x \quad (14)$$

$$[B] = [B]_0 - b/a \cdot x \quad (15)$$

onde x é a concentração de A consumida até ao instante t , pelo que a velocidade da reacção vem como

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A][B] = \frac{dx}{dt} = k([A]_0 - x)([B]_0 - \frac{b}{a}x) \quad (16)$$

Integrando vem

$$\frac{a}{b[A]_0 - a[B]_0} \ln \frac{[A]_0[B]}{[A][B]_0} = -kt \quad (17)$$

que pode ser representado numa relação linear como

$$\ln \frac{[A]}{[B]} = \ln \frac{[A]_0}{[B]_0} + \frac{b[A]_0 - a[B]_0}{a} kt \quad (18)$$

entre $\ln [A]/\ln [B]$ e o tempo t , obtendo-se do declive a constante cinética.[1]

Reacção de ordem n

De um modo geral, para uma cinética de ordem n do tipo

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^n \quad (19)$$

por integração vem, para $n \neq 1$

$$\frac{1}{[A]^{n-1}} = \frac{1}{[A]_0^{n-1}} + (n-1)kt \quad (20)$$

o que corresponde a uma representação linear entre $1/[A]^{n-1}$ e t .

Da análise dimensional da equação 20 mostra-se que as unidades da constante cinética para ordem n serão $M^{(1-n)}[tempo]^{-1}$. [1]

Mecanismo de Michaelis-Menten

As enzimas são catalisadores biológicos, isto é, aumentam a velocidade da reacção algumas ordens de grandeza quando presentes, mesmo em concentrações muito baixas. [1]

Segundo o mecanismo de Michaelis-Menten de 1913, a enzima (E) associa-se ao substrato (S) formando uma espécie intermediária (ES) que funciona como precursor dos produtos da reacção (P). [1]



Aplicando a aproximação do estado estacionário à espécie ES, fazendo a variação nula da sua concentração, vem para a velocidade de aparecimento dos produtos da reacção

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_{-1} k_2 + k_1 [S]} = k' [E]_0 \quad (22)$$

com

$$k' = \frac{k_1 k_2 [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]} \quad (23)$$

Chama-se constante de Michaelis k_M à razão das constantes cinéticas

$$k_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{\text{desaparecimento de ES}}{\text{aparecimento de ES}} \quad (24)$$

donde usualmente toma forma de

$$\frac{d[P]}{dt} = k' [E]_0 \quad \text{com} \quad k' = \frac{k_2 [S]}{k_M + [S]} \quad (25)$$

Representando a equação de Michaelis-Menten em ordem a [S], o que implica uma função da velocidade da reacção em ordem à concentração de substrato, verifica-se que a velocidade aumenta linearmente com [S] para depois atingir um patamar, a partir do qual, a velocidade é constante e independente de [S]. Essa é a velocidade máxima (v_{max}) da reacção para uma dada concentração de enzima, $[E]_0$. De facto, para $[S] \gg K_M$, $v = k_2 [E]_0 = v_{max}$ o que acontece quando toda a enzima está na forma de ES e nenhuma na forma livre E. [1]

Há um factor importante que também é possível retirar pela equação de Michaelis-Menten: para uma velocidade de reacção com metade do valor da velocidade máxima, a

concentração de substrato é igual à constante de substrato é igual à constante de Michaelis-Menten, K_M . [1]

$$v = \frac{v_{max}}{2} = \frac{k_2[E]_0}{2} \Rightarrow \frac{1}{2} = \frac{[S]}{k_M + [S]} \quad (26)$$

pelo que $[S] = k_M$. Um valor baixo de k_M indica que o aparecimento de ES é preponderante em relação ao seu desaparecimento, pelo que é necessária uma concentração mais baixa de substrato para se obter a velocidade máxima da reacção. Assim, tem-se o equilíbrio da formação da espécie ES muito deslocado para a direita e consegue-se obter a eficiência máxima da enzima para concentrações baixas de substrato. Linearizando a equação 25 vem

$$\frac{1}{k'} = \frac{k_M}{k_2} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_2} \quad (27)$$

obtendo-se da representação do inverso de k' com o inverso de $[S]$ a constante cinética k_2 da ordenada da origem e a constante de Michaelis-Menten do declive. Outra proposta de linearização da equação 25, de modo a obter estas constantes cinéticas, foi a equação de Lineweaver-Burk, de 1934, talvez a mais popular. [1]

$$\frac{1}{v} = \frac{k_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (28)$$

cuja representação mostra um declive dado por k_M/v_{max} , uma ordenada na origem igual a $1/v_{max}$ e uma abcissa na origem de $-1/k_M$. [1]

De um modo geral, para obter uma cinética reaccional, é necessário proceder à quantificação dos solutos envolvidos na reacção quer seja pela quantificação do desaparecimento do substrato quer pela quantificação do aparecimento do soluto. Uma vez que neste trabalho experimental, tanto os substratos como os produtos e logicamente a enzima utilizada são componentes proteicos torna-se necessário compreender as propriedades físico-químicas dos mesmos, de modo a proceder a um estudo com menor engano.

A área responsável pela análise sistemática das proteínas para sua posterior identificação, quantificação e função, denomina-se de proteómica e, contrastando com o genoma estático de uma célula, o proteoma (conjunto de todas as proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo) é tanto complexo como dinâmico. A análise do proteoma é geralmente acompanhada pela combinação de técnicas de electroforese e espectrometria de massa. No entanto, esta técnica encontra-se sobre elevado escrutínio devido à dificuldade em detectar proteínas pouco abundantes na totalidade dos lisados celulares. [2]

A análise do proteoma apresenta problemas analíticos específicos derivados da abundância de proteínas bem como as múltiplas formas que estas podem apresentar, sendo sobre este segundo aspecto que recai maior atenção. Deste modo, torna-se fulcral o desenvolvimento de técnicas de separação que permitam analisar as proteínas ou péptidos de acordo com as suas características física e/ou químicas. [2]

PROTEÍNAS

As proteínas são polipeptídeos de alto peso molecular que por hidrólise total geram L- α -aminoácidos. Os aminoácidos ligam-se entre si através de ligações covalentes denominadas ligações peptídicas, feitas entre os grupos α -COOH do primeiro aminoácido e o α -NH₂ do segundo aminoácido:

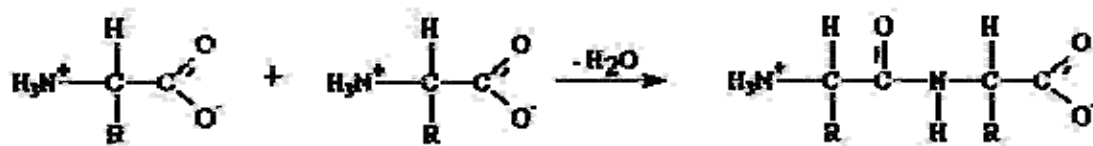


Figura 1 – Esquema da formação de ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos.

A cadeia principal de uma proteína (também chamada de espinha dorsal ou esqueleto) repete-se sempre, seguindo a ordem: N, C α , C=O. Não existe ligação covalente no grupo R para formar a cadeia principal de uma proteína. [3]

Para cada proteína podem discutir-se quatro tipos de estrutura:

I - Estrutura Primária - Sequência de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Embora esta ligação seja representada como uma ligação simples, ela possui carácter

parcial de ligação dupla. Assim, não há liberdade de rotação em torno da ligação peptídica, enquanto há ampla liberdade de rotação em torno das outras ligações. [3]

II - Estrutura Secundária - Disposição espacial, regular e periódica da cadeia principal mantida por pontes de hidrogénio entre os grupos NH e CO. Podem ser de três tipos: hélice α , folha β , e volta β . [3]

- **Hélice α** - Nesta estrutura, a cadeia principal possui orientação helicoidal em torno de um eixo, onde os grupos R são projectados para fora. Esta estrutura é estabilizada por pontes de hidrogénio entre resíduos da mesma cadeia, o que confere máxima estabilidade à hélice. Duas ou mais hélices podem entrelaçar-se formando fibras. [3]
- **Folha β** - Na folha β , a cadeia está totalmente distendida, sendo estabilizada por pontes de hidrogénio entre resíduos de cadeias vizinhas, que sucedem em direcções opostas (anti-paralelas) ou iguais (paralelas). As pontes de hidrogénio encontram-se perpendiculares ao eixo da cadeia e os grupos R projectam-se para cima ou para baixo em relação ao plano. [3]
- **Volta β** - estrutura normalmente encontrada no final das folhas β a fim de possibilitar a reversão no sentido da cadeia, na qual uma ponte de hidrogénio é formada entre o oxigénio carboxílico de um resíduo ao hidrogénio amínico de outro resíduo situado três resíduos à frente. [3]

Pode ocorrer que consideráveis porções da proteína estejam numa conformação diferente das três mencionadas acima. Este caso, denominado de enrolamento aleatório, apresenta igual importância biológica. [3]

III - Estrutura Terciária - Surge em virtude do enrolamento em estruturas tridimensionais compactas, devido à formação de ligações cruzadas e pontes de sulfureto intra-cadeias. Podem levar à estrutura terciária as pontes de hidrogénio entre grupos R polares, interacções iónicas entre grupos laterais de cargas opostas e interacções hidrofóbicas entre grupos laterais. Quando a proteína está em meio aquoso, a probabilidade é de que os resíduos hidrofóbicos estejam para dentro e os hidrofílicos para fora da estrutura proteica. [3]

IV - Estrutura Quaternária - É a conformação nativa da proteína quando subunidades iguais ou diferentes se agrupam. Esta estrutura é estabilizada pelas mesmas interacções que estabilizam a estrutura terciária. [3]

Devido às diferentes conformações que as proteínas podem apresentar, são-lhes conferidas diferentes propriedades físico-químicas. [3]

Anfoterismo: devido à presença de grupos ionizáveis, as influências das interacções electrostáticas sobre o pK de cada um resultam em curvas de dissociação ou de titulação complexas e de difícil interpretação. Apesar disso, as proteínas possuem pI bem definido. [3]

Solubilidade: vários factores afectam a solubilidade das proteínas:

a) Estrutura: os grupos ionizáveis possibilitam interacções electrostáticas intra e intermoleculares, bem como interacções dipolo com a água. Isto é, grupos polares fazem pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, bem como com as moléculas de água, enquanto, grupos hidrofóbicos possibilitam interacções de *Van der Waals* intra e intermoleculares. [3]

b) Factores Ambientais: para valores de pH afastados do pI a solubilidade é maior, pois uma carga maior favorece a hidratação. No pI, a força de repulsão é menor, o que favorece a agregação e floculação das moléculas, o que pode levar a uma precipitação isoeléctrica. A concentração de iões em solução, ou seja, a força iónica do meio, também produz alterações que afectam a solubilidade das proteínas. Altos valores de força iónica geralmente levam a um decréscimo da solubilidade, pois a água tende a solvatar preferencialmente os iões. [3]

c) Pressão Hidrostática: um aumento da pressão promove a dissociação das proteínas e quando a pressão é normalizada, ocorre uma reassociação aleatória. [3]

d) Solventes Orgânicos: os solventes orgânicos diminuem a constante dieléctrica do meio, diminuindo a solvatação das proteínas, que se associam e precipitam. [3]

Desnaturação: o rompimento da estrutura nativa da proteína é chamado de desnaturação, o que fisicamente pode ser considerado como uma conformação alterada da cadeia polipeptídica, não afectando a estrutura primária, no entanto, a proteína, geralmente, perde a sua actividade biológica. Alguns agentes desnaturantes são:

a) Temperatura: o aumento da temperatura destrói as pontes de hidrogénio e as interacções hidrofóbicas, levando ao desenrolamento da proteína, o que resulta em coagulação ou precipitação. Esta precipitação depende também do pH, da força iónica, entre outros factores e, ocorre próxima ao pI como resultado da agregação molecular que acontece devido à exposição ao meio exterior de grupos hidrofóbicos e grupos -SH que estavam no seio da estrutura nativa. [3]

b) Ácidos e Bases Fortes: alteram a carga molecular. Em determinados valores de pH a repulsão entre estas cargas pode destabilizar a estrutura compacta da proteína. [3]

c) Agentes Caotrópicos: ureia e sais de guanidino podem formar pontes de hidrogénio com os grupos R e/ou com átomos envolvidos nas ligações peptídicas, destabilizando as interacções intramoleculares e modificando a estrutura original da proteína. [3]

d) Solventes Orgânicos: podem formar pontes de hidrogénio com os grupos R ou destruir as ligações hidrofóbicas existentes. A sua acção depende da polaridade e é mais eficaz a temperaturas elevadas. [3]

e) Detergentes: por possuírem porções hidrofóbicas e hidrofílicas estabelecem forte interacção entre as suas cadeias e as cadeias proteicas causando a modificação da estrutura da proteína. Contudo, a desnaturação pode ser um processo reversível. [3]

MÉTODOS PARA ESTIMATIVA E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO UV-VISÍVEL

Os cromóforos proteicos são de três categorias: as ligações peptídicas, as cadeias laterais de alguns aminoácidos (grupos R) e os grupos prostéticos. [4]

Em termos quantitativos, a **ligação peptídica** é o cromóforo mais importante de uma proteína, pois existem **n-1** ligações peptídicas em cada **n** aminoácidos. O seu comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) encontra-se centrado em torno dos 200nm. Trata-se de um cromóforo que absorve na região dos UV longínquo devido às transições electrónicas do C=O da ligação peptídica. Este grupo carbonilo tem as suas propriedades electrónicas modificadas devido à proximidade dos electrões desemparelhados do átomo de nitrogénio (N) que participa na ligação. De um modo geral, a banda de absorção das ligações peptídicas é a mais intensa num espectro de absorvância de uma proteína. No entanto, a este comprimento de onda também absorvem muitos outros compostos, nomeadamente uma grande quantidade de solventes orgânicos e tampões. Adicionalmente, algumas ligações das cadeias laterais de certos aminoácidos tais como Phe, Trp, Glu, Gln, Asp, Asn, His e Arg, também absorvem a comprimentos de onda abaixo dos 210nm. Esta contribuição pode não ser importante devido ao conteúdo relativos destes mesmos aminoácidos, no entanto, pode falsear os resultados obtidos nesta região do espectro. [4]

Quanto às **cadeias laterais dos aminoácidos**, as bandas de absorção mais significativas encontram-se no intervalo de comprimentos de onda entre os 230 e 300nm, ou seja, dentro da zona do UV próximo. Concretamente, as cadeias laterais que absorvem neste intervalo de frequências são as dos aminoácidos aromáticos e as da cisteína. Esta última dá lugar a uma banda centrada em torno dos 250nm, pelo que apenas se pode considerar, uma vez que o seu coeficiente de extinção molar é muito pequeno. Os outros três resíduos mencionados, os aromáticos, absorvem principalmente em torno dos 260-290nm. [4]

Finalmente, as bandas de absorção mais importantes da maioria dos **grupos prostéticos** encontram-se na zona correspondente ao visível. Por isso, as proteínas que os apresentam são coloridas. Além disso, quase todos estes grupos apresentam absorvâncias bem diferenciadas a comprimentos de onda menores, no entanto, não são considerados de muita importância devido ao número de grupos prostéticos por cadeia polipeptídica ser pequeno. Todavia, a presença de um grupo prostético com bandas de absorção na zona do visível pode ser uma característica muito útil quando se trata de identificar uma proteína. Esta apresentará características espectrais muito particulares, que permitirão a sua detecção, mesmo quando na presença de outras. [4]

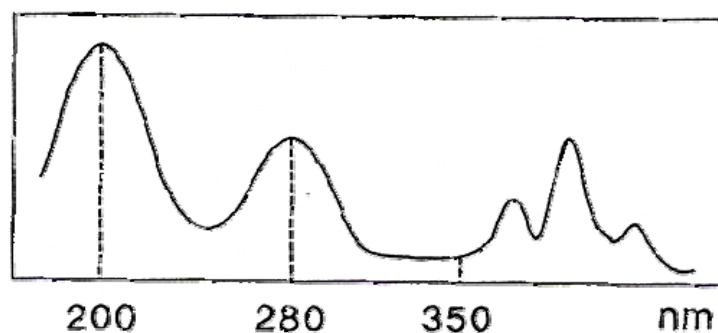


Figura 2 – Espectro típico de uma proteína, cuja composição possui um número significativo de aminoácidos aromáticos, assim como um grupo prostético com uma banda intensa na região do visível. A banda sobre os 200nm corresponde à absorção da ligação peptídica. A banda nos 280nm resulta das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos e as bandas que aparecem acima dos 350nm são resultado da existência do grupo prostético. [4]

Influência da estrutura terciária sobre o espectro de absorção dos cromóforos proteicos

Um cromóforo em solução está em constante interacção com o solvente. Normalmente trata-se de forças de dispersão de London que se estabelecem entre as moléculas do solvente e as do soluto. A consequência desta interacção é que o espectro de um cromóforo em solução aparece sempre desviado para comprimentos de onda maiores. Como as moléculas biológicas são estudadas em solução, é interessante considerar a influência que pode ter a natureza do solvente sobre os espectros de absorção UV-Visível. Para tal, há que recorrer ao princípio de Franck-Condon:

Princípio de Franck – Condon

Considerando a grande diferença de massa entre núcleo e electrões, a transição electrónica ocorre muito rapidamente, sendo que, logo após a absorção, a configuração nuclear permanece inalterada, sendo esta, a mesma configuração apresentada no estado fundamental, instantes antes da absorção. Assim, o princípio de Franck-Condon comprova que as transições electrónicas mais prováveis serão aquelas cujas configurações nucleares do estado excitado sejam semelhantes às do estado fundamental. [5]

Deste modo, também não é possível que se alterem as posições relativas dos átomos que formam a ligação. Isto significa que, quando o estado excitado é alcançado, a orientação do cromóforo é idêntica à que existia no estado fundamental. [4]

Aplicações da espectroscopia de absorção UV-Visível ao estudo de proteínas

Em algumas separações cromatográficas, a medida de absorvância a 214nm no eluído permite localizar as diferentes fracções que contêm as proteínas separadas. Esta medida espectroscópica também se pode realizar a 280nm, no entanto, diminui a sensibilidade pois a absorvância a este comprimento de onda também é menor. De igual modo, no caso de uma proteína com cor, a eleição adequada do seu $\lambda_{\text{máx}}$ é na zona do visível, característica do seu grupo prostético, permitindo a sua localização. [4]

Quando se trata de preparações homogéneas, de soluções de proteínas isoladas, pode utilizar-se o seu coeficiente de extinção molar (ϵ) para calcular a sua concentração, segundo a equação de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c \quad (29)$$

em que **A** corresponde à absorvância; ϵ ao coeficiente de extinção molar ($\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); **d** à distância percorrida pelo feixe de luz (cm) e **c** à concentração ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). [4]

Obviamente, que é necessário conhecer o coeficiente de extinção molar *a priori*. O cálculo do ϵ é feito registando a absorvância de uma solução de proteína de concentração conhecida em função das diferentes concentrações. [4]

Existem vários métodos para a determinação de proteínas totais, que foram desenvolvidos para diferentes amostras, tais como células bacterianas (Biureto), proteínas dissolvidas (Bradford), soluções que contenham detergentes (BCA – Ácido Bicinconínico), proteína pura (absorção UV), alimentos (Biureto, Lowry, Bradford), plasma sanguíneo (Biureto, Lowry, Bradford), plantas (Lowry), entre outras. Cada método apresenta um princípio diferente e precisa ser analisado separadamente. [6]

O método **Biureto** envolve a mistura de sulfato de cobre e hidróxido de sódio com tartarato de sódio, que estabiliza o cobre em solução. Ocorre a formação de um complexo de cobre com a ligação peptídica da proteína, em meio alcalino. Geralmente, as concentrações de proteínas são superestimadas, uma vez que todos os compostos com grupos $-\text{NH}_2$ são medidos. Apresenta limite de detecção de $1 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ e leitura de absorvância a 310nm. O complexo formado no método do Biureto também pode ser lido a 540nm, porém com menor sensibilidade. [6]

O método de **Lowry** apresenta limite de detecção de $0,7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ e leitura de absorvância a 750nm. Neste método, ocorre redução dos constituintes activos do reagente folin-fenol por meio das cadeias laterais de alguns aminoácidos. [6]

No método de **Bradford**, as leituras são feitas a 595nm e o limite de detecção é de $2 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Neste método ocorre ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* aos grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Para isto ocorrer, a proteína deve ter, no mínimo, 3kDa. A reacção ocorre em dois minutos e dura aproximadamente duas horas. [6]

No método **BCA - Ácido Bicinconínico**, com leituras a 562nm e limite de detecção de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, ocorre formação de um complexo colorido com BCA, pela redução do Cu^{2+} , em meio alcalino. Este método monitoriza os iões de cobre monovalentes produzidos na reacção das proteínas com cobre bivalente, aumentando a sensibilidade do método, como ocorre no de Lowry. Existem outras substâncias capazes de reduzir o Cu^{2+} a Cu^+ tais como ácido úrico e glicose que causam interferência na determinação. [6]

O método **Kjeldahl** é baseado na determinação do nitrogénio total e consequente multiplicação por 6,25. Este factor é referente à média de nitrogénio proteico presente na maioria dos compostos. Neste método o limite de detecção é de $0,1\text{mg. dm}^{-3}$. [6]

Vários factores devem ser analisados antes da escolha da metodologia para determinação de proteína total, como sensibilidade, reprodutibilidade, simplicidade, poucas substâncias interferentes, disponibilidade de volume de amostra, rapidez, baixo custo, similaridade às concentrações ambientais e toxicidade do reagente. [6]

Além das metodologias acima descritas para a determinação de proteínas totais numa amostra, existem outros processos que permitem de igual modo monitorizar a quantidade de proteínas ou péptidos existentes numa solução.

ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA

Algumas moléculas, uma vez absorvida a radiação electromagnética, são capazes de emitir luz. A fluorescência é um destes fenómenos de emissão. O seu estudo proporciona uma informação valiosa, tanto qualitativa com quantitativa sobre os aspectos estruturais da molécula responsável ou do seu relacionamento com o meio que a rodeia. [7]

Por consequência da absorção de um fotão, um electrão da molécula passa do estado fundamental a um estado excitado. Uma vez no estado excitado, o electrão tende a passar ao estado fundamental. Esse retorno pode ser efectuado de diversas formas, as quais competem entre si. [7]

A transição de modo vibracional do estado excitado ao fundamental é conhecida como “desexcitação”. Pode ocorrer de uma forma não-radiativa (sem emitir radiação electromagnética) ou de forma radiativa (emitindo um fotão). Às substâncias que emitem radiação electromagnética dá-se o nome de luminescentes. As formas mais importantes de desexcitação também podem ser classificadas de verticais ou horizontais. As primeiras referem-se a transições entre estados vibracionais de energia diferente enquanto as segundas implicam transições entre modos vibracionais isoenergéticos. [7]

Se a transição ocorrer do modo singleto do estado excitado, fala-se em fluorescência, enquanto se a transição for do modo tripleto, fala-se em fosforescência. Ambas as transições são do tipo vertical. [7]

De um modo conclusivo, para que uma molécula seja capaz de emitir fluorescência, tem que ser capaz de absorver luz, isto é, como consequência da absorção de um fotão com

uma certa frequência, a molécula passará do estado fundamental, possivelmente num modo vibracional de menor energia, a um modo vibracional do estado excitado. É necessário, portanto, que a molécula possua cromóforos, ou seja, ligações responsáveis pela tal absorção. No entanto, a existência de um cromóforo não implica necessariamente que possa emitir fluorescência. O fenómeno da emissão fluorescente há que competir vantajosamente, ou pelo menos com certa probabilidade de êxito em relação a outras formas de desexcitação. Para que tal aconteça é necessário que a energia dos modos vibracionais dos estados implicados na transição e as distâncias médias dos núcleos dos átomos possibilitem o fenómeno fluorescente. Quando ocorre, o cromóforo pode emitir fluorescência e denomina-se de fluoróforo. [7]

Quando uma molécula possui naturalmente um fluoróforo, este classifica-se como intrínseco. Noutros casos, é conveniente unir a molécula, covalentemente, ou não, a um fluoróforo externo. [7]

Características da emissão fluorescente

Como já foi referido, o fóton absorvido geralmente leva a molécula a um modo vibracional de alta energia do estado excitado. Isto ocorre porque, segundo o princípio de Franck-Condon, a transição electrónica ocorre sem que se alterem as distâncias entre os núcleos dos diferentes átomos do cromóforo e, a distância correspondente do modo vibracional menos energético do estado excitado é normalmente maior que a do nível correspondente no estado fundamental. [7]

Intensidade de fluorescência

Devido ao fenómeno de fluorescência em si, e a forma como se mede nos espectrofluorímetros, é possível definir três tipos distintos de intensidade de emissão de fluorescência: real, observada e corrigida. [7]

A intensidade real de fluorescência é o número total de fótons emitidos por unidade de tempo. Obviamente, esta intensidade está directamente relacionada com a intensidade de luz absorvida e o rendimento quântico de fluorescência que, por definição, é o quociente entre o número de fótons emitidos e os absorvidos. [7]

Ao aumentar a intensidade da luz absorvida, aumentará proporcionalmente, na teoria, a intensidade real. Contudo o número de fótons absorvidos não depende unicamente do

coeficiente de extinção molar (ϵ) do fluoróforo a esse comprimento de onda e da sua concentração, também depende da intensidade da luz incidente, que para um mesmo valor de absorvância é igual à intensidade da luz incidente menos a intensidade da luz transmitida. [7]

Não só tem grande utilidade a medida da intensidade real de fluorescência como é muito difícil quantificá-la. Em primeiro lugar, devido às características dos espectrofluorímetros, em que apenas uma fracção dessa dita intensidade real atinge de uma maneira eficaz o fotomultiplicador. Além disso, apenas é medida a fluorescência de uma pequena porção da amostra, um elemento do volume colocado no centro da célula. A luz que chega a esse mesmo elemento de volume e os fotões emitidos por fluorescência podem ser “filtrados” pela própria amostra. Para que a luz atinja esse elemento de volume central, já atravessou previamente uma parte da amostra, portanto, a intensidade da luz incidente que chega a esse mesmo elemento de volume central será tanto menor quanto maior for a concentração do fluoróforo e, conseqüentemente, menor será a emissão fluorescente. Para evitar este efeito, torna-se necessário trabalhar com amostras diluídas, o que por sua vez, exige que a intensidade da lâmpada seja grande o suficiente para provocar o máximo de excitação e assim obter emissões apreciáveis. [7]

Medidas de concentrações. Fluorimetrias.

Tendo em conta o descrito anteriormente sobre a dependência linear da concentração do fluoróforo e a intensidade de fluorescência observada ou corrigida, a medida destas grandezas pode ser utilizada para estimar concentrações. Esta análise apresenta algumas vantagens sobre o equivalente realizado por medidas de absorvância. Assim, já que a intensidade da lâmpada dos espectrofluorímetros é superior à dos espectrofotômetros, a medida dos primeiros tem uma sensibilidade maior. Além disso, uma medição de absorvância requer uma comparação contínua entre a intensidade de luz incidente e transmitida, de modo a que, se a concentração é muito baixa, ambas as magnitudes são muito parecidas, conseqüentemente erros maiores. Com um espectrofluorímetro não é necessária esta comparação das intensidades e, é possível medir soluções de concentrações baixas que num espectrofotómetro não se observariam ou estariam no limite de sensibilidade do aparelho. [7]

Todas estas análises são denominadas de fluorimetrias e apresentam um conjunto de características comuns. Para que a medida da intensidade de fluorescência possa ser

utilizada para calcular concentrações, é necessário efectuar uma recta de calibração. Esta é construída por dissolução do fluoróforo a concentrações conhecidas e nas mesmas condições experimentais nas quais vão ser realizadas as medições da amostra. A intensidade de fluorescência destas dissoluções só pode ser medida no comprimento de onda a que é produzida a maior emissão de fluorescência. Os valores obtidos são então representados frente à concentração e a série de pontos experimentais obtida é ajustada a uma recta. A necessidade de uma recta padrão surge uma vez que as medidas de fluorescência não possuem uma magnitude equivalente ao coeficiente de extinção molar e, portanto, não se pode utilizar uma equação semelhante à de *Lambert-Beer* (equação 29). [7]

Além das duas metodologias acima descritas de espectrometria de absorção e de fluorescência, um outro método bastante utilizado para a quantificação de proteínas baseia-se na electroforese em gel. Contudo, dadas as diversas limitações que apresenta, têm vindo a ser desenvolvidas outras alternativas, nomeadamente, espectrometria de massa baseada na marcação isotópica das amostras. Esta técnica envolve a introdução de um isótopo na cadeia polipeptídica, seguida por quantificação da espécie marcada isotopicamente por espectrometria de massa. [8]

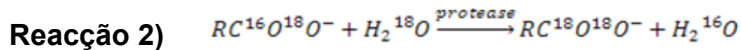
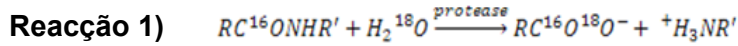
MARCAÇÃO ISOTÓPICA

A primeira utilização da técnica de marcação isotópica com ^{18}O na quantificação de péptidos foi efectuada por *Desiderio and Kai*, em 1983. Estes investigadores incorporaram enzimaticamente átomos de ^{18}O no C-terminal de uma proteína e utilizaram-na como padrão interno para quantificar essa mesma proteína através de espectrometria de massa. Apesar de esta técnica ter sido desenvolvida para quantificar péptidos, o princípio de quantificação é o mesmo que é utilizado para quantificar proteínas após incorporação proteolítica. [8]

Mirgorodskaya et al., em 2000 expandiu a utilização da marcação isotópica adaptada à quantificação de proteínas e sugeriu o uso desta técnica em proteómica comparativa. A primeira aplicação proteómica desta técnica remonta a 2001, em que *Yao et al.*, quantificaram proteínas em dois serotipos de um adenovírus. Desde essa data ocorreram inúmeras referências a esta técnica em aplicações biológicas. [8]

Reacção enzimática de marcação isotópica com ^{18}O

A enzima proteolítica catalisa as duas seguintes reacções:



A hidrólise de uma proteína por uma protease em meio enriquecido com $H_2^{18}O$ resulta na incorporação de átomos de ^{18}O no C-terminal de cada péptido originado. [8]

O mecanismo envolve um ataque nucleofílico pela molécula de água ao grupo carbonilo do péptido originado (reacção 1). Após esta reacção de hidrólise a protease ainda consegue incorporar outro ^{18}O no C-terminal do péptido. Esta segunda incorporação resulta em dois átomos de ^{18}O no C-terminal. [8]

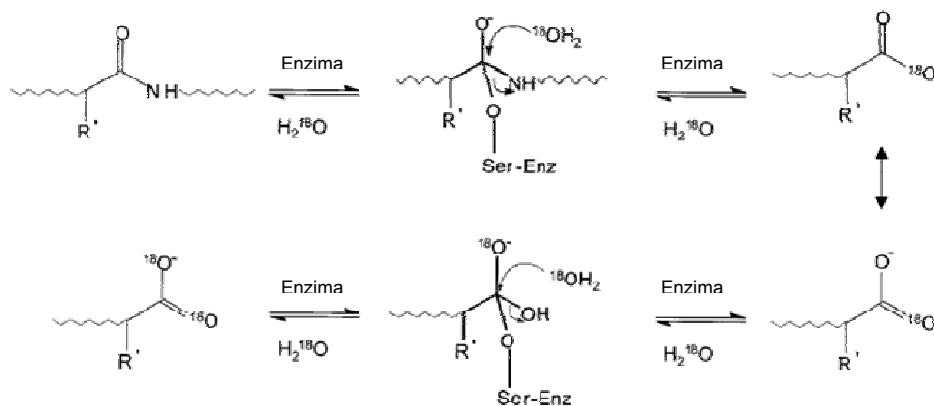


Figura 3 – Esquema do mecanismo responsável pela incorporação de ^{18}O após digestão com tripsina, Glu-C (glucose oxidase) ou a endopeptidase Lys-C que permitem a incorporação de dois átomos de oxigénio no C-terminal dos péptidos originados. Adaptado de [9]

Existe uma diferença de eficiência da primeira reacção para a segunda. A primeira incorporação do ^{18}O ocorre devido à clivagem da ligação peptídica, sendo necessário apenas um único ciclo para que esta aconteça. Por outro lado, a segunda reacção necessita decorrer durante algum tempo para que seja alcançada a segunda incorporação, isto deve-se ao facto de existir 50% de hipóteses de ser substituído o átomo de ^{18}O incorporado na reacção 1 (assumindo que a velocidade de reacção de substituição do ^{18}O e do ^{16}O é a mesma). [8],[9]

Esta técnica resulta numa incorporação variável de um ou dois átomos de oxigénio-18 em cada péptido. Esta incorporação variável torna-se bastante problemática, uma vez que a segunda reacção é extremamente lenta sob as condições que normalmente são utilizadas e requer múltiplas reacções enzimáticas. Infelizmente, as velocidades de reacção não são previsíveis e diferem de péptido para péptido. Esta incorporação variável limita a quantificação dos péptidos e aumenta o erro nos cálculos dos respectivos rácios entre os péptidos não marcados e marcados ($^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$). Deste modo, quando os péptidos não marcados e os péptidos marcados são misturados, o espectro de massa obtido torna-se bastante complexo. [8]

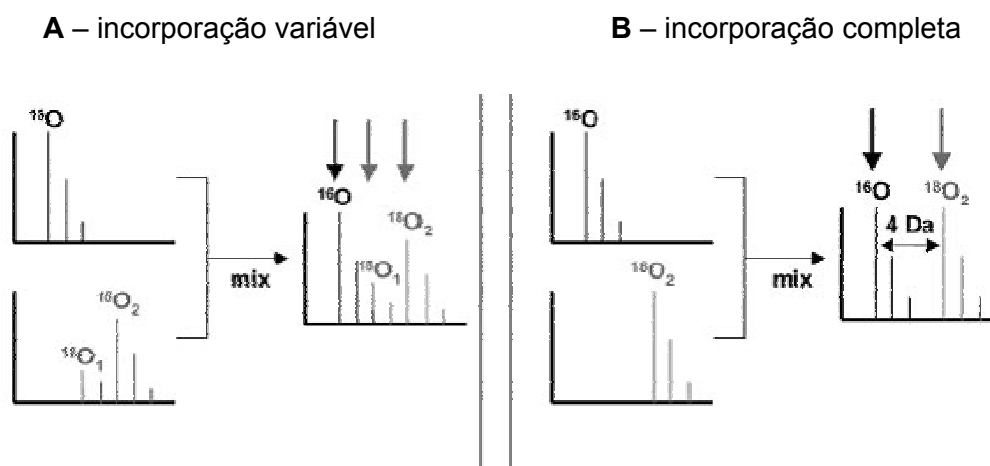


Figura 4 – Espectro de massa obtido para incorporação variável de ^{18}O (A) e para a incorporação completa de dois átomos de ^{18}O (B). [8]

Quando o péptido não marcado e o péptido marcado com um número variável de átomos de oxigénio-18 são misturados, o espectro de massa obtido é complexo (figura 4A). Para obter uma quantificação correcta da abundância relativa dos respectivos péptidos é necessário considerar:

- 1) O pico monoisotópico da espécie não marcada (péptido ^{16}O).
- 2) O pico monoisotópico da espécie marcada com apenas um átomo de ^{18}O (péptido $^{18}\text{O}_1$)
- 3) O pico monoisotópico da espécie marcada com os dois átomos de ^{18}O (péptido $^{18}\text{O}_2$)

A intensidade do pico monoisotópico correspondente ao péptido ^{16}O indica a quantidade de proteína não marcada na amostra, enquanto as intensidades dos picos monoisotópicos dos péptidos $^{18}\text{O}_1$ e $^{18}\text{O}_2$ indicam a quantidade de proteína marcada. O

resultado destes experimentais, com misturas de isótopos, apresenta uma grande variabilidade comparativamente aos resultados obtidos para um péptido que tenha sido marcado na totalidade com dois átomos de ^{18}O . Esta incorporação variável é normalmente a responsável pela dificuldade em obter intensidades precisas dos péptidos marcados isotopicamente aquando da análise dos espectros de massa. [8]

Por outro lado, quando os péptidos ^{16}O são misturados apenas com os péptidos $^{18}\text{O}_2$ o espectro de massa obtido é mais simples (figura 4B). É então utilizado o pico monoisotópico do péptido ^{16}O e o pico monoisotópico do péptido $^{18}\text{O}_2$ para calcular a abundância relativa. [8]

Para superar este problema da incorporação variável de oxigénio é necessário alcançar um procedimento de incorporação de apenas um ou incorporação completa dois átomos de ^{18}O . A obtenção da incorporação completa de apenas 1 átomo de ^{18}O resulta do abrandamento ou paragem da reacção 2. Por outro lado, para obter a incorporação completa de dois átomos de ^{18}O a reacção 2 deve ser acelerada significativamente. Torna-se fundamental encontrar condições ideais para que a quantificação absoluta de proteínas através da marcação isotópica seja possível, uma vez que até à data esta técnica é utilizada como um método de quantificação relativo, isto porque a quantidade de proteína numa amostra é analisada comparativamente à quantidade dessa mesma proteína numa outra. [8]

As proteases podem então ser classificadas em dois grupos:

- Proteases de Classe 1 que hidrolisam o N-terminal do péptido num aminoácido específico, tais como a endopeptidase Lys-N ou a endoproteínase Asp-N. [8]
- Proteases de Classe 2 que hidrolisam o C-terminal do péptido num aminoácido específico, tais como a tripsina ou a endopeptidase Lys-C. [8]

As proteases de classe 1 são escolhidas se for preferencial a incorporação de apenas um único ^{18}O e as proteases de classe 2, na incorporação de dois átomos de ^{18}O . [8]

Dado o objectivo deste trabalho experimental, para evitar oscilações na quantificação dos péptidos obtidos após hidrólise, é preferível a utilização de uma protease do tipo 2, nomeadamente a tripsina.

PARTE EXPERIMENTAL

APARELHAGEM

A electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, vulgo SDS-PAGE, foi realizada num aparelho da BioRad, modelo PowerPac Basic e de acordo com as instruções do fabricante.

A manipulação das amostras foi efectuada em tubos *ependorf* de 500 μ L.

Utilizou-se na secagem e pré-concentração das amostras, uma centrífuga de vácuo UniEquip, modelo UNIVAPO 100H acoplada a uma bomba de vácuo modelo Unijet II. Sempre que necessário foram utilizadas centrífugas e vortex da Biogen Cientifica, modelo Sky Line e placa de agitação e aquecimento da AGIMATIC-N, modelo Selecta.

Para acelerar a digestão enzimática recorreu-se a um sonoreactor, modelo UTR200, Dr. Hielsher (Teltow, Switzerland).

Para a marcação isotópica utilizou-se uma sonda metálica de quatro pontas: Ultrasonic multiprobe, model SLPe (Branson Ultrasonics Corporation, USA) 150W, 40kHz of ultrasonic frequency, 1mm diameter probe.

A água Mili-Q utilizada em todo o procedimento experimental foi obtida a partir de um aparelho da Milipore, modelo Simplicity™ 185.

Foram utilizados espectrofotómetros UV-Vis e de fluorescência NanoDrop® modelos ND-1000 e ND-3300.

PADRÕES E REAGENTES

Ao longo do trabalho experimental foram utilizadas as seguintes proteínas:

- Albumina de soro bovino (BSA), α -Lactoalbumina ($\geq 85\%$), Anidrase Carbónica (93%), Protease Type XIV e Tripsina da SIGMA.
- Ovalbumina ($\geq 95\%$) e Tripsina da FLUKA.

Todas as proteínas referidas foram analisadas sem posterior procedimento de purificação.

O corante fluorescente SYPRO® Orange foi adquirido da SIGMA.

Para a marcação isotópica foi utilizada H_2^{18}O 97 atom% ^{18}O da ISOTEC.

A matriz utilizada no tratamento da amostra para análise por MALDI-TOF foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) *puriss* da Fluka.

Como padrão de calibração para MALDI-TOF foi utilizado o Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit da AP Biosystems.

Além dos reagentes já referidos, foram ainda utilizados ao longo do trabalho prático os seguintes:

- Solução 30% de mistura acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) da BioRad;
- Metanol, acetonitrilo, iodoacetamida (IAA), DL-ditioneitol (DTT), α,α,α -tris-(hidroximetil)metilamina, tris(hidroxitetrametil)aminometano (Tris base) ultra puro, persulfato de amónio (PSA) e N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e Acetonitrilo da SIGMA;
- Bicarbonato de amónia ($> 99,5\%$) e ácido fórmico da Fluka;
- Azul de bromofenol, glicina, glicerol, ácido tri-fluoroacético (TFA 99%), da Riedel-de-Haën;
- *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (CBB), β -mercaptoetanol, dodecilsulfato de sódio (SDS) e o ácido fosfórico a 85% da Merck;
- Ácido etilenodiaminotetraacético sal dissódica 2-hidrato e acetato de sódio anidro (99%) da Panreac;
- Agarose (*agarose gel electrophoresis*) da Pronadisa.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

PREPARAÇÃO DE GÉIS SDS-PAGE

No interior dos dois vidros que vão suportar o gel, um com espaçamento de 0,5mm e outro fino, foi colocada uma solução de *Running Gel* 12,5% em poliacrilamida, preparada de acordo com a tabela 1.

Adicionou-se n-butanol sobre a solução diminuindo a oxigenação desta de modo a facilitar a reacção de polimerização da acrilamida e garantindo, em simultâneo, a uniformidade da superfície do gel.

Após a polimerização da acrilamida (15-20minutos) verifica-se a existência de 3 fases: o gel polimerizado, água e butanol. Nesta etapa, retira-se o butanol e a água e adiciona-se a solução de *Stacking Gel* 5% em acrilamida, como descrito na tabela 1 e, foi imediatamente colocado um pente para permitir a formação dos poços, nos quais vão ser aplicadas as amostras.

O espaço entre os géis é preenchido na totalidade com tampão tris-glicina (*running buffer*), enquanto o exterior é preenchido até um terço da altura da tina de electroforese.

Tabela 1 - Volumes das soluções utilizados na preparação dos géis de poliacrilamida 12,5% e SDS 0,1% para posterior coloração com *Coomassie Brilliant Blue*. Os valores a negrito correspondem à preparação de dois géis. A solução I corresponde ao tampão utilizado para o *Running Gel* e a solução II corresponde ao tampão utilizado no *Stacking Gel*. Em anexo encontram-se as tabelas contendo os volumes utilizados na preparação de géis de poliacrilamida com várias percentagens, bem como a constituição das soluções utilizadas.

Soluções stock (mL)	Stacking Gel	Running Gel
% Acrilamida	5	12,5
Solução I	-	0,75/1,5
Solução II	0,45/0,9	-
Solução III	0,3/0,6	2,08/4,16
SDS 10%	0,018/0,036	0,05/0,1
H ₂ O Mili-Q	0,94/1,88	2,1/4,2
PSA 10% (µL)	13,5/27	38/76
TEMED (µL)	2/4	2,5/5

TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

PROTOCOLO BASE DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS ACELERADA POR ULTRASONS

ETAPA 1: Solução de proteína em H₂O/ACN 50%.

ETAPA 2: Desnaturar em sonoreactor a 50% de amplitude durante 1 minuto.

ETAPA 3: Adicionar DTT 110mM em Ambic 12,5mM.

ETAPA 4: Reduzir em sonoreactor a 50% de amplitude durante 1 minuto.

ETAPA 5: Adicionar IAA 600mM em Ambic 12,5mM.

ETAPA 6: Alquilar em sonoreactor a 50% de amplitude durante 1 minuto.

