



Paula Maria Gonçalves de Oliveira Roldão Chicau

(Licenciatura em Engenharia Química)

**Relatório de Actividade Profissional
para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Ana Cecília Afonso Roque, Professora Associada,
FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio
Arguente: Prof. Doutor João Paulo da Costa Noronha
Vogal: Prof. Doutora Ana Cecília Afonso Roque



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2018

Copyright © 2018 by Paula Chicau
All Rights Reserved
Printed in Portugal

Aos meus 4 Chicauzinhos

Agradecimentos

O trabalho descrito neste relatório resulta de uma longa colaboração com duas Instituições: o ITQB NOVA e o IBET. Aos seus responsáveis, em particular ao Professor António Xavier (*in memoriam*), os meus sinceros agradecimentos.

Quero expressar a minha gratidão a todos aqueles com quem tenho colaborado ao longo dos anos e que me inculcaram o espírito de organização e de rigor, e que se disponibilizaram sempre para me ajudar debatendo comigo práticas e resultados, confiando na honestidade do meu trabalho.

À Professora Cecília Roque que com toda a disponibilidade e simpatia aceitou orientar este projecto, os meus sinceros agradecimentos.

À Vanessa Pereira, uma pessoa fantástica, agradeço a generosidade e cumplicidade dos últimos meses.

À Manuela Regalla, agradeço a amizade e os muitos anos de partilha de conhecimentos e camaradagem.

Aos meus pais, incondicionalmente a meu lado, bem hajam por todo o apoio e carinho.

Aos meus Chicauzinhos, que acharam “o máximo” este projecto e que, com todo o carinho colaboraram para me libertar os serões e fins-de-semana para que pudesse cumprir este objectivo. Obrigada. Adoro-vos! Um agradecimento especial à Cati, que além da grande ajuda que deu nas formatações, trocou comigo de posto e foi uma “super-mãe” desta família nos últimos meses.

Enquadramento

A elaboração deste relatório tem como objectivo a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica, de acordo com o estabelecido no regulamento da Faculdade de Ciências e Tecnologia para Licenciados “pré-Bolonha” por Instituições do Ensino Superior do Sistema Nacional. Este regulamento define as condições que permitem aos antigos licenciados acederem aos graus entretanto criados pelo Dec.Lei 74/2006.

Os requisitos para atribuição do grau de Mestre são definidos no Artigo 15º do Decreto-Lei n.º 74/2006 de 24 de Março. Neste caso,

- Tendo obtido o grau de Licenciatura em Engenharia Química - Ramo de Biotecnologia, no Instituto Superior Técnico em 1989 e possuindo mais de cinco anos de experiência profissional na área de especialidade da mesma Licenciatura, e
- Tendo sido atribuída equivalência à parte escolar do Mestrado da referida especialidade,

com a apresentação do relatório detalhado da actividade profissional devidamente comprovada, incluindo a discussão da experiência e competências adquiridas (alínea 5 do Despacho nº 29/2010), que será analisado e discutido por um júri de avaliação,

ficam cumpridos os requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica.

Resumo

Estrutura e Organização do Relatório

Este relatório profissional tem por objectivo a obtenção do grau de mestre em Engenharia Química e Bioquímica para Licenciados, de acordo com o estabelecido no regulamento da Faculdade de Ciências e Tecnologia para Licenciados “pré-Bolonha” por Instituições do Ensino Superior do Sistema Nacional, com mais de 5 anos de experiência profissional na área de especialidade da licenciatura.

Este relatório contém uma descrição detalhada do meu percurso e da minha experiência profissional. Além disso, são apresentados dois documentos que preparei durante a minha colaboração com a Unidade de Serviços Analíticos (ASU) do ITQB/IBET em âmbito de boas práticas de laboratório, e um artigo científico em que tive participação técnica e do qual sou co-autora (em anexo). É também apresentada uma lista de estudos em que participei, alguns dos quais em ambiente de boas práticas de laboratório. Como conclusão, é feita uma análise crítica da minha evolução e relevância da minha actividade profissional.

O documento está dividido em 4 capítulos:

No Capítulo 1, Resumo da Carreira Profissional e Actividades Desenvolvidas, é feito um traçado do meu percurso profissional até ao presente. Nele é referida a minha experiência profissional, principais acções de formação com as quais ganhei competências para o desenvolvimento das minhas funções, e actividades desenvolvidas ao longo deste percurso; é também feita referência a trabalhos de maior importância, em que participei.