ETAPA 7: Adicionar a enzima 1:20 (m/m) enzima:proteína.

ETAPA 8: Digerir em sonoreactor a 50% de amplitude.

ETAPA 9: Adicionar ácido fórmico para inactivar a enzima.

ETAPA 10: Analisar.

ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO

Protocolo A – protocolo acelerado de digestão

1. A 2mg de proteína BSA adicionar 500µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 500µl de acetonitrilo (concentração 2µg/µl).
2. Retirar 100µl da solução anterior e adicionar 200µl de H₂O MQ e 200µl de acetonitrilo. (concentração 0,4µg/µl)
3. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
4. Aos 500µl da solução de BSA 0,4µg/µl adicionar 50µl de uma solução de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
5. Reduzir em sonoreactor 50% durante 1 minuto.

6. Adicionar 50µl de IAA 600mM em Ambic 12,5mM à solução anterior.
7. Alquilar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
8. Diluir com 200µl de tampão Ambic 12,5mM.
9. Adicionar 200µl de uma solução de tripsina 0,05µg/µl.
10. Retirar uma alíquota de 10µl, adicionar-lhe 1µl de ácido fórmico 50% e guardar a -20°C .
11. Digerir em sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos de reacção.
12. Retirar alíquotas de 10µl a cada tempo de reacção e adicionar 1µl de ácido fórmico 50%.
13. A cada tempo de digestão efectuar o *scan spectrum curve* da solução.
14. As alíquotas retiradas ao longo do protocolo foram utilizadas para efectuar um gel SDS-PAGE a 12,5% poliacrilamida.

Protocolo B – preparação de soluções

Solução A:

1. A 2mg de proteína BSA adicionar 500µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 500µl de acetonitrilo (concentração 2µg/µl).
2. Retirar 50µl da solução de BSA 2µg/µl, adicionar 225µl de H₂O MQ e 225µl de acetonitrilo. (concentração 0,2µg/µl)
3. Colocar os 500µl da solução BSA 0,2µg/µl na célula e medir contra um branco de 500µl H₂O MQ:ACN 50%.

Solução B:

1. A 5µg de tripsina adicionar 250µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 250µl de acetonitrilo. (concentração 0,01µg/µl)
2. Colocar os 500µl da solução de tripsina 0,01µg/µl na célula e medir contra um branco de 500µl H₂O MQ:ACN 50%.

Solução C:

1. Pipetar 41µl de H₂O MQ, 41µl de acetonitrilo, 393µl de tampão bicarbonato de amónia 12,5mM e 25µl de ácido fórmico.
2. Transferir a solução para a célula e medir contra um branco de H₂O MQ.

Solução D:

1. Pipetar 250µl de H₂O MQ e 250µl de acetonitrilo.

2. Transferir a solução para a célula e medir contra um branco de H₂O MQ.

Solução E:

1. A 475µl de H₂O MQ adicionar 25µl de ácido fórmico.
2. Transferir a solução para a célula e medir contra um branco de H₂O MQ.

Protocolo C – Estudo do efeito dos ultrasons nos solventes

Estudo 1

1. Pipetar para um *ependorf* 10µl de H₂O MQ, 10µl acetonitrilo, 2µl DTT 110mM, 2µl IAA 600mM e 76µl de tampão bicarbonato de amónia 12,5mM.
2. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
3. Medir a absorvância da solução a 400nm a cada tempo de reacção.

Estudo 2

1. Pipetar para um *ependorf* 10µl de H₂O MQ, 10µl acetonitrilo, 2µl DTT 110mM, 2µl IAA 600mM e 36µl de tampão bicarbonato de amónia 12,5mM.
2. Adicionar 40µl de tampão Ambic 12,5mM a 1µg de tripsina para ressuspender.
3. Transferir a solução de tripsina para o *ependorf* com os restantes reagentes.
4. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
5. Medir a absorvância da solução a 400nm a cada tempo de reacção.

Estudo 3

1. A 10mg de proteína BSA adicionar 250µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 250µl de acetonitrilo (concentração 20µg/µl).
2. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
3. Adicionar 20µl de uma solução de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
4. Reduzir no sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
5. Adicionar 20µl de uma solução de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
6. Alquilar no sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
7. Diluir a solução, adicionando 460µl de Ambic 12,5mM.
8. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
9. Medir a absorvância da solução a 400nm a cada tempo de reacção.

Estudo 4

1. A 0,8mg de BSA adicionar 500µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 500µl de acetonitrilo (concentração 0,8µg/µl).
2. Retirar 50µl da solução de BSA 0,8µg/µl e adicionar 25µl de H₂O MQ e 25µl de acetonitrilo.
3. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
4. Adicionar 4µl de uma solução de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
5. Reduzir no sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
6. Adicionar 2µl de uma solução de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
7. Alquilar no sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
8. Diluir a solução, adicionando 52µl de Ambic 12,5mM.
9. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
10. Medir a absorvância da solução a 400nm a cada tempo de reacção.

Protocolo D – Recta de calibração

1. Partiu-se de uma solução mãe de BSA a 2µg/µl e preparou-se soluções diluídas de acordo com a tabela seguinte:

Tabela 2 – Volumes necessários à preparação das diferentes soluções para a realização da recta de calibração.

Volume BSA 2µg/µl (µl)	Volume H ₂ O MQ/ACN 50% (µl)	Volume DTT 110mM (µl)	Volume IAA 600mM (µl)	Volume solução tripsina 0,05µg/µl (µl)	Volume Ambic 12,5mM (µl)	Concentração BSA (µg/µl)
10	490	50	50	200	200	0,02
20	480	50	50	200	200	0,04
30	470	50	50	200	200	0,06
40	460	50	50	200	200	0,08
50	450	50	50	200	200	0,10
60	440	50	50	200	200	0,12
70	430	50	50	200	200	0,14
80	420	50	50	200	200	0,16
90	410	50	50	200	200	0,18
100	400	50	50	200	200	0,20

2. A cada *ependorf* contendo as diferentes concentrações de BSA, efectuou-se o protocolo A à excepção dos passos 10 a 14.
3. Mediram-se as absorvâncias de cada solução a 400nm.

Protocolo E – efeito da agarose na absorvância da solução a 400nm.

Estudo 1

1. Pesar 9,7mg de agarose e diluir em 500µl H₂O MQ. Aquecer a solução para facilitar a solubilização.
2. Adicionar 500µl de acetonitrilo.
3. Agitar por inversão.
4. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
5. Medir a absorvância da solução a 400nm a cada tempo de reacção.

Estudo 2

1. Pesar 9,7mg de agarose e diluir em 250µl H₂O MQ. Aquecer a solução para facilitar a solubilização.
2. Adicionar 500µl de acetonitrilo e agitar por inversão.
3. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
4. Adicionar 20µl de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
5. Reduzir no sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
6. Adicionar 20µl de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
7. Alquilar no sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
8. Diluir em 420µl de Ambic 12,5mM.
9. Adicionar 1µg de tripsina em 40µl de Ambic 12,5mM.
10. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
11. Medir a absorvância da solução a 400nm a cada tempo de reacção.

Protocolo F – proporção entre a quantidade de reagente de Bradford e de proteína

1. A 33,6mg de BSA adicionar 50µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 50µl de acetonitrilo.
2. Desnaturar a solução em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
3. Adicionar 4µl de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
4. Reduzir em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.

5. Adicionar 4µl de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
6. Alquilar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
7. Diluir a solução com 92µl de Ambic 12,5mM.
8. Preparar diluições de acordo com a tabela 4.

Tabela 3 – Volumes necessários à preparação das diferentes soluções do protocolo F e respectivo cálculo da proporção de reagente de Bradford e concentração de BSA (µg/µl).

Volume BSA 168µg/µl (µl)	Volume reagente de Bradford (µl)	Proporção do reagente de Bradford	Concentração final BSA (µg/µl)
10	25	2:5	48
10	50	1:5	28
10	100	1:10	15,3
10	150	1:15	10,5
10	200	1:20	8
10	250	1:25	6,5
10	300	1:30	5,4
10	400	1:40	4,1
10	500	1:50	3,3
10	1000	1:100	1,7

Protocolo G – Optimização protocolo de Bradford

Estudo 1

1. A 16,8mg de proteína BSA adicionar 100µl de H₂O MQ e homogeneizar a solução.
2. Preparar diluições de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 4 – Volumes necessários à preparação das diferentes soluções para a realização do estudo 1 de acordo com o protocolo G.

Volume BSA 168µg/µl (µl)	Volume H₂O MQ (µl)	Volume reagente de Bradford (µl)	Concentração final BSA (µg/µl)
1	9	200	0,8
2	8	200	1,6
4	6	200	3,2
6	4	200	4,8
8	2	200	6,4
10	0	200	8

3. Medir absorvância das soluções a 595nm.

Estudo 2

1. A 16,8mg de proteína BSA adicionar 50µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 50µl de acetoneitrilo.
2. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
3. Preparar diluições de acordo com a tabela 4.
4. Medir absorvância das soluções a 595nm.

Estudo 3

1. A 16,8mg de proteína BSA adicionar 25µl H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 25µl de acetoneitrilo.
2. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
3. Adicionar 2µl de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
4. Reduzir em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
5. Adicionar 2µl de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
6. Alquilar em sonoreactor a 50% em Ambic 12,5mM.
7. Diluir com 46µl de Ambic 12,5mM.
8. Preparar diluições de acordo com a tabela 4.
9. Medir absorvância das soluções a 595nm.

Protocolo H – Digestão em ultrasons de uma solução de BSA pela protease type XIV e quantificação pelo método de Bradford.

1. A 12,61mg de proteína BSA adicionar 50µl de H₂O MQ, homogeneizar e adicionar 50µl de acetoneitrilo.
2. Desnaturar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
3. Adicionar 4µl de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
4. Reduzir em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
5. Adicionar 4µl de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
6. Alquilar em sonoreactor a 50% durante 1 minuto.
7. Diluir com 392µl de Ambic 12,5mM contendo 7,7µg de *protease type XIV*.
8. Colocar a solução no sonoreactor a 50% de amplitude a diferentes tempos.
9. A cada tempo de reacção retirar alíquotas de 20µl e adicionar a 100µl de reagente de Bradford.
10. Agitar por inversão e deixar repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
11. Medir a absorvância da solução a 595nm a cada tempo de reacção.

Protocolo I – Introdução do passo de secagem das amostras no procedimento de digestão acelerado (protocolo A)

1. Dissolver 20mg de BSA em 500µl de H₂O MQ (concentração de 40µg/µl).
2. *Split* de 5µl da solução para diferentes *eppendorfs*.
3. Adicionar 5µl de acetonitrilo numa proporção 50:50.
4. Desnaturar em sonoreactor a 50% de amplitude durante 1 minuto.
5. Adicionar 0,5µl de DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
6. Reduzir em sonoreactor a 50% de amplitude durante 1 minuto.
7. Adicionar 0,5µl de IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
8. Alquilar em sonoreactor a 50% de amplitude durante 1 minuto.
9. Adicionar 9µl de tampão bicarbonato de amónia (Ambic) 12,5mM com *Protease Type XIV* dissolvida (1:20 m/m)
10. Digerir a diferentes tempos no sonoreactor a 50% de amplitude.
11. Adicionar 20µl de reagente de Bradford.
12. Levar à centrífuga de vácuo para *secura total*.
13. Ressuspender em 10µl de H₂O Mili-Q.
14. Deixar repousar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
15. Medir a absorvância a 595nm.

ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA

Ao longo de todo o procedimento experimental, em que foram efectuadas medições de fluorescência, o método utilizado foi sempre o seguinte:

Método Sypro Orange

LED Source: Blue

Excitation wavelength: 470nm ± 10nm

AutoGain: on

Analysis wavelength: 569nm

Protocolo J – Optimização da proporção do fluoróforo SYPRO® Orange.

1. Preparar uma solução de BSA 2µg/µl em SDS 0,01%.
2. Efectuar diversas diluições de acordo com a tabela 5.
3. Medir o sinal de fluorescência de cada amostra a 569nm de acordo com o método Sypro Orange.

Tabela 5 - Soluções preparadas para testar a reprodutibilidade do NanoDrop® de fluorescência (ND-3300) e a resposta do mesmo às soluções a utilizar no procedimento experimental. As soluções de SYPRO® Orange e de BSA 2µg/µl foram preparadas em SDS 0,01%. O sinal foi medido contra soluções sem proteína.

Amostras	Volume SYPRO® Orange 1:1000 (µl)	Volume BSA 2µg/µl (µl)	Volume SDS 0,01% (µl)	Proporção SYPRO® Orange na solução final	Concentração final BSA (µg/µl)
A	50 *	25	25	1:1000	0,5
B	50	25	25	1:2000	0,5
C	33,5	25	41,5	1:3000	0,5
D	25	25	50	1:4000	0,5
E	20	25	55	1:5000	0,5
F	16,7	25	58,3	1:6000	0,5
G	14,3	25	60,7	1:7000	0,5
H	12,5	25	62,5	1:8000	0,5
I	11,1	25	63,9	1:9000	0,5
J	10	25	65	1:10000	0,5

* Solução de SYPRO® Orange a 1:500 em SDS 0,01%.

Protocolo L - Optimização da quantidade de SDS

1. Dissolver BSA em tampão tris-glicina sem SDS numa concentração de 2µg/µl.
2. Preparar diversas diluições de acordo com a tabela 6.
3. Medir o sinal de fluorescência de cada amostra a 569nm de acordo com o método criado: Sypro Orange.

Tabela 6 – Soluções preparadas para verificar qual a influência da quantidade de SDS em solução.

Amostras	% SDS	Volume BSA 2µg/µl (µl)	Volume SDS 5% (µl)	Volume Tampão Tris- Gly sem SDS (µl)	Volume SYPRO® Orange 1:1000 em tampão Tris-Gly sem SDS (µl)
A	0,01	25	20	35	20
B	0,005	25	10	45	20
C	0,001	25	2	53	20
D	0,0005	25	1	54	20
E	0,0001	25	10 *	45	20
F	0	25	0	55	20

* Solução SDS 1%.

Protocolo M – Verificação do efeito da agarose no sinal de fluorescência

1. Dissolver agarose em tampão tris-glicina sem SDS numa concentração de 2µg/µl.
2. A 100µl da solução de agarose adicionar 100µl de tampão tris-glicina sem SDS.
3. Incubar durante 1hora a 37°C.
4. Adicionar a solução de agarose a uma alíquota de 10µg de tripsina.
5. Retirar alíquota de 25µl para t=0s.
6. Levar ao sonoreactor a 1, 4 e 8 minutos retirando alíquotas de 25µl a cada tempo de reacção.
7. Adicionar 2,5µl de ácido fórmico 50% para inactivar a tripsina.
8. A cada alíquota adicionar 20µl do corante SYPRO® Orange 1:1000 em tampão tris-glicina sem SDS.
9. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
10. Medir a fluorescência a 569nm.

Protocolo N

Ensaio I

1. Dissolver BSA em tampão tris-glicina sem SDS numa concentração de 2µg/µl.
2. A 100µl de solução de BSA adicionar 100µl de ACN.
3. Desnaturar durante 1minuto no sonoreactor a 50% de amplitude.
4. Adicionar 4µl DTT 110mM em tris-glicina sem SDS.

5. Reduzir durante 1minuto no sonoreactor a 50% de amplitude.
6. Adicionar 4µl IAA 600mM em tris-glicina sem SDS.
7. Alquilar durante 1minuto no sonoreactor a 50% de amplitude.
8. Adicionar 35µl de tampão tris-glicina contendo 10µg de tripsina.
9. Retirar alíquota de 25µl para t=0s.
10. Levar ao sonoreactor a 1, 4 e 8 minutos retirando alíquotas de 25µl a cada tempo de reacção.
11. Adicionar 2,5µl de ácido fórmico 50% para inactivar a tripsina.
12. A cada alíquota adicionar 20µl do corante SYPRO® Orange 1:1000 em tampão tris-glicina sem SDS.
13. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
14. Medir a fluorescência a 569nm.

Ensaio II

1. Dissolver BSA em tampão tris-glicina sem SDS (2µg/µl).
2. A 100µl de solução de BSA adicionar 100µl de ACN.
3. Desnaturar durante 1minuto no sonoreactor a 50% de amplitude.
4. Adicionar 4µl DTT 110mM em tris-glicina sem SDS.
5. Reduzir durante 1minuto no sonoreactor a 50% de amplitude.
6. Adicionar 4µl IAA 600mM em tris-glicina sem SDS.
7. Alquilar durante 1minuto no sonoreactor a 50% de amplitude.
8. Adicionar 40µl de SYPRO® Orange 1:1000 em tampão tris-glicina sem SDS.
9. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
10. Adicionar 35µl de tampão tris-glicina contendo 10µg de tripsina.
11. Retirar alíquota de 25µl para t=0s.
12. Levar ao sonoreactor a 1, 4 e 8 minutos retirando alíquotas de 25µl a cada tempo de reacção.
13. Adicionar 2,5µl de ácido fórmico 50% para inactivar a tripsina.
14. Medir a fluorescência a 569nm.

Ensaio III

1. Dissolver BSA em tampão tris-glicina sem SDS (2µg/µl).
2. A 100µl de solução de BSA adicionar 100µl de tampão tris-glicina sem SDS.
3. Incubar durante 10minutos a 95°C
4. Adicionar 10µg de tripsina.
5. Retirar alíquota de 25µl para t=0s.

6. Levar ao sonoreactor a 50% durante 1, 4 e 8 minutos retirando alíquotas de 25µl a cada tempo de reacção.
7. Adicionar 2,5µl de ácido fórmico 50%.
8. A cada alíquota adicionar 20µl de corante SYPRO® Orange 1:1000 em tampão tris-glicina.
9. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
10. Medir a fluorescência a 569nm.

Ensaio IV

1. Dissolver BSA em tampão tris-glicina sem SDS (2µg/µl).
2. A 100µl de solução de BSA adicionar 100µl de tampão tris-glicina sem SDS.
3. Incubar durante 10 minutos a 95°C
4. Adicionar 40µl de SYPRO® Orange 1:1000 em tampão tris-glicina sem SDS.
5. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
6. Adicionar 10µg de tripsina.
7. Retirar alíquota de 25µl para t=0s.
8. Levar ao sonoreactor a 50% durante 1, 4 e 8 minutos retirando alíquotas de 25µl a cada tempo de reacção.
9. Adicionar 2,5µl de ácido fórmico 50%.
10. Medir a fluorescência a 569nm.

Protocolo O – Procedimento clássico de digestão em banho termostaticado

1. A 100µl de uma solução de anidrase carbónica 2µg/µl adicionar 100µl de H₂O MQ.
2. Incubar durante 10 minutos a 95°C.
3. Adicionar a solução anterior a uma alíquota de 10µg de tripsina.
4. Retirar alíquota de 25µl para t=0s.
5. Adicionar 2,5µl de ácido fórmico 50% à alíquota.
6. Colocar a solução num banho termostaticado a 37°C a diferentes tempos.
7. Retirar alíquotas de 25µl a cada tempo.
8. Repetir passo 5.
9. A cada alíquota adicionar 20µl do corante SYPRO® Orange 1:1000 em tampão tris-glicina sem SDS.
10. Incubar durante 5 minutos a 37°C.
11. Medir a fluorescência a 569nm.

MARCAÇÃO ISOTÓPICA - ^{18}O

Passo 1: Digestão

1. Preparar solução mãe de BSA em Ambic 12,5mM/ACN 50%.
2. Retirar alíquota de 50 μl para cada poço da placa de 96 poços.
3. Diluir com 22 μl de Ambic 12,5mM/ACN 50% (aumentar o volume para evitar a formação de aerossóis)
4. Desnaturação com sonda durante 1 minuto a 25% de amplitude.
5. Adicionar 4 μl DTT 110mM em Ambic 12,5mM.
6. Redução com sonda durante 1 minuto a 25% de amplitude.
7. Adicionar 4 μl IAA 600mM em Ambic 12,5mM.
8. Alquilação com sonda durante 1 minuto a 25% de amplitude.
9. Adicionar 10 μl de solução de tripsina preparada de modo a obter uma proporção de enzima:proteína 1:20 (m/m) na amostra.
10. Digestão com sonda durante 2 minutos a 10% de amplitude.
Mode: Pulse; Time on: 2.05 min; Time off: 0.05 min
11. Adicionar 10 μl de ácido fórmico a 50%.
12. Transferir o conteúdo de cada poço para *ependorfs* devidamente rotulados e identificados.
13. Secar na centrífuga de vácuo e guardar a -20°C .

Passo 2: Marcação Isotópica

14. Ressuspender as amostras em 5 μl CaCl_2 0,5M, 5 μl CH_3COOH 1M com tripsina (1^a adição) e 5 μl ACN 20%.
15. Secar na centrífuga de vácuo.
16. Ressuspender as amostras em 50 μl H_2^{16}O MQ e, em 50 μl H_2^{18}O os padrões.
17. Transferir o conteúdo dos *ependorfs* para os respectivos poços.
18. Sonicar durante 2 minutos a 10% de amplitude
Mode: Pulse; Time on: 2.05min; Time off: 0.05min
19. Adicionar 2 μl TFA 27% (1% na mistura final).
20. Ressuspender o 2^a alíquota de tripsina em H_2^{16}O MQ excepto a tripsina que será introduzida nas amostras padrão. Essa é ressuspendida em H_2^{18}O .

21. Adicionar 2µl da solução de tripsina a cada poço (2ª adição).
 22. Sonicar durante 2 minutos a 10% de amplitude.
- Mode: Pulse; Time on: 2.05min; Time off: 0.05min

Passo 3: Análise por MALDI-TOF-MS

23. Retirar 2µl de cada poço/amostra e adicionar 2µl de padrão (¹⁸O).
24. Adicionar 4µl de solução matriz, α-CHCA.
25. Aplicar 1µl na placa para MALDI-TOF-MS.
26. Deixar secar.
27. Dessalinizar as amostras com 1 gota de TFA 0,01% em cada poço. Deixar actuar aproximadamente durante 30 segundos, sugar a gota com a ajuda de uma micropipeta e deixar secar.
28. Recristalizar as amostras com a aplicação de 0,5µl de uma solução de 70% ACN e TFA 0,1% por cada amostra e deixar secar.
29. Analisar as amostras por MALDI-TOF-MS.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM MALDI-TOF-MS

Para a preparação da matriz foram pesadas 10mg de CHCA e dissolvidas numa solução de 50% acetonitrilo e 0,1% TFA.

Adicionou-se a 4 μ L de amostra, 4 μ L de matriz e agitou-se a mistura no *vortex* durante alguns segundos.

As aplicações nos poços da placa de MALDI-TOF-MS foram feitas com 1 μ L de amostra. Além das amostras, foram aplicados 1 μ L de padrão de calibração com matriz (1:1), tal como representado a seguir:

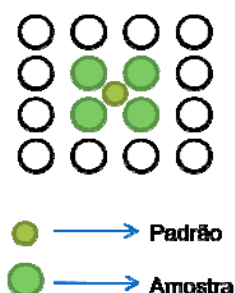


Figura 5 - Esquema de aplicações de amostra e padrão de calibração na placa MALDI-TOF. A calibração efectuada foi do tipo externa próxima.

ANÁLISE POR MALDI-TOF-MS

A análise das amostras de péptidos foi efectuada usando um aparelho de MALDI-TOF da *Applied Biosystems (Foster City, USA)*, modelo *Voyager DE-PRO biospectrometry workstation*, equipado com um laser de azoto emitindo radiação de comprimento de onda 337nm.

A aquisição dos espectros de massa foi feita, de acordo com as instruções do fabricante, e com o seguinte método:

- modo reflector de ião positivo;
- potencial de aceleração de 20kV;
- *grid voltage* a 75,1%;
- *guide wire* a 0,002%;
- *delay time* de 100ns.

Os espectros de massa foram obtidos com aplicação, em média, de 300 disparos de laser sobre a amostra.

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons encontra-se descrito anteriormente, na *Parte Experimental – Tratamento das amostras*.

O primeiro método escolhido para análise e quantificação das amostras de proteína digerida por ultrasons tem como base a espectrofotometria de absorção ultravioleta-visível.

ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

Uma vez que o protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerada por US recorre à utilização de diversos solventes e soluções, nomeadamente, acetonitrilo, DTT, IAA e tampão Ambic, é necessário efectuar alguns estudos no sentido de verificar qual a contribuição destes na absorvância da solução.

Preparou-se 100µl de uma solução de BSA a 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada, de acordo com o protocolo B (*Parte Experimental – Tratamento de amostra*) à excepção da incorporação da enzima e da utilização dos ultrasons e, traçaram-se vários espectros da mesma solução.

Para além de verificar a influência dos solventes mencionados acima, pretendeu-se verificar a reprodutibilidade do aparelho com esta mesma solução.

Como o volume máximo necessário para efectuar medições no NanoDrop® é de 2µl, há a necessidade de comprovar a reprodutibilidade do aparelho dado que protocolo utilizado

incorpora diversos compostos e, como tal, é imprescindível ter em conta diversos factores tais como a densidade e viscosidade das amostras.

Estes factores são de extrema importância, uma vez que neste tipo de aparelho é a própria amostra que funciona como célula espectrofotométrica, isto é, há a formação de um capilar pela própria amostra que é trespassado pelo feixe de luz. No anexo D, encontra-se, em mais detalhe, o funcionamento da tecnologia NanoDrop®.

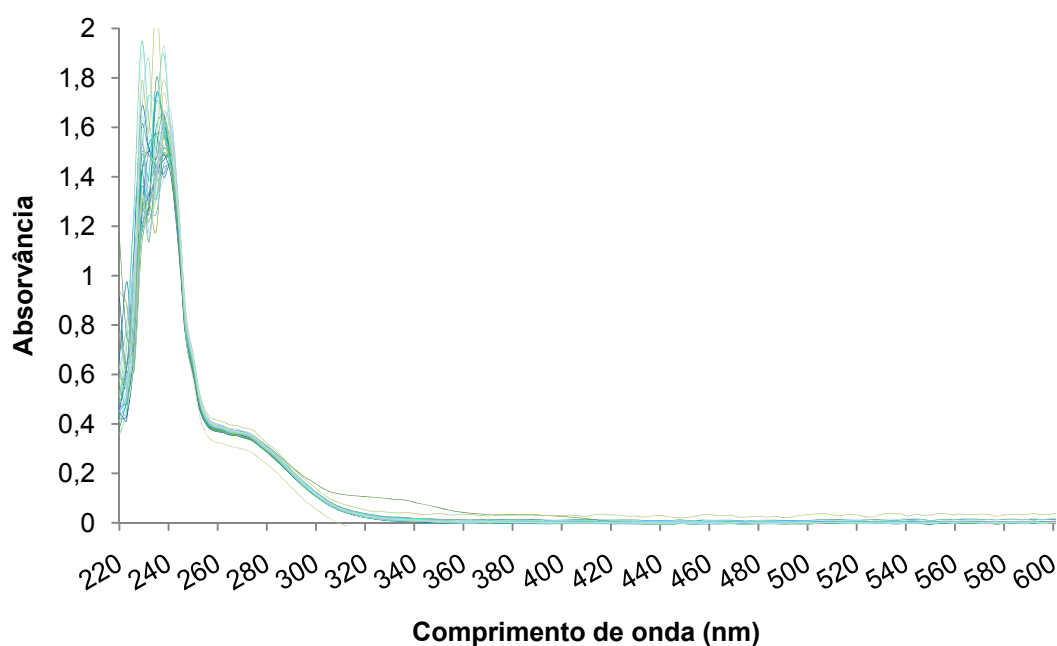


Figura 6 – Influência dos diferentes compostos presentes no protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerado por ultrasons. As medições foram efectuadas em 2µl de uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturalada, reduzida e alquilada sem adição de enzima e sem submeter a solução a ultrasons. A gota colocada no pedestal do espectrofotómetro ND-1000 foi reaproveitada, tendo sido efectuadas 33 repetições (n=34).

Analisando o espectro obtido no varrimento de 220 a 600nm permitido pelo NanoDrop® verifica-se que entre os 220 e, aproximadamente, os 250nm há uma grande oscilação nos espectros de absorvância obtidas. Este facto explica-se devido à existência de diversos compostos orgânicos na solução, pois estes absorvem preferencialmente nesta zona.

Assim, exclui-se a possibilidade de utilizar esta gama de comprimentos de onda para seguir a reacção quando utilizado este protocolo de digestão enzimática de proteínas.

Segue-se então, a possibilidade de monitorizar a reacção a 280nm, na zona de absorção dos aminoácidos aromáticos da proteína.

Para tal, efectuou-se novo estudo, utilizando os compostos orgânicos mencionados acima, mas desta vez, de modo independente, para verificar a sua influência a 280nm, quando em solução com a proteína.

Antes de avançar com os testes às soluções utilizadas no decorrer do protocolo, efectuou-se um outro estudo respeitante ao tempo de ligação do aparelho, no sentido de verificar se há necessidade de existir um período de tempo para aquecimento da lâmpada de UV antes da utilização.

Deste modo, foram efectuados outros estudos mantendo a mesma solução de trabalho, isto é, uma solução de BSA de concentração 5µg/µl.

Foram preparadas seis amostras da mesma solução e todas foram desnaturadas, enquanto, as amostras 4, 5 e 6 além da desnaturação, sofreram redução e alquilação, de acordo com o descrito no protocolo A, passos 3, 5 e 7.

A cada amostra foram efectuadas três medições da absorvância a 400nm.

Tabela 7 – Influência do tempo de ligação do espectrofotómetro ND-1000 tendo em conta as absorvâncias a 400nm medidas para as seis amostras respeitantes a uma solução de BSA a 5µg/µl desnaturada (1-6) reduzida (4-6) e alquilada (4-6). Foram efectuadas três réplicas a diferentes tempos de ligação do NanoDrop® (0, 50 e 100 minutos) para verificar se existe alguma interferência do tempo de ligação da lâmpada de UV.

Amostras	Tempo de ligação ND-1000 (minutos)		
	0	50	100
1	0,040 ± 0,003	0,039 ± 0,001	0,041 ± 0,002
2	0,038 ± 0,002	0,036 ± 0,003	0,040 ± 0,002
3	0,038 ± 0,002	0,039 ± 0,001	0,041 ± 0,003
4	0,030 ± 0,002	0,029 ± 0,005	0,028 ± 0,001
5	0,029 ± 0,003	0,026 ± 0,001	0,026 ± 0,003
6	0,027 ± 0,001	0,029 ± 0,003	0,029 ± 0,002

Destes dados retira-se que não existe qualquer tipo de interferência na medição da absorvância em função do tempo de ligação do aparelho, sendo os resultados bastantes reprodutíveis mesmo após um longo período de utilização.

Após ter sido verificada a reprodutibilidade do ND-1000 e a estabilidade do mesmo ao longo do tempo de ligação, é possível avançar para o estudo dos diferentes compostos utilizados ao longo do protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons.

Essas soluções foram preparadas de acordo com o protocolo B, descrito na *Parte Experimental – Tratamento das amostras*.

- A. BSA a $0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ em $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50% (branco: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50%)
- B. Tripsina a $0,01\mu\text{g}/\mu\text{l}$ em $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50% (branco: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50%)
- C. H_2O , ACN, tampão bicarbonato de amónia (Ambic) 12,5mM e, ácido fórmico 5% (branco: H_2O MQ)
- D. $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50% (branco: H_2O MQ)
- E. Ácido fórmico 5% (branco: H_2O MQ)

A figura 7 apresenta os espectros de absorvância obtidas para as diferentes soluções.

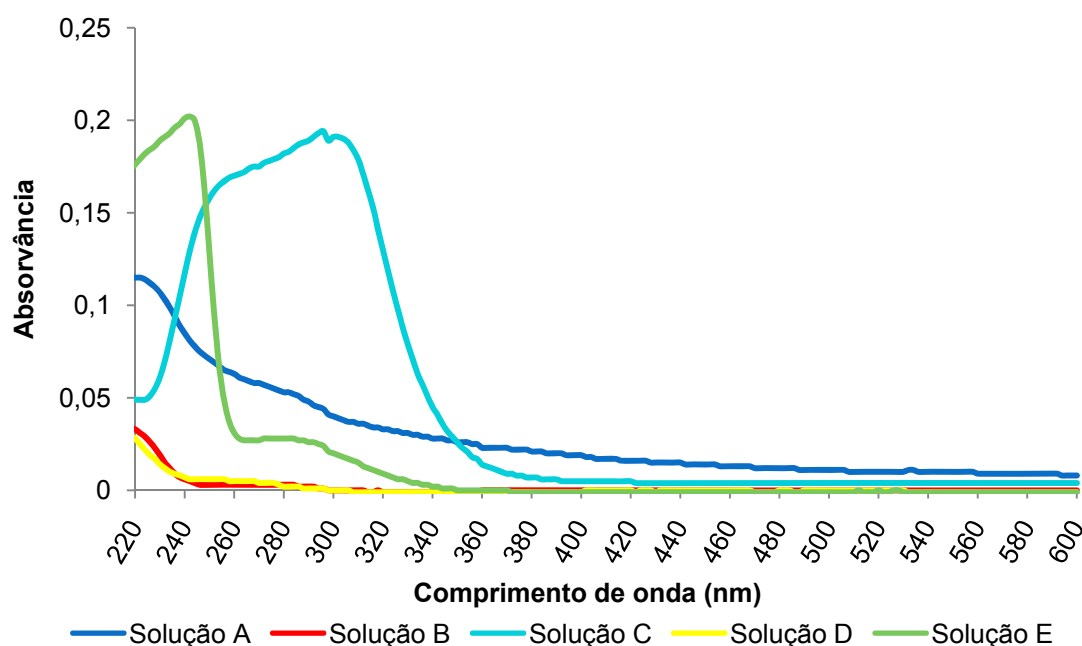


Figura 7 – Comportamento dos compostos utilizados ao longo do trabalho experimental, medido em absorvância, em função dos diferentes comprimentos de onda. Solução A) BSA a $0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ em $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50%. Solução B) Tripsina a $0,01\mu\text{g}/\mu\text{l}$ em $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50%. Solução C) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50%, Ambic 12,5mM e ácido fórmico. Solução D) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50%. Solução E) Ácido fórmico 5%. As soluções A-C foram contra um branco de $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50% e as soluções D e E contra um branco de H_2O MQ.

Analisando a figura 7 verifica-se que nos 280nm ainda há uma forte contribuição dos compostos orgânicos, especialmente devido ao tampão bicarbonato de amónia (Ambic).

O espectro que representa a solução de BSA (solução A) apenas se sobrepõe aos restantes quatro espectros para comprimentos de onda superiores a 360nm.

Para evitar estas contribuições dos compostos orgânicos, as linhas de base a partir deste ponto foram efectuadas com soluções contendo todos os reagentes à excepção da proteína, uma vez que era esta que se pretendia monitorizar.

Ainda antes de avançar para o processo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons, resta ainda verificar qual a influência dos US nos compostos presentes no protocolo base.

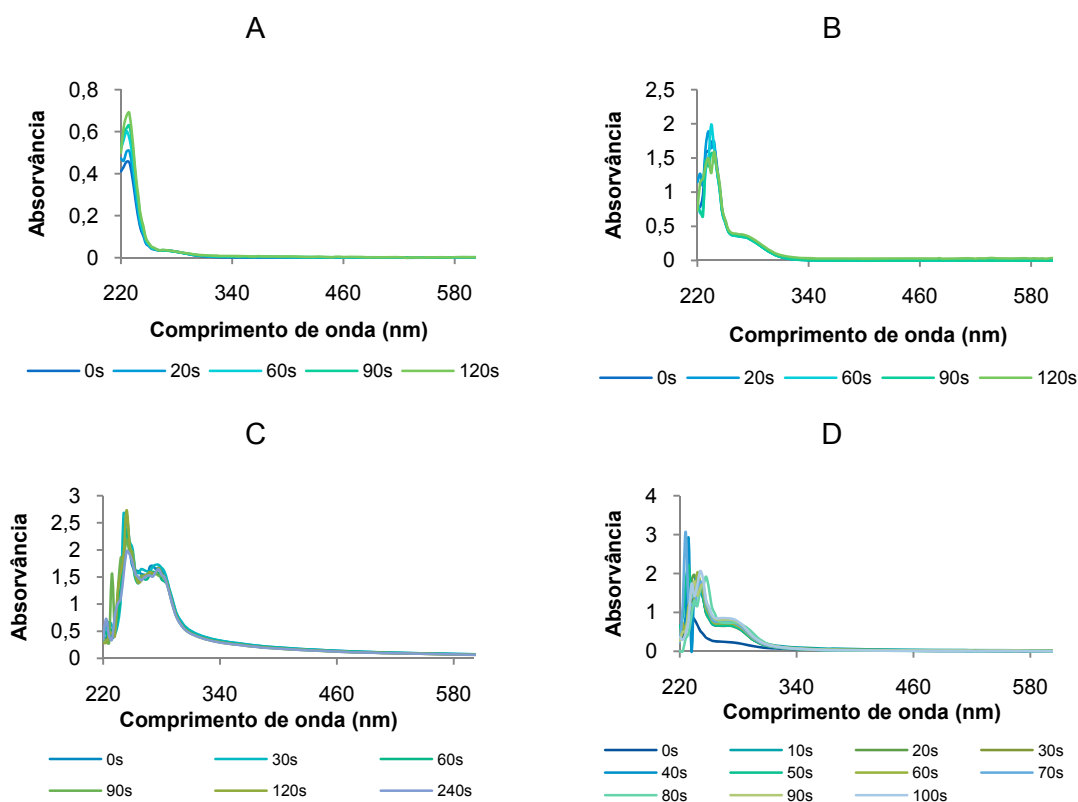


Figura 8 – Influência dos ultrasons nas diferentes soluções utilizadas no protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons. A) Solução contendo H₂O, ACN, DTT, IAA, Ambic e ácido fórmico. B) Solução com todos os solventes da solução A aos quais foi adicionada tripsina. C) Solução de BSA desnaturada, reduzida e alquilada, sem tripsina. D) Solução de BSA desnaturada, reduzida e alquilada, à qual foi adicionada tripsina. Todas as soluções foram preparadas conforme o descrito na *Parte Experimental – Tratamento de amostras – protocolo C*.

Por observação da figura 8, verifica-se que não há qualquer tipo de interferência dos ultrasons nas soluções utilizadas, uma vez que há sobreposição dos espectros para os diferentes tempos de sonicação.

Tendo sido comprovado que não há qualquer tipo de degradação dos reagentes bem como da enzima e da proteína quando submetidos aos ultrasons, estamos em condições de avançar com o protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons.

De acordo com o protocolo A, descrito na *Parte Experimental – Tratamento das amostras*, preparou-se uma solução de BSA a qual foi desnaturada, reduzida e alquilada em sonoreactor a 50%. Seguidamente foi adicionada a enzima tripsina 1:20 (m/m) enzima:proteína e a solução foi digerida em US, no sonoreactor a 50% de amplitude.

A cada tempo de digestão foi retirada uma alíquota para efectuar um gel SDS-PAGE de modo a monitorizar a digestão da proteína.

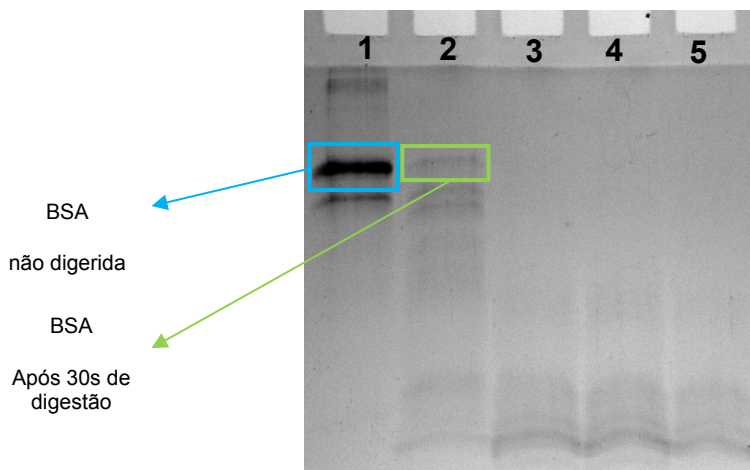


Imagem 1 – Fotografia do gel SDS-PAGE 12,5% poliacrilamida, cuja electroforese foi realizada a 120V, 400mA e durante 60 minutos e posterior coloração com *Coomassie Brilliant Blue*. Nos 5 poços foi aplicada 15µl de amostra numa diluição 1:1 com *sample buffer*. 1) Solução BSA para t=0s. 2) Solução BSA após 30s. 3) Solução BSA após 60s. 4) Solução BSA após 90s. 5) Solução BSA após 120s. A solução de BSA foi digerida utilizando o sonoreactor a 50% de acordo com o descrito no protocolo A.

Analisando a imagem 1 verifica-se que após os 60 segundos de sonicação a banda da BSA já não é visível, o que indica que a proteína foi efectivamente digerida, deste modo, diminuiu-se o intervalo de tempo no qual se retiraram as alíquotas, sendo a cada 5 segundos até perfazer 60 segundos de total de reacção.

Pelo que foi referido anteriormente, a valores na ordem dos 200nm não é possível retirar qualquer valor devido à existência dos compostos orgânicos. Na zona onde há absorção dos aminoácidos aromáticos, isto é, nos 280nm, não há variação do sinal uma vez que não há alteração da composição da solução. Assim, seleccionou-se um outro comprimento de onda.

Pelo espectro apresentado na figura 8D, retira-se que acima dos 350nm, há diminuição da absorvância à medida que aumenta o tempo de sonicação da solução de BSA:tripsina. Escolheu-se o comprimento de onda de 400nm e procedeu-se ao estudo detalhado da reacção de digestão enzimática de proteínas acelerada por US.

A tabela 8 apresenta os valores de absorvância medidos a 400nm em função do tempo de sonicação da solução de BSA:tripsina, numa proporção 1:20 (m/m) enzima:proteína. A solução de BSA foi tratada conforme o protocolo A, descrito detalhadamente no capítulo *Parte Experimental – Tratamento de amostras*.

Tabela 8 – Valores lidos de absorvância a 400nm de uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada com posterior digestão com tripsina acelerada por ultrasons em sonoreactor a 50% de amplitude, de acordo com o protocolo A.

Tempo de sonicação (s)	Absorvância a 400nm
0	0,120
5	0,124
10	0,129
15	0,124
20	0,112
25	0,108
30	0,104
35	0,091
40	0,078
45	0,073
50	0,067
55	0,063
60	0,059

Representando graficamente a absorvância em função do tempo de digestão e ajustando os pontos experimentais a dois tipos de regressão, linear e exponencial, obteve-se o que se encontra representado na figura 9 e que indica que há um maior ajuste dos dados experimentais à regressão exponencial.

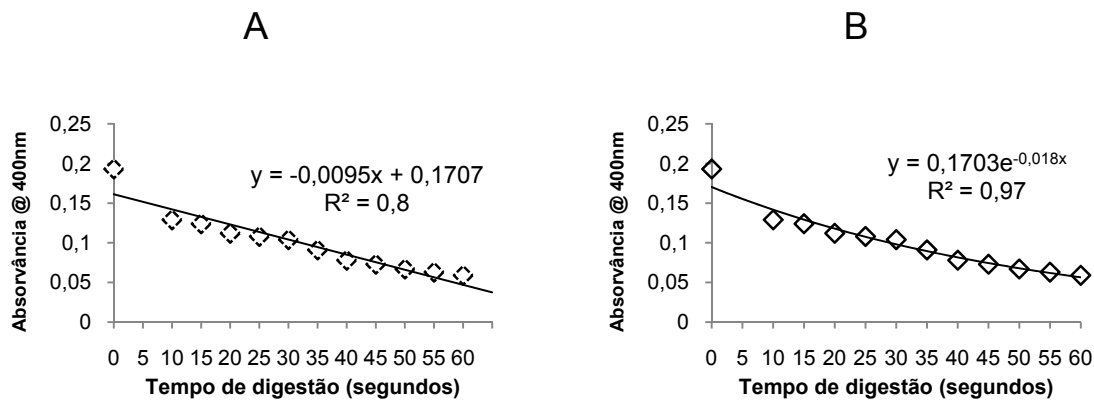


Figura 9 - Representação gráfica da absorvância medida a 400nm para uma solução de BSA desnaturada, reduzida e alquilada a 0,2 μ g/ μ l e digerida com tripsina a 0,01 μ g/ μ l (1:20 m/m) no sonoreactor a 50%. A) Regressão linear. B) Regressão exponencial.