Nos capítulos seguintes, Capítulo 2 e 3, são apresentados dois exemplos de trabalhos realizados durante a minha actividade profissional: - no Capítulo 2, Análise de Aminoácidos, é apresentado o procedimento operativo que descreve o protocolo usado na quantificação de aminoácidos livres e totais, realizado em ambiente de boas práticas de laboratório; - no Capítulo 3, Validação do Método de Quantificação de Aminoácidos em Proteínas e Péptidos e Determinação da Concentração de Proteína, é apresentado o relatório de validação do protocolo apresentado anteriormente.

No capítulo 4, Conclusões e Notas Finais, é feita uma reflexão sobre a evolução, contribuição em trabalhos que resultaram em artigos científicos e perspectivas futuras.

Nos Anexos são apresentados vários documentos: 1) um artigo científico em que dei a minha contribuição técnica seguindo o procedimento operativo atrás referido e de que sou co-autora; 2) é apresentada uma lista-resumo de trabalhos em que prestei colaboração ao longo dos anos, alguns deles em ambiente de boas práticas de laboratório; 3) é apresentada uma lista das principais acções de formação em que participei; 4) Cromatogramas e Cálculos Estatísticos relativos à validação do método referida no capítulo 3.

Palavras-chave: engenharia, percurso, competências, formação, validação, evolução

Abstract

Report Structure

The main goal of this report is to fulfil the requirements for the degree of Master's in Chemical and Biochemical Engineering, according to the rules established by the Faculdade de Ciências e Tecnologia for "pre Bolonha" graduated students from Institutions of the Higher Education National System, with more than 5 years of professional experience in the area of speciality.

This report contains a detailed description of my professional history and experience. It includes two examples of documents elaborated during my collaboration with the Analytical Services Unit (ASU), from ITQB/IBET under good laboratory practices environment, and a scientific paper that I co-authored in which I collaborated with technical analysis. A list of projects in which I had participation is also included, some of them in good laboratory practice environment. To conclude, there is a critical analysis of my professional career and progress, as well as the relevance of my activity.

This document is divided into 4 chapters:

Chapter 1 traces my career to the present date referring my professional experience, the main training actions that provided skills to the development of my curriculum, the main activities performed, and projects of major importance that I took part in.

The following chapters, Chapter 2 and 3, present studies elaborated during my professional activity: Chapter 2 presents the operating procedure describing the protocol used for quantification of free and total amino acids, executed in good laboratory practices environment; Chapter 3 shows the validation report of the method previously presented; Chapter 4, Conclusions and Final Notes, reflects on the progress, contribution in collaborations resulting in scientific papers, and future perspectives regarding my career.

In addition, several documents are presented as appendix: 1) a scientific paper that I co-authored in which I gave a technical contribution by applying the operating procedure previously mentioned; 2) a list of studies in which I've collaborated, some of them executed in good laboratory practices environment; and 3) a list of the main training actions that I took part in; 4) chromatograms and statistics regarding the method validation described in Chapter 3.

Keywords: engineering, experience, skills, training, validation, evolution

Índice

Capítulo 1	Resumo da Carreira Profissional e Actividades Desenvolvidas	1
Capítulo 2	Análise de Aminoácidos	11
Capítulo 3	Validação do Método de Quantificação de Aminoácidos em Proteínas e Péptidos e Determinação da Concentração de Proteína	27
Capítulo 4	Conclusões e Notas Finais	61
Anexos		A-1

CAPÍTULO 1

Resumo da Carreira Profissional e Actividades Desenvolvidas

Neste capítulo é feita uma descrição da minha actividade profissional até ao presente, principais funções desempenhadas e responsabilidades que me foram sendo atribuídas. Também são descritas as principais acções de formação em que participei e que mais contribuíram para aquisição das competências necessárias ao desempenho da minha actividade profissional

1. Formação académica

Frequentei a licenciatura no curso de Engenharia Química do Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa – Ramo de Biotecnologia, que concluí em 1989.

2. Actividade Profissional

Iniciei a minha vida profissional com uma breve passagem pelo ensino (ano lectivo 1989-90), em que leccionei a disciplina de Físico-Química a alunos do 3º ciclo do Ensino Básico na Escola Secundária Camilo Castelo Branco, Carnaxide. Esta experiência, embora breve, deixou em mim o gosto de comunicar com os mais jovens e que mantenho até hoje.

CTQB: 1990 - 1993

Em 1990 iniciei um estágio de especialização em técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) no Centro de Tecnologia Química e Biológica (CTQB), técnica que tenho usado até hoje para análise de variados compostos e desenvolvimento e validação de métodos.

Neste estágio recebi formação e adquiri conhecimentos para utilização de técnicas e equipamentos de cromatografia líquida com vista a purificação de proteínas. Adquiri competências para programação, funcionamento e manutenção de sistemas de cromatografia preparativa (Shimadzu) e analítica (LKB Pharmacia), em colunas com enchimentos em resinas de permuta catiónica, aniónica, exclusão molecular (SEC) e fase reversa (RP) e detecção por Ultra Violeta/Visível e Índice de Refracção.

Esta formação foi complementada com a participação em diversas acções de formação, das quais destaco:

- “Separation and Sequencing of Peptides and Proteins” – Estudos Avançados em Biotecnologia, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra, Setembro de 1990;
- Jornadas sobre Proteínas – Aspectos Estruturais e Funcionais, Sociedade Portuguesa de Bioquímica, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra, Janeiro de 1992.

Posteriormente, recebi formação para análise de aminoácidos totais em amostras de proteína pura e produtos alimentares. Adquiri competências que me permitiam quantificar aminoácidos em Analisador Automático Beckman System 6300 com derivatização pós-coluna por ninidrina, após hidrólise ácida com HCL 6N a 110°C em atmosfera inerte, seguida de neutralização e separação em HPLC. Na altura, foram testados métodos alternativos com diferentes condições de hidrólise e em forno microondas e em banho de óleo.

Foi estabelecida colaboração com o laboratório de Nutrição e Higiene dos Alimentos do INSA (Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge) através da qual participei em ensaios interlaboratoriais de análise de aminoácidos em produtos alimentares.

ITQB: 1993 - 2006

Em 1993, o CTQB, sob a liderança do Professor António V. Xavier, deu origem ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica, ao ser integrado na Universidade Nova de Lisboa. O ITQB (actualmente ITQB NOVA) é um centro de Investigação Científica que tem por missão a pesquisa associada ao ensino a pós-graduados nas áreas da química, ciências da vida, ambiente e respectivas tecnologias. Dedicar-se paralelamente à promoção da ciência e tecnologia junto da sociedade civil. Fica localizado na vila de Oeiras.

Em Junho de 1993 foi criado o Grupo de Purificação, Análise e Sequenciação de Proteínas do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, que passei a integrar.

Nesta fase comecei a especializar-me em outras técnicas complementares como a sequenciação do N-terminal de proteínas, e mais tarde a electroforese bidimensional.

A Sequenciação do N-terminal de Proteínas é uma técnica que permite a determinação da estrutura primária de uma proteína ou péptido em solução ou suporte de PVDF. Consiste numa sequência de reacções que se repetem de forma cíclica e automatizada. Começa com a derivatização com Fenilisotiocianato (PITC) do aminoácido N-terminal da cadeia polipeptídica, seguida de clivagem, e posterior libertação, estabilização e identificação com detecção por Ultra Violeta. Esse processo dá-se num sequenciador automático (Procise Protein Sequencing System, modelo 491, ABI) acoplado a um HPLC com coluna de fase reversa e detector UV, no qual adquiri competências para programação, análise de dados e manutenção.

Este equipamento, relativamente fácil de programar, tem um funcionamento e manutenção bastante complexos, que actualmente domino.

Esta técnica foi ao longo dos anos muito requisitada pelos investigadores do Instituto, principalmente na resolução da estrutura primária de proteínas: após digestão química e/ou enzimática, seguida do isolamento dos respectivos peptídeos por RP-HPLC e posterior determinação da sequência interna de aminoácidos.

A sequenciação do N-terminal é, ainda hoje, uma técnica considerada fundamental na identificação expedita e inequívoca de proteínas de sequências conhecidas.

Nessa altura, foi adoptada uma nova técnica para análise de aminoácidos, desenvolvida pela marca Waters. A quantificação de aminoácidos livres e totais passou a ser realizada em HPLC, de forma bastante eficaz. Evoluiu muito em termos de preparação de amostra, em relação ao que se fazia até essa altura. Após extracção em coluna SPE (ideal para extracção de aminoácidos na forma livre em meios de cultura ou fluidos fisiológicos como soro, plasma e urina, ou ainda extractos de plantas) é feita a quantificação em HPLC com coluna de fase reversa, após derivatização com PITC (Fenilisotiocianato). As hidrólises passaram a ser realizadas numa *workstation* que, além do forno, inclui um bloco de válvulas que permite ciclos alternados de vácuo e azoto para criação de atmosfera inerte.

Esta técnica foi utilizada em inúmeros projectos e deu origem vários artigos científicos (ver no Anexo 2 as publicações em co-autoria e resumo da colaboração técnica em projectos de investigação e trabalhos publicados). Nesta fase passei a prestar colaboração técnica a investigadores internos e de entidades externas como o IBET, Instituto Gulbenkian Ciência, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Coimbra, IPIMAR e colaborei em projectos ligados a várias áreas de investigação (ver no anexo 2 a lista de principais projectos em que prestei colaboração técnica)

Foi ainda estabelecida colaboração com a ABRF (*Association of Biomolecular Resource Facilities*), através da qual foram realizados ensaios interlaboratoriais de análise de aminoácidos e de sequenciação do N-terminal de proteínas com diferentes graus de complexidade.