Como já foi referido anteriormente o objectivo deste trabalho experimental é a obtenção da cinética da reacção de digestão enzimática de proteínas através da tecnologia de US.

Para tal, é necessário quantificar a quantidade de produto que se forma ou a quantidade de reagente que se transforma.

Através da espectrofotometria UV-Vis obtém-se os valores de absorvância de uma solução. Contudo é necessário substituir esses dados de absorvância por concentrações. Para converte-los recorre-se a rectas de calibração.

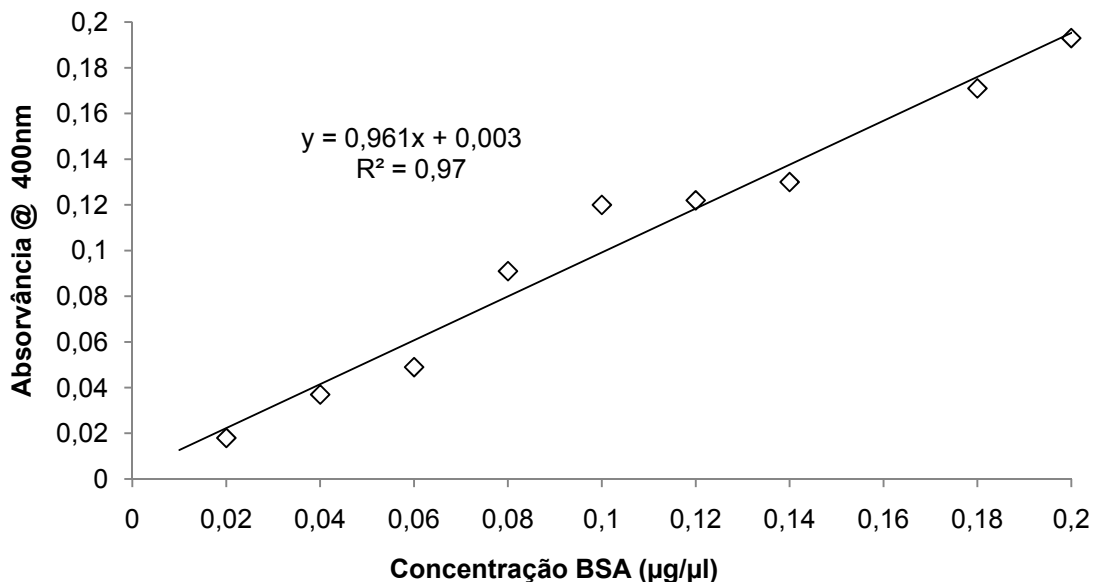


Figura 10 – Recta de calibração para quantificação da proteína BSA em função da absorvância medida a 400nm após tratamento da solução de acordo com o protocolo D.

De acordo com o descrito na *Parte Experimental – Tratamento das amostras*, no protocolo D, para efectuar a recta de calibração prepararam-se várias soluções de BSA a diferentes concentrações, e mediram-se as absorvâncias a 400nm.

Neste ensaio, não foi considerado o ponto correspondente ao valor de concentração de 0,16µg/µl, uma vez que o valor de absorvância obtido era superior aos restantes. Além do valor discrepante, o desvio padrão é superior à unidade.

Tabela 9 - Valores lidos de absorvância a 400nm de uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada com posterior digestão com tripsina acelerada por ultrasons em sonoreactor a 50% de amplitude e respectiva conversão em concentração de BSA de acordo com a equação da recta de calibração $y = 0,961x + 0,003$.

Tempo de sonicação (segundos)	Absorvância a 400nm	Concentração BSA (µg/µl)
0	0,193	0,198
10	0,129	0,131
15	0,124	0,126
20	0,112	0,113
25	0,108	0,109
30	0,104	0,105
35	0,091	0,092
40	0,078	0,078
45	0,073	0,073
50	0,067	0,067
55	0,063	0,062
60	0,059	0,058

Tal como foi indicado na *Introdução* desta dissertação, através do método da integração pretende-se obter a cinética da reacção por ajuste dos dados experimentais aos modelos matemáticos teóricos deduzidos para as diferentes ordens de reacção.

Deste modo, ajustaram-se os dados experimentais a três ordens cinéticas: ordem 0, ordem 1 e ordem 2.

A cinética de ordem 0 representa uma reacção cuja velocidade não depende da concentração do reagente e, este tipo de cinética encontra-se representado na figura 11A Tanto a cinética de 1ª ordem como a de 2ª ordem dependem da concentração do reagente na solução e as simulações para estas cinéticas estão representadas na figura 12.

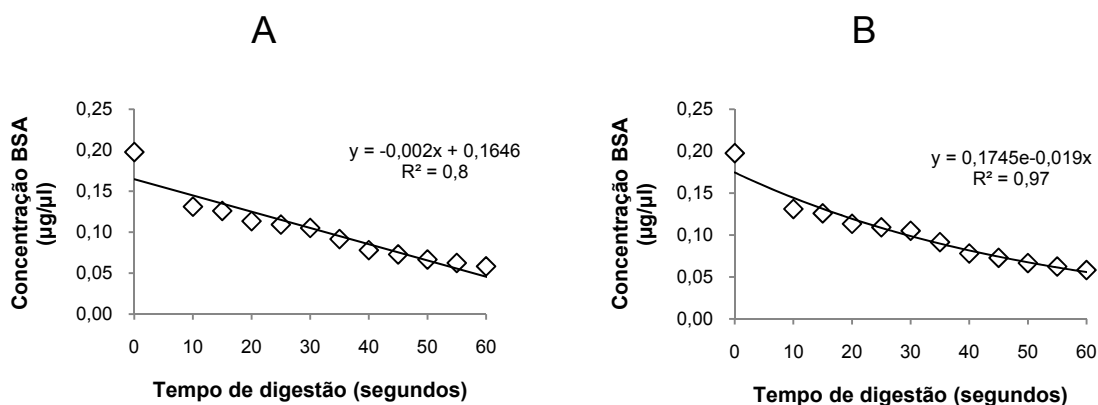


Figura 11 - Representação gráfica dos valores de concentração para uma solução de BSA 0,2µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada, e digerida com tripsina a 0,01µg/µl (1:20 m/m) no sonoreactor a 50% a partir da equação da recta de calibração $y = 0,961x + 0,003$. A) Regressão linear que também representa a cinética de ordem zero. B) Regressão exponencial.

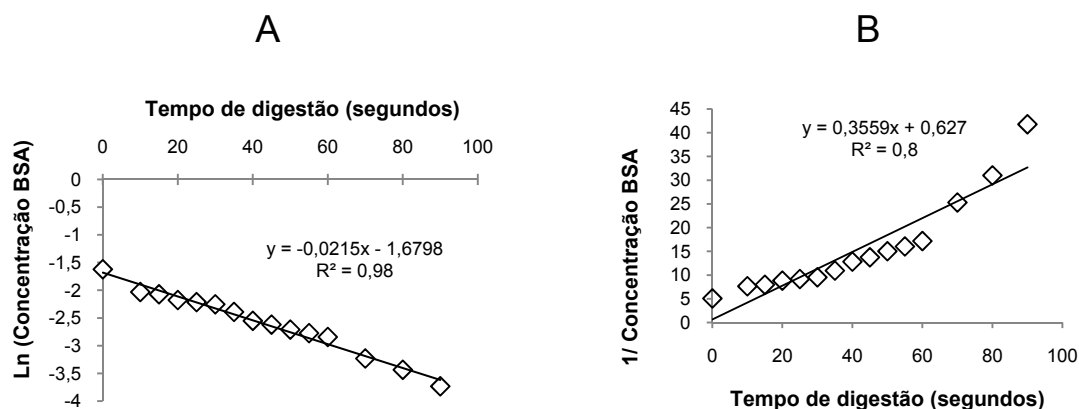


Figura 12 - Simulação de duas ordens de cinética de reacção. A) Representação gráfica do logaritmo neperiano da concentração de BSA em função do tempo de digestão em segundos para simulação de uma cinética de 1ª ordem. B) Representação gráfica do inverso da concentração de BSA em função do tempo de digestão em segundos para simulação de uma cinética de 2ª ordem.

Da análise das figuras 11-A (ordem 0), 12-A (ordem 1) e 12-B (ordem 2) verifica-se que para a linearização da cinética de ordem 1, há um maior ajuste dos dados à recta que representa o logaritmo neperiano da concentração da proteína em função do tempo de digestão em sonoreactor numa amplitude de 50%.

Assim sendo, verifica-se que existe uma cinética de 1ª ordem associada a esta reacção e que pode ser monitorizada a 400nm. No entanto, pelo que já foi referido relativamente à absorção das proteínas, apenas existem três zonas chave que permitem quantificá-las

por espectrofotometria UV-Vis. Essas três zonas situam-se nos 200, 280 e 350nm. [4] Como tal, não é possível declarar que essa cinética corresponde à hidrólise enzimática da BSA pela tripsina.

Absorvância a 400nm de diferentes proteínas

De modo a verificar o que está a ser medido a 400nm e se existe alguma ligação específica à proteína BSA ou se este perfil ocorre noutras amostras, foram escolhidas três proteínas e submetidas ao mesmo protocolo.

Prepararam-se soluções independentes de α -lactoalbumina, anidrase carbónica e ovalbumina a $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e comparam-se os resultados obtidos com os de uma solução de BSA a $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

As proteínas foram desnaturadas, reduzidas e alquiladas e digeridas com tripsina 1:20 (m/m) enzima:proteína, em sonoreactor a 50% de amplitude em intervalos de 30 segundos até atingir 120 segundos de reacção, conforme o protocolo A, descrito na *Parte Experimental – Tratamento de amostras*.

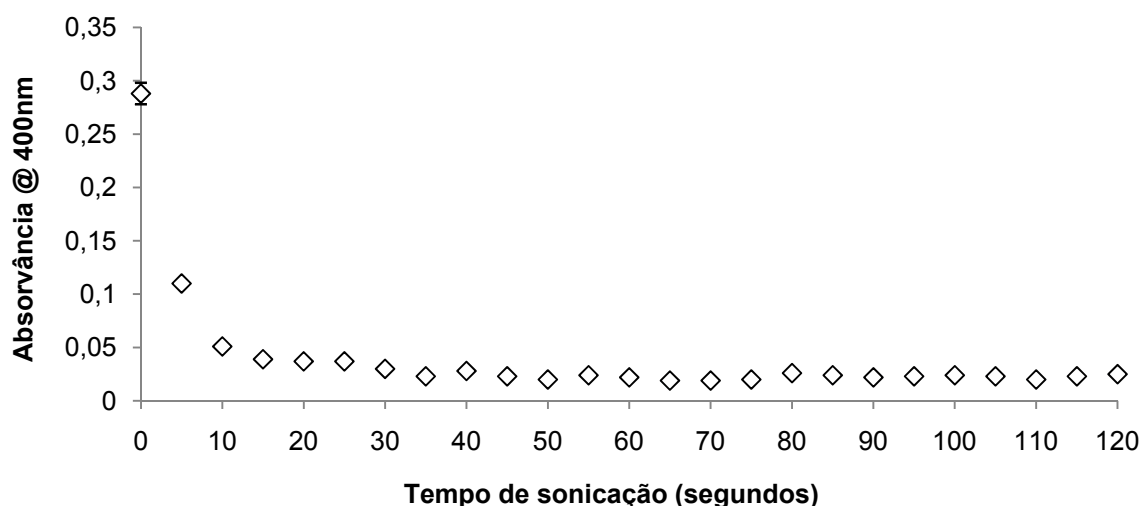


Figura 13 – Efeito do tempo de sonicação numa solução de BSA a $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ desnaturada, reduzida e alquilada, submetida a digestão enzimática com tripsina em procedimento acelerado por ultrasons no sonoreactor a 50% de amplitude, de acordo com o protocolo A, medido em valores de absorvância a 400nm.

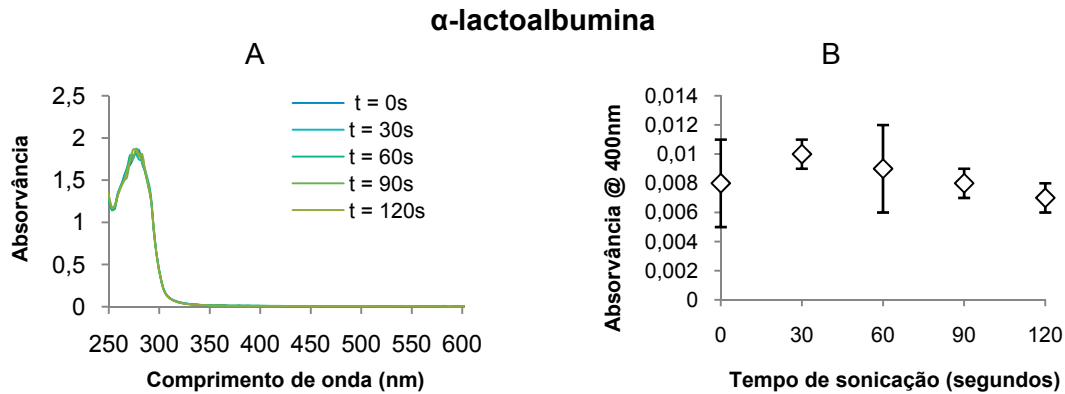


Figura 14 - A) Espectro de varrimento para uma solução de α -lactoalbumina 10 μ g/ μ l desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com tripsina em sonoreactor a 50% de amplitude. B) Absorvâncias a 400nm medidas a cada tempo de sonicação.

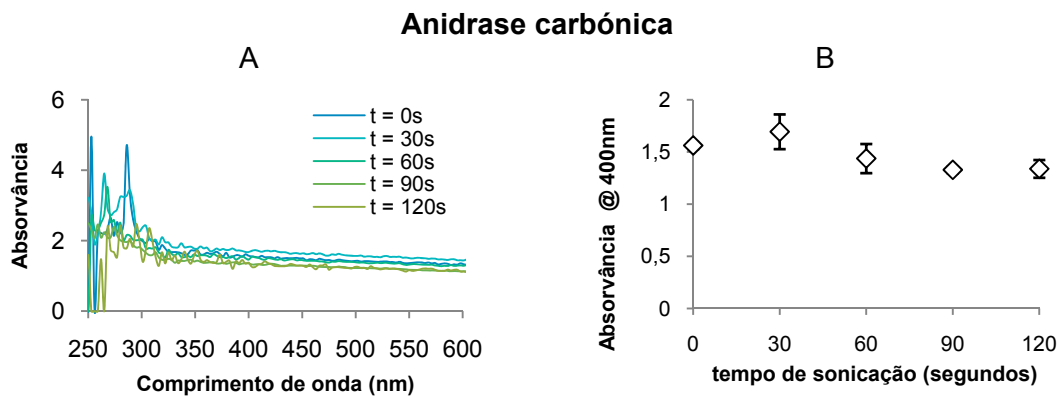


Figura 15 - A) Espectro de varrimento para uma solução de anidrase carbónica 10 μ g/ μ l desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com tripsina em sonoreactor a 50% de amplitude. B) Absorvâncias a 400nm medidas a cada tempo de sonicação.

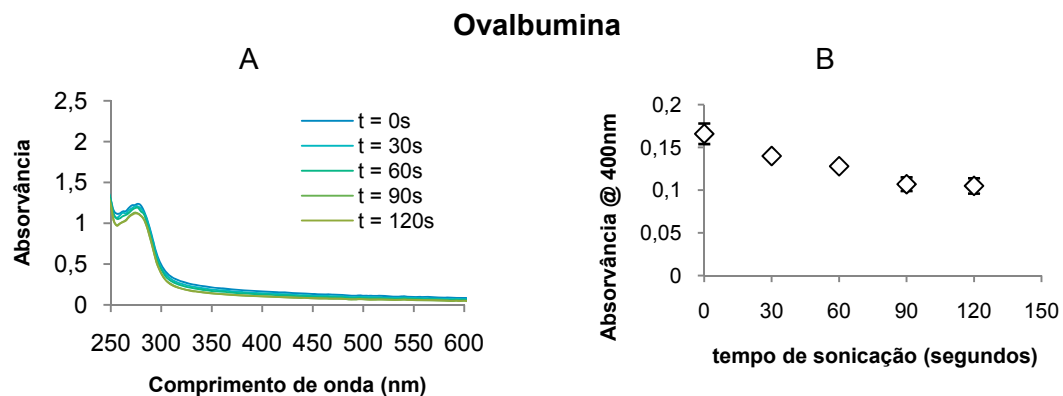


Figura 16 - A) Espectro de varrimento para uma solução de ovalbumina 10 μ g/ μ l desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com tripsina em sonoreactor a 50% de amplitude. B) Absorvâncias a 400nm medidas a cada tempo de sonicação.

Analisando os resultados obtidos para estas três proteínas (figuras 14, 15 e 16), verifica-se que nenhuma apresenta um perfil semelhante ao que se obteve para a BSA (figura 16). Assim, o que está a ser medido a 400nm e que sugere uma cinética de 1ª ordem, está relacionado especificamente com a proteína BSA.

Após pesquisa bibliográfica [10] o que difere na BSA comparativamente à α -lactoalbumina, ovalbumina e anidrase carbónica é o modo de estabilização da proteína.

A BSA vem estabilizada em 97% de agarose, o que pode interferir com a absorvância da solução no comprimento de onda seleccionado, deste modo, torna-se necessário verificar qual a contribuição da agarose na absorvância a 400nm.

Preparou-se uma solução de agarose a 97%, conforme o descrito em *Parte Experimental – Tratamento de amostras - protocolo E* e, mediu-se a absorvância da solução a 400nm em função do tempo de utilização dos US.

De referir que a solução de agarose preparada contém os mesmos solventes que a solução anteriormente preparada, excepto a proteína BSA.

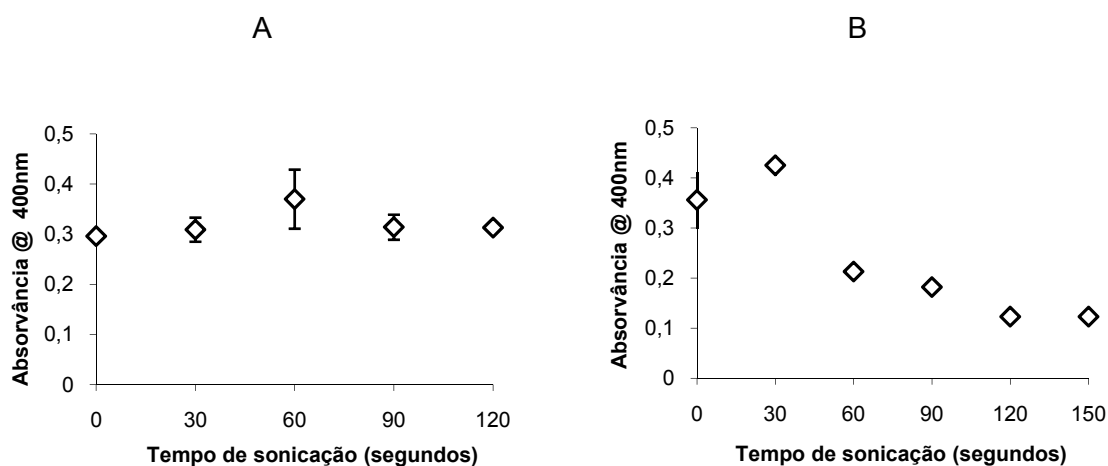


Figura 17 – Influência do tempo de sonicação na degradação da agarose a 97% e respectiva influência na absorvância da solução a 400nm. A) Solução de agarose a 97% preparada em H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic 12,5mM e submetida a ultrasons no sonoreactor a 50% de amplitude. B) Solução de agarose a 97% em H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic 12,5mM à qual foi adicionada a enzima tripsina. Esta solução foi submetida igualmente a US no sonoreactor a 50% de amplitude.

Ao analisar os gráficos da figura 17, verifica-se que não há degradação da agarose pela aplicação de ultrasons, contudo quando à solução de agarose é adicionada a enzima tripsina, há uma diminuição do valor de absorvância obtido para os 400nm.

Comparando a figura 17B com a figura 13, há semelhança entre os dados. Este facto leva a inferir sobre a possibilidade de estar a ser quantificado algum tipo de degradação da agarose por parte de tripsina ao invés da hidrólise da BSA pela enzima.

Quando comparados os resultados de absorvância obtidos para as proteínas α -lactoalbumina, anidrase carbónica e ovalbumina, com os resultados obtidos para a BSA, não se verifica a mesma similaridade de diminuição da absorvância a 400nm em função do tempo de utilização de US. O mesmo acontece quando se comparam os resultados dessas proteínas com o efeito dos ultrasons na solução de agarose e tripsina.

Assim, é possível relacionar a diminuição da absorvância a 400nm na solução de BSA digerida em US com tripsina e a existência da agarose.

Dos experimentais que foram realizados até este ponto verificou-se que na zona de absorção das ligações peptídicas, $\approx 200\text{nm}$, há uma forte contribuição dos compostos orgânicos existentes na solução e, como tal, não é possível a utilização deste comprimento de onda, nem λ abaixo deste devido ao *cut off* do solvente, para quantificar a quebra das ligações peptídicas ao utilizar a solução conforme descrito no protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por US.

Relativamente ao $\lambda=280\text{nm}$, onde ocorre a absorção dos aminoácidos aromáticos, verificou-se pela figura 7 que a maior contribuição nesta região se deve ao tampão Ambic. Ainda relativamente à figura 7 existe um aspecto que deve ser referido no que se refere ao tampão. Uma vez que a solução de branco utiliza exactamente os mesmos reagentes que a solução de trabalho, à excepção da proteína, se o tampão promove uma absorvância superior à da proteína e, de acordo com a lei de *Lambert-Beer*, a absorvância é proporcional à concentração, é necessário aumentar a concentração da proteína em solução.

Para além da contribuição do tampão na absorvância a 280nm, há que referir que este λ se refere aos aminoácidos aromáticos existentes. Assim, independentemente da existência da proteína intacta no início da reacção, ou de fragmentos da proteína à medida que avança a digestão, os aminoácidos mantêm-se em solução na mesma quantidade. Se não há variação na quantidade dos aminoácidos, então a 280nm não se verificam alterações significativas na absorvância da solução.

No respeitante às absorvâncias na região dos 350nm, correspondentes à absorção dos grupos prostéticos das proteínas, não há qualquer efeito na BSA em estudo, dado que esta não possui grupos prostéticos, logo, não é possível obter qualquer informação neste λ acerca do procedimento de digestão acelerada de proteínas em US, que se pretende testar.

Os dados que foram retirados a 400nm e que indicam uma cinética de 1ª ordem, são devidos à existência da agarose na solução de trabalho que, em contacto com a tripsina, deve sofrer algum tipo de degradação. Como tal, não é possível efectuar a quantificação directa da digestão enzimática da BSA pela tripsina através da medição de absorvância quer a 200nm, quer a 280nm, quando se utiliza este protocolo de digestão.

Tal como já foi referido, existem diversos métodos de quantificação proteica [6], através de espectrofotometria UV-Vis.

Para a selecção do método a utilizar foram tidos em consideração vários aspectos: limites de detecção, locais de ligação à proteína, sensibilidade, reprodutibilidade dos resultados e compatibilidade com os reagentes utilizados neste protocolo de digestão enzimática de proteínas.

O método de Bradford actua por ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* aos aminoácidos aromáticos e aos básicos, especialmente aos resíduos de arginina das proteínas. [24]

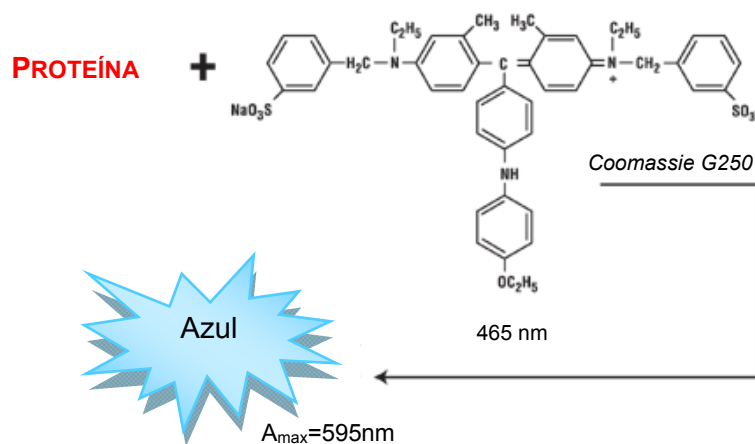


Imagem 2 – Esquema da reacção de ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* à proteína, de acordo com o método de Bradford. [Adaptado de [25]]

Quando não ligado, o corante absorve a 465nm e quando ligado absorve a 595nm, sendo neste último c.d.o. que serão efectuadas as medições. [11]

O limite de detecção deste método é de $2 \times 10^{-5} mg \cdot dm^{-3}$ sendo superior aos limites de detecção dos restantes métodos, nomeadamente do método de Lowry e de BCA. [6]

De acordo com a literatura [24] o método de Bradford é compatível com os compostos orgânicos utilizados neste protocolo de digestão enzimática de proteínas e nas concentrações em que estão preparados.

Sendo assim, o que se pretende agora é testar como funcionará a variação da absorvância a 595nm de todas os solventes e proteínas envolvidos na reacção.

Validação do método de Bradford no NanoDrop® ND-1000

O reagente de Bradford foi preparado através do seguinte protocolo [12]:

- *Dissolver 50mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50ml de etanol;*
- *Adicionar 100ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85% (v/v);*
- *Adicionar a solução anterior a 500ml de H_2O Mili-Q;*
- *Filtrar a solução para retirar todas as partículas em suspensão;*
- *Adicionar H_2O Mili-Q até perfazer 1000ml;*
- *Conservar a solução a 4°C.*

Após ter sido preparado o reagente foram efectuados vários ensaios para verificar qual o sinal obtido a 595nm.

As soluções foram preparadas conforme o descrito na tabela 10 e os resultados encontram-se representados graficamente na figura 18.

Tabela 10 – Volumes necessários à preparação das várias soluções para validação do método de Bradford. A solução de BSA foi preparada de acordo com os passos de desnaturação, redução e alquilação descritos no protocolo A.

	Volume BSA 3ug/μl	Volume tripsina 1ug/ml	Volume H₂O	Volume Bradford	Quantidade BSA (μg)	Quantidade tripsina (μg)	Proporção Bradford
A	20		70	10	0,6		1:10
	20		60	20	0,6		2:10
	20		50	30	0,6		3:10
	20		40	40	0,6		4:10
	20		30	50	0,6		5:10
B		20	70	10		0,0002	1:10
		20	60	20		0,0002	2:10
		20	50	30		0,0002	3:10
		20	40	40		0,0002	4:10
		20	30	50		0,0002	5:10
C	10		80	10	0,3		
	20		70	10	0,6		
	30		60	10	0,9		
	40		50	10	1,2		1:10
	50		40	10	1,5		
	60		30	10	1,8		
	70		20	10	2,1		
	80		10	10	2,4		
D		10	80	10		0,0001	
		20	70	10		0,0002	
		30	60	10		0,0003	
		40	50	10		0,0004	1:10
		50	40	10		0,0005	
		60	30	10		0,0006	
		70	20	10		0,0007	
		80	10	10		0,0008	

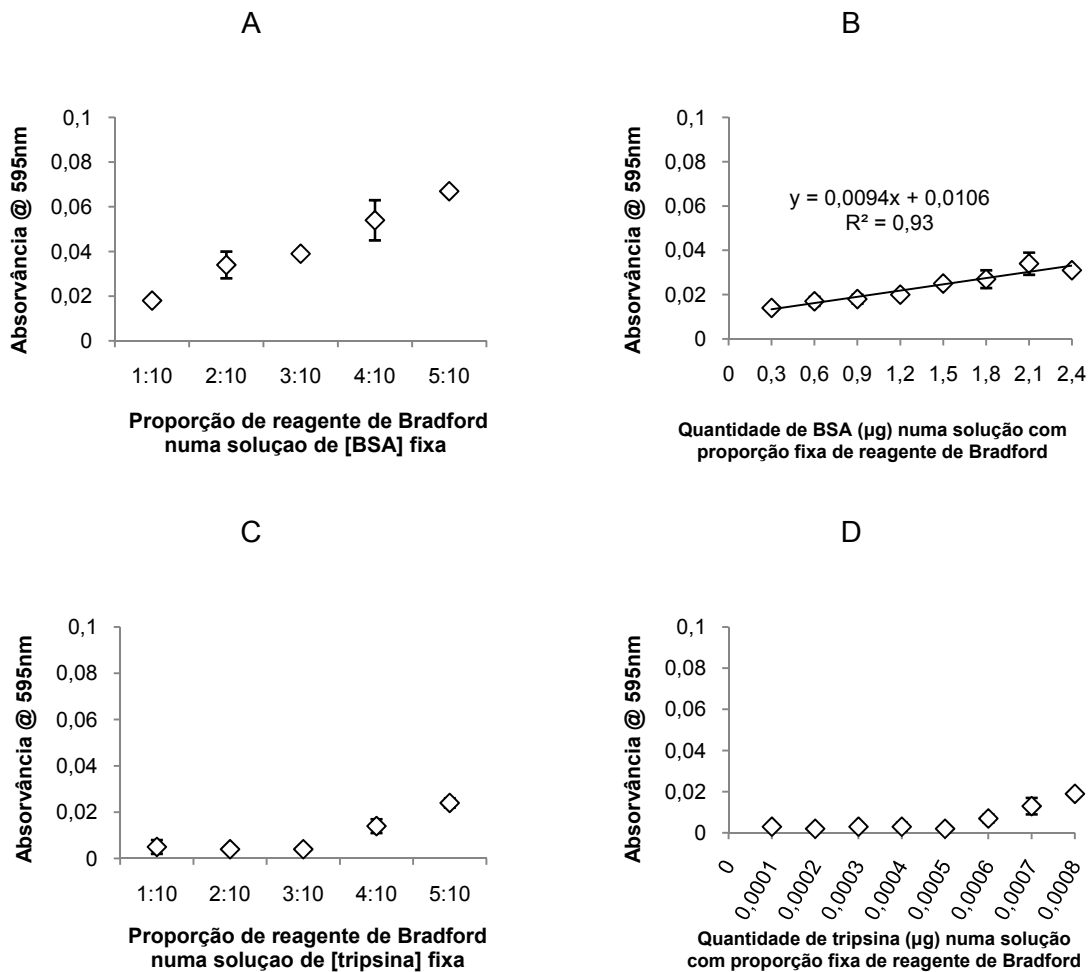


Figura 18 – A) Influência da variação da proporção de reagente de Bradford numa solução de quantidade fixa de proteína (0,6µg de BSA desnaturada, reduzida e alquilada). B) Influência da variação da quantidade de proteína (BSA desnaturada, reduzida e alquilada) numa solução com proporção fixa de reagente de Bradford (1:10). C) Influência da variação da proporção de reagente de Bradford numa solução de H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic, com quantidade fixa de enzima (0,0002µg). D) Influência da variação da quantidade de enzima numa solução de H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic contendo proporção fixa de reagente de Bradford (1:10).

Analisando os quatro gráficos representados na figura 18, verifica-se que

- Aumentando a quantidade de reagente de Bradford na solução de BSA de quantidade fixa, o valor de absorbância a 595nm é directamente proporcional ao aumento da proporção do corante na solução (figura 18A).

- Aumentando a quantidade de BSA na solução, mantendo a proporção do corante fixa, o valor da absorvância a 595nm aumenta igualmente de uma forma linear. (figura 18B)

Isto é, há aumento do sinal de absorvância com o aumento da quantidade de corante em solução, independentemente da quantidade de BSA.

- Aumentando a quantidade de corante na solução de tripsina, verifica-se que o sinal de absorvância mantém-se constante nas soluções em que a concentração de corante é mais baixa (1:10 – 3:10) apenas havendo um aumento do valor da absorvância à medida que aumenta a proporção de reagente (4:10 – 5:10). (figura 18C)
- Aumentando a quantidade de tripsina em solução, mantendo constante a proporção de corante (1:10), o sinal de absorvância mantém-se constante nas soluções em que a quantidade de enzima é muito baixa (0,0001 – 0,0005 μg). Dos 0,0005 μg – 0,0008 μg de enzima observa-se aumento do sinal.

Isto significa que para quantidades muito baixas de proteína, o sinal de absorvância é invariável, apenas estando a ser contabilizado o corante em solução. A partir de um certo valor de quantidade de proteína, há aumento da absorvância da solução independentemente da quantidade de corante.

Elaborou-se um novo protocolo descrito na *Parte Experimental – Tratamento das amostras - protocolo G* e analisou-se uma solução de BSA em três condições distintas.

Ensaio I – Solução aquosa de BSA.

Ensaio II – Solução de BSA em H₂O/ACN 50%.

Ensaio III – Solução de BSA em H₂O/ACN 50%, DTT, IAA e Ambic.

Estas três soluções foram preparadas a diferentes concentrações e diluídas com reagente de Bradford numa proporção de 1:20.

A figura 19 representa a absorvância a 595nm das soluções acima descritas em função das concentrações de proteína.

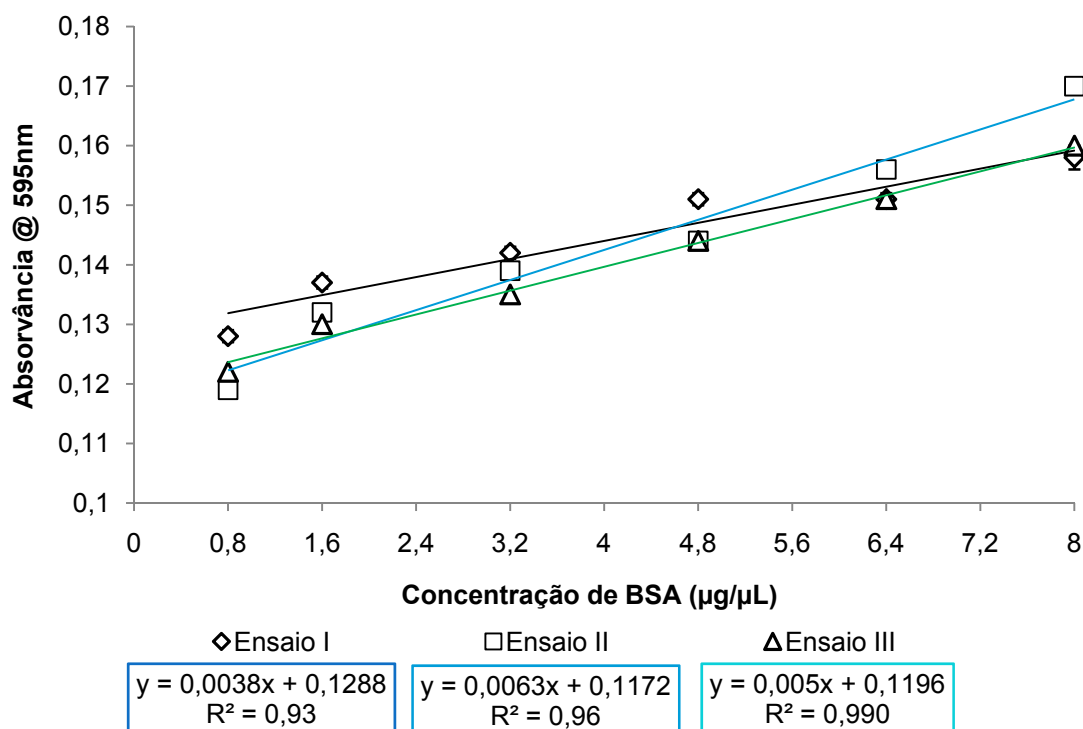


Figura 19 – Estudo do efeito dos diferentes reagentes utilizados no protocolo de digestão enzimática de proteínas e o método de Bradford. Ensaio I) Solução aquosa de BSA. Ensaio II) BSA em solução de desnaturação H₂O/ACN 50%. Ensaio III) BSA em solução de desnaturação (H₂O/ACN 50%), redução (DTT) e alquilação (IAA) em meio tamponizado (Ambic 12,5mM) a pH≈8.

Pela análise da figura 19, há uma relação linear entre a absorvância a 595nm com a concentração da proteína nas diferentes condições.

Relativamente aos dados obtidos em cada ensaio independentemente, estes são bastante próximos e, como tal, há compatibilidade entre a utilização deste tipo de reagentes, nestas concentrações e o método de Bradford.

De acordo com o protocolo H, da solução mãe de BSA são transferidos 5µl para cada alíquota. A cada alíquota adiciona-se 15µl de H₂O MQ e 50µl de reagente de Bradford, perfazendo um volume total de 70µl.

Para que a solução final seja de 48µg/µl, cada alíquota terá $48 \frac{\mu g}{\mu l} \times 70 \mu l = \frac{3360 \mu g \text{ BSA}}{5 \mu l} = 672 \mu g / \mu l$

Admitindo que são preparados 200µl de solução (5µl × 21 pontos = 105µl), para a solução mãe de BSA são necessárias $672 \frac{\mu g}{\mu l} \times 200 \mu l = 134400 \mu g = 134,4 \text{ mg de BSA}$.

Uma vez que a proporção de enzima:proteína neste protocolo é de 1:20 (*m/m*), seriam necessárias 6,72mg de tripsina para esta reacção.

Por motivos económicos, esta quantidade de tripsina é impensável para efectuar uma única reacção. Assim, efectuou-se o estudo utilizando uma outra enzima, a *protease type XIV* [13].

O protocolo seguido neste experimental encontra-se descrito na *Parte Experimental – Tratamento de amostras – protocolo H*.

À solução de BSA desnaturada, reduzida, alquilada em sonoreactor a 50% e tamponizada a pH≈8 adicionou-se a enzima *Protease Type XIV*, numa proporção 1:20 (*m/m*) com a proteína e sonicou-se em sonoreactor a 50% de amplitude.

A cada tempo foram retiradas alíquotas de 20µl e adicionados 100µl de reagente de Bradford. Deixou-se incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância a 595nm.

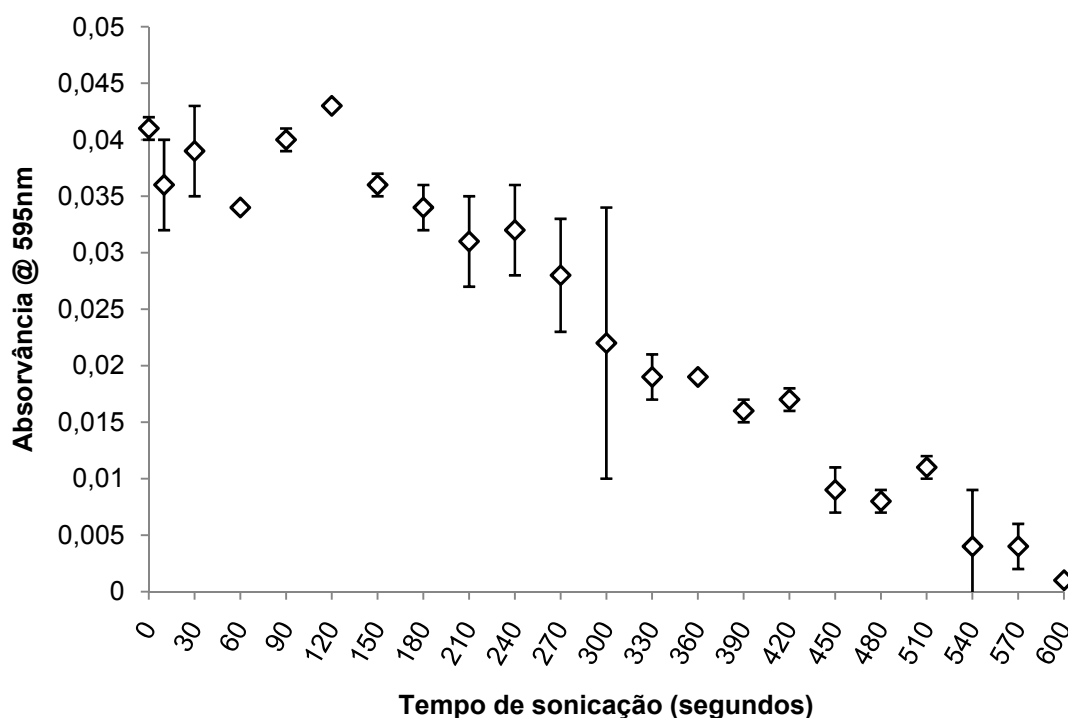


Figura 20 – Efeito dos US (sonoreactor 50%) numa solução de BSA e *Protease Type XIV* (alíquotas independentes) e medição da absorvância a 595nm de acordo com o método de Bradford.

A solução de BSA que foi preparada para efectuar este ensaio apresentava uma elevada quantidade de espuma na interfase. As espumas obtidas através de soluções proteicas são uma consequência da desnaturação parcial e do desdobramento das cadeias polipeptídicas.

À medida que foram adquiridos os valores das absorvâncias, houve alguns problemas com a linha de base. Esta não se apresentava homogénea e diferia substancialmente de alíquota para alíquota.

Estes dois factos levam a suspeitar de uma elevada concentração de BSA na solução de trabalho.

Analisando a figura 20, verifica-se uma diminuição do valor de absorvância registado a 595nm à medida que aumenta o tempo de sonicação, à excepção dos primeiros 120 segundos de reacção.

Relacionando estes resultados com a teoria subjacente ao método de Bradford, que indica que o corante *Coomassie* não se liga a aminoácidos livres, proteínas de baixa massa molecular e péptidos [6],[12], infere-se que nos segundos iniciais de sonicação, os fragmentos que se formam da proteína ainda são suficientemente grandes, mantendo a ligação do corante, daí que não haja diminuição do sinal de absorvância. À medida que o tempo de digestão aumenta, o tamanho dos fragmentos de proteína diminui e o corante não se liga a estes, havendo a diminuição do sinal da absorvância, isto porque o corante livre não absorve a 595nm.

No entanto e dadas as limitações acima mencionadas no que se refere à própria solução de BSA bem como à estabilização da linha de base, é necessário repetir o experimental.

Neste novo ensaio, as alíquotas não foram tratadas independentemente como no ensaio anterior. Esta alteração foi introduzida, uma vez que esta também pode ser uma outra explicação para a oscilação que se verifica nos dados experimentais nos segundos iniciais da reacção.

Assim, repetiu-se o experimental mas desta vez, tratando em US a solução mãe e retirando as alíquotas posteriormente a cada tempo de sonicação.