A outra técnica em que me especializei, a electroforese bi-dimensional em gel de poliacrilamida é uma técnica importante na resolução de misturas complexas de proteínas e complementou a minha formação anterior. As espécies são separadas em duas etapas: na primeira, a focagem isoelectrica de acordo com o seu ponto isoelectrico e na segunda, o SDS-PAGE, de acordo com o peso molecular.

No entanto, para que se possam analisar os resultados de uma forma sistemática por comparação com bases de dados, é fundamental que haja reprodutibilidade nos géis de 2D.

Para conseguir essa reprodutibilidade é importante:

- realizar uma boa preparação da amostra que garanta que todas as espécies existentes estão dissolvidas e que haja o mínimo de compostos interferentes;
- controlar cada passo de preparação da amostra, por exemplo confirmando o rebentamento das células ao microscópio e verificando a cada passo a quantidade de proteína em solução;
- realizar a focagem isoelectrica em géis com gradiente de pH imobilizado (IPG);
- garantir que a focagem isoelectrica se dê a temperatura constante nas várias experiências, uma vez que o alinhamento das espécies varia com a temperatura, tornando-se difícil a comparação dos géis.

Entre Fevereiro e Março de 2000 participei no curso de formação de Electroforese Bidimensional “Zweidimensionale Elektrophorese für die Proteomeanalyse”- na Universidade Técnica de Munique, Freising-Weihenstephan. Este *workshop* permitiu-me ganhar sensibilidade aos muitos detalhes deste método que se pretendia implementar no ITQB. Conferiu-me competências para formar os futuros utilizadores:

- a) na preparação de amostras (métodos de lise para diferentes tipos de células, remoção de substâncias interferentes, solubilização das amostras);
- b) na preparação de géis de gradiente imobilizado de pH; programação do equipamento para focagem em sistema IPGphor e também Multiphor II;
- c) na preparação de géis SDS-PAGE para a segunda dimensão, equilíbrio dos géis IPG, electroforese em SDS-PAGE e fixação;
- d) na visualização e análise de imagem.

Neste âmbito, elaborei um manual com instruções de funcionamento e conselhos práticos sobre preparação de amostras com o objectivo de ajudar os novos utilizadores na fase inicial do seu trabalho.

ITQB/IBET (ASU): 2006-2016

Em 2006, o ITQB estabeleceu um protocolo de colaboração com o IBET (organização privada com fins não lucrativos que desenvolve pesquisa na área da biotecnologia e ciências da vida, criando uma interface entre a investigação e a indústria farmacêutica e agro-alimentar), com vista à integração de alguns dos seus técnicos na Unidade de Boas Práticas de Laboratório. Este grupo deu origem à Unidade de Serviços Analíticos (ASU) ITQB/IBET.

A ASU, actualmente com certificação de qualidade pelo INFARMED e DGAV, oferece, entre outros, serviços de desenvolvimento e validação de métodos analíticos, e também análise de compostos químicos e biológicos para a indústria química, farmacêutica, biofarmacêutica e agro-industrial.

Na preparação para esta integração, participei em várias acções de formação, entre as quais: “Acreditação de Laboratórios e a NP EN ISO/IEC 17025” em Janeiro/Fevereiro de 2006 (Specanalítica/UBIA), “Boas Práticas de Laboratório e a sua aplicação na Unidade BPL do IBET”, em Maio de 2006 (IBET) e “Validação de Métodos e Instrumentos em Cromatografia” (RELACRE).

Posteriormente, participei na adaptação do laboratório ITQB onde desenvolvia as minhas actividades, aos princípios de boas práticas de laboratório. Neste âmbito, foi realizada:

- 1) Inventariação e qualificação operacional dos equipamentos disponíveis de acordo com os procedimentos operativos em vigor na Unidade: balanças, pipetas volumétricas, material de vidro, banho termostaticado, potenciómetro, workstation para hidrólise, equipamentos de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e respectivos detectores (díodos (PDA) e fluorescência (FLR)), etc;
- 2) Inventariação e preparação de fichas de utilização de colunas de HPLC e do sequenciador de N-terminal de proteínas
- 3) Inventariação e atribuição de códigos internos a reagentes e padrões, e preenchimento das respectivas fichas de registo de acordo com os procedimentos operativos em vigor na Unidade;
- 4) Escrita de procedimentos operativos relativos aos métodos analíticos em vigor no laboratório (protocolos de análise de aminoácidos livres e totais e sequenciação do N-terminal de proteínas);
- 5) Validação dos métodos analíticos em vigor no laboratório;
- 6) Elaboração de Planos de Manutenção, Limpeza e Controlo de equipamentos.