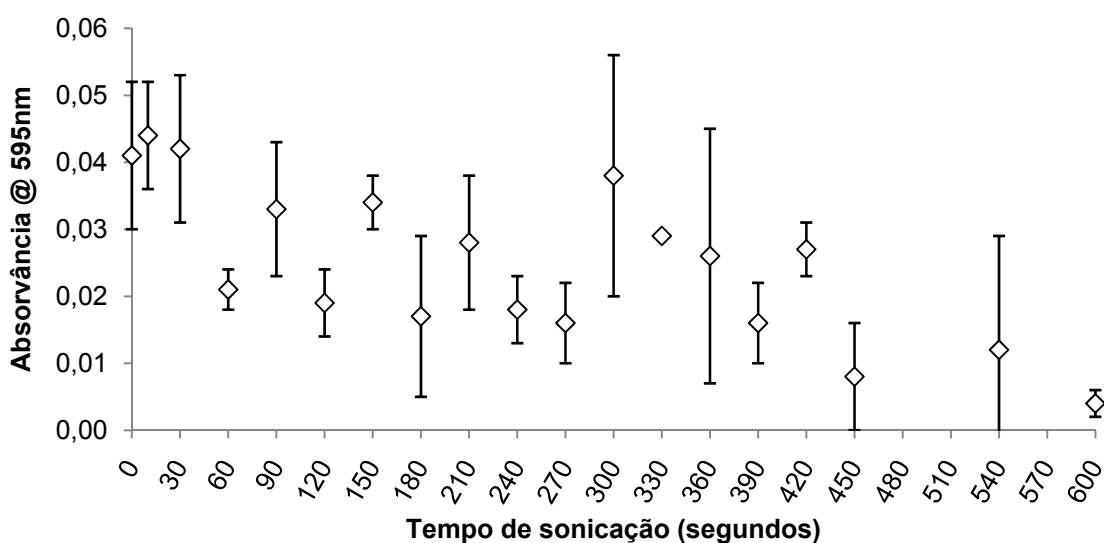


Figura 21 - Efeito dos US (sonoreactor 50%) numa solução de BSA e Protease *Type XIV* e medição da absorvância a 595nm de acordo com o método de Bradford.

Observando a figura 21 e comparando com a figura 20, verifica-se que estas não apresentam o mesmo comportamento.

Novamente neste experimental houve dificuldades com a solução de BSA. Além da quantidade de espuma existente na interfase, houve a formação de um precipitado de coloração amarelo-esbatido no fundo do *ependorf*. Admitindo que o precipitado que se formou é agarose que solidificou e, juntando a este dado, a informação sobre a espuma existente na interfase, infere-se uma excessiva quantidade de proteína em solução.

Cruzando os dados existentes no manual de instruções do NanoDrop® [14] com o protocolo do método de Bradford [12] e a informação química da proteína BSA [10], há a possibilidade de analisar desde $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a $8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solução proteica no ND-1000 através do método de Bradford.

Para partir de uma solução mãe de BSA com concentração máxima de $40\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e obter uma concentração final de $8\mu\text{g}/\mu\text{l}$, é necessário recorrer a alterações ao protocolo base. Uma das hipóteses é recorrer à secagem das amostras através de uma centrifuga de vácuo de modo a reduzir o volume necessário mantendo a concentração da BSA suficiente para leitura no NanoDrop®. Foi então elaborado e testado um novo procedimento experimental, protocolo I, descrito em pormenor na *Parte Experimental – Tratamento das amostras*.

Inicialmente este protocolo foi testado apenas com quatro tempos de sonicação, a 0, isto é, logo após ressuspensão das amostras, a 30s, 180s e 240s.

A figura 22 apresenta os dados de absorvância obtidos a 595nm em função dos diferentes tempos de sonicação das amostras em sonoreactor a 50% de amplitude.

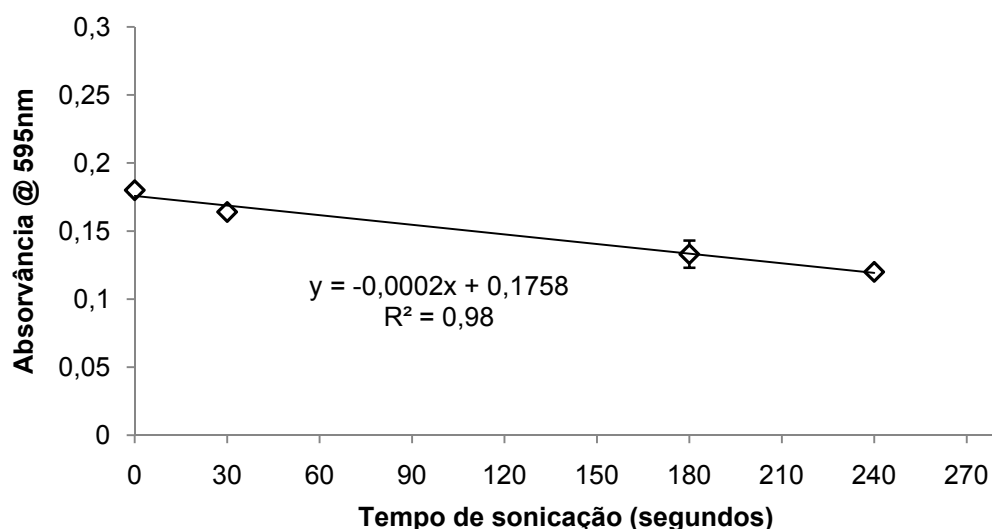


Figura 22 - Absorvância a 595nm (método de Bradford) em função do tempo de sonicação em sonoreactor a 50% de amplitude, relativamente a tempos teste do protocolo I contemplando a secagem das amostras.

Verifica-se uma relação linear entre a absorvância medida a 595nm e o tempo de digestão da BSA com *Protease Type XIV* em sonoreactor a 50% de amplitude. Foi então redimensionado este experimental, desta vez a intervalos de tempo de sonicação mais curtos, sendo efectuadas medições a cada 30 segundos. Estes resultados encontram-se representados graficamente na figura 23.

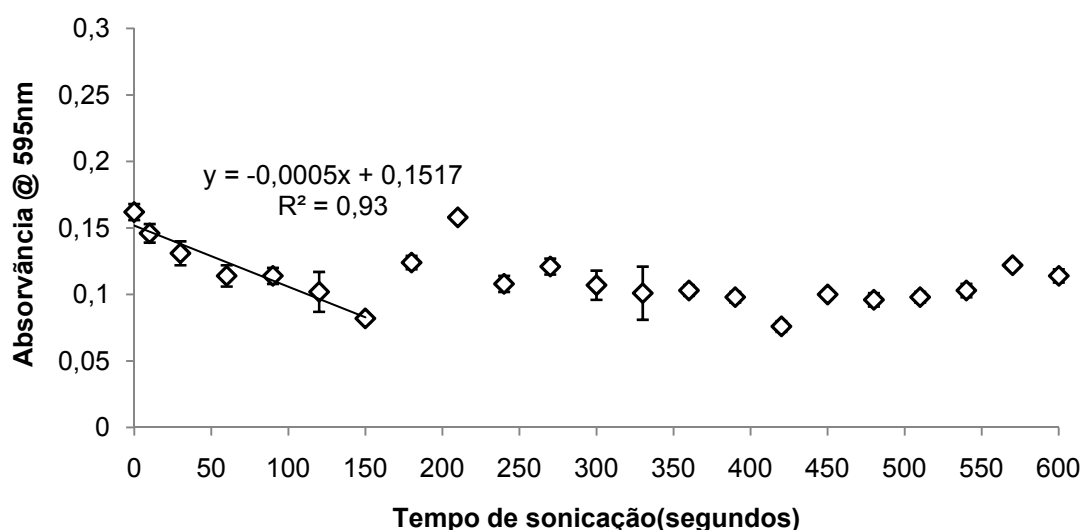


Figura 23 - Absorvância a 595nm (método de Bradford) em função do tempo de sonicação em sonoreactor a 50% de amplitude, para uma solução de BSA 40µg/µl desnaturada, reduzida e alquilada e digerida com *Protease Type XIV* (1:20 m/m), de acordo com o descrito no protocolo I.

Nos segundos iniciais de digestão é possível inferir acerca de uma relação linear decrescente da absorvância a 595nm em função do aumento do tempo de reacção, no entanto, a elevada oscilação que se verifica após os 150 segundos de reacção não permite elaborar qualquer teoria acerca do perfil observado inicialmente.

Dado que se pretende estudar qual o efeito dos US no protocolo de digestão enzimática de proteínas e sendo que todos os experimentais efectuados foram no sonoreactor a 50%, o estudo seguinte altera a amplitude de sonicação do passo de digestão para 20% e 80%.

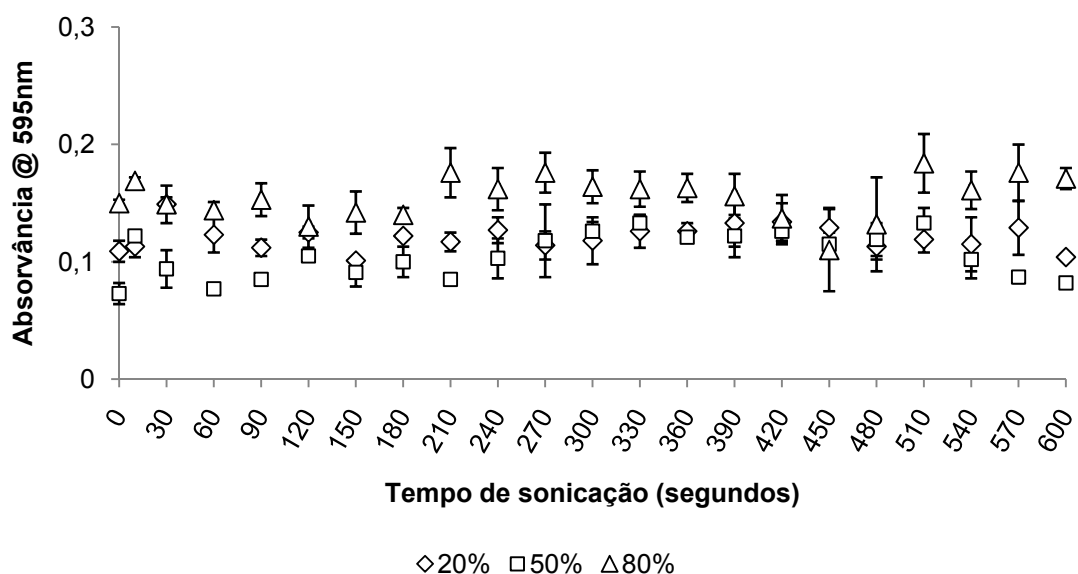


Figura 24 – Efeito da amplitude dos ultrasons no passo de digestão para uma solução de BSA a 40µg/µl digerida com Protease type XIV 1:20 (m/m), de acordo com o protocolo I.

Analisando os dados da figura 24 verifica-se que não há diferença na utilização do sonoreactor nas diferentes amplitudes para efectuar a digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons, de acordo com o protocolo proposto.

Além disso, o sinal de absorvância mantém-se praticamente invariável ao longo do tempo de cada reacção.

Deste modo, o método de Bradford não é adequado para monitorizar a reacção de digestão através do protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons que se pretende estudar.

ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA

À semelhança do que foi efectuado para o NanoDrop® de absorção, os primeiros estudos referem-se a testes ao funcionamento e reprodutibilidade do espectrofluorímetro ND-3300 relativamente às soluções utilizadas.

Deste modo, foram preparadas várias soluções, indicadas na tabela 11 e, conforme o descrito no protocolo J (*Parte Experimental – Tratamento das amostras*)

Diferentemente do que acontece para um espectrofotómetro, quando se efectuam medições em espectrofluorímetros é obrigatório a criação de um método de trabalho.

Para trabalhar com soluções contendo o corante SYPRO® Orange, foi criado um método que tem como base os comprimentos de onda de absorção e emissão deste composto. Assim, recorrendo a dados bibliográficos [16] com referências aos espectros de absorção e emissão deste corante ligado aos complexos proteína-SDS, criou-se um método de trabalho *Sypro Orange* e, que se encontra descrito em *Parte Experimental – Tratamento das amostras*.

Tabela 11 – Soluções preparadas para testar a reprodutibilidade do NanoDrop® de fluorescência (ND-3300) [17] e a resposta do mesmo às soluções a utilizar no procedimento experimental. As soluções de SYPRO® Orange e de BSA 2µg/µl foram preparadas em SDS 0,01%. O sinal foi medido contra soluções sem proteína.

Amostras	Volume SYPRO ORANGE 1:1000 (µl)	Volume BSA 2µg/µl (µl)	Volume SDS 0,01% (µl)	Proporção SYPRO ORANGE na solução final	Concentração BSA na solução final (µg/µl)
A	50 *	25	25	1:1000	0,5
B	50	25	25	1:2000	0,5
C	33,5	25	41,5	1:3000	0,5
D	25	25	50	1:4000	0,5
E	20	25	55	1:5000	0,5
F	16,7	25	58,3	1:6000	0,5
G	14,3	25	60,7	1:7000	0,5
H	12,5	25	62,5	1:8000	0,5
I	11,1	25	63,9	1:9000	0,5
J	10	25	65	1:10000	0,5

* Solução de Sypro® Orange a 1:500 em SDS 0,01%

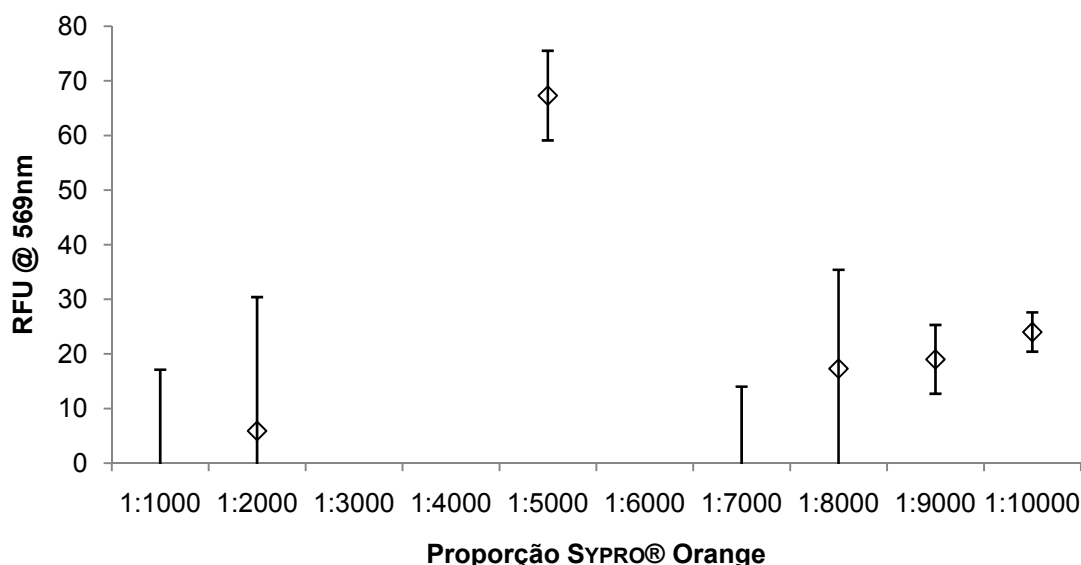


Figura 25 – Influência da proporção do corante SYPRO® Orange nas diferentes soluções indicadas na tabela 12, cuja concentração de proteína BSA é 0,5µg/µl.

Por observação da representação gráfica da variação do sinal em função das diferentes proporções de corante SYPRO® Orange, verifica-se que a maior variação do sinal se verifica quando é utilizada uma proporção de 1:5000.

As oscilações que se verificam nos dados experimentais podem ser devidas à quantidade de SDS presente na solução (0,01%). Caso a concentração de SDS seja excessiva pode camuflar o sinal do complexo proteína-SDS-SYPRO® Orange. Deste modo, efectuou-se novo estudo alterando a quantidade de SDS em solução.

Além do teste à quantidade de SDS em solução, testou-se a influência deste na solução. Assim, o SDS foi introduzido na solução proteica e incubado para que houvesse formação do complexo SDS-proteína e só posteriormente é que foi introduzido o corante SYPRO® Orange - protocolo L.

Mantendo a proporção de SYPRO® Orange de 1:5000 e a concentração final de BSA em 0,5µg/µl variou-se a quantidade de SDS em solução de 0 a 0,01%.

Após a adição do SDS à proteína, a solução foi incubada durante 1hora a 37°C para que ocorresse a formação do complexo proteína-SDS. Após este período de tempo adicionou-se o corante e, novamente, a solução foi incubada a 37°C durante 5 minutos.

Foram efectuadas as respectivas medições de fluorescência a 569nm após excitação da solução a 470nm±10nm (NanoLED azul). As medições foram efectuadas contra soluções de branco sem BSA.

Tabela 12 – Soluções preparadas para verificar qual a influência da quantidade de SDS em solução.

Amostras	% SDS	Volume BSA 2µg/µl (µl)	Volume SDS 5% (µl)	Volume Tampão Tris- Gly sem SDS (µl)	Volume Sypro® Orange 1:1000 em tampão Tris-Gly sem SDS (µl)
A	0,01	25	20	35	20
B	0,005	25	10	45	20
C	0,001	25	2	53	20
D	0,0005	25	1	54	20
E	0,0001	25	10 *	45	20
F	0	25	0	55	20

*Solução SDS 1%.

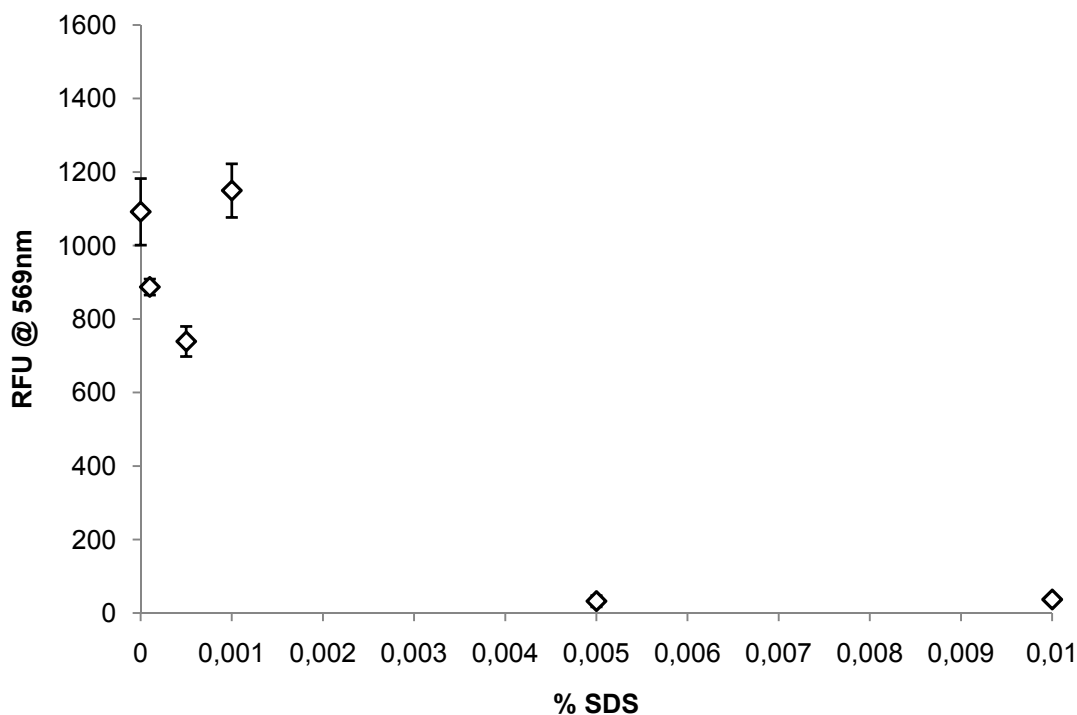


Figura 26 – Influência da quantidade de SDS numa solução de BSA a 0,5µg/µl e SYPRO® Orange a 1:5000. As soluções foram preparadas conforme o descrito na tabela 12 e o procedimento experimental descrito no protocolo M.

Da observação da figura 26 que corresponde à variação do sinal de fluorescência obtido em função da quantidade de SDS em solução, verifica-se que o maior RFU é o respeitante à percentagem de 0,001% de SDS.

No entanto, comparando este dado com o obtido para a solução sem SDS (0%) não há uma grande diferença. Deste modo, inferiu-se que é possível efectuar o procedimento experimental de digestão proteica sem incorporação do SDS na solução.

Estes dados obtidos são opostos aos que se encontravam descritos na literatura [17], onde se referiam alguns testes de fluorescência a este corante e que indicavam que sem a adição de SDS não havia sinal de fluorescência.

Uma vez testadas as condições experimentais, é possível avançar com o procedimento de digestão.

De modo a excluir todas as possíveis interferências e dado que pelos experimentais de espectrofotometria UV-Vis se verificou que há uma contribuição bastante elevada da agarose e que de alguma forma esta pode influenciar os resultados experimentais, houve necessidade de efectuar também para a espectrofotometria de fluorescência testes à influência da agarose.

Para verificar qual o efeito que a agarose pode produzir nos ensaios de fluorescência, preparou-se uma solução de agarose a 97% em tampão tris-glicina contendo tripsina e, submeteu-se a US a vários tempos, conforme o descrito na *Parte Experimental – Tratamento das amostras – protocolo M*.

Pela análise da figura 27, verifica-se que à medida que avança o tempo de sonicação da solução de agarose 97% com tripsina há um incremento do valor de RFU da solução. Como já se havia verificado anteriormente, há algum tipo de reacção entre a tripsina e a agarose (figura 17B), contudo não é possível antever o tipo de reacção e qual a extensão da mesma relativamente ao corante SYPRO® Orange.

Seguiu-se o estudo do protocolo de digestão enzimática de proteína acelerada por US utilizando a proteína BSA e a enzima tripsina, numa proporção enzima:proteína 1:20 (m/m).

O protocolo utilizado encontra-se descrito detalhadamente na *Parte Experimental – Tratamento das amostras – protocolo N, ensaios I, II, III e IV*.

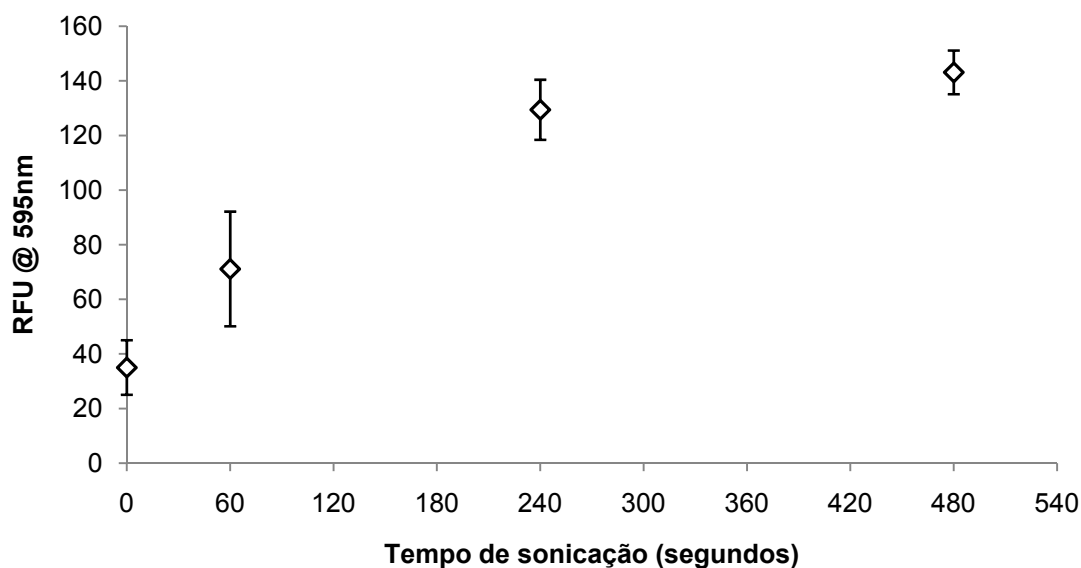


Figura 27 – Influência da agarose no sinal de fluorescência numa solução a 97% em tampão tris-glicina sem SDS e com adição de tripsina, em função do tempo de utilização dos US (sonoreactor 50%).

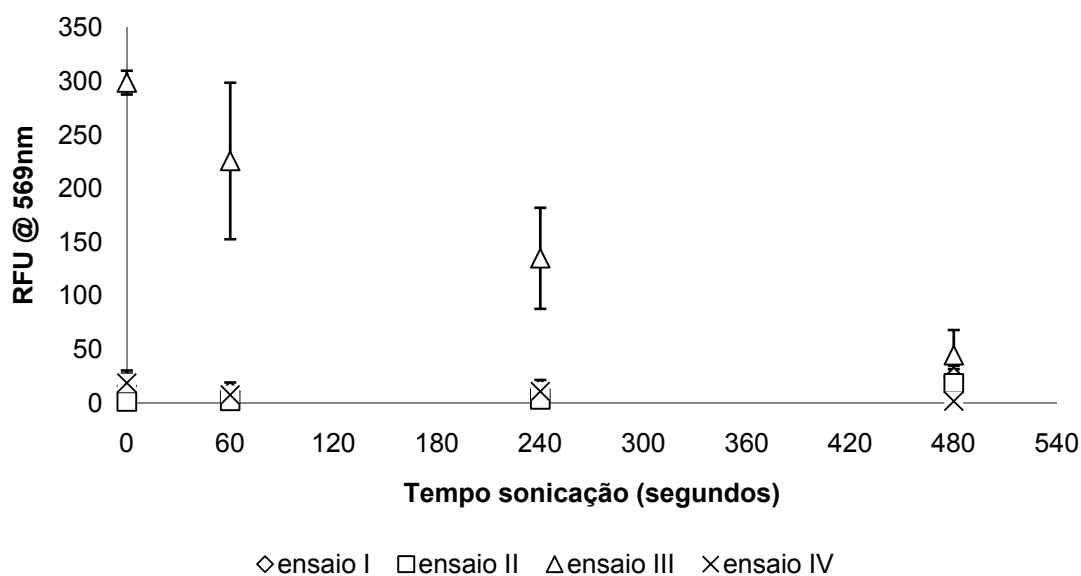


Figura 28 – Influência de diferentes tratamentos de amostra em função do tempo de utilização dos US no protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons. Ensaio I) protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerada por US. Ensaio II) incorporação do corante SYPRO® Orange na solução antes do passo de digestão. Ensaio III) desnaturação da proteína por acção do calor e sem etapas de redução e alquilação. O corante SYPRO® Orange é incorporado na solução após a digestão. Ensaio IV) repetição do ensaio III mas com a introdução do corante SYPRO® Orange antes da etapa de digestão.

Da análise dos dados representados graficamente na figura 28 verifica-se que apenas os dados respeitantes ao ensaio III apresentam um perfil decrescente.

Os ensaios I, II e IV resultaram em valores de fluorescência constantes ao longo do tempo de utilização dos ultrasons.

Comparando este protocolo N – ensaio III com o protocolo base de digestão enzimática acelerada por US, verificam-se algumas diferenças.

No protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerada por US, a desnaturação é feita em solução orgânica, com acetoneitrilo, enquanto neste último protocolo, a desnaturação da proteína é feita por acção da temperatura. Além do passo de desnaturação, este novo procedimento não inclui os passos de redução com DTT e alquilação com IAA.

Comparando os dados da figura 27 e dos da figura 28 respeitantes ao ensaio III, verifica-se que a BSA digerida com tripsina origina uma diminuição do sinal de fluorescência enquanto a solução de agarose com tripsina origina um aumento no sinal de fluorescência a 595nm.

Estes dados levam a inferir que no decorrer hidrólise da agarose por parte da tripsina ocorra libertação de algum resíduo ou que ocorra algum tipo de interacção entre a agarose e o corante SYPRO® Orange e que origine o aumento do sinal de fluorescência.

De modo a excluir alguma reacção entre o fluoróforo e a agarose, efectuou-se o mesmo protocolo (protocolo N – ensaio III) mas com uma proteína semelhante à BSA, contudo, que não contenha agarose. Foi então utilizada a anidrase carbónica [18].

Antes de avançar com o protocolo de digestão de anidrase carbónica, efectuou-se o estudo desta proteína no que diz respeito à existência de fluoróforos intrínsecos e que possam influenciar os dados.

Preparou-se uma solução de anidrase carbónica a $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$, desnaturou-se por acção da temperatura e adicionou-se tripsina 1:20 (m/m) com a proteína. Esta solução foi submetida a ultrasons no sonoreactor a 50% e medido o valor de RFU a 595nm. Estas medições foram efectuadas contra soluções sem proteína anidrase carbónica e submetidas ao mesmo protocolo.

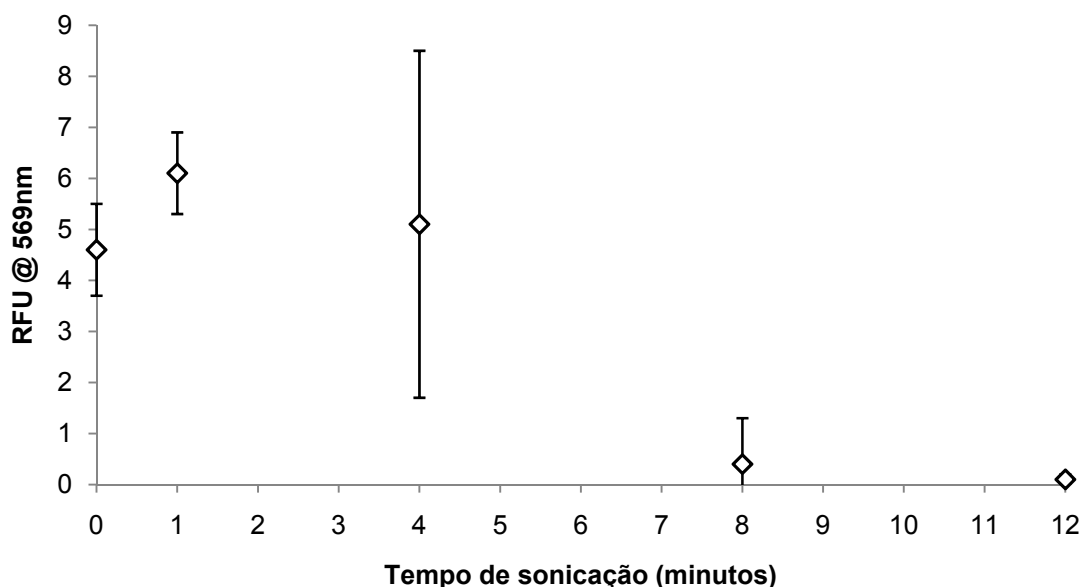


Figura 29 – Verificação da existência de fluoróforos intrínsecos na proteína anidrase carbónica numa solução a $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ desnaturada por acção do calor e digerida com tripsina a 1:20 (m/m) em função do tempo de sonicação no sonoreactor a 50% de amplitude.

Por observação da figura 29, verifica-se pela grandeza dos valores de RFU obtidos que a proteína anidrase carbónica não apresenta fluorescência nativa, isto é, não possui fluoróforos intrínsecos que possam contribuir para a quantificação da proteína com utilização do fluoróforo extrínseco SYPRO® Orange.

Assim, efectuou-se novo estudo, desta vez para verificar qual o efeito da utilização dos ultrasons na solução de anidrase carbónica com o fluoróforo SYPRO®.

Preparou-se uma solução de anidrase carbónica a $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$, desnaturou-se a proteína através de calor, adicionou-se o SYPRO® Orange, submeteu-se a solução a US e mediuiu-se o sinal de fluorescência.

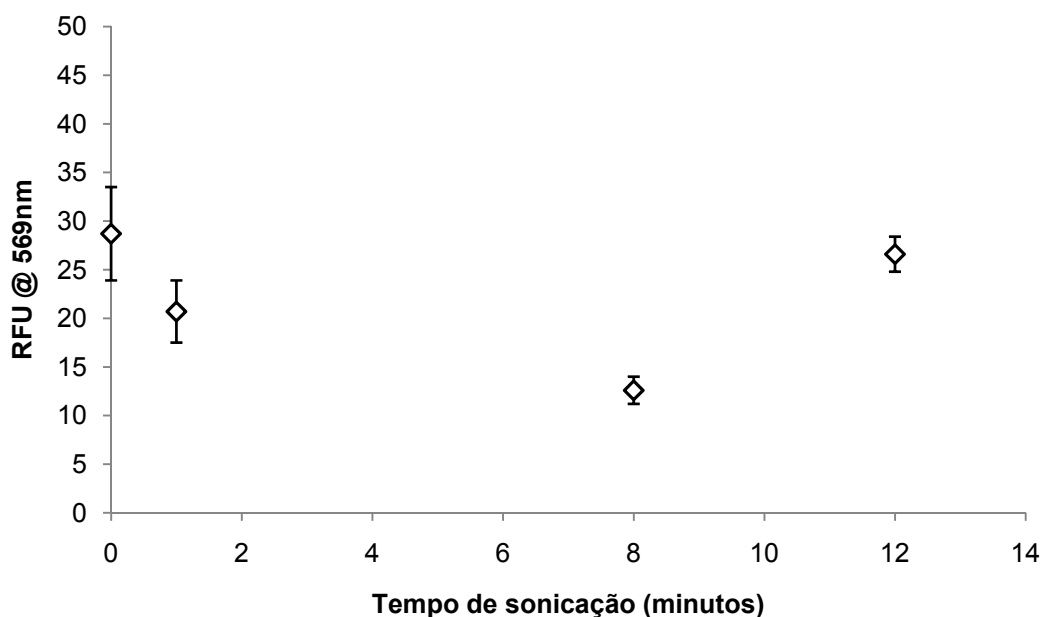


Figura 30 – Influência da utilização dos ultrasons numa solução de anidrase carbónica a 2µg/µl com SYPRO® Orange e sem tripsina, em função do tempo de sonicação em minutos.

De acordo com os dados representados nas figuras 29 e 30, respeitantes à fluorescência nativa da proteína quando digerida pela tripsina, sem utilização do fluoróforo SYPRO® Orange, bem como da influência dos ultrasons na proteína é possível retirar que a proteína não apresenta sinal de fluorescência nativa considerável bem como que os ultrasons não provocam qualquer tipo de degradação que influencie a monitorização da reacção de acordo com o protocolo proposto.

Através da literatura [16], 17, 19], obteve-se a informação que o corante SYPRO® Orange é mais eficaz quando utilizado em condições ácidas. Assim, introduziu-se no protocolo acima testado, uma etapa de incorporação de ácido fórmico. De acordo com o protocolo base de digestão enzimática de proteínas acelerada por ultrasons, há um passo de inactivação da enzima por adição de uma solução de ácido fórmico.

Cruzando estes dois protocolos e dado que o corante SYPRO® Orange é adicionado após o passo de digestão, acrescentou-se ao protocolo de fluorescência a etapa de inactivação da enzima com adição de ácido fórmico. Desta forma, diminui-se o pH da solução à qual se adiciona o corante, o que teoricamente resultará no aumento da eficácia do mesmo.

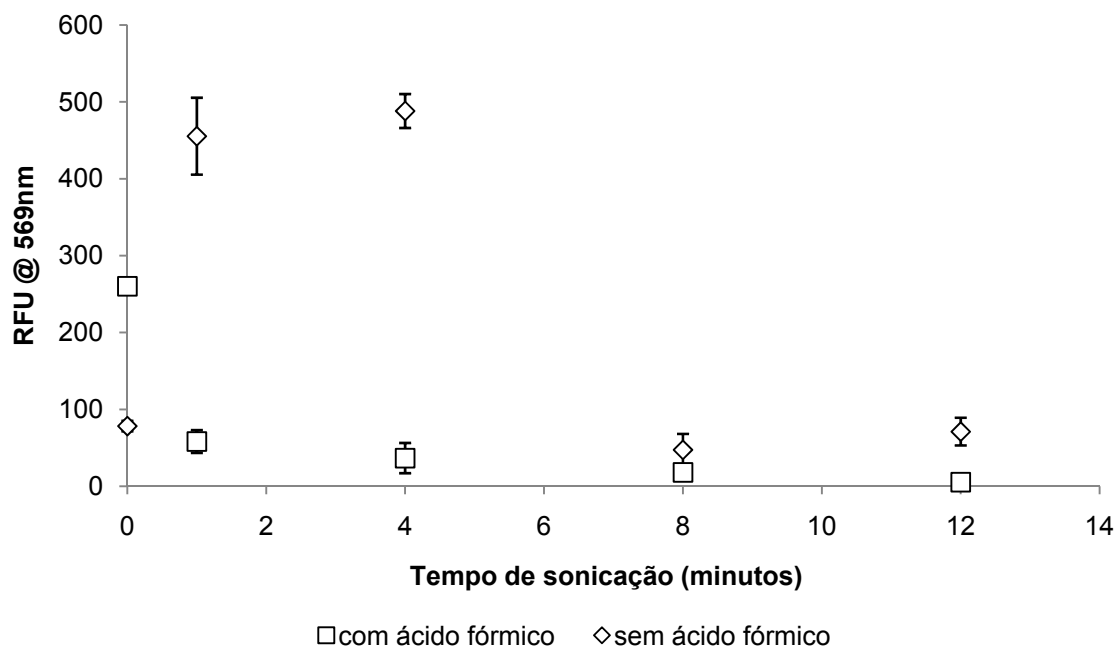


Figura 31 – Efeito da utilização de ácido fórmico para inactivação da enzima, numa solução de anidrase carbónica digerida com tripsina e com Sypro® Orange. As proteínas foram preparadas em soluções aquosas ao invés do tampão tris-glicina sem SDS.

Observando os resultados representados graficamente na figura 31, verifica-se que no experimental que incorpora a utilização de ácido fórmico há semelhanças com o perfil decrescente apresentado anteriormente (figura 28).

Destes dois protocolos é possível retirar ainda que o tampão tris-glicina sem SDS não tem qualquer tipo de interferência na reacção.

Deste modo, conclui-se que o ácido fórmico é fundamental para o perfil de diminuição de RFU à medida que avança a digestão.

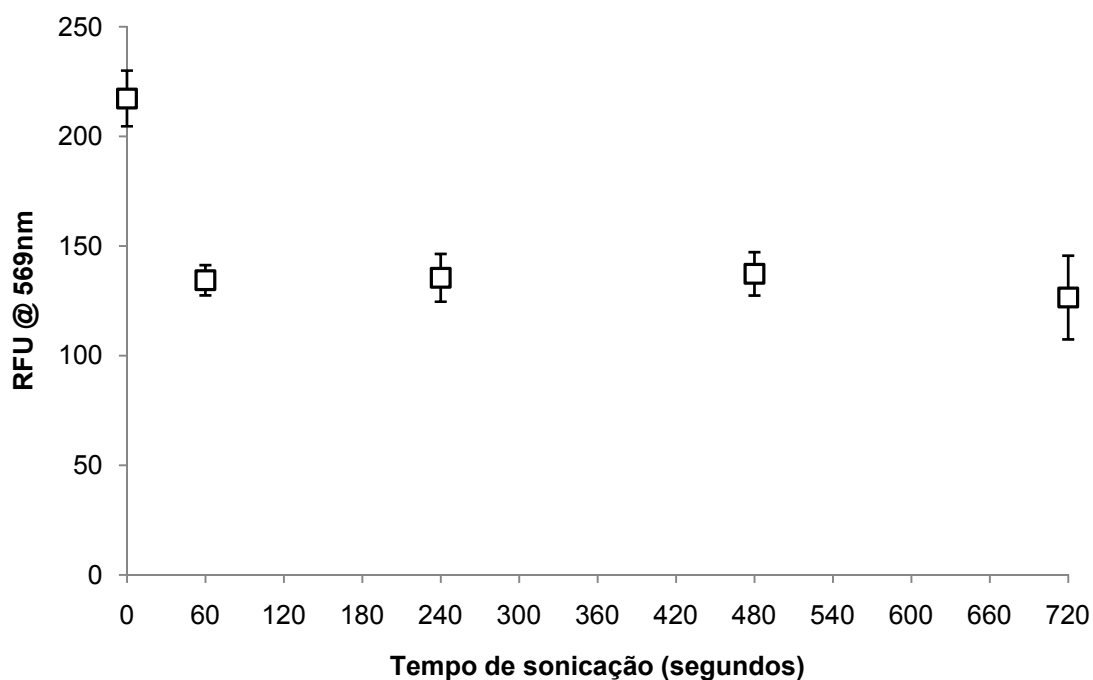


Figura 32 – Influência dos ultrasons na digestão de uma solução de anidrase carbónica 0,5 μ g/ μ l em tampão tris-glicina com tripsina 0,05 μ g/ μ l numa solução incubada com Sypro® Orange.

Por análise da figura 32 e à semelhança do que se havia verificado para a solução de BSA, na figura 28, há diminuição do sinal de fluorescência à medida que o tempo de sonicação aumenta. No entanto, o decréscimo para a solução de BSA é contínuo ao longo do tempo enquanto para a solução de anidrase carbónica, a diminuição é mais acentuada no primeiro minuto mantendo-se constante a $t > 60$ segundos.

Para terminar os ensaios de modo a ser possível avançar com a totalidade dos tempos de digestão e efectuar os respectivos estudos cinéticos, efectuou-se o protocolo clássico de digestão de proteínas em solução em que é utilizado um banho termostaticado a 37°C para efectuar a etapa de digestão ao invés do sonoreactor – *Parte Experimental – Tratamento das amostras - protocolo O*.

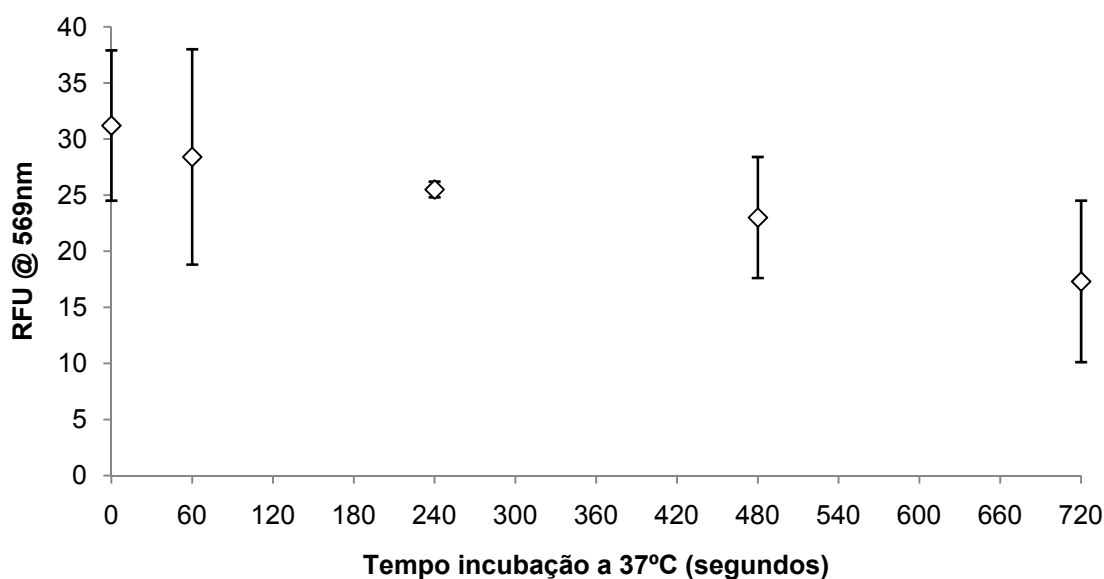


Figura 33 – Influência do tempo de incubação em banho termostatizado a 37°C de uma solução aquosa de anidrase carbónica 0,5µg/µl com tripsina a 0,05µg/µl e posterior medição do sinal de fluorescência através do corante SYPRO® Orange.

Analisando a figura 33 referente ao processo de digestão clássica de proteínas, verifica-se que há diminuição do sinal de fluorescência da solução aquosa de anidrase carbónica digerida com tripsina e incubada com o corante SYPRO® Orange.

Comparando estes dados experimentais com os dados representados na figura 32, que se refere ao protocolo de digestão acelerada por US, há igualmente diminuição no sinal de fluorescência.

Os dados obtidos pelo procedimento de digestão clássico permitem verificar que nos primeiros 12 minutos de reacção há diminuição do sinal de fluorescência para metade do valor inicial. Admitindo que este procedimento de incorporação do fluoróforo SYPRO® Orange permite monitorizar a reacção de digestão, havendo a queda do sinal para metade do valor, infere-se que tenha ocorrido digestão da proteína.

De acordo com o descrito na literatura [26], pelo procedimento clássico de digestão de proteínas, a digestão da anidrase carbónica pela tripsina só está completa, no mínimo, após 4 horas de incubação.

Deste modo, este procedimento através da incorporação do fluoróforo SYPRO® Orange não permite monitorizar esta reacção de digestão enzimática de proteínas acelerada por US.

MARCAÇÃO ISOTÓPICA

Uma outra metodologia que permite efectuar quantificação de proteínas e péptidos é a marcação isotópica com H_2^{18}O . Este método como já foi referido baseia-se na introdução de átomos de ^{18}O em substituição dos ^{16}O existentes na cadeia carboxílica das proteínas. [8]

O protocolo utilizado para o experimental que se segue encontra-se descrito na *Parte Experimental – Tratamento das amostras* e, é constituído por três passos fundamentais. O primeiro passo refere-se à digestão proteica, de acordo com o procedimento de utilização dos ultrasons. O segundo passo corresponde à marcação isotópica propriamente dita. A última etapa é a da análise dos péptidos através das suas razões massa/carga resultantes de espectrometria de massa MALDI-TOF-MS.

Através da análise das razões de massa/carga (m/z) dos péptidos, e relacionando estes valores com as concentrações das proteínas, teoricamente é possível quantificar qualquer amostra da mesma proteína e tratada pelo mesmo método.

Como em qualquer outro procedimento direccionado para quantificação, é necessário, a existência de uma recta de calibração. Para efectuar a recta de calibração, prepararam-se várias soluções de diferentes concentrações da proteína que se pretende quantificar.

Tal como descrito na *Parte Experimental - Tratamento das amostras – Marcação isotópica* para efectuar a quantificação da proteína é necessária a existência de um padrão. Este padrão é constituído por uma solução da mesma proteína das amostras que se pretendem quantificar, sendo marcado com ^{18}O e de concentração conhecida.

A recta de calibração foi efectuada com proteína BSA a diferentes quantidades e misturada com o padrão de BSA, marcado isotopicamente.

Estas soluções correspondentes às diferentes amostras foram preparadas apenas em H_2^{16}O , sendo só posteriormente misturadas com os padrões de BSA a $40\mu\text{g}$ cujos péptidos se encontram marcados isotopicamente com $^{18}\text{O}_1$ ou $^{18}\text{O}_2$.

De modo a verificar a reprodutibilidade dos dados da recta de concentração, foram preparados dois padrões internos partindo da mesma solução de BSA mas tratados de forma independente.

As amostras foram colocadas numa placa de 96 poços, de acordo com a figura 34 e, processadas por ultrasons utilizando uma sonda metálica de 4 pontas. Foram efectuados 4 ensaios para cada concentração de proteína.

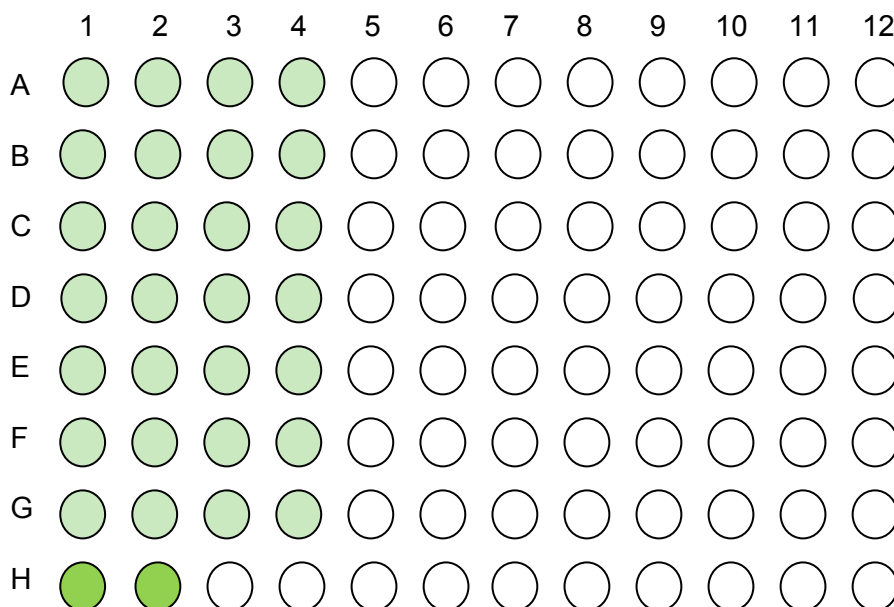


Figura 34 – Representação da placa de 96 poços utilizada para tratamento das amostras e respectiva disposição das mesmas. As amostras foram denominadas de acordo com as posições que ocupam na placa. Amostras A1 – A4 correspondem a 10µg de BSA (^{16}O). B1 – B4: 20µg BSA (^{16}O). C1 – C4: 30µg BSA (^{16}O). D1 – D4: 40µg BSA (^{16}O). E1 – E4: 50µg BSA (^{16}O). F1 – F4: 60µg BSA (^{16}O). G1 – G4: amostra BSA de quantidade desconhecida (^{16}O). H1 - H2: Padrões BSA 40µg (^{18}O).

Após ter sido efectuado todo o procedimento experimental de digestão e marcação isotópica e, antes da preparação das amostras para MALDI-TOF-MS, efectuou-se a combinação entre as diferentes amostras de BSA (^{16}O) e os dois padrões de BSA (^{18}O) – padrão interno. Estas foram então aplicadas na placa de aço do MALDI e analisadas, de acordo com o método descrito na *Parte Experimental – Análise por MALDI-TOF-MS*.

Para a análise da proteína BSA foram seleccionados três razões massa/carga das quais foram retiradas as respectivas intensidades relativas.

Os valores escolhidos correspondem às razões 927,49; 1439,81 e 1479,80. A cada um destes valores m/z existe um péptido associado resultante da hidrólise da BSA pela tripsina. Os péptidos são os seguintes: YLYEIAR, RHPEYAVSVLLR, LEGYGFQNALIVR, respectivamente.

Para cada amostra resulta um espectro de massas. Os espectros de massa obtidos para cada amostra estão incluídos no apêndice A.

A cada um desses espectros foram retiradas as intensidades relativas de cada razão massa/carga correspondente a cada ião e calculados os rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$.

Tabela 13 – Rácios $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtidos para o ião correspondente ao péptido YLYEIAR, cuja razão m/z é de 927,49.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	BSA (µg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$
927,49	A	10	0,82 ± 0,35
	B	20	1,16 ± 0,38
	C	30	1,48 ± 0,46
	D	40	1,57 ± 0,47
	E	50	3,53 ± 0,47
	F	60	3,21 ± 0,57
	G	x	2,10 ± 0,39

Tabela 14 - Rácios $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtidos para o ião correspondente ao péptido RHPEYAVSVLLR, cuja razão m/z é de 1439,81.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	BSA (µg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$
1439,81	A	10	0,79 ± 0,30
	B	20	1,08 ± 0,38
	C	30	1,61 ± 0,57
	D	40	1,70 ± 0,66
	E	50	4,00 ± 1,39
	F	60	3,09 ± 0,62
	G	x	2,39 ± 0,49

Tabela 15 - Rácios $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtidos para o ião correspondente ao péptido LEGYGFQNALIVR, cuja razão m/z é de 1479,80.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	BSA (µg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$
1479,80	A	10	0,65 ± 0,26
	B	20	0,93 ± 0,36
	C	30	1,41 ± 0,35
	D	40	1,65 ± 0,49
	E	50	3,37 ± 0,85
	F	60	2,68 ± 0,37
	G	x	1,97 ± 0,37

Representando graficamente os rácios obtidos para cada uma das quantidades de proteína em função da quantidade de BSA, obtém-se uma recta de calibração.

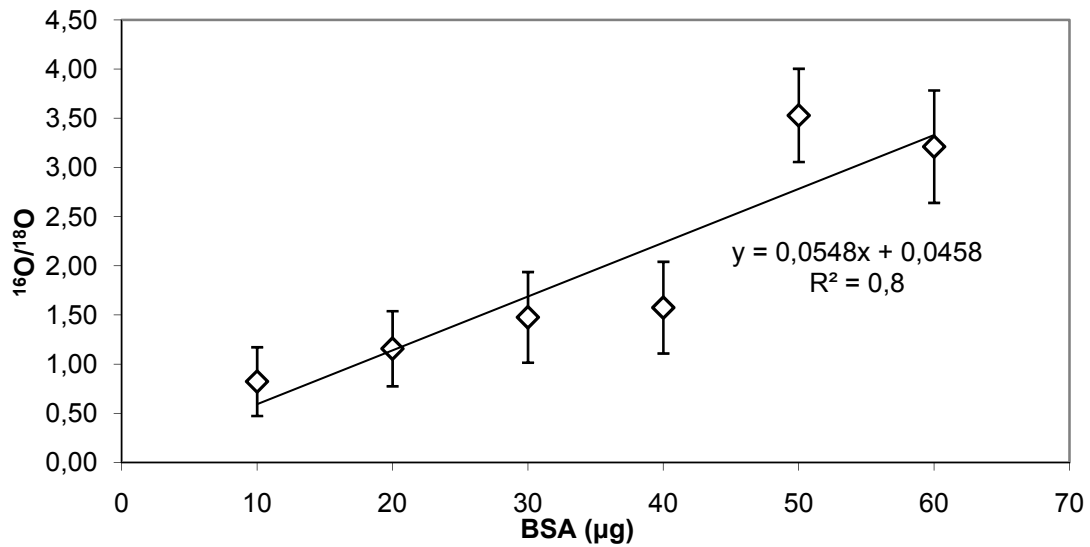


Figura 35 – Representação gráfica da quantidade de proteína BSA (µg) em função do rácio de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtido após análise das intensidades relativas obtidas para o péptido m/z de 927,49.

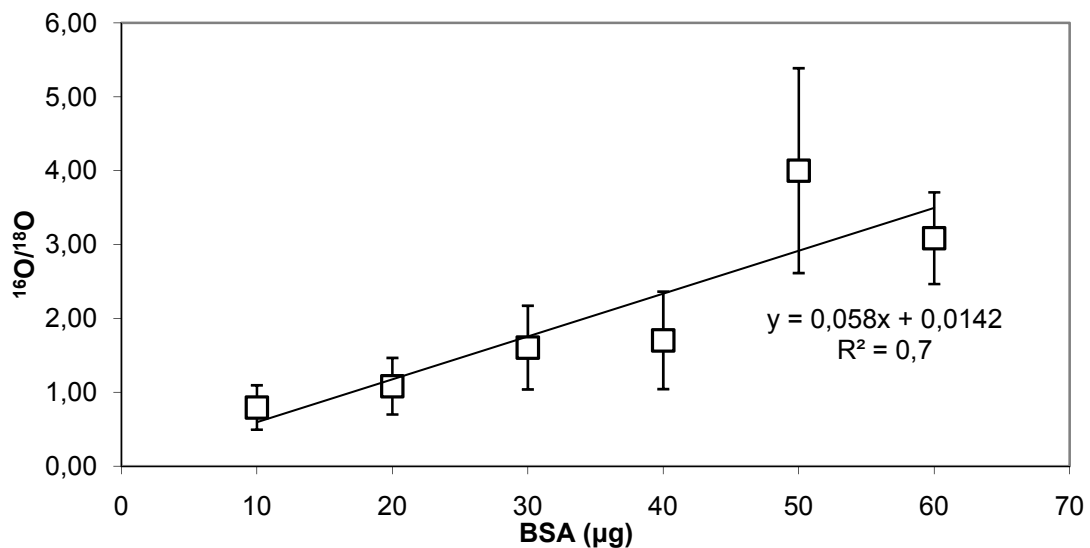


Figura 36 - Representação gráfica da quantidade de proteína BSA (µg) em função do rácio de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ obtido após análise das intensidades relativas obtidas para o péptido m/z de 1439,81.

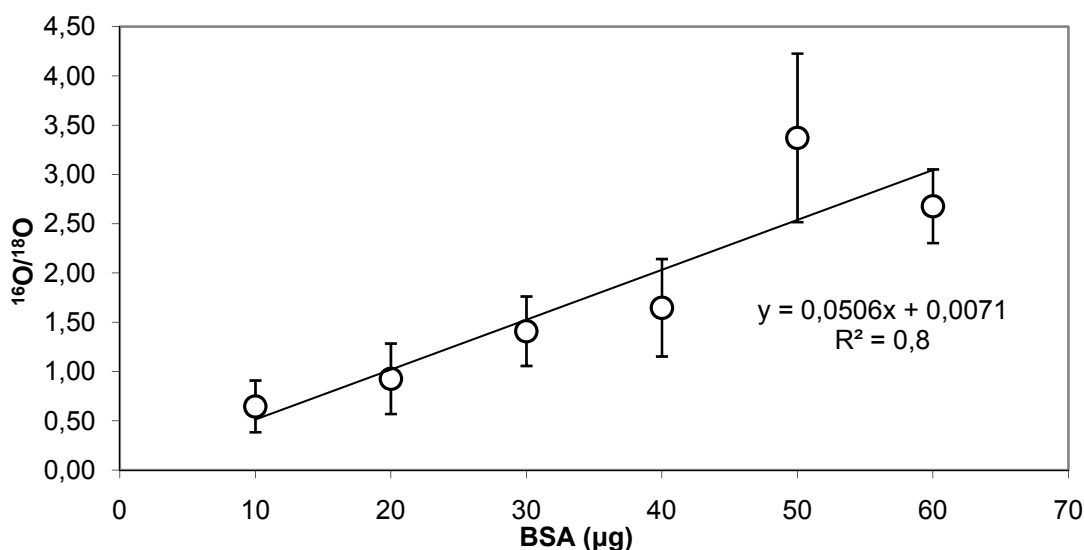


Figura 37 - Representação gráfica da quantidade de proteína BSA (µg) em função do rácio de ¹⁶O/¹⁸O obtido após análise das intensidades relativas obtidas para o péptido m/z de 1479,80.

Das regressões lineares efectuadas a cada série de dados, obteve-se uma equação que corresponde à recta de calibração de cada um dos péptidos em questão.

Tabela 16 – Equações das rectas de calibração obtidas para os três picos correspondentes a três péptidos resultantes da hidrólise da BSA pela enzima tripsina após terem sido marcados isotopicamente e analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF-MS.

Massa [M+H] ⁺	Equação da recta
927,49	y = 0,0548x + 0,0458
1439,81	y = 0,058x + 0,0142
1479,80	y = 0,0506x + 0,0071

De modo a verificar o processo de quantificação através deste procedimento, aos rácios ¹⁶O/¹⁸O obtidos para a amostra G dos três péptidos em análise: 2,10±0,39 (927,49), 2,39±0,49 (1439,81) e 1,97±0,37 (1479,80) e substituindo nas equações das rectas, obtém-se a quantidade de proteína presente nessa amostra.

Substituindo os valores de ¹⁶O/¹⁸O obtidos para a amostra G dos três péptidos em análise, obtém-se a quantidade mássica média de proteína de 39,080 ± 1,756µg.

- **927,49** → $y = 0,0548x + 0,0458 \leftrightarrow x = 37,458\mu g$
- **1439,81** → $y = 0,058x + 0,0142 \leftrightarrow x = 40,962\mu g$
- **1479,80** → $y = 0,0506x + 0,0071 \leftrightarrow x = 38,792\mu g$

Uma vez que a solução havia sido preparada com $40\mu g$ de proteína, numa proporção 1:1 com a massa do padrão, o valor obtido através da substituição na recta de calibração é aceitável.

Para confirmar estes dados, foi efectuado um novo experimental, de acordo com o mesmo protocolo mas desta feita com três amostras de BSA (^{16}O) em quantidade de 15, 25 e $40\mu g$ e igualmente um padrão interno de BSA (^{18}O) de $40\mu g$.

O tratamento de dados efectuado foi o descrito anteriormente.

Tabela 17 – Valores obtidos para os rácios de três péptidos resultantes da hidrólise da BSA pela enzima tripsina em função da quantidade de proteína. Os valores de massa $[\text{M}+\text{H}]^+$ admitidos estão em concordância com os escolhidos para as rectas de calibração (tabela17).

Massa $[\text{M}+\text{H}]^+$	BSA (μg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$
927,49	40	$1,28 \pm 0,22$
		$1,80 \pm 0,12$
	25	$0,47 \pm 0,04$
		$0,70 \pm 0,17$
	15	$0,27 \pm 0,08$
		$0,37 \pm 0,20$
1439,81	40	$1,24 \pm 0,27$
		$1,88 \pm 0,32$
	25	$0,43 \pm 0,11$
		$0,66 \pm 0,24$
	15	$0,24 \pm 0,06$
		$0,41 \pm 0,15$
1479,80	40	$1,34 \pm 0,27$
		$2 \pm 0,25$
	25	$0,52 \pm 0,14$
		$0,78 \pm 0,28$
	15	$0,27 \pm 0,09$
		$0,39 \pm 0,19$

Tendo sido calculados os valores do rácio $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$, e utilizando as equações das rectas indicadas na tabela 16, estamos em condições de verificar se através das rectas de

calibração é possível quantificar a proteína desta segunda amostragem, em que todas as soluções são preparadas de fresco.

Tabela 18 – Quantidade de BSA (μg) calculada através das equações das rectas de calibração e respectivos valores médios e desvios padrões. A cada solução foram feitas duas amostragens.

Massa [M+H] ⁺	BSA (μg)	¹⁶ O/ ¹⁸ O	BSA (μg) calculada	Média BSA (μg)
927,49	40	1,28 ± 0,22	22,52	27 ± 7
		1,80 ± 0,12	32,01	
	25	0,47 ± 0,04	7,74	10 ± 3
		0,70 ± 0,17	11,94	
	15	0,27 ± 0,08	4,09	5 ± 1
		0,37 ± 0,20	5,91	
1439,81	40	1,24 ± 0,27	21,13	27 ± 8
		1,88 ± 0,32	32,17	
	25	0,43 ± 0,11	7,16	9 ± 3
		0,66 ± 0,24	11,13	
	15	0,24 ± 0,06	3,89	5 ± 2
		0,41 ± 0,15	6,82	
1479,80	40	1,34 ± 0,27	26,34	33 ± 9
		2 ± 0,25	39,39	
	25	0,52 ± 0,14	10,14	13 ± 4
		0,78 ± 0,28	15,27	
	15	0,27 ± 0,09	5,19	6 ± 2
		0,39 ± 0,19	7,56	

Analisando os dados na tabela anterior verifica-se que a quantidade de BSA calculada é bastante inferior à que existe na amostra.

De acordo com os dados contidos no apêndice B, que correspondem às intensidades relativas dos picos correspondentes aos péptidos em estudo, bem como aos cálculos de rácios ¹⁸O₁/¹⁸O₂ e de ¹⁶O/¹⁸O apresentados nas tabelas 13, 14, 15 e 17, é possível retirar algumas relações relativamente aos péptidos e à extensão da marcação.

Relacionando o facto dos péptidos que contêm no seu C-terminal resíduos de arginina incorporarem maioritariamente 2 átomos de ¹⁸O [20] com a sequência dos péptidos analisados, verifica-se que os três possuem resíduos de arginina no C-terminal, como tal incorporam preferencialmente 2 átomos de ¹⁸O.

De um modo geral e, de acordo com os dados apresentados no apêndice B, o péptido que melhor permite a distinção entre a incorporação de 2 átomos e a de apenas 1, é o péptido cujo m/z é 927,49.

O péptido que melhor permite distinguir entre marcado (^{18}O) e não marcado (^{16}O) é o 1479,80, logo é o que permite seguir a extensão da marcação em termos da incorporação completa de 2 átomos de ^{18}O .

Ambos possuem resíduos de arginina no C-terminal, sendo este o único resíduo de arginina presente nas suas sequências. O péptido cujo m/z é 1439,81, intermédio a estes dois já referidos, além do resíduo de arginina no C-terminal apresenta outro resíduo de arginina no N-terminal. Pelos dados apresentados no apêndice B, este não permite concluir nada acerca da incorporação de 1 ou 2 átomos de oxigénio-18, bem como, acerca da extensão da marcação.

Assim, pela análise destes dados experimentais é possível retirar algumas elações acerca da quantificação por marcação isotópica com ^{18}O , nomeadamente, que a elaboração deste experimental obriga a que as soluções utilizadas sejam sempre as mesmas, especialmente do padrão utilizado de modo a evitar oscilações nos dados experimentais.

Como se pode observar pelos dados da tabela 17, existem diferenças nos rácios obtidos para a mesma amostras quando misturada com os dois padrões. Se dentro da mesma amostra e da mesma solução, existem oscilações nos valores de rácios, quando se comparam rácios obtidos de soluções preparadas em alturas diferentes, embora tentando recriar exactamente as mesmas condições experimentais, ocorrem discrepâncias para efectuar a quantificação da proteína.

Assim, a cada amostra a analisar teria que ser feita uma recta de calibração própria. Uma vez que cada experimental de marcação isotópica, conforme o protocolo descrito e utilizado, demora 3 dias, é impensável manter as soluções proteicas guardadas durante tanto tempo, especialmente os padrões marcados isotopicamente, uma vez que como é referido na *Introdução*, a incorporação dos átomos de ^{18}O continua enquanto a solução se mantém em contacto com a H_2^{18}O . Só este facto altera as condições reaccionais da recta de calibração e conseqüentemente, as amostras, a quantificar, já não teriam os padrões nas mesmas condições da recta de calibração.

CONCLUSÕES

O tema desta dissertação de mestrado consistiu em estudar a aceleração das reacções de hidrólise enzimática de proteínas mediante o recurso à energia ultrasónica e, para efectuar esses estudos foram feitas tentativas de desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas.

A primeira abordagem a este experimental foi através de espectrofotometria de absorção ultravioleta-visível, seguindo-se espectrofotometria de fluorescência e por último um novo procedimento através da marcação isotópica de proteínas e péptidos com ^{18}O .

I) Espectrofotometria UV-Visível

No respeitante aos dados obtidos na secção de espectrofotometria de absorção ultravioleta-visível não foi possível obter qualquer relação cinética para a reacção de hidrólise das proteínas BSA, anidrase carbónica, α -lactoalbumina e ovalbumina com a enzima tripsina, através do protocolo proposto de digestão enzimática de proteínas acelerada por US.

A 200 e 280 nm não é possível monitorizar a reacção de hidrólise das ligações peptídicas devido à interferência dos compostos orgânicos utilizados na solução.

O recurso ao método de Bradford também se revelou infrutífero. Apesar de este método ser compatível com todos os reagentes utilizados ao longo do protocolo em estudo, não permite quantificar a hidrólise da proteína BSA através do protocolo de digestão enzimática acelerada por US.

II) Espectrofotometria de fluorescência

Pelos estudos efectuados com base no protocolo de digestão enzimática de proteínas acelerada por US, não foi possível monitorizar a digestão enzimática acelerada por ultrasons devido às interferências causadas pelas macromoléculas resultantes da digestão enzimática nos tempos iniciais de digestão.

III) Marcação Isotópica

Ao estudar a quantificação proteica com marcação isotópica com ^{18}O verificou-se que a quantificação efectuada é relativa e, para realizar estudos cinéticos é necessária uma quantificação absoluta.

De um modo geral, o grande problema para a quantificação pela metodologia de UV-Vis ou de fluorescência prende-se com a formação de macromoléculas nos tempos iniciais da digestão, que interferem com as tentativas de quantificação da proteína intacta, pelo menos nas condições aqui testadas.

TRABALHOS FUTUROS

Uma dos resultados importantes retirados deste trabalho experimental refere-se com a importância da separação da proteína intacta que permanece em solução dos péptidos recém-formados, e/ou dos solventes orgânicos que constituem o protocolo de digestão enzimática de proteínas, para diminuição dos interferentes em solução. Assim, como trabalhos futuros propõem-se:

1. A utilização de Centricon® que, aproveitando a diferença do tamanho das partículas, permite concentrar proteínas, alterar tampões, dessalinizar amostras ou remover impurezas. [31]
2. Monitorizar a hidrólise da proteína através de cromatografia líquido-líquido HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). Esta técnica permite, através da utilização de uma coluna de fase reversa, separar proteínas de uma mistura e monitorizar a absorvância da solução.
3. Zaia *et al* propuseram uma metodologia básica que utiliza *p*-benzoquinona (PBQ) para a determinação de proteínas em diversos meios. O método baseia-se no facto do produto de reacção entre PBQ e as proteínas absorver a 350nm. Além deste método, propuseram uma metodologia inédita que possibilita determinar simultaneamente proteínas e aminoácidos pois o produto de reacção PBQ/proteína absorve a 350nm e o produto de reacção PBQ/aminoácidos absorve a 480nm. [30]
4. Quantificação da proteína em gel de poliacrilamida. Nesta técnica de densitometria, há a separação electroforética das proteínas de acordo com a massa molecular das mesmas, com posterior coloração do gel de poliacrilamida quer com corantes fluorescentes ou não-fluorescentes. Seguidamente à coloração, os géis são colocados num transiluminador e densitometricamente é medida a intensidade relativa das bandas, recorrendo a *software* informático.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Sotomayor, J. (2003). *Cinética Química*. Lisboa, LIDEL – edições técnicas, Ida.
- [2] Peng, J.; Gygi, S.P.; *Journal of mass spectrometry*, **2001**, 36, 1083 – 1091.
- [3] Bioquímica – Proteínas. Recuperado a 4 de Setembro de 2008, em <http://www.marvial.oi.com.br/enggui/topicos/quimbiol02.html>.
- [4] Segura-García, J. M., Gavilanes, J. G., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñadero, M., Vivarco, F. (1999). *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*. Capítulo 2 – Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible. Editorial Sintesis.
- [5] Atkins, P., & de Paula, J. (2002). *ATKINS' PHYSICAL CHEMISTRY* (7th Edition). Oxford University Press, Capítulo 17, página 542.
- [6] Miwa, A., de Falco, P., Calijuri, M.; *Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização*, **2008**, 13, 236-242.
- [7] Segura-García, J. M., Gavilanes, J. G., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñadero, M., Vivarco, F. (1999). *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*. Capítulo 3 – Emisión de fluorescencia. Editorial Sintesis.
- [8] Miyagi, M., Sekhar Rao, K.C., *Proteolytic ¹⁸O-labeling strategies for quantitative proteomics; Mass Spectrometry Reviews*, **2007**, 26, 121-136.
- [9] Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P.A., Fenselau, C., *Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: Model Studies with two serotypes of adenovirus; Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 2836 - 2842.
- [10] A7511pis.pdf. Recuperado a 21 de Setembro de 2008, em <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/a7511pis.pdf>.
- [11] Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- [12] Gebauer, W., *Protein Quantification: Bradford Method*, Encyclopedia of life sciences, **2002**.
- [13] P5147pis.pdf. Recuperado a 22 de Setembro de 2008, em <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p5147pis.pdf>.
- [14] NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, v3.5 User's Manual.
- [15] 93610 Trypsin from bovine pancreas BioChemika, essential salt free, lyophilized, ~9000 units/mg. Recuperado a 23 de Setembro de 2008 em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/93610>.
- [16] Steinberg, T., Jones, L., Haugland, R., Singer, V., *SYPRO Orange and SYPRO Red Protein Gel Stains: One Step Fluorescent Staining of Denaturing Gels for Detection of Nanogram Levels of Protein*, Analytical Biochemistry, **1996**, 239, 223-227.
- [17] Malone, J., Radabaugh, M., Leimgruber, R., Gerstenecker, G., *Practical aspects of fluorescent staining for proteomic application*, Electrophoresis, **2001**, 22, 919-932.
- [18] C3934 Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes lyophilized powder, ≥ 2,500 W-A units/mg protein. Recuperado em 23 de Setembro de 2008 em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C3934>.
- [19] S5692dat.pdf. Recuperado a 23 de Setembro de 2008, em <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/datasheet/s5692dat.pdf>.
- [20] Havlis, J., Shevchenko, A., *Absolute Quantification of Proteins in Solutions and in Polyacrylamide Gels by Mass Spectrometry*, Analytical Chemistry, **2004**, 76, 3029-3036.
- [21] Galésio, M., Vieira, D.V., Rial-Otero, R., Lodeiro, C., Moura, L., Capelo, J.L., *Influence of the Protein Staining in the Fast Ultrasonic Sample Treatment for Protein Identification through Peptide Mass Fingerprint and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*, Journal of Proteome Research, **2008**, 7, 2097-2106.
- [22] Paz, N. V. N. (2006). *Estudo de enovelamento da Isoforma 1 da Lectina de Sementes de Cratylia mollis: caracterização de estados intermédios.*, Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Recife: Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.
- [23] O5440 Albumin from chicken egg white BioChemika, lyophilized, 5xcryst., ≥95% (GE). Recuperado a 23 de Setembro de 2008, em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/05440>.
- [24] *Bio-Rad Protein Assay*. Recuperado a 28 de Setembro de 2008, em <http://www.technomedica.com/publikazii/belur/Bio-Rad.pdf>.

- [25] Pierce Biotechnology - *Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit*, Thermo Scientific. Recuperado a 28 de Setembro de 2008, em <http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily&ID=02020105&Format=Print>.
- [26] Karuso, P., Crawford, A., Veal, D.A. Scott, G.B.I., Choi, H., *Real-time Fluorescence Monitoring of Tryptic Digestion in Proteomics*, Journal of Proteome Research, **2008**, 7, 361-366.
- [27] *Técnicas Moleculares Aplicadas à Análise Proteómica*, Gliberto B. Domont, Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia. Recuperado a 28 de Setembro de 2008 em <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/LIMPP/PDFsLIMPP/CursoCBAB/GilbertoDomontII.pdf>.
- [28] NanoOrange® Quantificação de proteína com os Multidetectors Anthos Zenyth 1100/3100, Application Notes, Anthos LABTEC INSTRUMENTS. Recuperado a 30 de Setembro de 2008 em http://www.instrulab.com.br/assets/downloads/aplicacoes_zenyth_3100.pdf.
- [29] Fontes, R., *Separação de proteídeos*, Porto 1997.
- [30] Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J., *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*, **1998**, 21(6), 787-793.
- [31] Centricon® Centrifugal Filter Units From Millipore – BioCompare Buyer's Guide For Life Scientists. Recuperado a 8 de Outubro de 2008 em <http://www.biocompare.com/review/657/Centricon-Centrifugal-Filter-Units-From-Millipore.html>.

OUTRAS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

Sarmiento, Manuela, (2008). *Guia Prático sobre a Metodologia Científica para a Elaboração, Escrita e Apresentação de Teses de Doutoramento, Dissertações de Mestrado e Trabalhos de Investigação Aplicada*, Universidade Lusíada de Lisboa, Lisboa, Colecção Manuais.

ANEXOS

ANEXO A – VOLUMES DE SOLUÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DE UM GEL DE POLIACRILAMIDA.

Tabela 19 – Volumes e respectivas soluções necessárias à preparação de géis SDS-PAGE em função da percentagem de acrilamida.

Soluções stock (mL)	Stacking Gel	Running Gel								
		% Acrilamida	5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
Solução I	-		0,75/1,5	0,75/1,5	0,75/1,5	0,75/1,5	0,75/1,5	0,75/1,5	0,75/1,5	0,75/1,5
Solução II	0,45/0,9		-	-	-	-	-	-	-	-
Solução III	0,3/0,6		1,25/2,5	1,33/2,66	1,67/3,34	2,08/4,16	2,5/5,0	2,92/5,84	3,33/6,66	
SDS 10%	0,018/0,036		0,05/0,1	0,05/0,1	0,05/0,1	0,05/0,1	0,05/0,1	0,05/0,1	0,05/0,1	0,05/0,1
H ₂ O Mili-Q	0,94/1,88		2,93/5,86	2,85/5,7	2,51/5,02	2,1/4,2	1,66/3,32	1,24/2,48	0,84/1,68	
PSA 10% (µL)	13,5/27		38/76	38/76	38/76	38/76	38/76	38/76	38/76	38/76
TEMED (µL)	2/4		2,5/5	2,5/5	2,5/5	2,5/5	2,5/5	2,5/5	2,5/5	2,5/5

Os valores **a negrito** correspondem à preparação de dois géis.

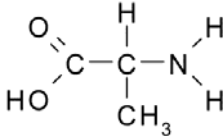
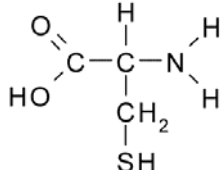
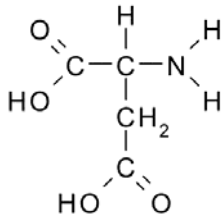
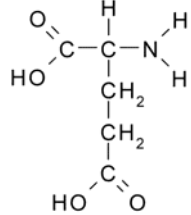
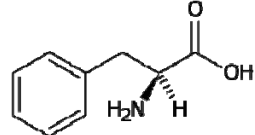
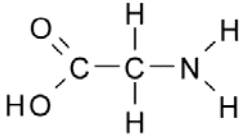
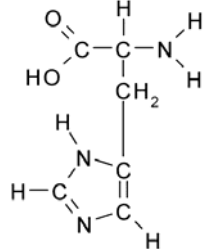
ANEXO B – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES STOCK NECESSÁRIAS PARA A PREPARAÇÃO DE GÉIS DE POLIACRILAMIDA.

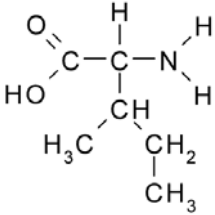
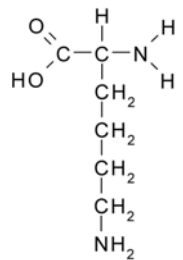
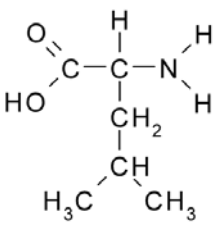
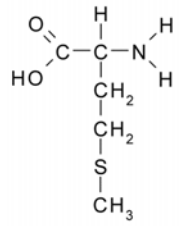
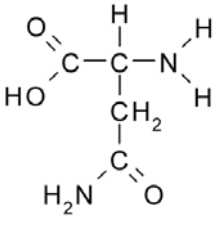
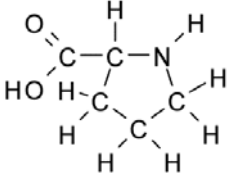
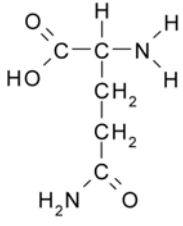
Tabela 20 – Composição das soluções necessárias para preparar géis de poliacrilamida.

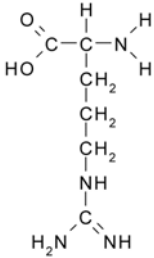
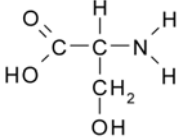
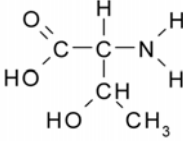
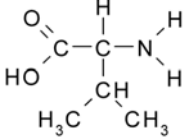
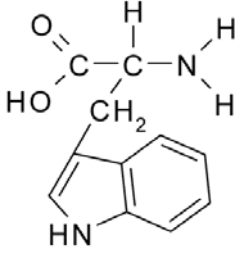
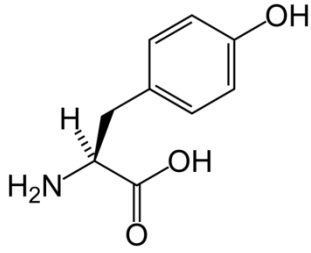
Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Solução I <i>Tampão do gel de separação (running gel)</i>	Tris-base HCl conc. H ₂ O	30,3g Até pH 8,8 Até 100mL	pH = 8,8-9,0
Solução II <i>Tampão do gel de concentração (stacking gel)</i>	Tris-base HCl conc. H ₂ O	6,06g Até pH 6,8 Até 100mL	pH = 8,8-9,0
10% SDS	SDS H ₂ O	10g Até 100mL	-
10% PSA	Persulfato de amónio H ₂ O	0,5g Até 5mL	-
Tampão de electroforese Tris-Glicina (Running Gel)	Tris-base Glicina SDS H ₂ O	30,3g 144,1g 10g Até 1000mL	pH=8,3 diluir 1:10 antes de utilizar
Tampão para amostras SDS-PAGE (Sample Buffer)	Solução II 10% SDS β -mercaptoetanol Glicerol Azul de bromofenol H ₂ O	5mL 8mL 1mL 2mL 4mg Até 20mL	Adicionar 1:1 à amostra

ANEXO C – TABELA DAS ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

Tabela 21 – Tabela resumo da simbologia, abreviaturas e estruturas de cada aminoácido.

Símbolo	Abreviatura	Aminoácido	Estrutura
A	Ala	Alanina	
C	Cys, Cis	Cisteína	
D	Asp	Ácido aspártico ou aspartato	
E	Glu	Ácido glutâmico ou glutamato	
F	Phe, Fen	Fenilalanina	
G	Gly, Gli	Glicina	
H	His	Histidina	

I	Ile	Isoleucina	
K	Lys, Lis	Lisina	
L	Leu	Leucina	
M	Met	Metionina	
N	Asn	Asparagina	
P	Pro	Prolina	
Q	Gln	Glutamina	

R	Arg	Arginina	 <p>The structure shows the side chain of Arginine: a three-carbon chain starting from the alpha-carbon, with a guanidino group at the end. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom and an amino group. The beta-carbon is bonded to a hydroxyl group. The gamma-carbon is bonded to two amino groups.</p>
S	Ser	Serina	 <p>The structure shows the side chain of Serine: a two-carbon chain starting from the alpha-carbon, with a hydroxyl group on the beta-carbon. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom and an amino group.</p>
T	Thr, The	Treonina	 <p>The structure shows the side chain of Threonine: a two-carbon chain starting from the alpha-carbon, with a hydroxyl group and a methyl group on the beta-carbon. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom and an amino group.</p>
V	Val	Valina	 <p>The structure shows the side chain of Valine: a two-carbon chain starting from the alpha-carbon, with two methyl groups on the beta-carbon. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom and an amino group.</p>
W	Trp, Tri	Triptofano	 <p>The structure shows the side chain of Tryptophan: a two-carbon chain starting from the alpha-carbon, with an indole ring system attached to the beta-carbon. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom and an amino group.</p>
Y	Tyr, Tir	Tirosina	 <p>The structure shows the side chain of Tyrosine: a two-carbon chain starting from the alpha-carbon, with a para-hydroxybenzyl group attached to the beta-carbon. The alpha-carbon is bonded to a hydrogen atom and an amino group.</p>

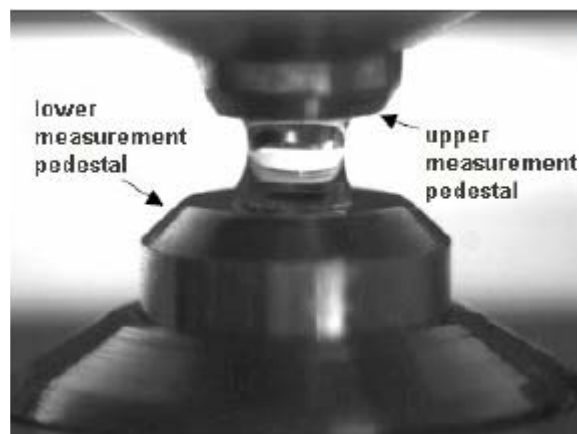
ANEXO D – APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NO NANODROP®

As principais etapas para a utilização deste sistema são as seguintes:



Levantar o braço magnético e pipetar o volume de amostra (1 ou 2 μ l) para o pedestal inferior.

Fechar o braço magnético e iniciar as medições utilizando o software operacional no pc.



A amostra forma automaticamente uma coluna entre os pedestais superior e inferior.