Passei a prestar colaboração técnica na ASU de acordo com princípios de boas práticas de laboratório para o controlo de qualidade, participando em estudos de desenvolvimento e validação, análises de rotina e também preparar e responder a auditorias internas e externas. Era condição da unidade que todos os elementos dominassem o maior número de técnicas possível, para que qualquer elemento pudesse substituir outro em caso de necessidade.

As minhas funções e responsabilidades como elemento da ASU eram as seguintes:

- Realização de trabalho na área de Métodos Instrumentais de Análise, nomeadamente, a) cromatografia líquida (HPLC); b) cromatografia gasosa (GC-FID Thermo); c) espectrofotometria do UV-Visível;
- Utilização, qualificação e manutenção de sistemas de HPLC e UPLC nomeadamente no desenvolvimento, validação de métodos de análise de vários compostos no âmbito de projectos de colaboração com a indústria farmacêutica e elaboração dos respectivos relatórios;
- Implementação, validação e transferência de novos métodos analíticos e análises em Cromatografia líquida e espectrofotometria do UV-Vis.
- Utilização e programação do equipamento de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama – GC-FID Thermo com LVI (Large Volume Injection) e com SSL (Split, Slipt Less);
- Sequenciação de N-terminal de Proteínas: programação, análise de resultados e elaboração do respectivo relatório, e também qualificação e manutenção do equipamento (Procise, Applied Biosystems);
- Análise de consultas, propostas e contratos referentes à técnica de Sequenciação do N-terminal de Proteínas;

- Preparação de amostras (protein in-gel digestion) para determinação de mapa peptídico de proteínas e péptidos por Maldi (MS);
- Realização de trabalho na área de Espectrometria de Massa nomeadamente preparação e análise de amostras para determinação de mapas peptídicos em Maldi-ToF-ToF;
- Tratamento de amostras para doseamento de óleos minerais em óleos alimentares por cromatografia gasosa;
- Responsável pela qualificação operacional e manutenção do sistema de purificação de águas do Laboratório Analítico;
- Elaboração e revisão de procedimentos operativos em vigor no Laboratório Analítico;
- Controlo dos equipamentos de que era responsável e escolha dos laboratórios de calibração externa.
- Responsável pelo controlo interno do material volumétrico;
- Preenchimento da documentação GLP e posteriormente GMP;
- Formação interna de novos colaboradores ou pessoas externas autorizadas pela Direcção a utilizar as instalações do LA, nas áreas de utilização e validação de equipamentos de HPLC e espectrofotometria;
- Responsável pela validação e análise técnica dos certificados de calibração e/ou ensaio do equipamento de que é responsável;
- Execução do plano de tarefas regulares;
- Responsável pela recepção de amostras, reagentes, substâncias de referência e equipamentos;
- Responsável por seleccionar/contactar fornecedores.

No Anexo 2 é apresentada uma listagem com alguns trabalhos desenvolvidos neste âmbito durante estes anos de colaboração.

ITQB: 2016 - presente

No início de 2016, foi interrompida a colaboração do ITQB com a ASU. Esta interrupção e o meu regresso a tempo inteiro ao espaço do ITQB, coincidiu com o início da reestruturação dos Serviços Analíticos (que passaram a ser designados por *Research Facilities*) em que participei activamente:

- propus e participei na divulgação das *Research Facilities*, com colaboração na nova página de intranet, e criação de folheto informativo;
- propus e participei na organização de um espaço dedicado a análise cromatográfica onde estão reunidos todos os equipamentos de utilização comum nesta técnica. Neste espaço existem 6 equipamentos de cromatografia preparativa, cromatografia analítica de alta performance (HPLC) e de ultra alta performance (UPLC) com vários tipos de detectores: díodos, fluorescência e índice de refacção. Está previsto reunir nesta sala pelo menos mais um cromatógrafo com detector electroquímico; a este laboratório estão dedicados dois técnicos (onde me incluo) cuja missão é dar formação e apoio permanente a investigadores e alunos,

tanto na utilização dos equipamentos como no desenvolvimento de métodos analíticos. Este espaço, tem espaço e condições favoráveis ao funcionamento de aulas práticas de cromatografia;

- propus e foi concretizada a compra de acessórios de segurança (acessórios de retenção de gases de evaporação) para equipar todos os sistemas de cromatografia desta sala.
- propus a aquisição de vários *items* que permitem complementar e renovar os sistemas de cromatografia já existentes; a sua concretização começou pela aquisição de um detector de índice de refração.
- propus e concretizei a criação de um espaço único dedicado a um conjunto de equipamentos de precisão que permitem a caracterização de macromoléculas por métodos espectrofotométricos e análise termogravimétrica e suas interações através de métodos calorimétricos, disponibilizados para utilização comum. Alguns destes equipamentos estavam sub-aproveitados por falta de divulgação e de um responsável. Este espaço encontra-se sob a minha responsabilidade e actualmente todos os equipamentos são usados por utilizadores internos e também externos.