Quando a medição estiver terminada, levantar o braço magnético, limpar ambos os pontos de contacto com um papel que não deixe resíduos.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ESPECTROS MALDI-TOF-MS DA RECTA DE CALIBRAÇÃO

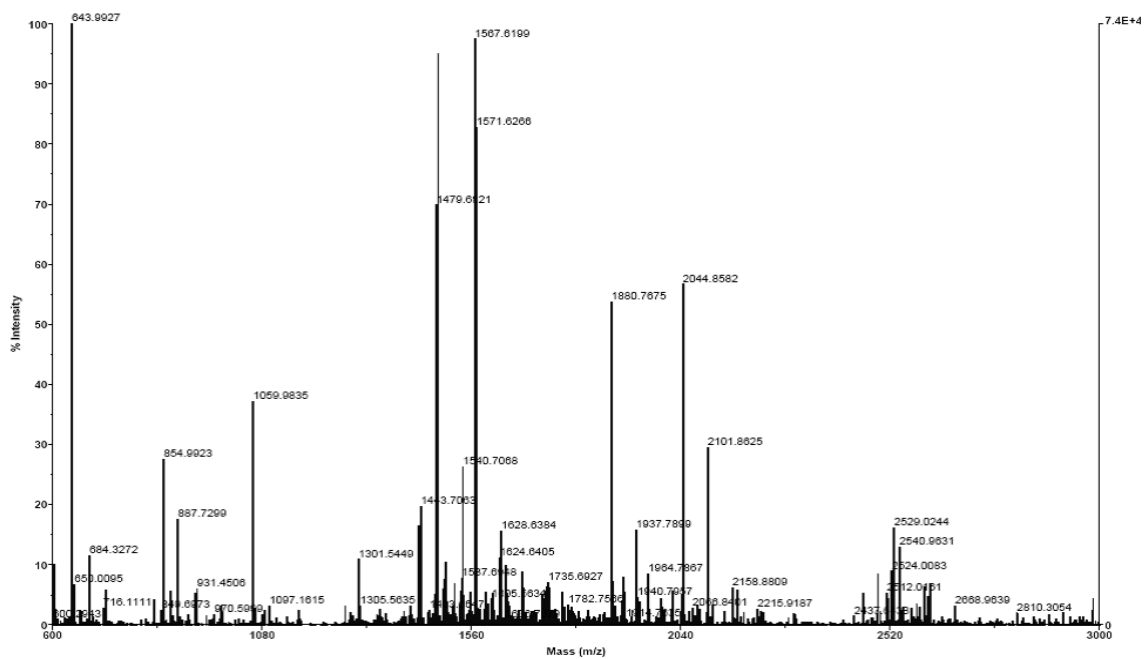


Figura 38 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A1G: 10 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

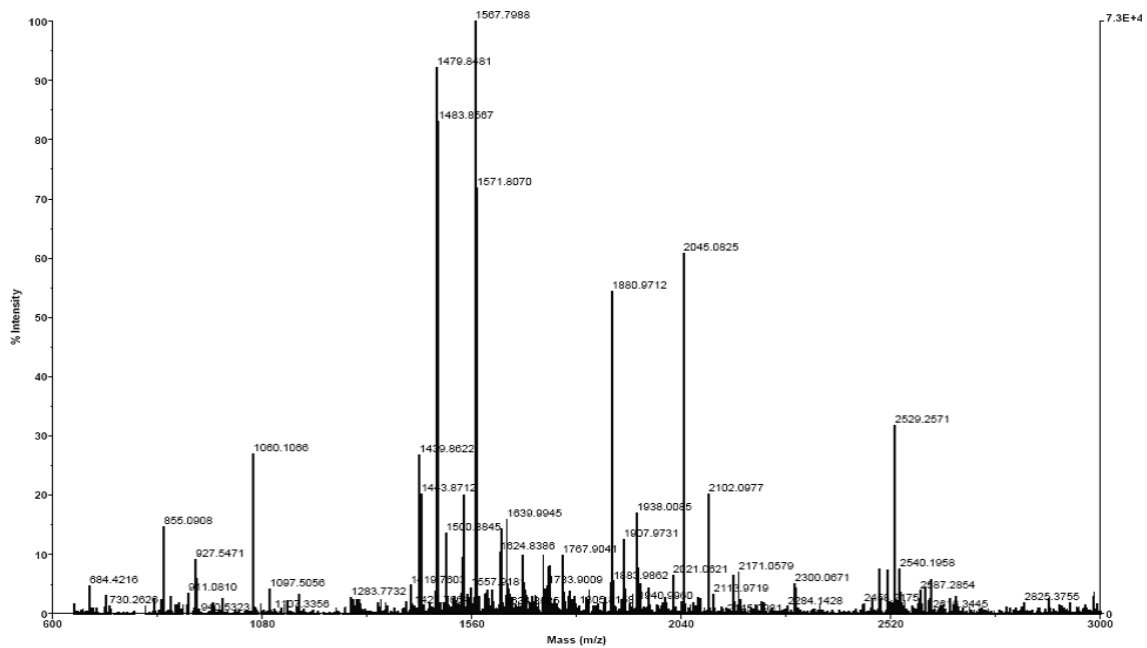


Figura 39 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A2G: $10\mu\text{g}$ de BSA H_2^{16}O + $40\mu\text{g}$ BSA H_2^{18}O)

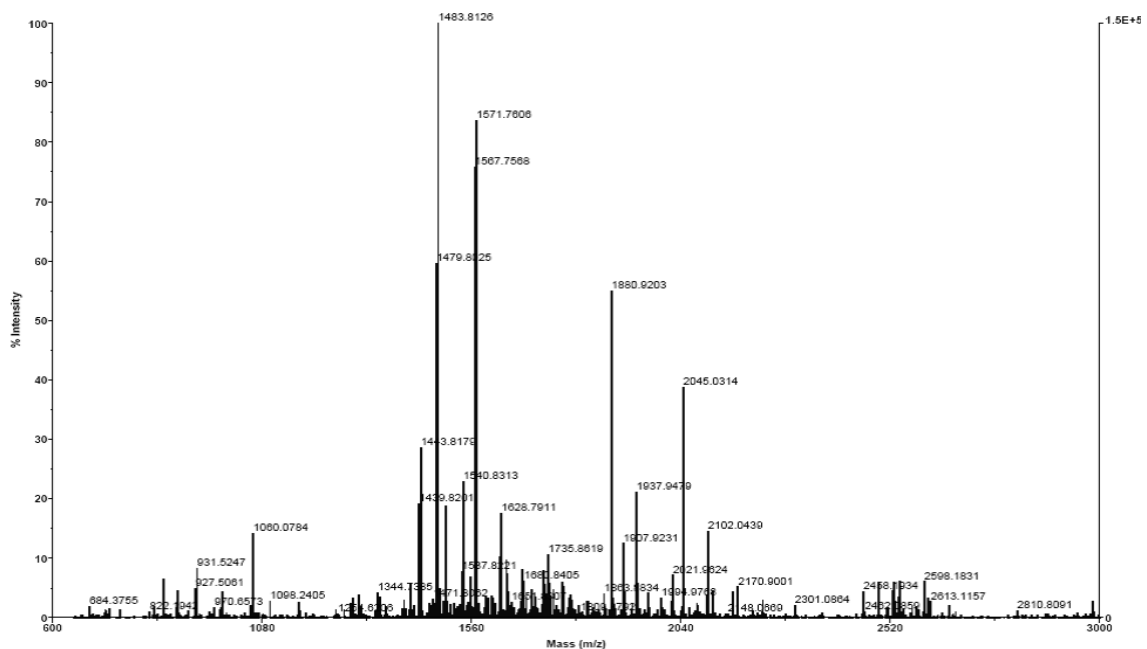


Figura 40 - Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A3G: $10\mu\text{g}$ de BSA H_2^{16}O + $40\mu\text{g}$ BSA H_2^{18}O)

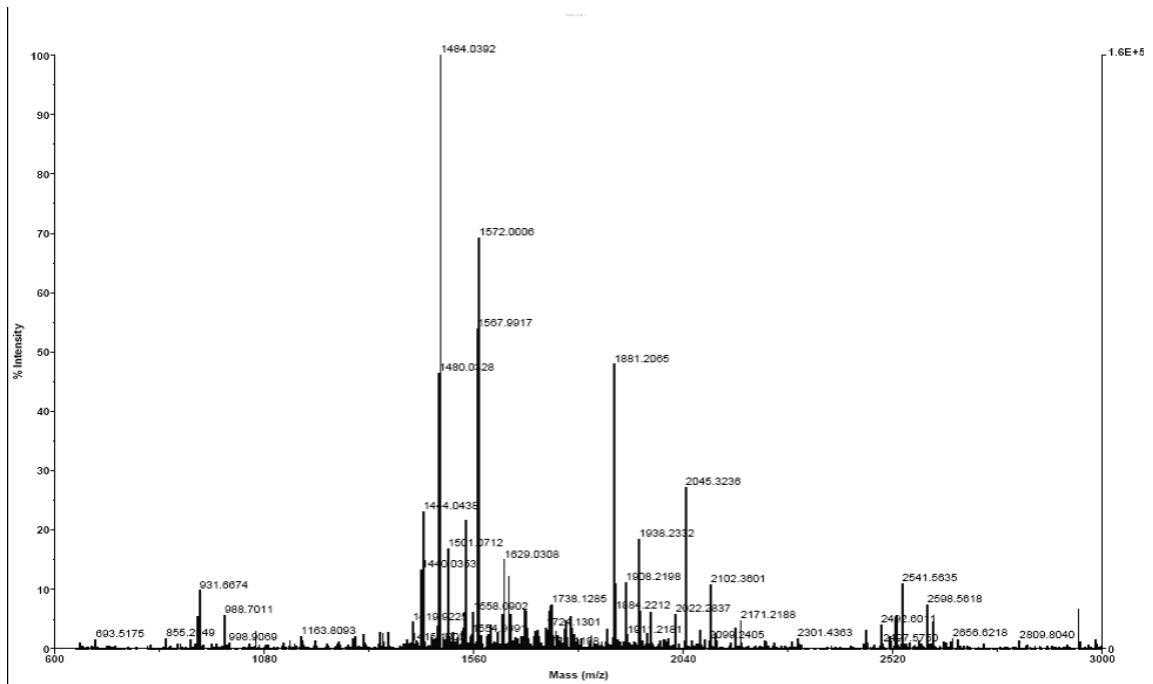


Figura 41 - Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra A4G: 10µg de BSA H_2^{16}O + 40µg BSA H_2^{18}O)

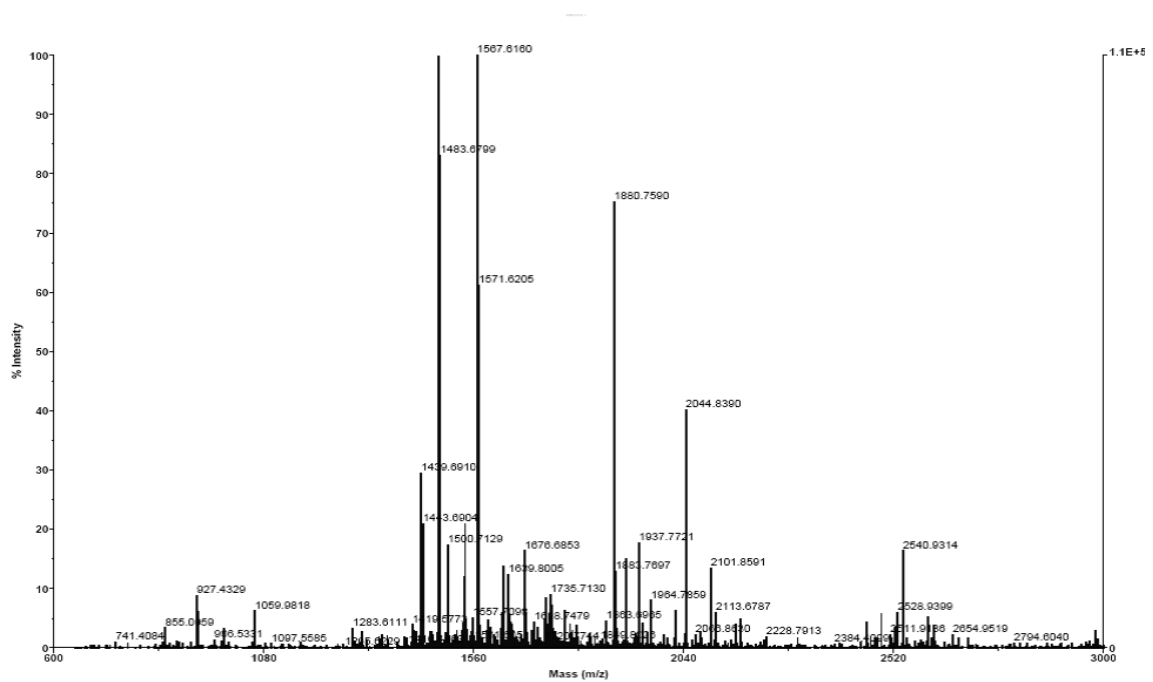


Figura 42 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B1G: 20µg de BSA H_2^{16}O + 40µg BSA H_2^{18}O)

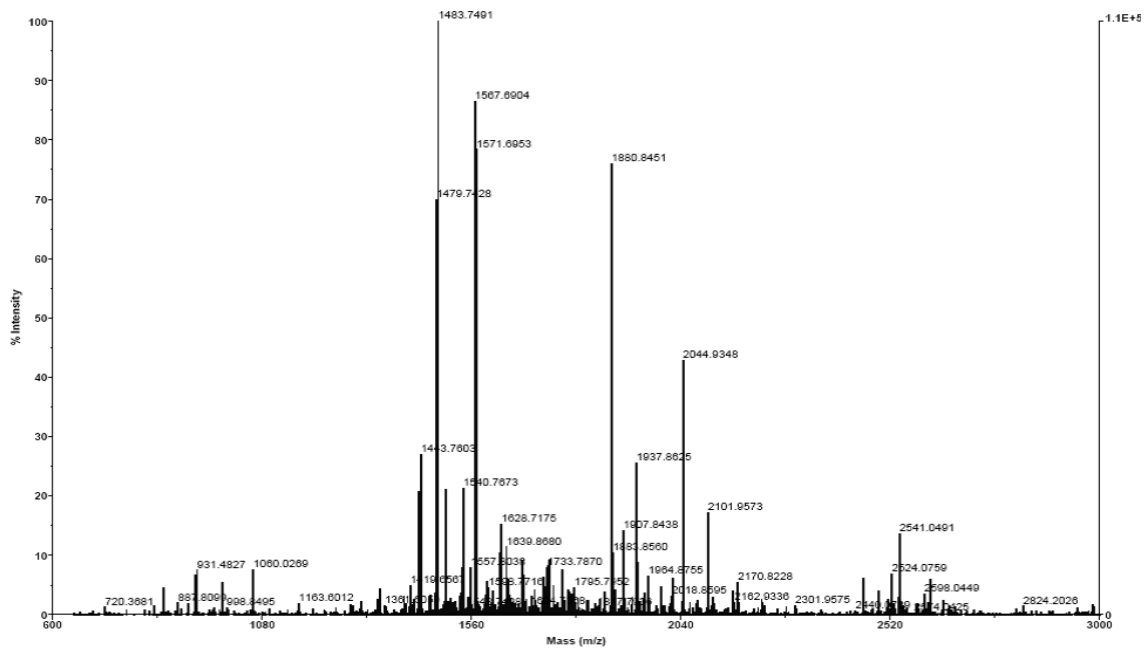


Figura 43 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B2G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

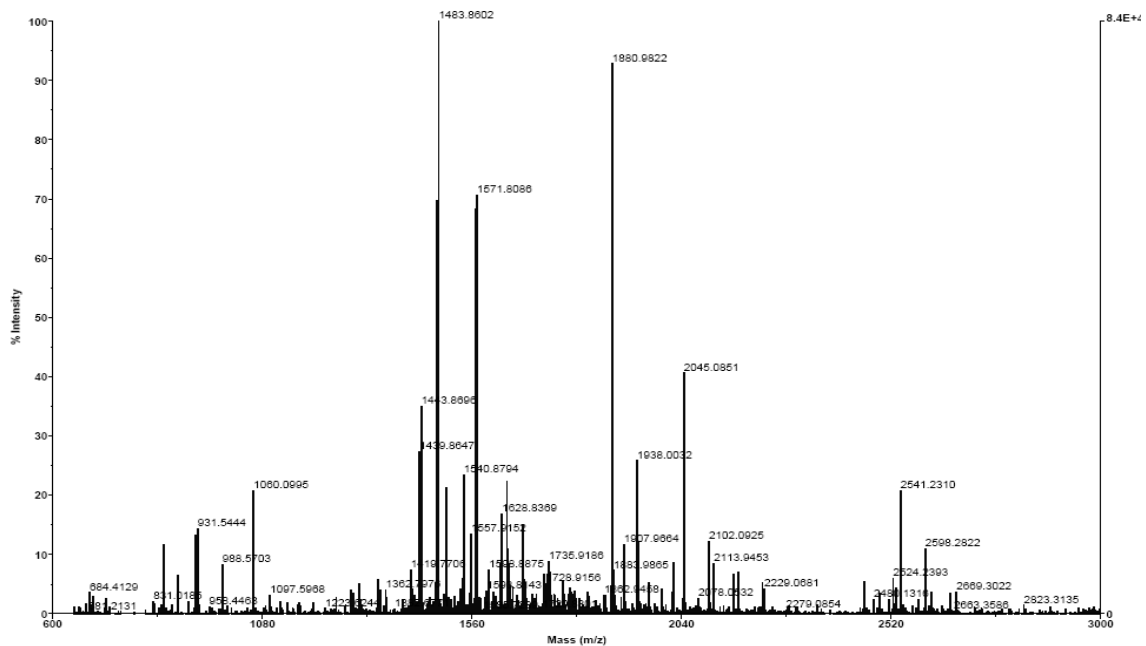


Figura 44 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B3G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

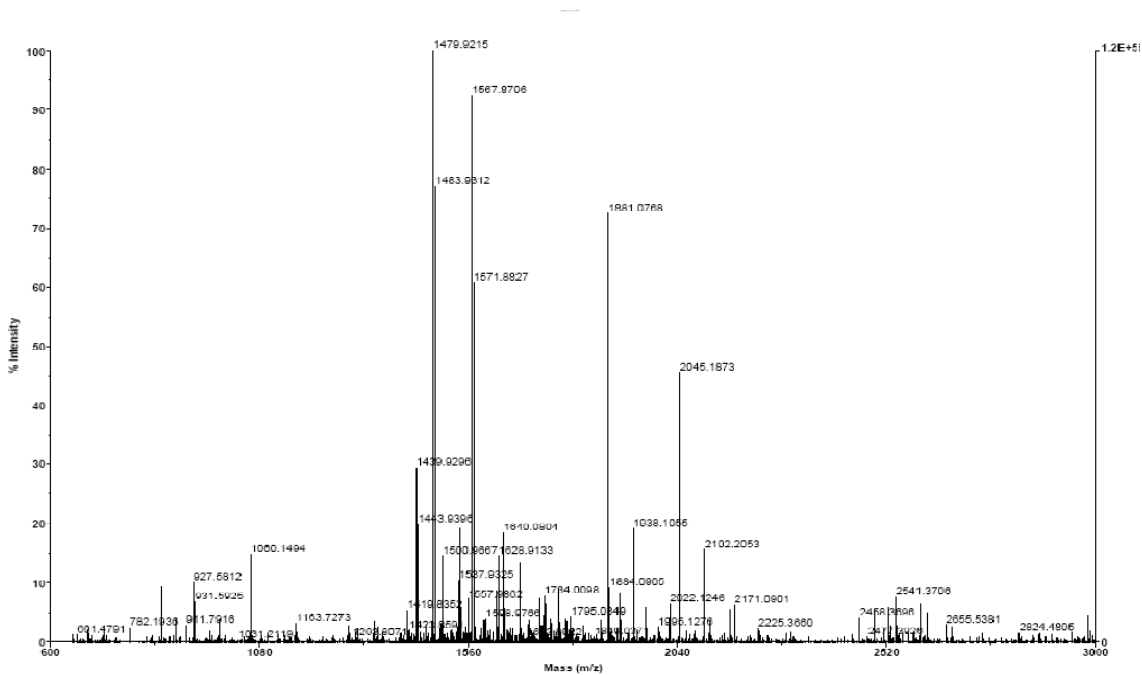


Figura 45 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra B4G: 20 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

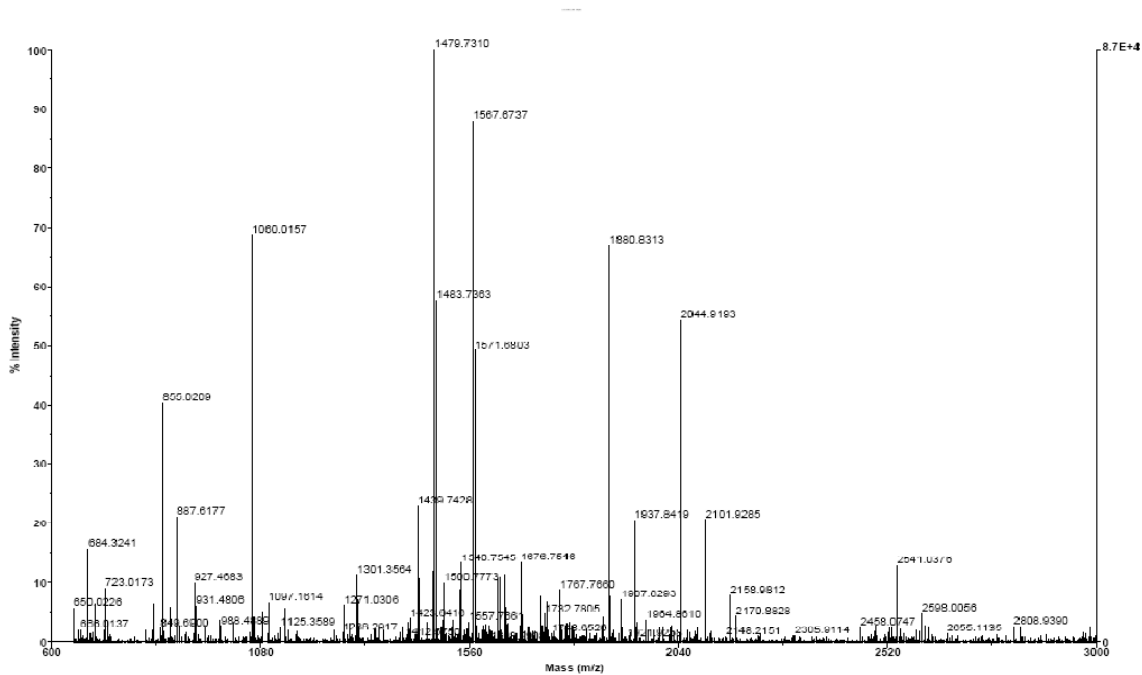


Figura 46 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C1G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

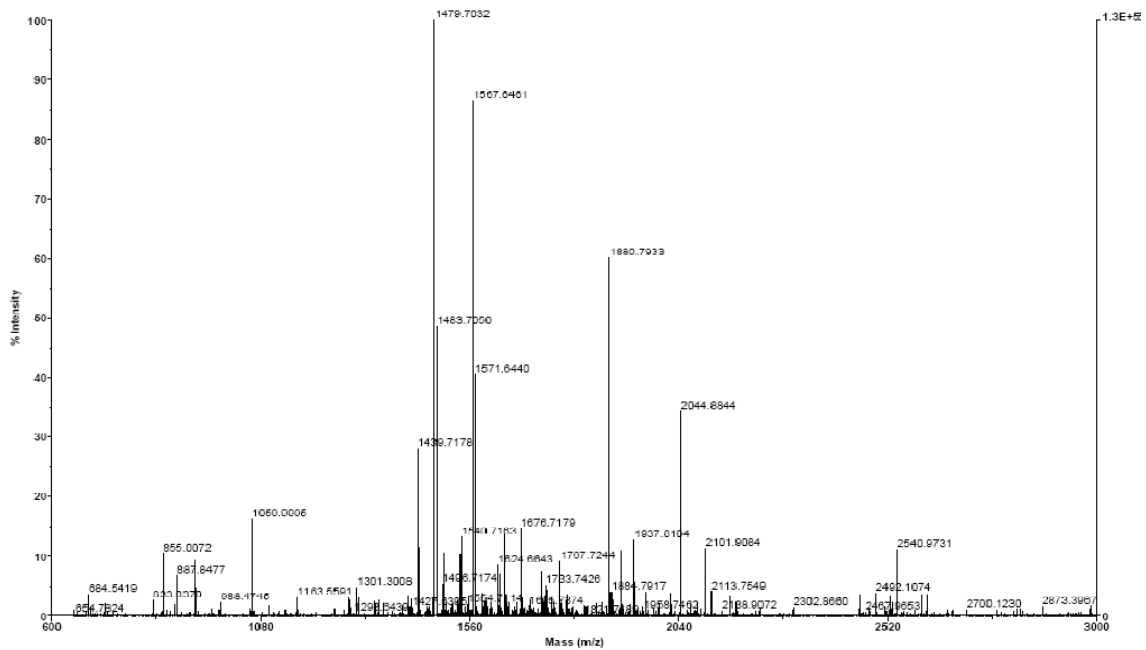


Figura 47 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C2G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

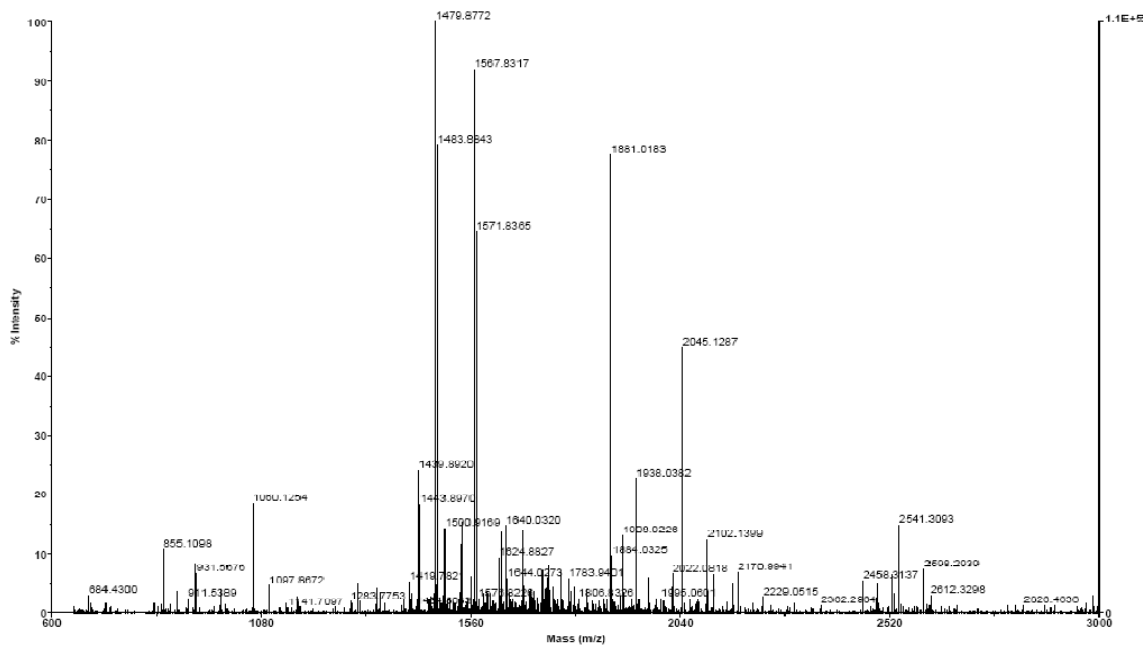


Figura 48 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C3G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

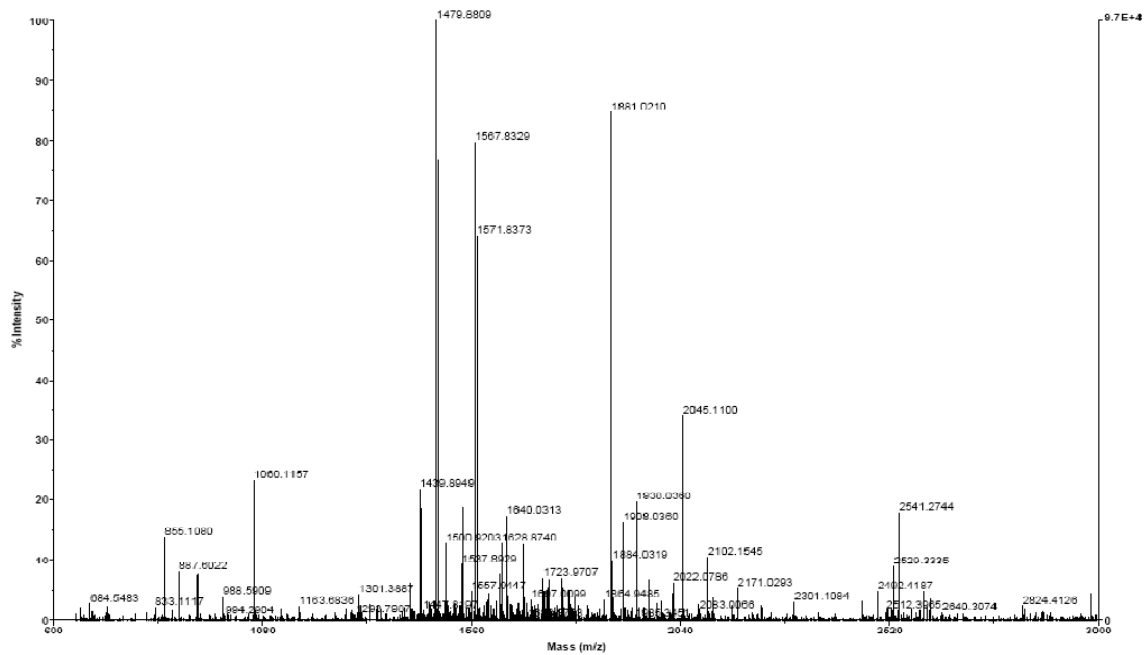


Figura 49 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra C4G: 30 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

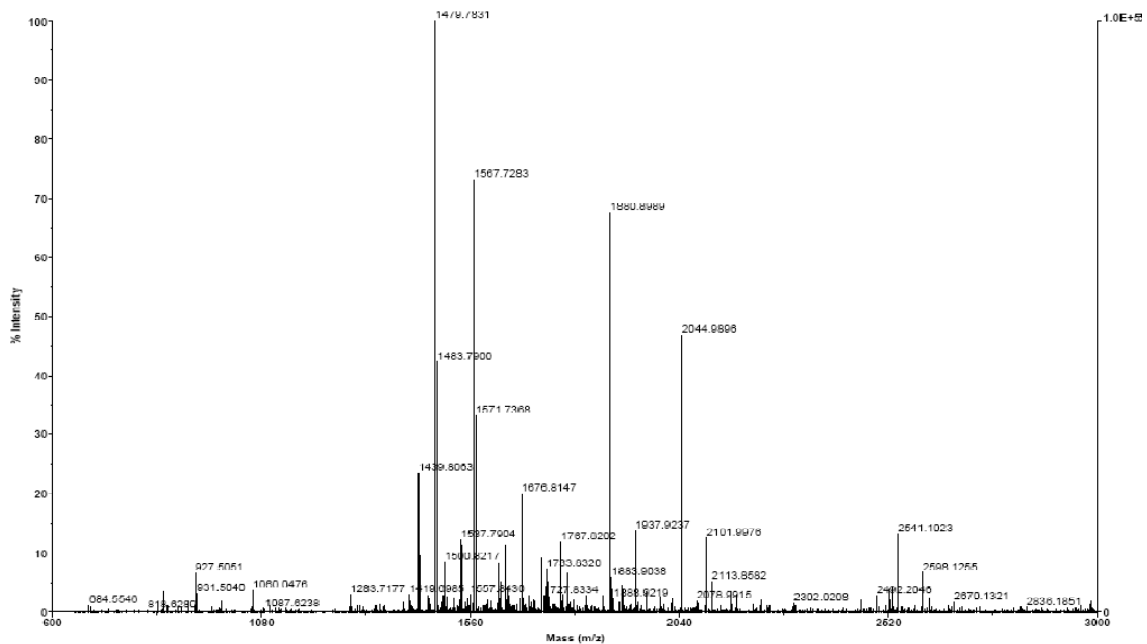


Figura 50 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D1G: 40 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

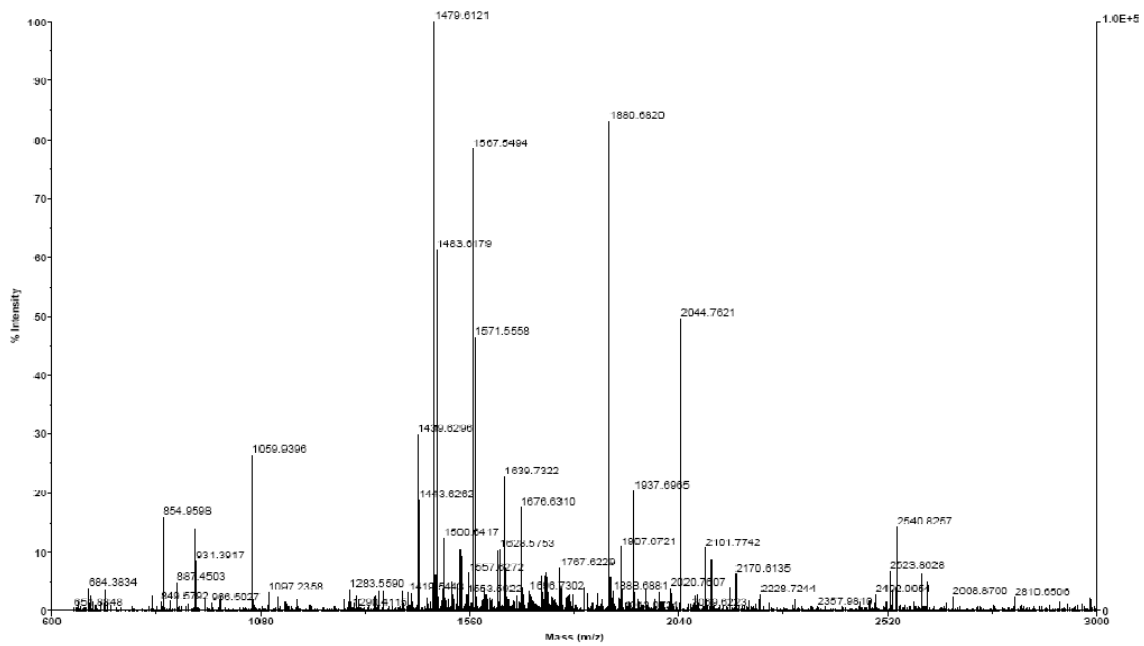


Figura 51 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D2G: 40µg de BSA H_2^{16}O + 40µg BSA H_2^{18}O)

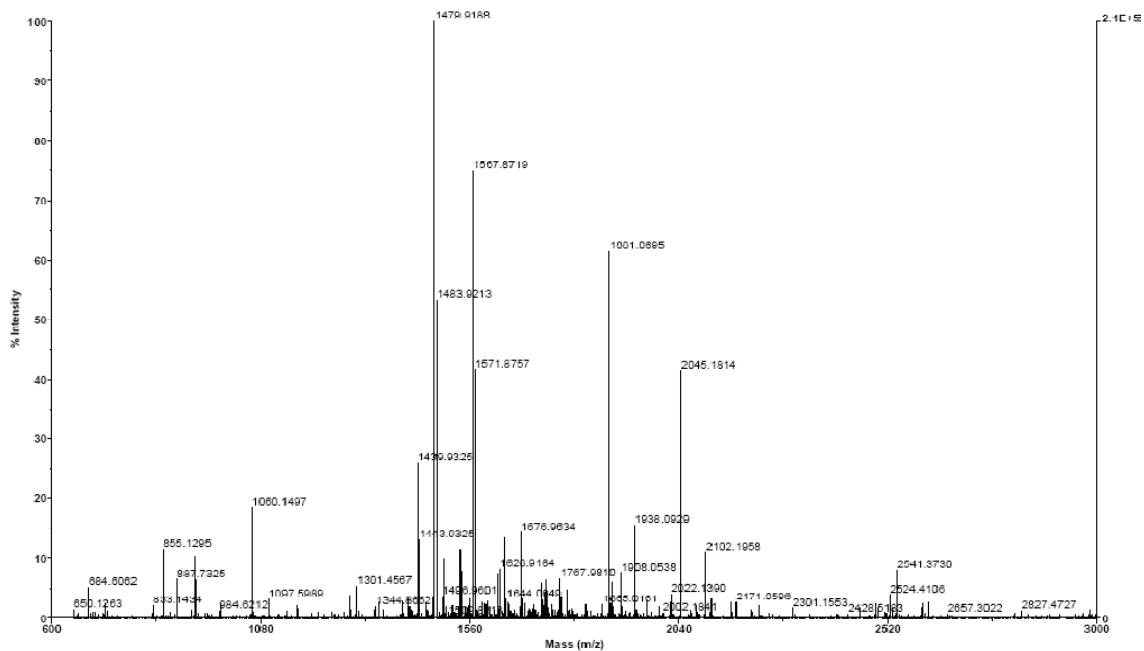


Figura 52 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D3G: 40µg de BSA H_2^{16}O + 40µg BSA H_2^{18}O)

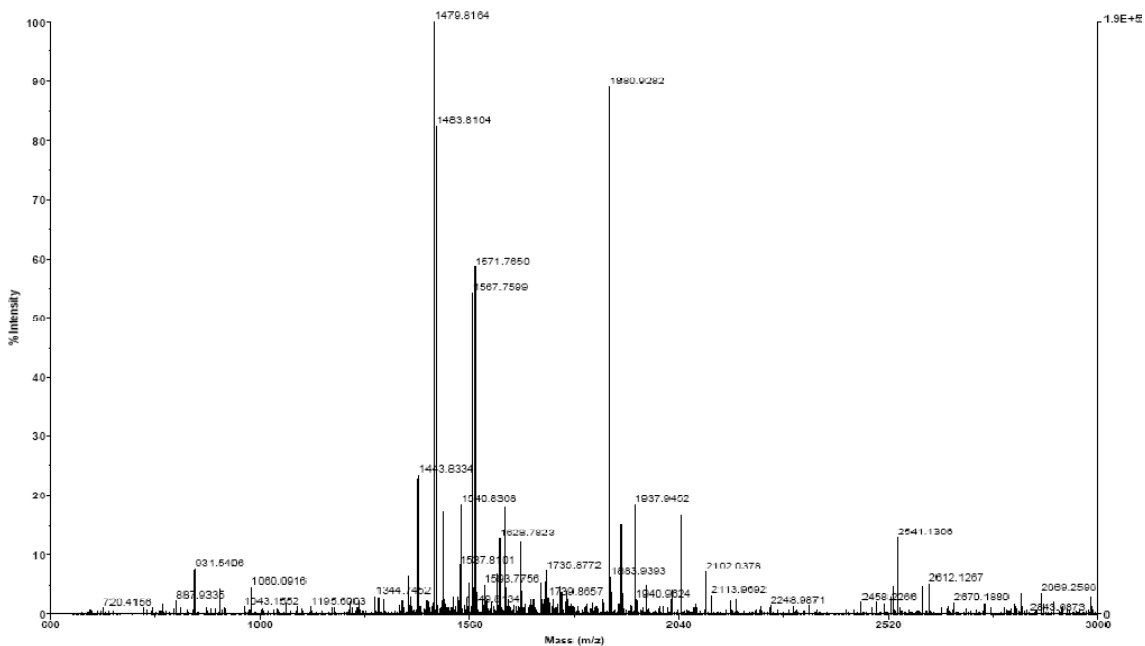


Figura 53 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra D4G: 40µg de BSA H_2^{16}O + 40µg BSA H_2^{18}O)

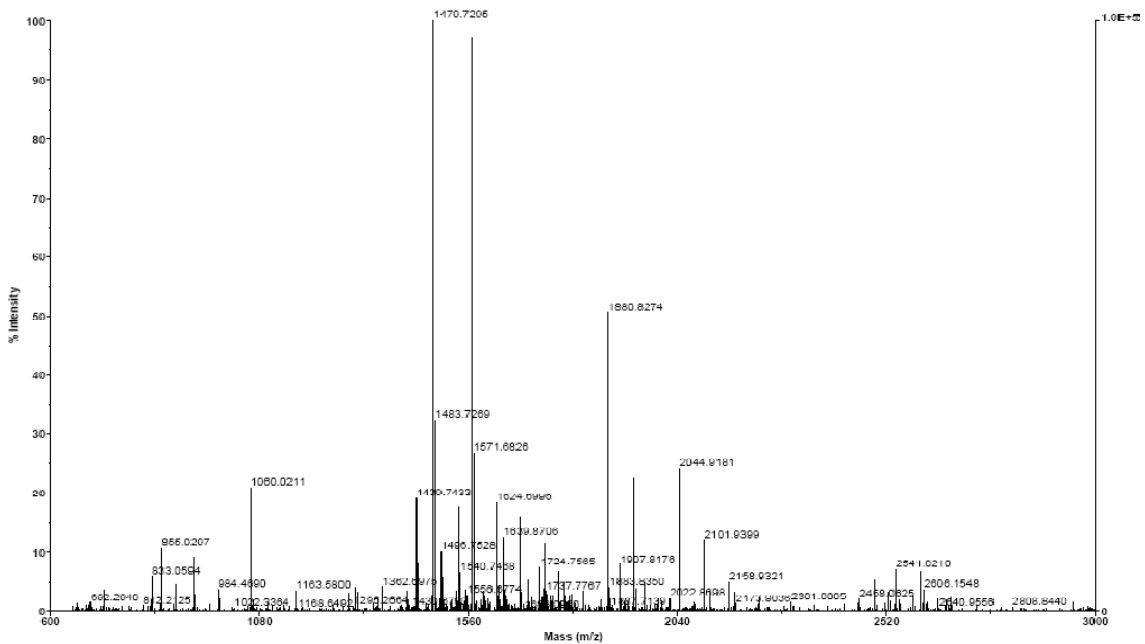


Figura 54 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E1G: 50µg de BSA H_2^{16}O + 40µg BSA H_2^{18}O)

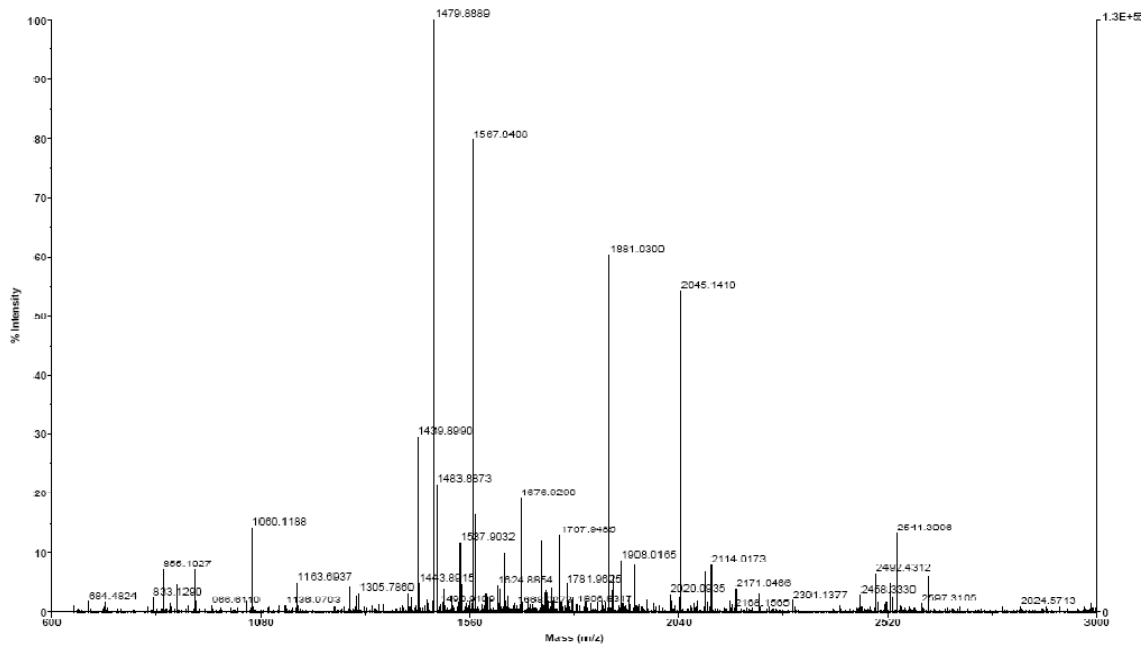


Figura 55 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E2G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

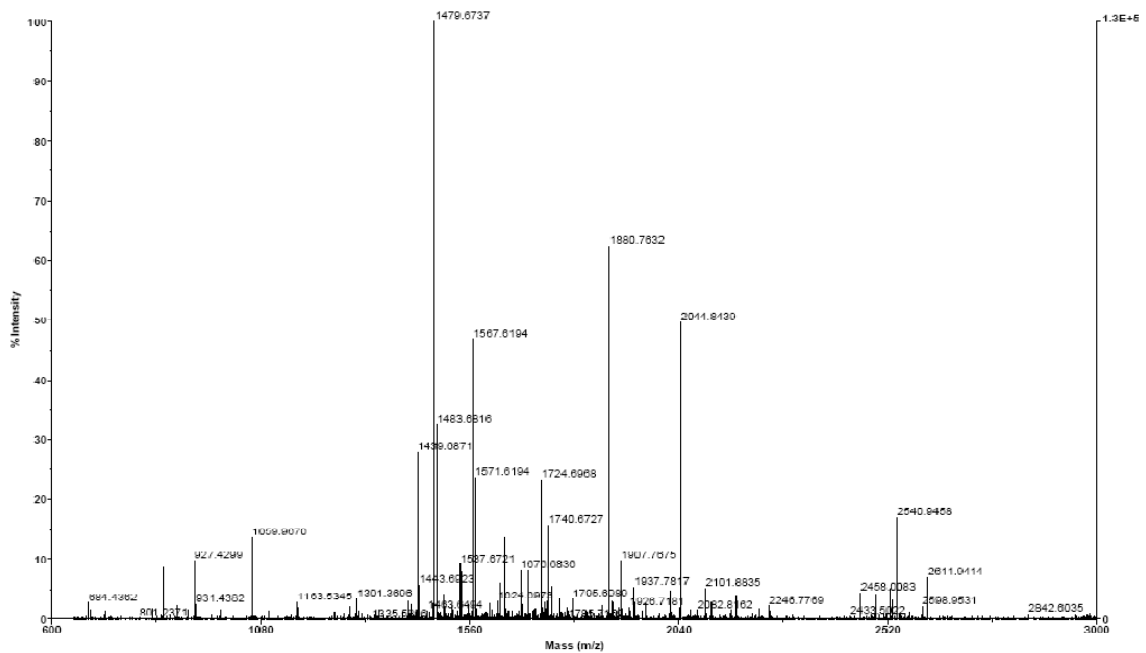


Figura 56 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E3G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

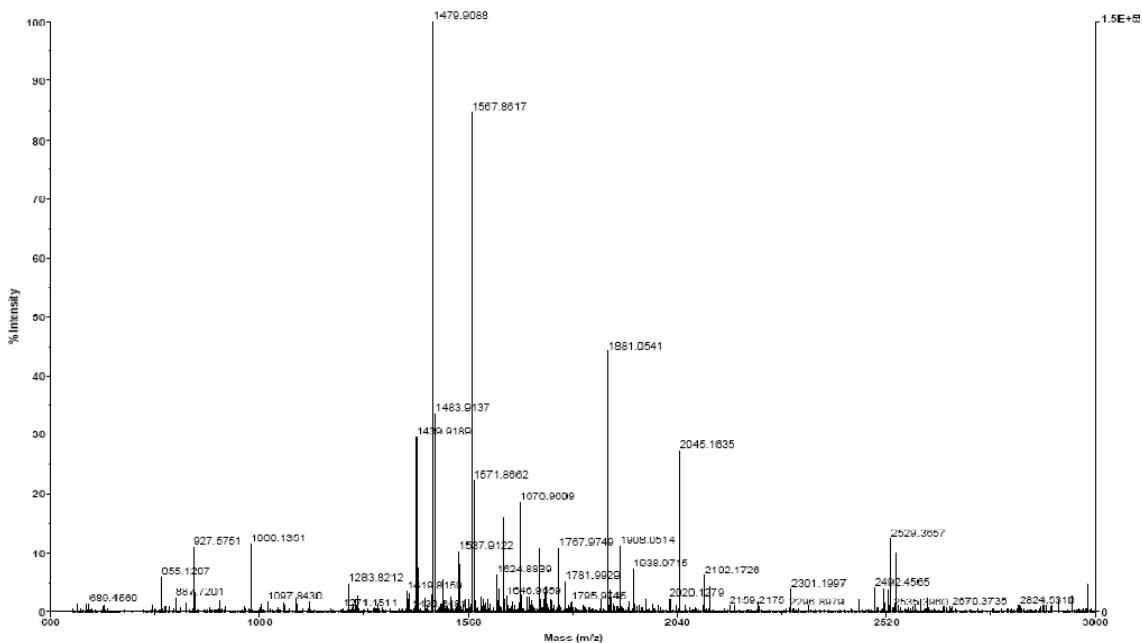


Figura 57 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra E4G: 50 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

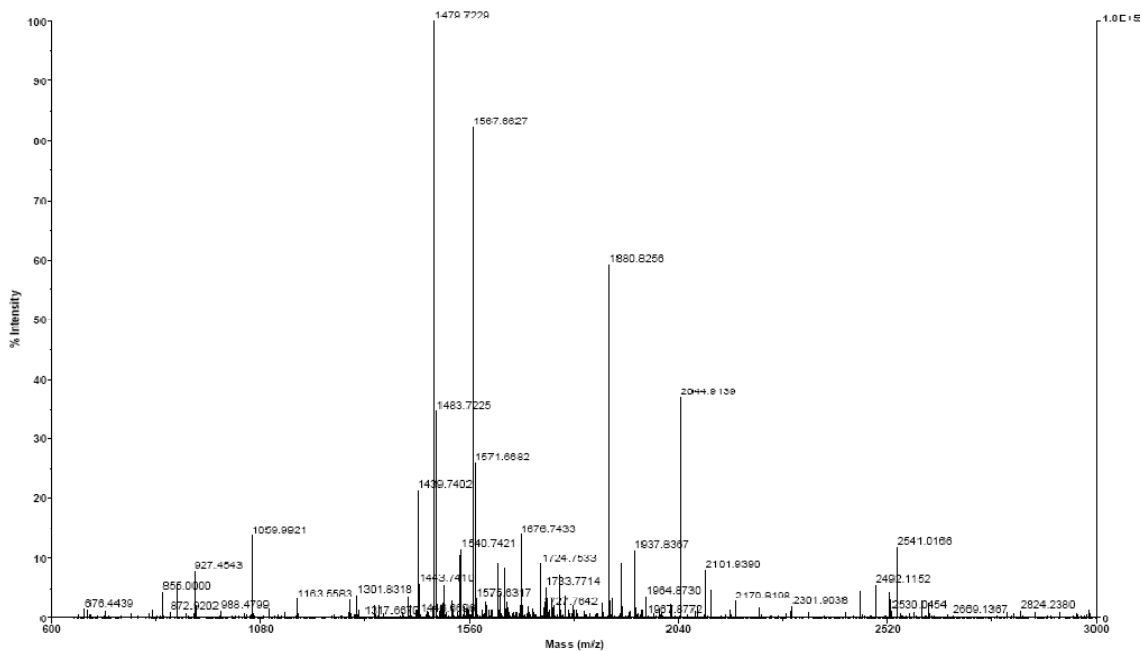


Figura 58 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F1G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

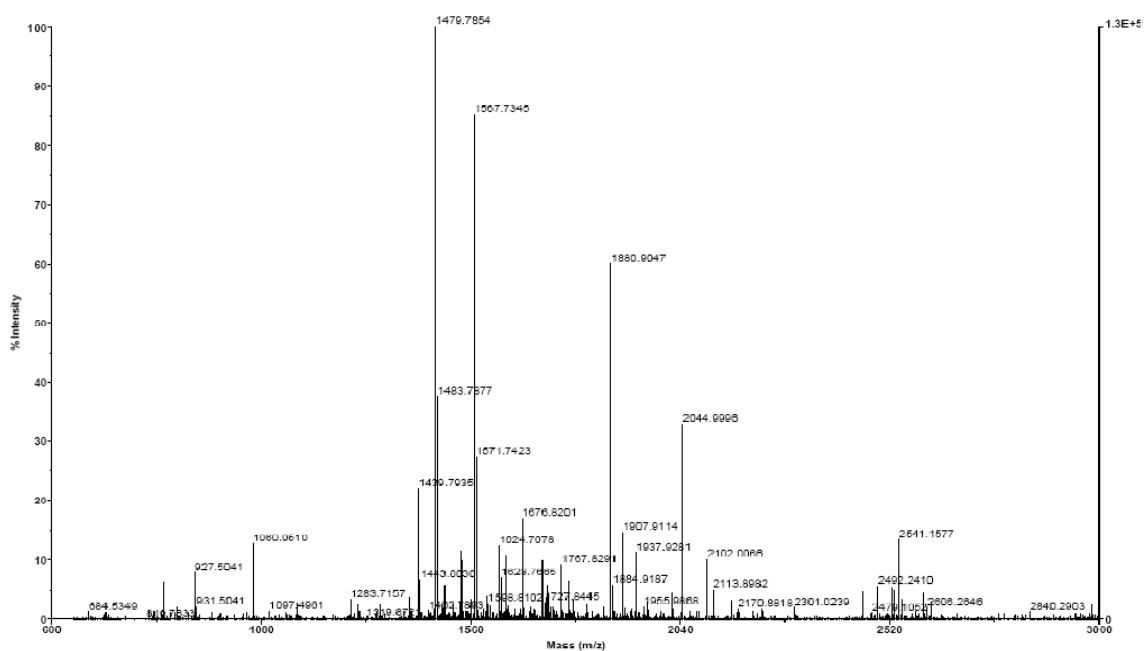


Figura 59 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F2G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

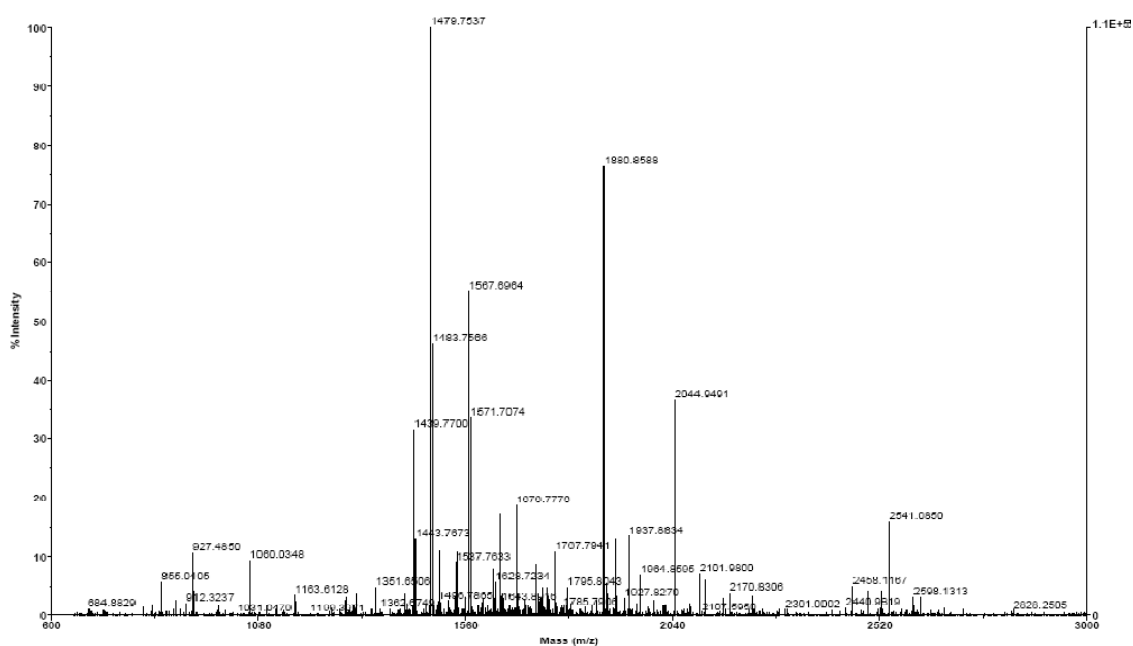


Figura 60 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F3G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

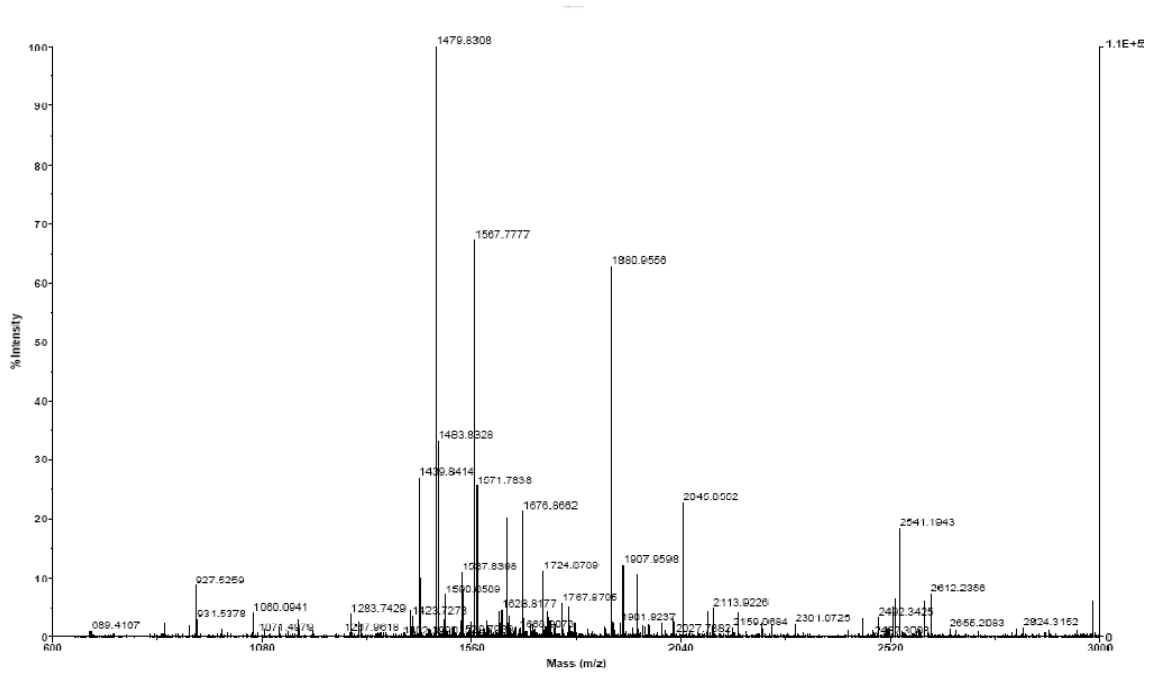


Figura 61 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica com ^{18}O . (Amostra F4G: 60 μg de BSA H_2^{16}O + 40 μg BSA H_2^{18}O)

APÊNDICE B – TABELAS DAS INTENSIDADES RELATIVAS RETIRADAS DOS ESPECTROS DE MASSA DA RECTA DE CALIBRAÇÃO

Tabela 22 – Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras A da recta de calibração.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	A1G		6,07	0,00	0,06	0,09	6,07	5,33	0,88	0,82	0,35
	A2G	1,1	6	0,18			7,10	9,19	1,29		
	A3G		8,34	0,00			8,34	4,93	0,59		
	A4G	0,47	9,81	0,05			10,28	5,42	0,53		
1439,81	A1G	0,25	19,73	0,01	0,07	0,05	19,98	16,53	0,83	0,79	0,30
	A2G	1,91	20,25	0,09			22,16	26,74	1,21		
	A3G	3,43	28,59	0,12			32,02	19,12	0,60		
	A4G	1,34	23,03	0,06			24,37	13,32	0,55		
1479,80	A1G	13,41	94,96	0,14	0,13	0,03	108,37	69,83	0,64	0,65	0,26
	A2G	8,32	83,08	0,10			91,40	92,22	1,01		
	A3G	11,26	100	0,11			111,26	59,56	0,54		
	A4G	17,21	100	0,17			117,21	46,39	0,40		

Tabela 23 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras B da recta de calibração.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	B1G		6,07	0,00	0,05	0,08	6,07	8,87	1,46	1,16	0,38
	B2G	0,23	7,51	0,03			7,74	6,70	0,87		
	B3G	2,47	14,35	0,17			16,82	13,29	0,79		
	B4G		6,65	0,00			6,65	10,05	1,51		
1439,81	B1G	1,06	20,93	0,05	0,03	0,03	21,99	29,51	1,34	1,08	0,38
	B2G	0,09	26,97	0,00			27,06	20,81	0,77		
	B3G	2,07	34,96	0,06			37,03	27,40	0,74		
	B4G		19,89	0,00			19,89	29,39	1,48		
1479,80	B1G	0,77	83,14	0,01	0,07	0,07	83,91	99,87	1,19	0,93	0,36
	B2G	12,58	100	0,13			112,58	69,90	0,62		
	B3G	13,19	100	0,13			113,19	69,73	0,62		
	B4G	1,22	77,02	0,02			78,24	100,00	1,28		

Tabela 24 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras C da recta de calibração.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	C1G	0,15	5,93	0,03	0,01	0,01	6,08	9,97	1,64	1,48	0,46
	C2G		4,63	0,00			4,63	9,41	2,03		
	C3G		6,72	0,00			6,72	8,48	1,26		
	C4G		7,57	0,00			7,57	7,35	0,97		
1439,81	C1G	4,76	10,52	0,45	0,11	0,23	15,28	22,96	1,50	1,61	0,57
	C2G		11,55	0,00			11,55	28,06	2,43		
	C3G		18,33	0,00			18,33	24,18	1,32		
	C4G		18,7	0,00			18,70	21,87	1,17		
1479,80	C1G	12,75	57,65	0,22	0,13	0,07	70,40	100,00	1,42	1,41	0,35
	C2G	4,03	48,54	0,08			52,57	100,00	1,90		
	C3G	4,63	79,28	0,06			83,91	100,00	1,19		
	C4G	12,36	76,71	0,16			89,07	100,00	1,12		

Tabela 25 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras D da recta de calibração.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (St Dev)
927,49	D1G		3,15	0,00	0,00	0,00	3,15	6,58	2,09	1,57	0,47
	D2G		8,55	0,00			8,55	13,94	1,63		
	D3G		6,29	0,00			6,29	10,21	1,62		
	D4G		7,56	0,00			7,56	7,23	0,96		
1439,81	D1G		9,46	0,00	0,03	0,05	9,46	23,44	2,48	1,70	0,66
	D2G	2,14	18,89	0,11			21,03	29,81	1,42		
	D3G		13,24	0,00			13,24	25,95	1,96		
	D4G	0,54	23,48	0,02			24,02	22,97	0,96		
1479,80	D1G	1,98	42,34	0,05	0,08	0,05	44,32	100,00	2,26	1,65	0,49
	D2G	2,29	61,34	0,04			63,63	100,00	1,57		
	D3G	5,46	53,19	0,10			58,65	100,00	1,71		
	D4G	12,51	82,43	0,15			94,94	100,00	1,05		

Tabela 26 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras E da recta de calibração.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	E1G	0,09	2,97	0,03	0,01	0,02	3,06	9,18	3,00	3,53	0,47
	E2G		1,92	0,00			1,92	6,99	3,64		
	E3G		2,36	0,00			2,36	9,73	4,12		
	E4G		3,24	0,00			3,24	10,89	3,36		
1439,81	E1G		8,07	0,00	0,08	0,12	8,07	19,24	2,38	4,00	1,39
	E2G	0,32	4,79	0,07			5,11	29,49	5,77		
	E3G	1,48	5,7	0,26			7,18	27,87	3,88		
	E4G		7,45	0,00			7,45	29,54	3,97		
1479,80	E1G	3,32	32,32	0,10	0,03	0,05	35,64	100,00	2,81	3,37	0,85
	E2G		21,53	0,00			21,53	100,00	4,64		
	E3G		32,58	0,00			32,58	100,00	3,07		
	E4G		33,65	0,00			33,65	100,00	2,97		

Tabela 27 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras F da recta de calibração.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	F1G		2,1	0,00	0,00	0,00	2,10	7,70	3,67	3,21	0,57
	F2G		2,11	0,00			2,11	7,84	3,72		
	F3G		4,17	0,00			4,17	10,67	2,56		
	F4G		3,01	0,00			3,01	8,75	2,91		
1439,81	F1G		5,63	0,00	0,00	0,00	5,63	21,46	3,81	3,09	0,62
	F2G		6,52	0,00			6,52	22,02	3,38		
	F3G		12,87	0,00			12,87	31,71	2,46		
	F4G		10,02	0,00			10,02	26,96	2,69		
1479,80	F1G		34,69	0,00	0,00	0,00	34,69	100,00	2,88	2,68	0,37
	F2G		37,72	0,00			37,72	100,00	2,65		
	F3G		46,25	0,00			46,25	100,00	2,16		
	F4G		33,22	0,00			33,22	100,00	3,01		

APÊNDICE C – ESPECTROS MALDI-TOF-MS DAS AMOSTRAS – TESTE.

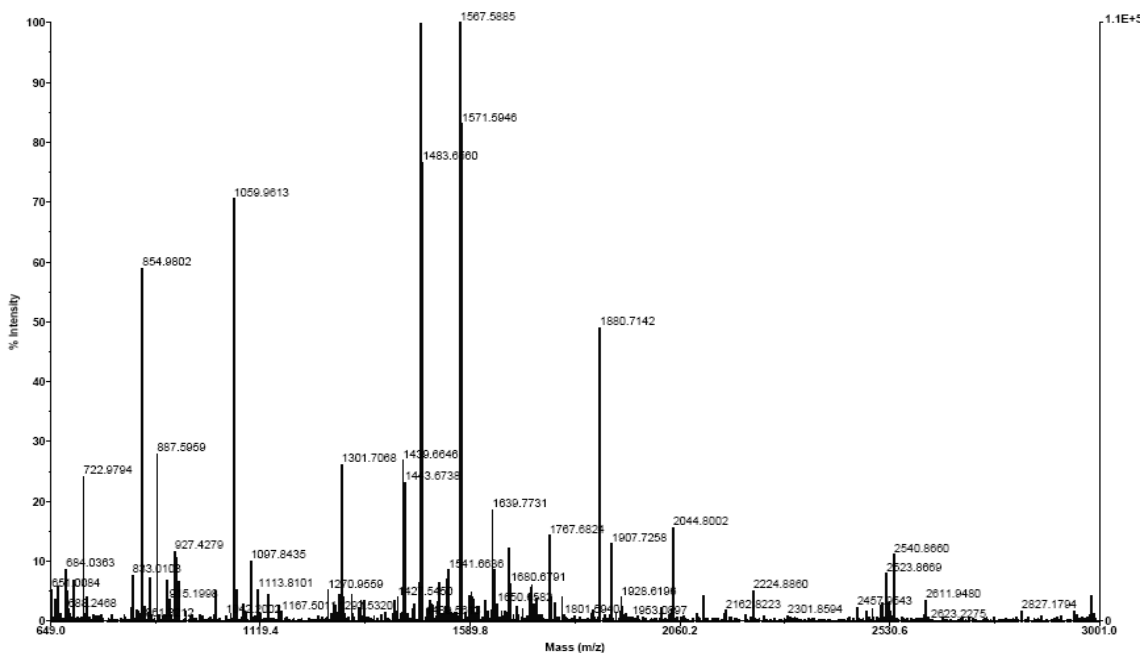


Figura 62 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A1D1)

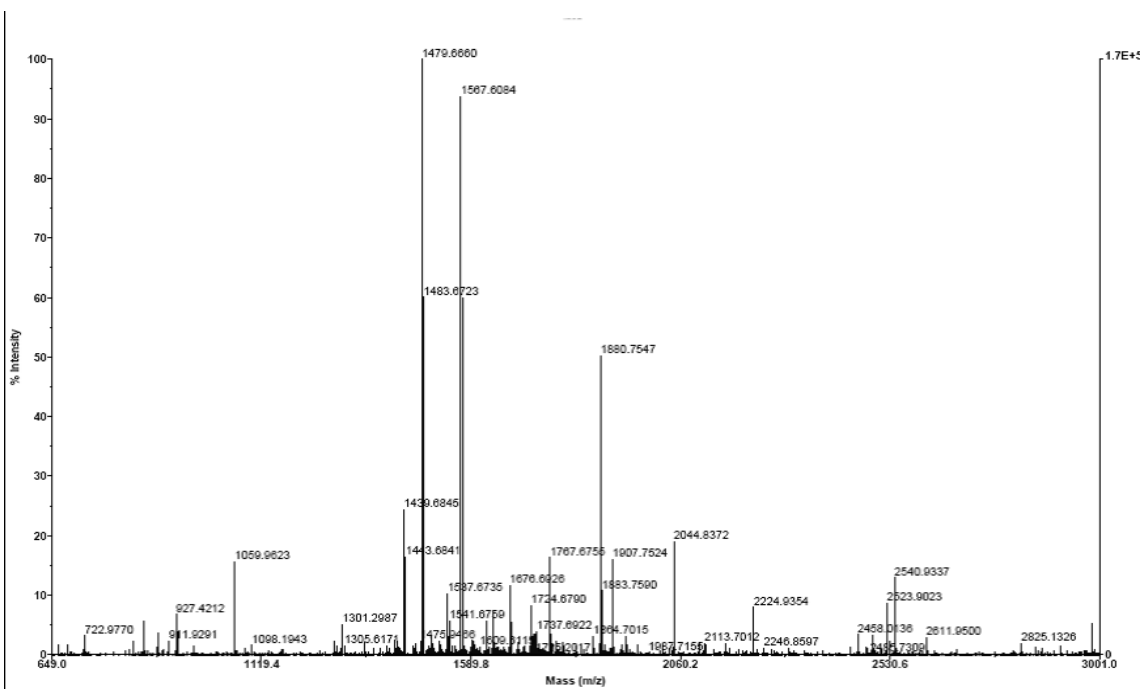


Figura 63 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A1D2)

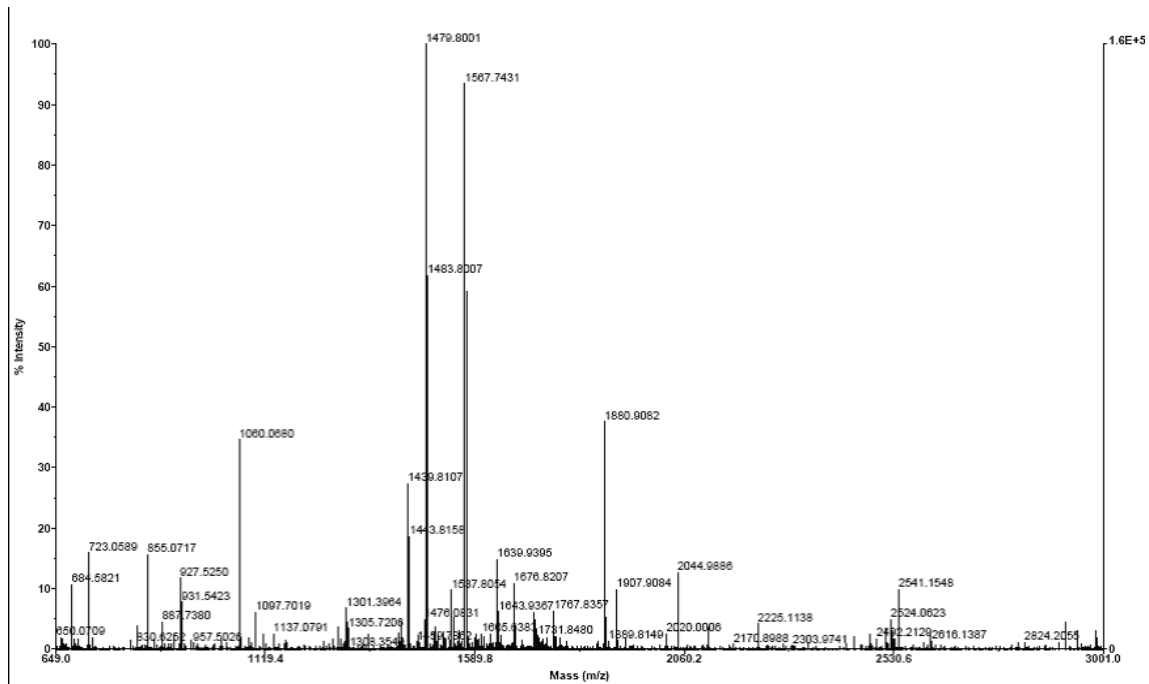


Figura 64 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A2D1)

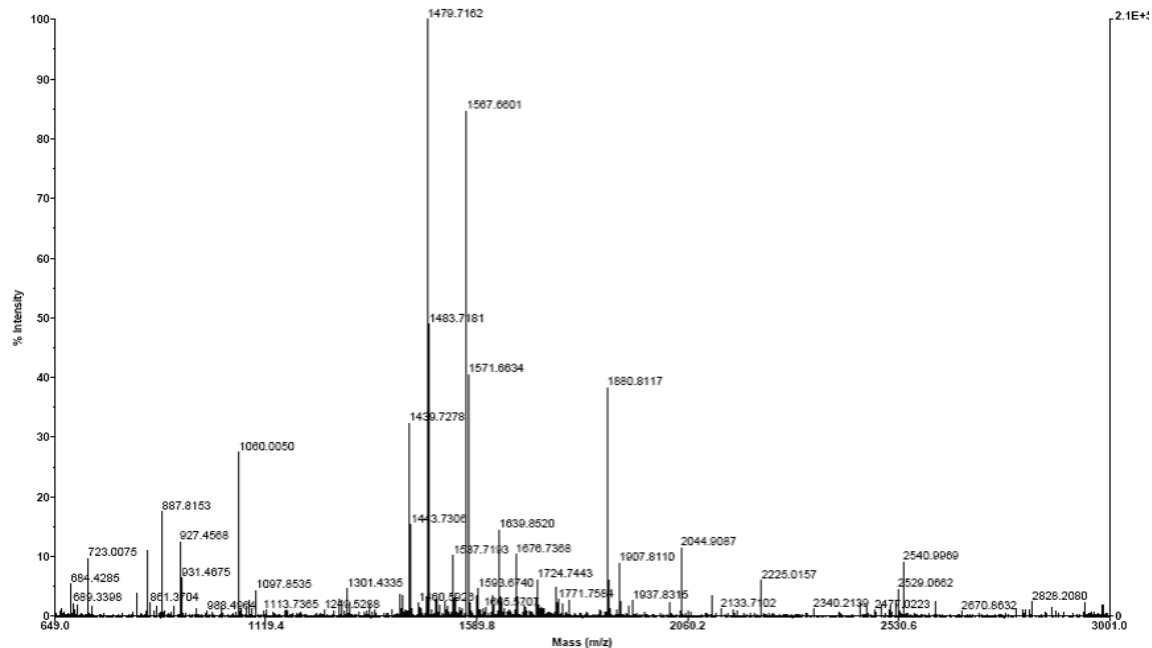


Figura 65 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A2D2)

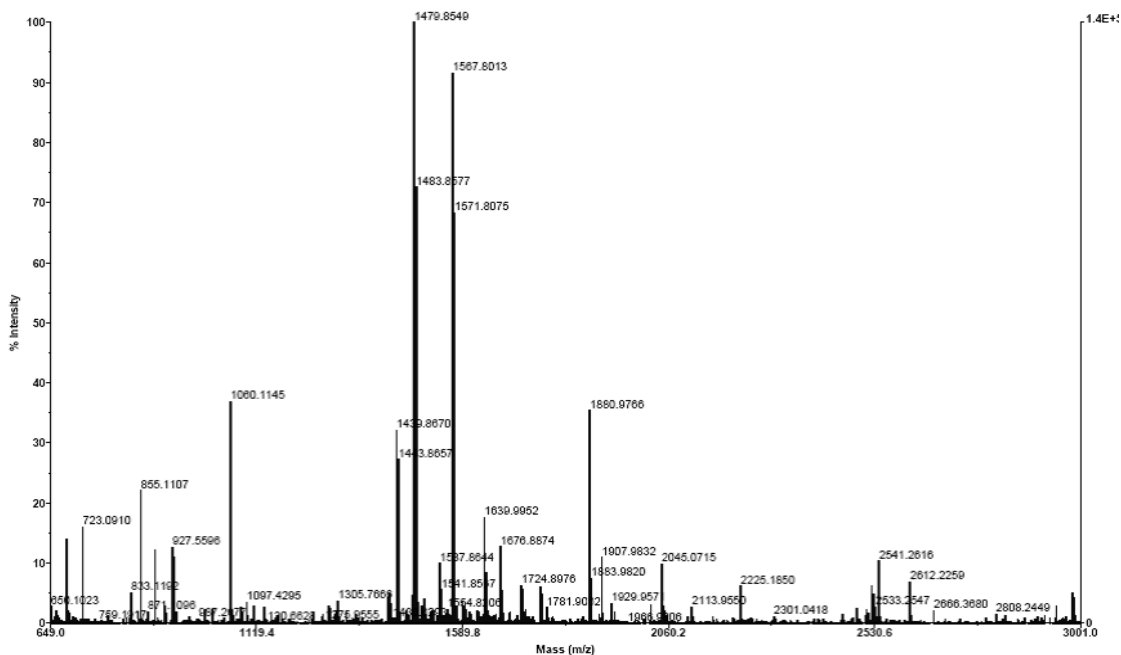


Figura 66 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A3D1)

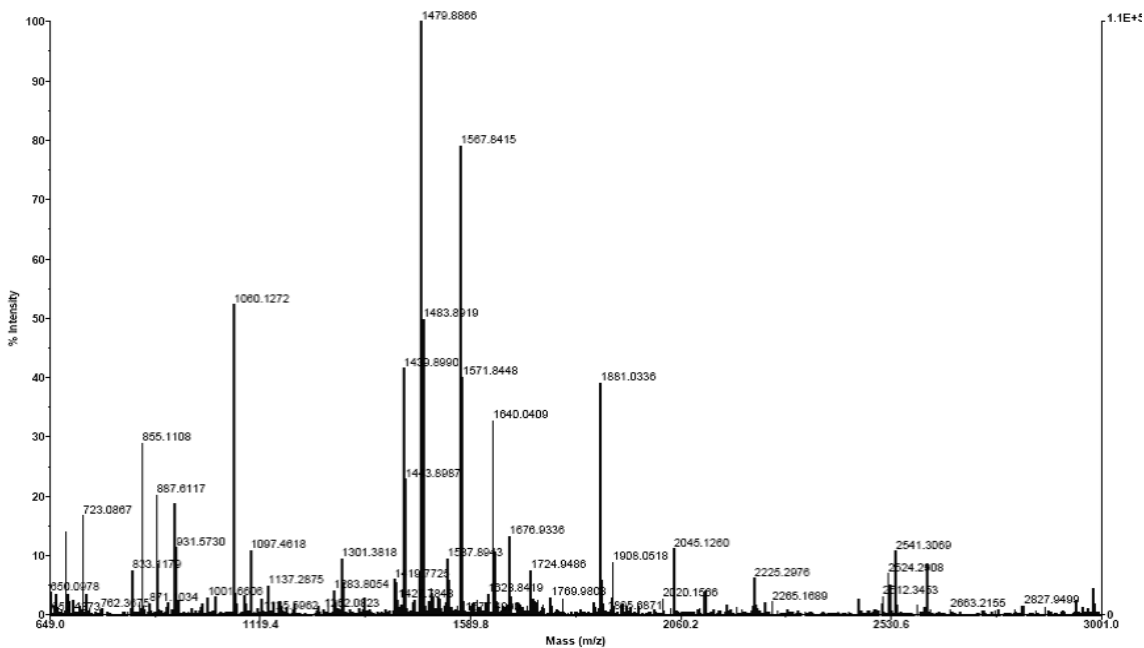


Figura 67 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A3D2)

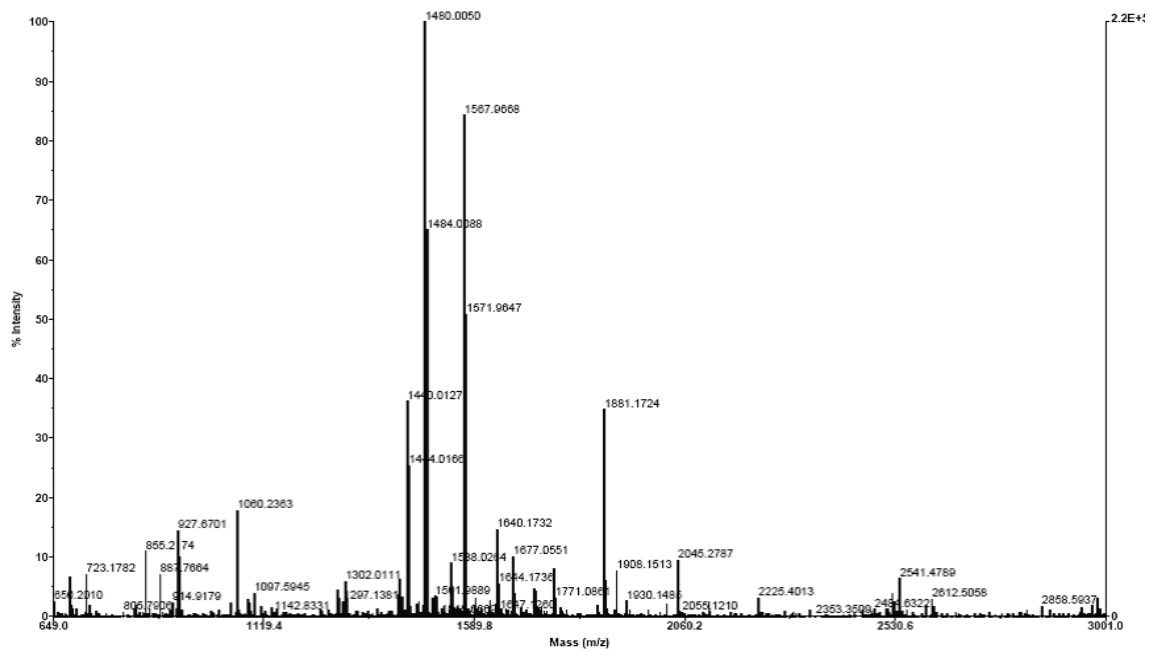


Figura 68 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A4D1)

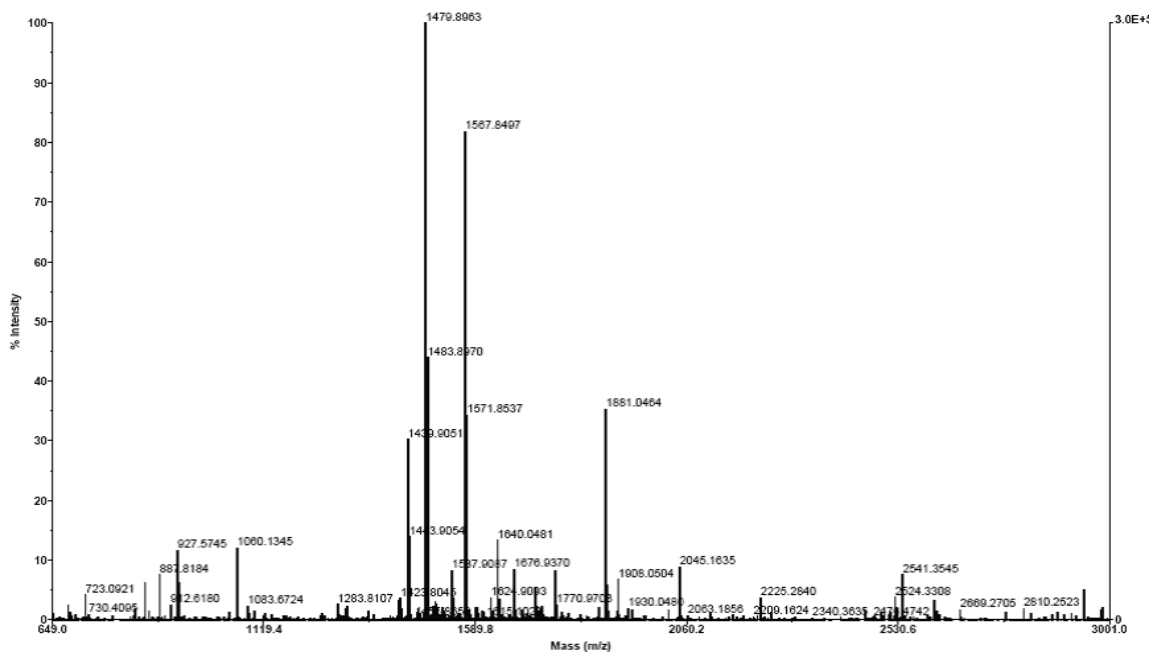


Figura 69 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (1:1) com ^{18}O . (Amostra A4D2)

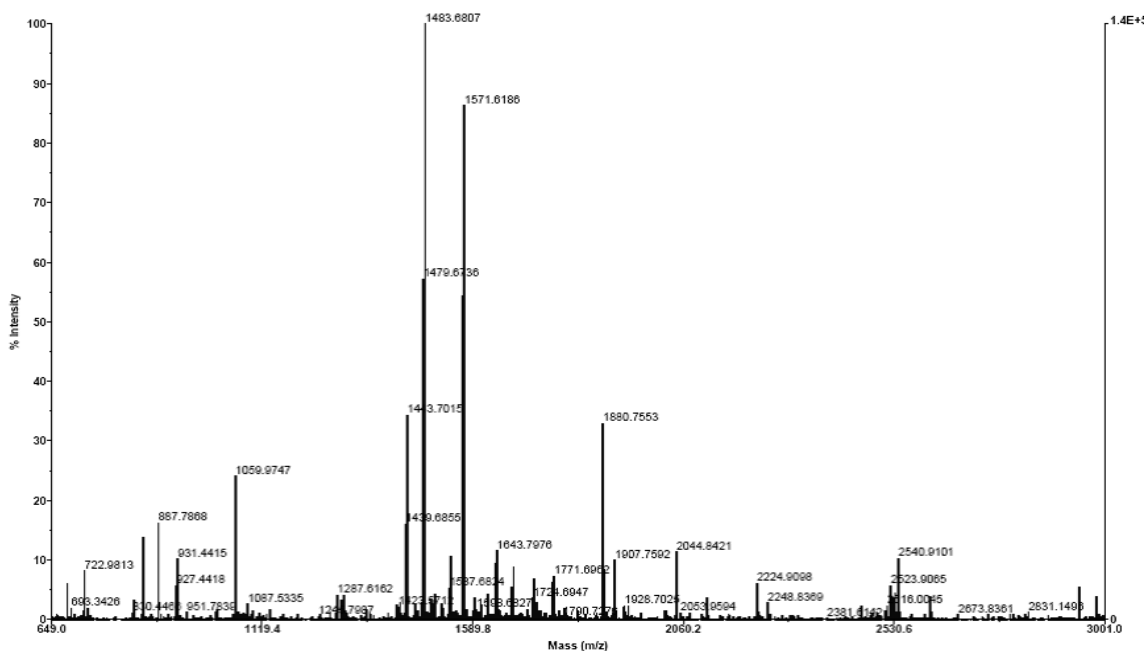


Figura 70 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B1D1)

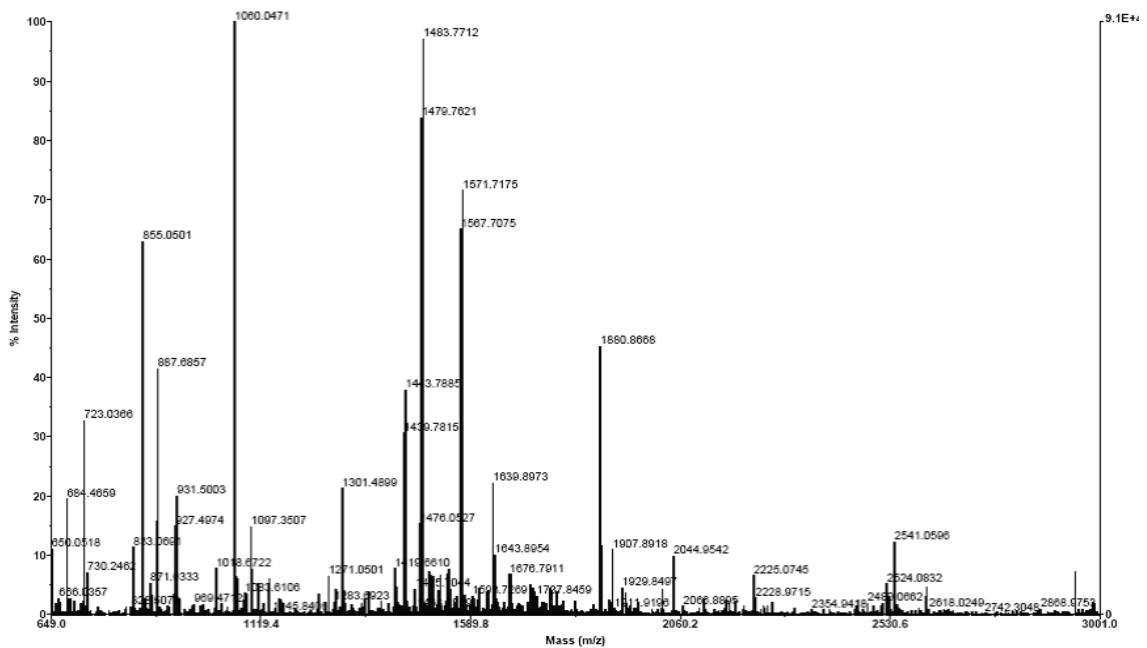


Figura 71 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B1D2)