Assim, actualmente as minhas áreas de competência são:

a) Nas *Research Facilities*:

- *Small Molecule Analysis*: Implementação e desenvolvimento de métodos analíticos para dar resposta a pedidos de análise por cromatografia líquida de alta performance, preparativa e analítica; formação de novos utilizadores de HPLC e UPLC na utilização, programação dos equipamentos e análise de resultados; gestão da utilização e manutenção;
- *Biophysical Resources* : responsável pela gestão da utilização e manutenção e formação de novos utilizadores, apoio técnico e manutenção;
- *Protein Purification & Characterization (Seq N-terminal)* responsável pelos ensaios de análise do N-terminal de proteínas pelo método de degradação de Edman e manutenção do respectivo equipamento;

b) Responsabilidades de Equipamento Comum:

Gestão de utilização, formação de novos utilizadores, apoio técnico e manutenção

- ABI Procise Protein Sequencing System;
- Dinamic Light Scattering, DLS Zetasizer Nano ZS, Malvern);
- Microcal iTC 200, GE;
- Differential Scanning Calorimeter (DSC Q200, TA);
- Thermogravimeter Analyser (TGA Q50, TA);
- Differential Scanning Calorimeter VP-DSC, Microcal;
- CD Spectropolarimeter J-815, Jasco;
- Spectrofluorimeter Cary Eclipse Varian;

- Biacore 2000, GE Healthcare;
- Image Scanner III (Fuji), GE Healthcare;
- Isoelectric Focusing System IPGphor 1 Amersham Pharmacia;
- Isoelectric Focusing System IPGphor 3, GE Healthcare
- -Image ScannerIII (Fuji), GE Healthcare
- Isoelectric Focusing System IPGphor 1 Amersham Pharmacia
- Isoelectric Focusing System IPGphor 3, GE Healthcare

e

c) Genericamente:

- Apoio à Coordenação de Piso relativamente a gestão de espaços e utilização de equipamentos comuns;
- Participação em actividades de formação aos estudantes (recentemente apresentação no programa de doutoramento MolBioS 2018).
- Procedimentos periódicos de manutenção e calibração dos equipamentos sob minha responsabilidade;
- Actividades de planeamento e gestão de recursos.

CAPÍTULO 2

Análise de Aminoácidos

PO 109 LA – Analytical Services Unit IBET/ITQB

Neste capítulo é apresentado o documento integral da última versão do procedimento operativo PO 109 LA que elaborei, e que descreve o método de quantificação de aminoácidos usado na Unidade de Serviços Analíticos ITQB/IBET, para determinação da concentração de aminoácidos na forma livre e determinação da composição ou concentração de proteínas e péptidos. Este documento resulta da actualização do PO 20 MS como referido no Historial da última página.

1. Objectivo e âmbito

O objetivo deste procedimento operativo (PO) é descrever com rigor os vários passos de uma análise de aminoácidos para determinação :

- da composição ou da concentração de proteínas e péptidos;
- da concentração de aminoácidos livres em fluidos fisiológicos ou meios de cultura. Este procedimento inclui a preparação das amostras, hidrólise e/ou limpeza, derivatização (com PITC), análise cromatográfica, quantificação e cálculos finais e destina-se aos elementos do Laboratório de Caracterização de Proteínas e Espectrometria de Massa e a todos os elementos devidamente autorizados a utilizar o sistema HPLC Alliance Waters.