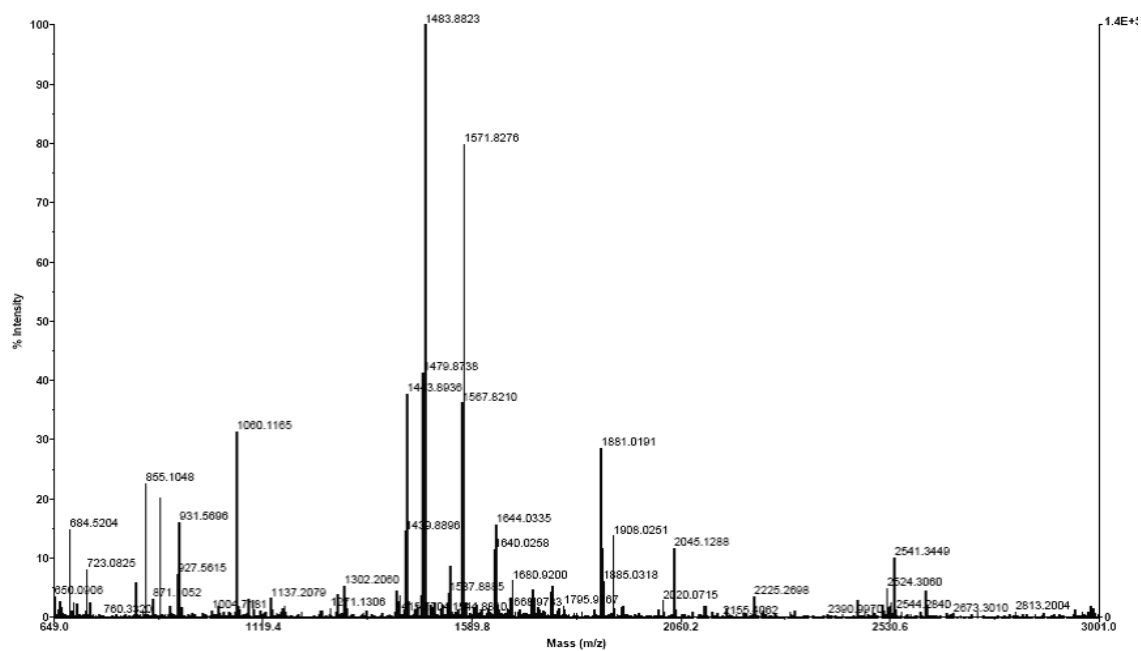


Figura 72 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B2D1)

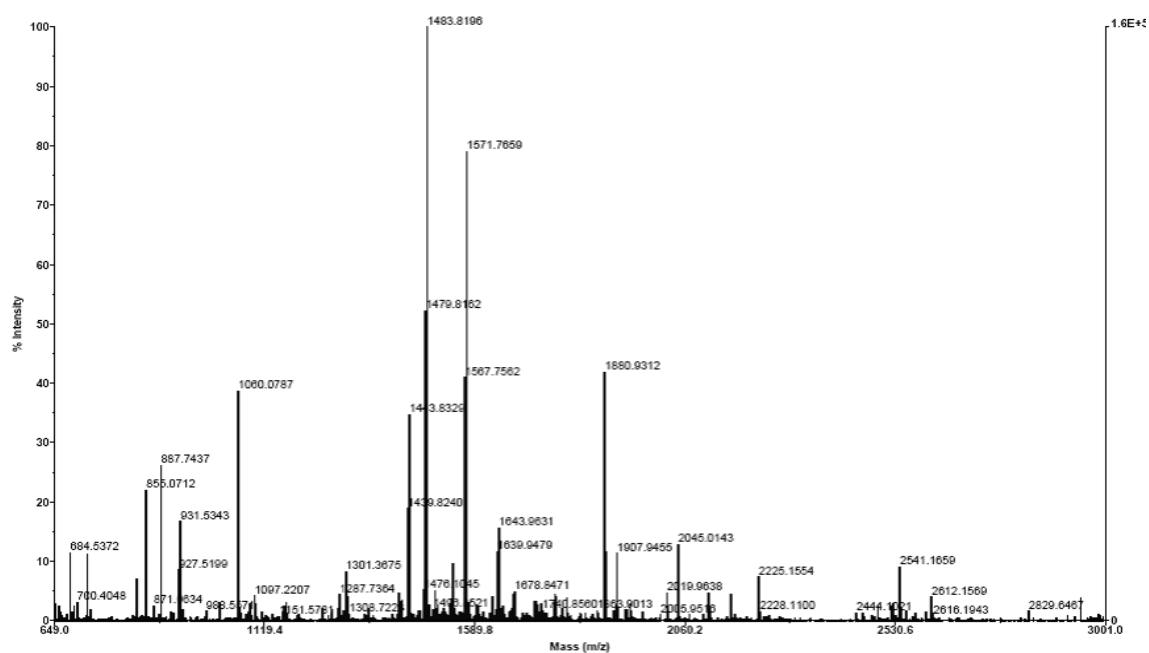


Figura 73 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B2D2)

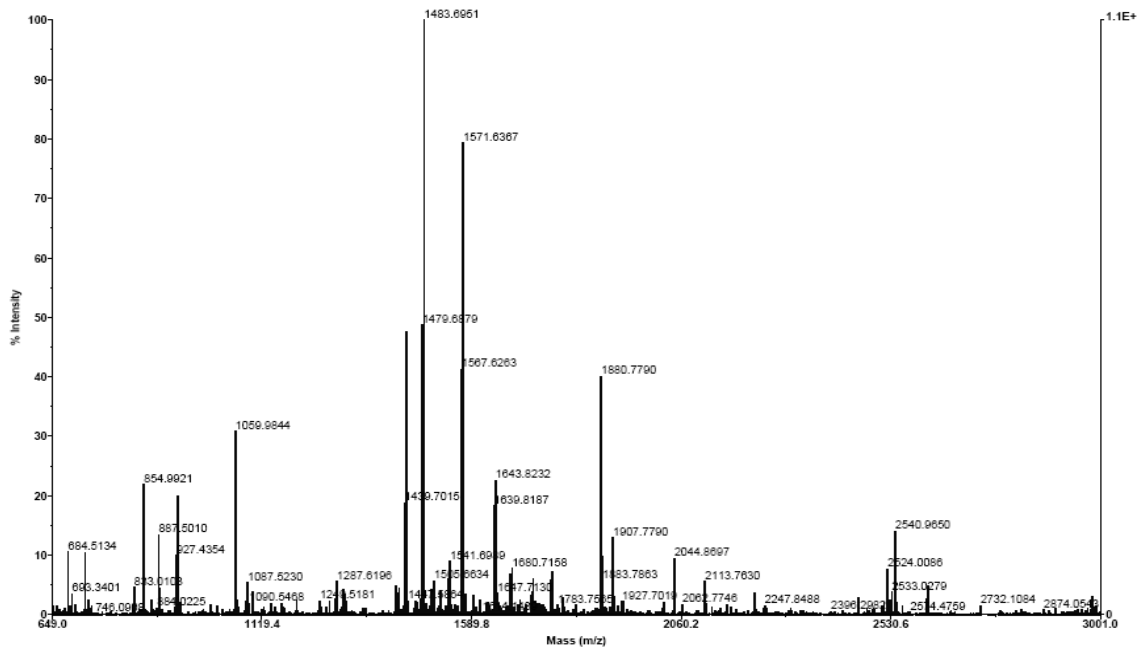


Figura 74 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B3D1)

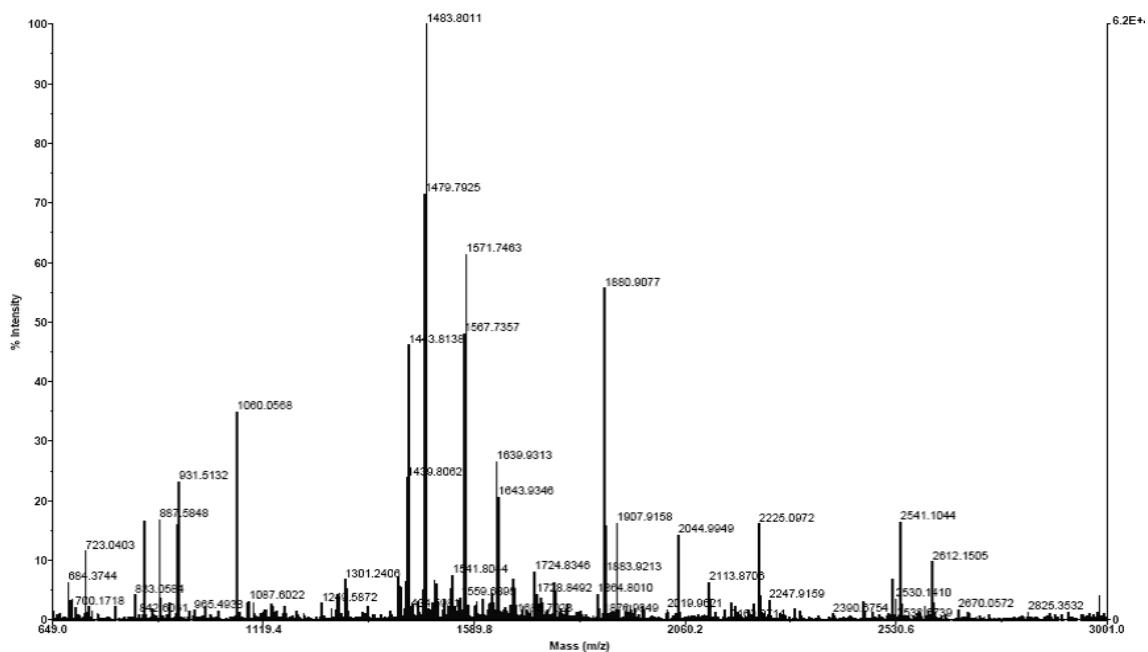


Figura 75 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B3D2)

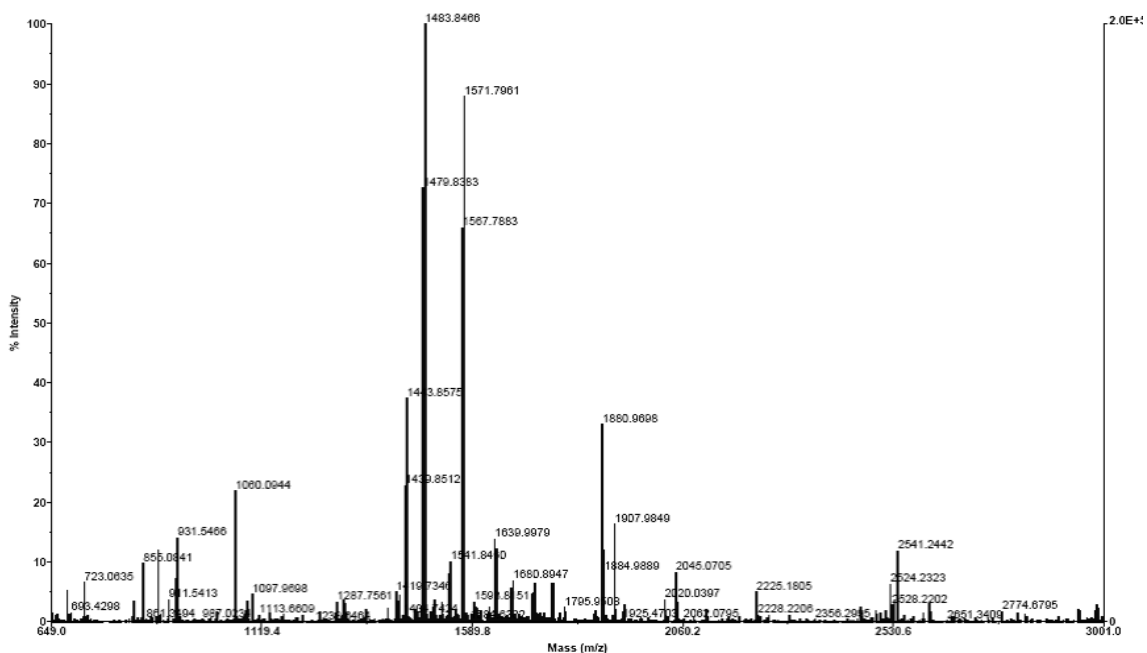


Figura 76 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B4D1)

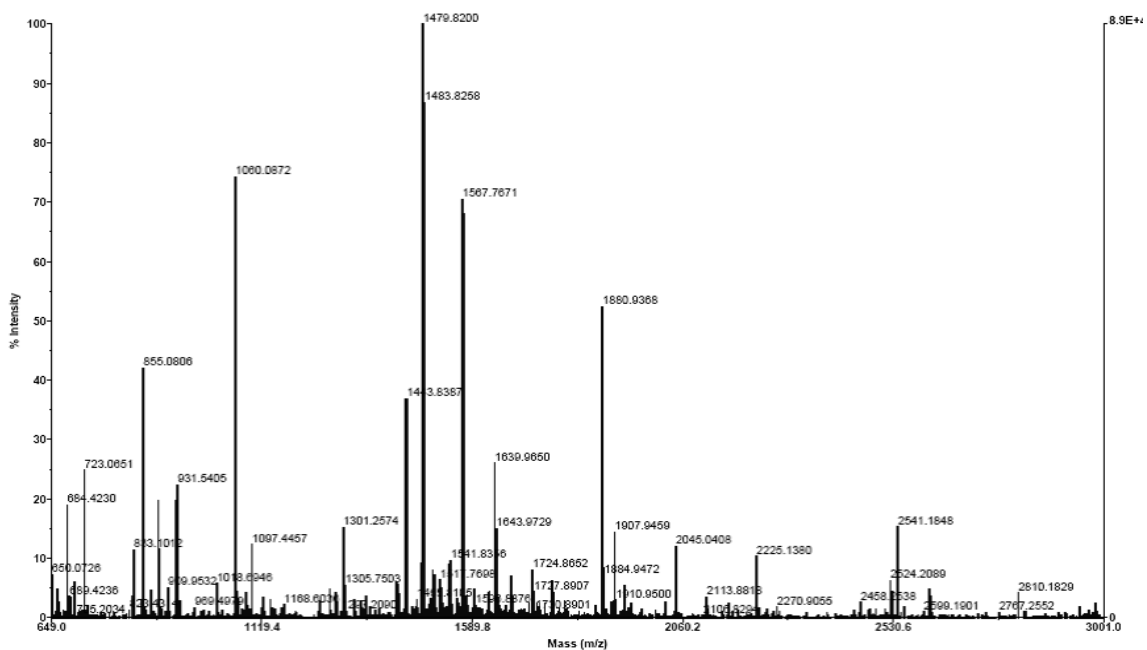


Figura 77 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (5:8) com ^{18}O . (Amostra B4D2)

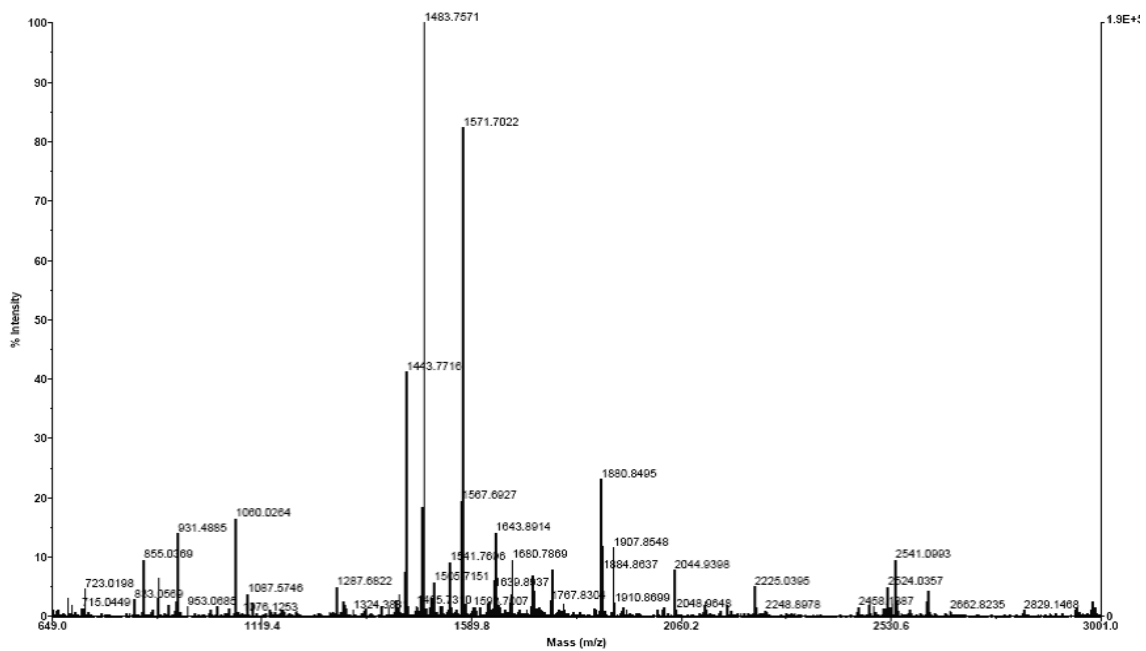


Figura 78 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C1D1)

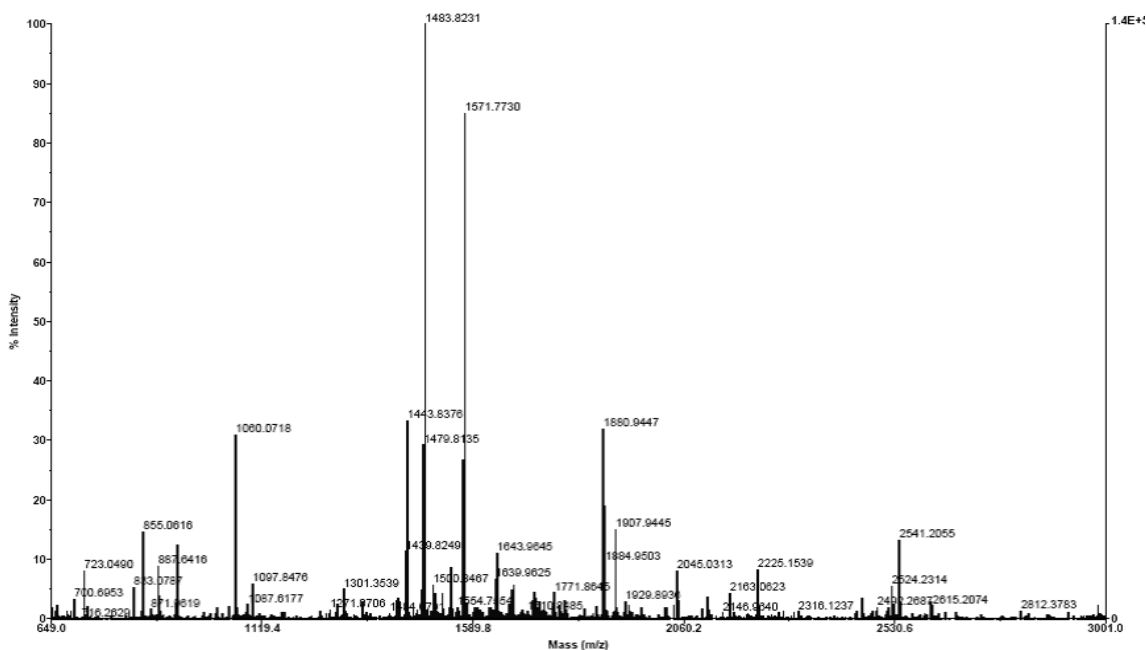


Figura 79 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C1D2)

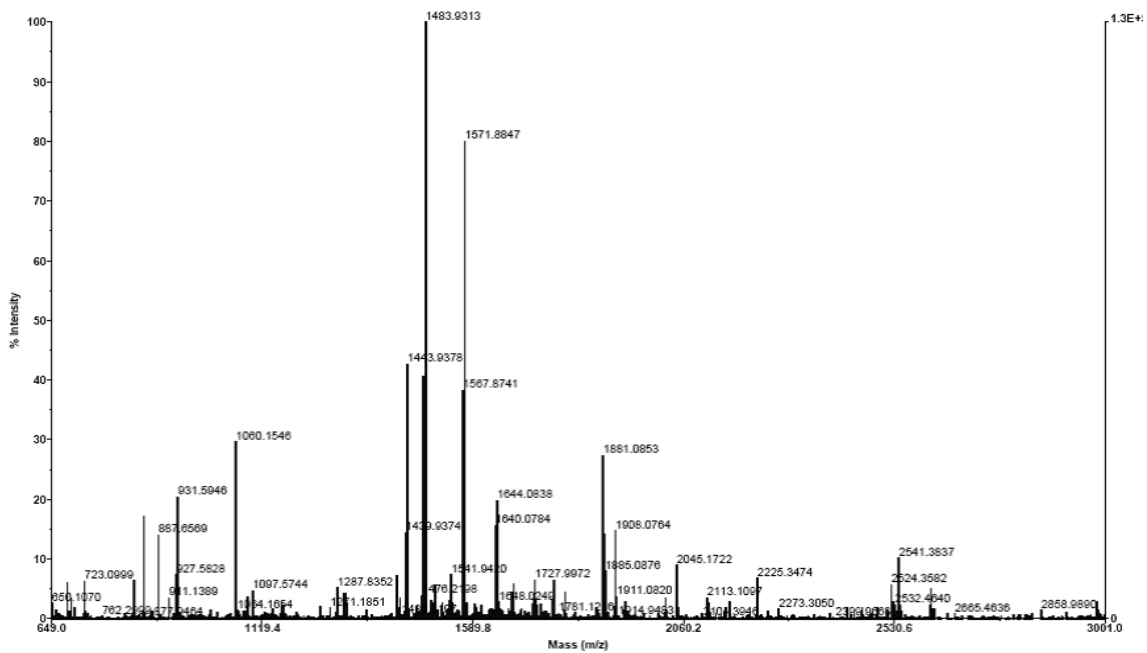


Figura 80 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C2D1)

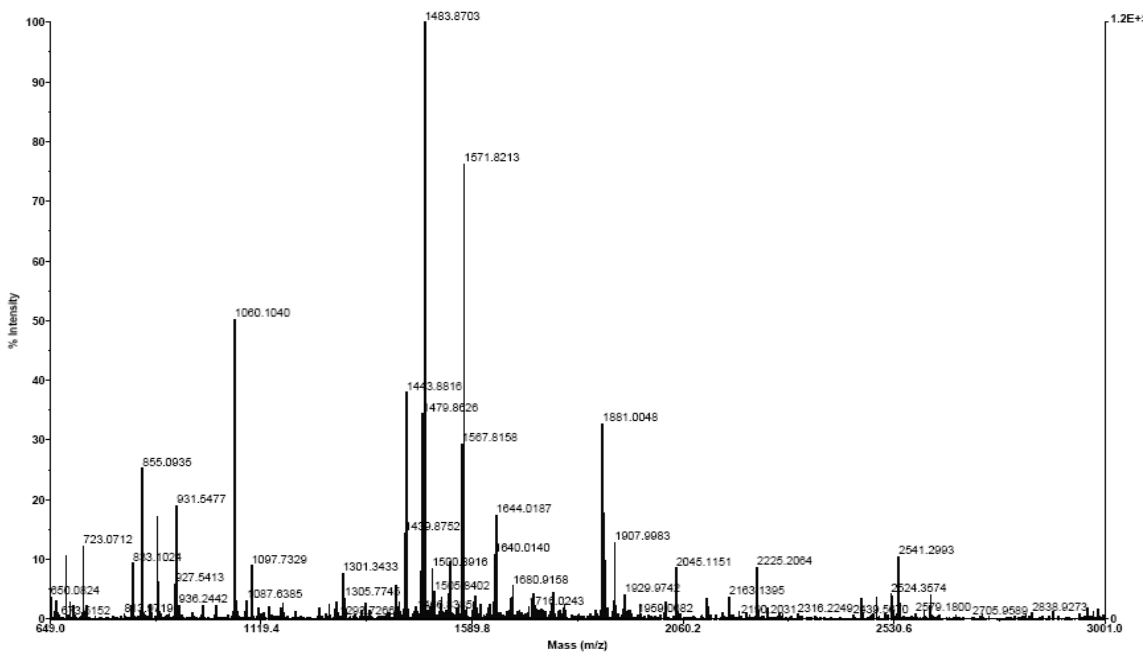


Figura 81 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C2D2)

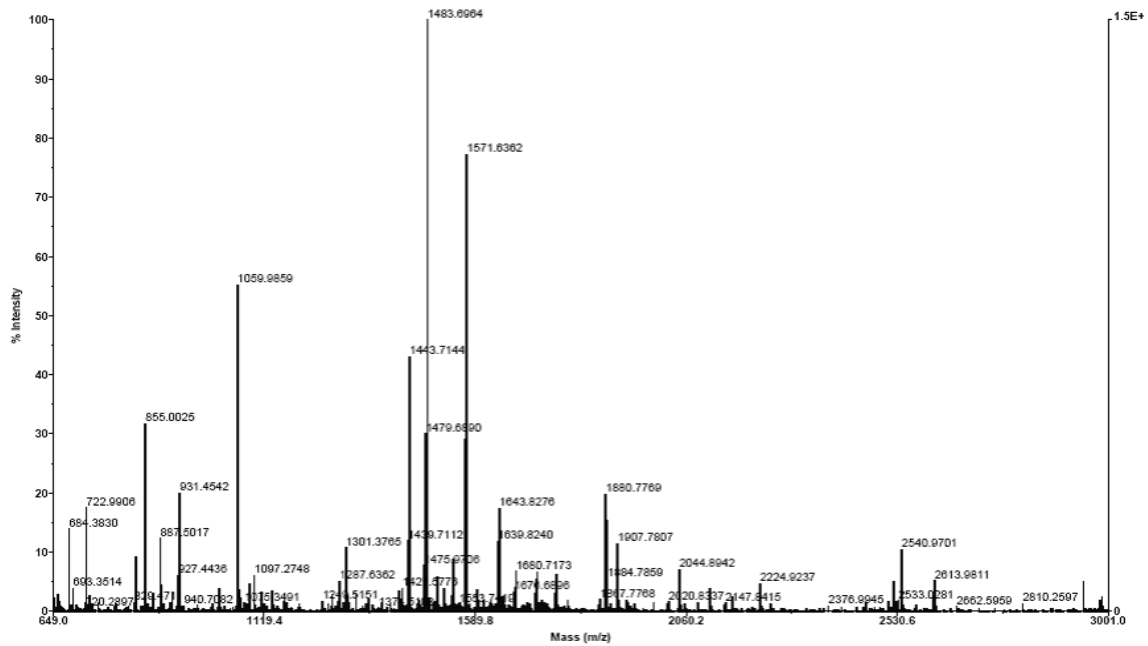


Figura 82 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C3D1)

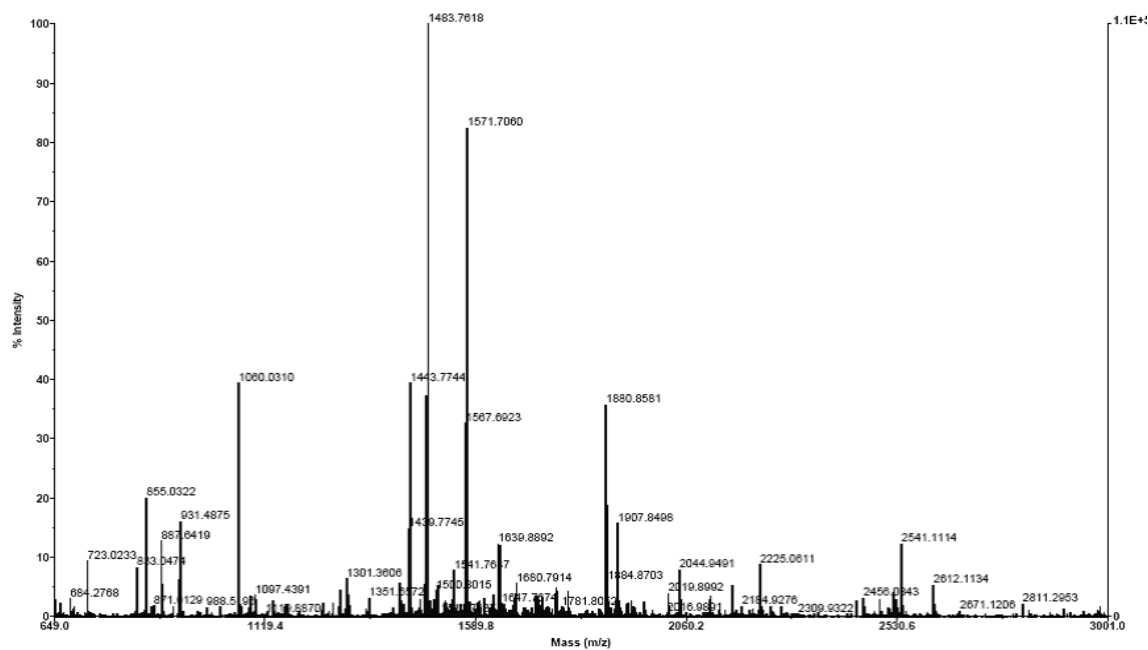


Figura 83 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C3D2)

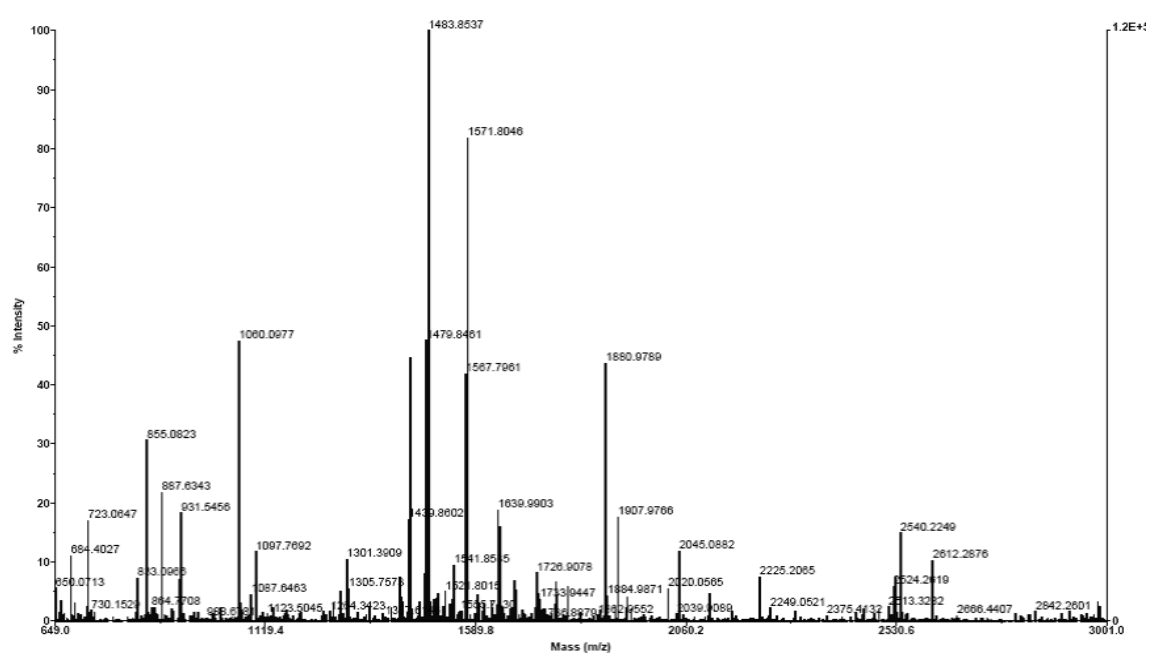


Figura 84 – Espectro de massas adquirido por MALDI-TOF-MS para os péptidos resultantes da hidrólise enzimática da proteína albumina (BSA) com tripsina e posterior marcação isotópica (3:8) com ^{18}O . (Amostra C4D1)

APÊNDICE D – TABELAS DAS INTENSIDADES RELATIVAS RETIRADAS DOS ESPECTROS DE MASSA DAS AMOSTRAS-TESTE

Tabela 28 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste A com o padrão interno 1.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	A1D1		11,64	0,00	0,01	0,02	11,64	12,58	1,08	1,28	0,22
	A2D1		7,81	0,00			7,81	11,75	1,50		
	A3D1	0,43	11,01	0,04			11,44	12,67	1,11		
	A4D1		10,04	0,00			10,04	14,47	1,44		
1439,81	A1D1	0,36	26,49	0,01	0,02	0,04	26,85	26,66	0,99	1,34	0,27
	A2D1		18,64	0,00			18,64	27,32	1,47		
	A3D1	2,30	27,25	0,08			29,55	32,07	1,09		
	A4D1		25,36	0,00			25,36	36,18	1,43		
1479,80	A1D1		85,97	0,00	0,02	0,04	85,97	97,81	1,14	1,34	0,27
	A2D1		61,79	0,00			61,79	100,00	1,62		
	A3D1	2,3	27,25	0,08			29,55	32,07	1,09		
	A4D1		65	0,00			65,00	100,00	1,54		

Tabela 29 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste A com o padrão interno 2.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	A1D2		3,82	0,00	0,00	0,00	3,82	6,80	1,78	1,80	0,12
	A2D2		6,34	0,00			6,34	12,42	1,96		
	A3D2		11,37	0,00			11,37	18,83	1,66		
	A4D2		6,22	0,00			6,22	11,16	1,79		
1439,81	A1D2	0,37	16,38	0,02	0,01	0,01	16,75	24,32	1,45	1,88	0,32
	A2D2		15,34	0,00			15,34	32,27	2,10		
	A3D2		22,89	0,00			22,89	41,59	1,82		
	A4D2	0,21	13,94	0,02			14,15	30,21	2,13		
1479,80	A1D2		60,03	0,00	0,00	0,00	60,03	100,00	1,67	2,00	0,25
	A2D2		48,93	0,00			48,93	100,00	2,04		
	A3D2		49,83	0,00			49,83	100,00	2,01		
	A4D2		43,97	0,00			43,97	100,00	2,27		

Tabela 30 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste B com o padrão interno 1.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	B1D1	0,61	10,17	0,06	0,06	0,00	10,78	5,65	0,52	0,47	0,04
	B2D1	1,09	15,96	0,07			17,05	7,26	0,43		
	B3D1	1,31	20,03	0,07			21,34	9,94	0,47		
	B4D1	0,84	14,07	0,06			14,91	7,20	0,48		
1439,81	B1D1	3,3	34,35	0,10	0,08	0,03	37,65	16,03	0,43	0,43	0,11
	B2D1	2,88	37,73	0,08			40,61	14,50	0,36		
	B3D1	5,13	47,67	0,11			52,80	18,80	0,36		
	B4D1	1,6	37,42	0,04			39,02	22,83	0,59		
1479,80	B1D1	4,78	100	0,05	0,07	0,03	104,78	57,20	0,55	0,52	0,14
	B2D1	9,36	100	0,09			109,36	41,29	0,38		
	B3D1	9,21	100	0,09			109,21	48,73	0,45		
	B4D1	3,04	100	0,03			103,04	72,57	0,70		

Tabela 31 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste B com o padrão interno 2.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	B1D2	0,51	19,94	0,03	0,02	0,03	20,45	14,90	0,73	0,70	0,17
	B2D2	1,19	16,71	0,07			17,90	8,53	0,48		
	B3D2		23,15	0,00			23,15	16,04	0,69		
	B4D2		22,38	0,00			22,38	19,80	0,88		
1439,81	B1D2	3,96	37,94	0,10	0,09	0,04	41,90	30,66	0,73	0,66	0,24
	B2D2	3,32	34,76	0,10			38,08	18,87	0,50		
	B3D2	6,06	46,15	0,13			52,21	23,84	0,46		
	B4D2	0,99	36,87	0,03			37,86	36,77	0,97		
1479,80	B1D2	6,2	97,09	0,06	0,04	0,03	103,29	83,85	0,81	0,78	0,28
	B2D2	6,45	100	0,06			106,45	52,21	0,49		
	B3D2	4,78	100	0,05			104,78	71,45	0,68		
	B4D2		86,74	0,00			86,74	100,00	1,15		

Tabela 32 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste C com o padrão interno 1.


Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	C1D1	1,35	13,96	0,10	0,07	0,02	15,31	2,49	0,16	0,27	0,08
	C2D1	0,95	20,35	0,05			21,30	7,39	0,35		
	C3D1	1,62	19,94	0,08			21,56	6,12	0,28		
	C4D1	1,3	18,01	0,07			19,31	5,40	0,28		
1439,81	C1D1	3,99	41,17	0,10	0,11	0,01	45,16	7,38	0,16	0,24	0,06
	C2D1	4,73	42,71	0,11			47,44	14,46	0,30		
	C3D1	4,49	43,05	0,10			47,54	11,98	0,25		
	C4D1	5,06	43,83	0,12			48,89	11,54	0,24		
1479,80	C1D1	11,22	100	0,11	0,11	0,02	111,22	18,40	0,17	0,27	0,09
	C2D1	8,6	100	0,09			108,60	40,68	0,37		
	C3D1	11,17	100	0,11			111,17	30,03	0,27		
	C4D1	12,78	100	0,13			112,78	32,21	0,29		

Tabela 33 - Valores das intensidades relativas dos diferentes iões e respectivos rácios de $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ e $^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ das amostras-teste C com o padrão interno 2.

Massa [M+H] ⁺	Amostra	$^{18}\text{O}_1$ (IR%)	$^{18}\text{O}_2$ (IR%)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (Avg)	$^{18}\text{O}_1/^{18}\text{O}_2$ (SD)	$^{18}\text{O}_1 + ^{18}\text{O}_2$	^{16}O (%)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (Avg)	$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ (SD)
927,49	C1D2	1,44	12,41	0,12	0,09	0,04	13,85	2,58	0,19	0,37	0,20
	C2D2	1,98	18,98	0,10			20,96	5,87	0,28		
	C3D2	1,38	15,98	0,09			17,36	6,24	0,36		
	C4D2	0,56	15,81	0,04			16,37	10,55	0,64		
1439,81	C1D2	2,74	33,27	0,08	0,08	0,01	36,01	11,32	0,31	0,41	0,15
	C2D2	2,61	37,96	0,07			40,57	14,38	0,35		
	C3D2	3,69	39,35	0,09			43,04	14,85	0,35		
	C4D2	2,46	37,83	0,07			40,29	25,91	0,64		
1479,80	C1D2	10,69	100	0,11	0,10	0,02	110,69	29,19	0,26	0,39	0,19
	C2D2	13,34	100	0,13			113,34	34,43	0,30		
	C3D2	9,9	100	0,10			109,90	37,23	0,34		
	C4D2	7,9	100	0,08			107,90	72,32	0,67		

COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS RESULTANTES DA PRESENTE MEMÓRIA DE INVESTIGAÇÃO

“Ultrasonic Assisted Enzymatic Protein Digestion Kinetic Studies”,
 C. Lodeiro, D. V. Vieira, Hugo M. Santos, Issa Isaac, J. L. Capelo,
 7th World Congress – HUPO 2008, 16 a 20 Agosto, Amesterdão.




Ultrasonic Assisted Enzymatic Protein Digestion Kinetic Studies

C. Lodeiro¹, D. V. Vieira¹, Hugo M. Santos², Issa Isaac², J. L. Capelo¹

¹REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

²Digilab-Genomic Solutions Inc., 4355 Varsity Drive, Ann Arbor, Michigan 48106, USA



INTRODUCTION:



Ultrasonic assisted protein enzymatic digestion (UAPED), is a relatively new sample treatment, with lower propensity for total protein digestion [1,2]. Partial or partial protein digestion can have variable influenced time and state which critical to diagnosis. Over-digestion can lead to wasteful cleavage, hence lower coverage due to unexpected changes of characteristics of peptides.

In the present work we report on kinetic studies regarding ultrasonic energy and ultrasonic protein digestion with the aim of getting a better understanding of the physico-chemical process involved in the acceleration of the enzymatic peptide cleavage.



METHODS:

BSA protein was used as standard substrate and the enzymes trypsin and pro tease type 2IV were chosen to perform protein cleavage. Ultrasonic energy to speed up enzymatic cleavage was provided using a sonicator device. www.digilab.com/ultrasonic/4355

Real-time monitoring of proteolytic digestion was done using API drops of the sample and ultraviolet and fluorescence spectroscopy through the new NanoDrop[®] device. www.nanodrop.com

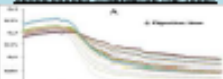






Protein digestion was followed and assessed through 1D-MS. Peptide formation was studied through MALDI-TOF-MS. Protease[®] and Protease[®] fluid (www.genosys.com) were used to perform the protein digestion (20048).

RESULTS:



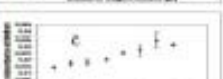

1) Digestion of BSA with trypsin and real time monitoring with ultraviolet spectroscopy (NanoDrop ND-1000)

A) Absorbance spectra curve of a BSA solution denatured, reduced and digested with different digestion times in a sonicator.
 B) Calibration curve for native BSA using monitoring.
 C) Absorbance at 280nm of a BSA solution after digestion at different sonication times.
 D) Absorbance at 280nm of an egg white solution after digestion at different sonication times.

2) Bradford method: optimization studies



Several studies were performed with different reaction conditions.

A) Absorbance of Bradford's reagent (5 µg/ml) as a function of Bradford's reagent ratio (1:10 – 1:30).
 B) Absorbance of trypsin (0.2 µg/ml) as a function of trypsin:reactant ratio (1:10 – 1:50).
 C) Absorbance of a BSA:Bradford's reagent solution as a function of BSA concentrations (0.3 – 0.4 µg/ml).
 D) Absorbance of a trypsin:Bradford's reagent solution as a function of trypsin concentrations (0.1 – 0.9 µg/ml).

3) Bradford Method: Influence of the ultrasonic time on protein degradation



A BSA solution was denatured, reduced, digested and analysed with protease type 2IV (120 mg) using the sonicator at different times.

A) BSA calibration Curve.
 B) Absorbance of a BSA solution digested with protease type 2IV as a function of the sonication time.

4) Sypro Orange Method: optimization studies (MangoDrop MD-3300)

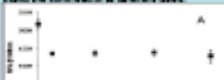

Several studies were performed to understand the interaction of this dye with the proteins and to optimize the digestion and analysis conditions.

A) Fluorescent signal as a function of different Sypro Orange concentrations (1:1000 – 1:10000).
 B) Fluorescent signal as a function of different SDS percentage in solution (0 – 0.6%).

5) Sypro Orange Method: Influence of the ultrasonic time on protein degradation

A carbonic anhydrase solution (concentrated, reduced and digested) was digested with trypsin (120 mg) using the sonicator at different times.

A) Fluorescent signal of a digested solution of carbonic anhydrase with trypsin (120 mg) as a function of the sonication time.
 B) Fluorescent signal of a digested solution at 37 °C of carbonic anhydrase with trypsin (120 mg) as a function time.

CONCLUSIONS

The UAPED methodology, based either on a sonicator or HIFU technology for the ultra fast protein digestion represents an important advance in the proteomic area. The automation given by the ProteoPilot allows to obtain protein digests in a reduced time and with higher efficiency in g/l of protein in solution. In addition, the high throughput obtained with this robot make it a powerful tool in the fast screening of biomarkers of diseases, i.e. cancer. Furthermore, the clean environment provided by its closed system avoids the problems of contamination, i.e. operations.

The methodology allows research of kinetic studies in real time using quantities of sample as low as 1 µl, thus avoiding the need of studies making use of high amounts of expensive reagents.

REFERENCES

[1] H. M. Santos, R. Rê, R. O. Dias, L. Fernandes, G. Vain, M. G. River, I. Moura, J. L. Capelo, J. Proteome Res. 6 (2007) 2282.
 [2] H. Benajou, J. L. Capelo, A. Mota, Y. Maric and C. Casanova, Top Trends Anal. Chem., 23 (2004) 46.
 [3] H. Lodeiro, D. V. Vieira, R. Rê, O. Dias, C. Lodeiro, I. Moura, J. L. Capelo, J. Proteome Res. 7 (2008) 2087.

ACKNOWLEDGEMENTS

H. M. Santos acknowledges the doctoral grant PCT (Science and Technological Foundation) from Portugal (RF14003/05/00003/07).
 D. V. Vieira acknowledges financial support given by the PCT and FCTER under project POC2004/055/0006. The research findings here reported are protected by international laws under patent number PCT/PT02/000224 and PT 133 203.