2. Metodologia

A metodologia apresentada neste PO baseia-se:

- nos métodos de hidrólise 1 e 4 descritos na European Pharmacopoeia 5.0 (2.2.56) para análise de proteínas e péptidos;
- no método de derivatização 3 referido na European Pharmacopoeia 5.0 (derivatização pré-coluna com PITC), mas com algumas alterações propostas pelo fabricante do equipamento e descritas nos manuais que o acompanham (ver bibliografia). Estas alterações serão devidamente reforçadas assinalando o texto com sublinhado. Assim, sempre que o cliente exigir a utilização da metodologia da European Pharmacopoeia 5.0 (2.2.56), estas modificações não poderão ser seguidas. São também descritas situações não contempladas na European Pharmacopoeia, tal como a hidrólise de amostras em suporte sólido.
- no relatório de “Validação do método de quantificação de aminoácidos em proteínas e péptidos e determinação da concentração em proteína”(MS 06/06)

2.1. Abreviaturas

PITC – Fenilisotiocianato

PVDF – Polivinyldene difluoride

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução de Fase Reversa

TEA – Trietilamina

TFA – Ácido Trifluoroacético

2.2. Material específico

Ao longo da descrição que se segue, será referido algum material especialmente desenvolvido para esta técnica, nomeadamente:

- Tubos de hidrólise (ver figura ao lado)

São tubos de vidro de dimensões 6x50 mm onde decorre todo o processo de tratamento da amostra.



- Frasco de hidrólise (ver figura ao lado)

É um frasco cuja utilização está associada à *Workstation Pico•Tag* e dentro do qual são colocados os tubos de hidrólise anteriormente referidos, durante os passos de hidrólise, derivatização e secagem (PO 12MS). A sua tampa possui uma válvula com duas posições aberto/fechado, que quando fixada na correspondente válvula da *Workstation* permite a formação de uma atmosfera de vácuo ou de azoto dentro do frasco, de acordo com as necessidades ao longo do processo.

2.3. Generalidades

A análise de aminoácidos exige algumas precauções para evitar contaminação por aminoácidos livres do ambiente e outros compostos detectáveis em UV, nomeadamente:

- Utilizar reagentes de elevado grau de pureza para evitar a presença de compostos contaminantes;
- Trabalhar em ambiente cuidadosamente limpo e utilizar material de vidro reservado a esta técnica, devidamente tratado para o efeito (PO 11MS) e resguardado do pó (que poderá contribuir para elevar os níveis de glicina, serina e alanina);
- Usar luvas de latex sem pó.

O método utilizado realiza-se em várias etapas sequenciais:

- Preparação das amostras a analisar;
- Hidrólise em meio ácido para libertação dos aminoácidos constituintes (só no caso da análise de proteínas e péptidos);
- Derivatização com PITC;
- Análise cromatográfica por RP-HPLC.

Ao longo do procedimento que vai ser descrito, serão realizados vários passos de secagem com diferentes objectivos. Excluindo situações específicas que serão devidamente assinaladas, as secagens podem ser efectuadas na *Workstation* Pico•Tag ou no Sistema de Evaporação de Amostras por Vácuo (PO 88LA).

Caso não seja conhecida a concentração em aminoácidos da amostra, deverá ser feito um ensaio prévio que permita decidir a toma a usar para obter valores de concentração da ordem de grandeza da gama de trabalho usada para os padrões.

A quantidade de amostra utilizada em cada toma e respectivo valor de solução de referência adicionada, serão registados em folha de registo criada para o efeito (ver anexo1). Também as tomas das soluções de referência para a recta de calibração serão registadas nesta folha.

2.4. Preparação da amostra

A preparação da amostra para análise de aminoácidos livres e de hidrolisados consiste, respectivamente:

- no isolamento dos aminoácidos livres de forma a evitar a presença de material de origem proteica e outros que interfiram no processo cromatográfico
- na eliminação de vestígios dos reagentes utilizados na purificação das proteínas ou péptidos a quantificar (como sais, detergentes ou ureia) que possam comprometer as etapas seguintes. A presença de concentrações elevadas de sais pode diminuir o rendimento da hidrólise

As amostras devem ser preparadas no menor número de passos possível evitando transferências entre operações, para minimizar contaminações e perdas.

Caso se pretenda usar o método do padrão externo, deve-se adicionar uma quantidade conhecida de uma solução de substância de referência (Norleucina por exemplo) que permita, nos cálculos, corrigir os resultados devido a perdas.

No caso de material proveniente de hidrolisados, e quando se pretende quantificar as cisteínas deverão ser preparadas e tratadas alíquotas em separado porque este aminoácido é parcialmente destruído em meio ácido. Relativamente ao triptofano, apesar de haver vários métodos descritos, não estão implementados neste laboratório.

2.4.1. Proteínas e péptidos

2.4.1.1. Amostra líquida

Além dos processos descritos na European Pharmacopoeia 5.0 (2.2.56, pag 87) para remoção de tampões salinos, este objectivo pode também ser conseguido por imobilização da proteína ou péptido numa membrana de PVDF utilizando um ProSorb® (PO 04MS).

2.4.1.2. Amostra proveniente de electroforese em gel de poliacrilamida

Sempre que o último passo da purificação seja a electroforese, a amostra deve ser transferida para membrana de PVDF por electrotransferência (PO 24LD) para posterior análise de aminoácidos. A banda a analisar é cortada com bisturi e colocada directamente num tubo de hidrólise.

Há três aspectos importantes a ter em conta:

- Evitar o uso de tampões de transferência contendo glicina.
- Evitar a coloração da membrana (em último recurso usar azul de Coomassie, PO 24LD).
- Analisar sempre um branco de PVDF em paralelo com a amostra que deve ser do mesmo lote e ter as mesmas dimensões que a banda que contém a amostra a estudar.

2.4.1.3. Amostra para quantificação de cisteínas

2.4.1.3.1. Amostra líquida

As alíquotas destinadas a quantificação das cisteínas são submetidas a tratamento com ácido per fórmico para promover a oxidação das cisteínas a ácido cisteico, que não será degradado durante a hidrólise ácida. O procedimento é o seguinte:

- Pipetar as alíquotas para tubos de hidrólise
- Evaporar sob vácuo
- Preparar reagente per fórmico imediatamente antes de cada utilização: 19 volumes de ácido fórmico 97% + 1 volume de peróxido de hidrogénio 30%. Deixar reagir 1 hora ao abrigo da luz
- Juntar 10 µl de reagente per fórmico no tubo de hidrólise e após 30 minutos evaporar sob vácuo
- Hidrolisar de acordo com o tratamento descrito no ponto 2.5.

2.4.1.3.2. Amostra liofilizada

Se a amostra estiver liofilizada, o procedimento a utilizar é o descrito em 2.4.1.3.1 mas a operação de pipetagem é substituída pela de pesagem, com os seguintes cuidados:

- A transferência da amostra para dentro do tubo de hidrólise deve ser feita com o auxílio de uma pipeta de Pasteur depositando cuidadosamente a amostra no fundo do tubo para evitar perdas nas paredes e eventuais contaminações entre tubos quando submetidos a vácuo.
- As pipetas de Pasteur a utilizar devem também sofrer o tratamento descrito no PO 11MS.

2.4.1.3.3. Amostra em suporte sólido

Se a amostra estiver adsorvida em PVDF, segue-se o procedimento descrito em 2.4.1.3.1, mas todos os passos de secagem deverão ser efectuados com centrifugação no Sistema de Evaporação de Amostras por Vácuo para evitar que a membrana seja aspirada do fundo do tubo.

A hidrólise realiza-se de acordo com o ponto 2.5.2.

2.4.2. Aminoácidos na forma livre

A preparação das amostras para a quantificação de aminoácidos na forma livre deve ser efectuada de acordo com o tipo de amostra a analisar. Deverão eliminar-se os componentes de elevada massa molecular para proteger as colunas de HPLC e também componentes que interfiram na separação cromatográfica como por exemplo sais. Antes de iniciar o processo, deve adicionar-se uma quantidade conhecida de uma substância de referência como a Norleucina, que permita controlar o processo de preparação e corrigir os resultados.

No caso de amostras fisiológicas a utilização do esquema do anexo 2 deste procedimento operativo pode facilitar a escolha de um método de preparação de amostras.

As técnicas mais eficazes na preparação de amostras são:

- A utilização de membranas de ultrafiltração que permitem remover facilmente componentes de elevado peso molecular. Devem ser utilizadas membranas com *cut-off* de 10K.
- A extracção em fase sólida em pequenas colunas de fase reversa como por exemplo os dispositivos Sep-Pak C18 da marca Waters (PN WAT020515, ou equivalente). Neste caso, cada coluna é hidratada com 10 ml de metanol e em seguida 10 ml de H₂O mQ. Aplica-se na coluna 1 ml da solução contendo a amostra (simultaneamente inicia-se a recolha do eluído). Os aminoácidos hidrofílicos são eluídos com 1,5 ml de HCl 0,1 N e os hidrofóbicos com 2,5 ml de acetonitrilo 30% em HCl 0,1N. Dos 5ml de eluído recolhidos, uma alíquota (200 µl ou mais, de acordo com a concentração da amostra) é pipetada para um tubo de vidro marcado (tubo de hidrólise), levada à secura no Sistema de Evaporação de Amostras por Vácuo e posteriormente derivatizada de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.6.

2.5. Hidrólise em meio ácido (Quantificação de Proteínas/Péptidos)

2.5.1. Hidrólise sob vapor de ácido

- Pipetar a amostra (0,5-10 µg) para um tubo de hidrólise ;

- Evaporar sob vácuo no sistema de evaporação de amostras por vácuo (para evitar que a água da amostra dilua o ácido na hidrólise);
- Colocar o tubo dentro de um frasco de hidrólise;
- Pipetar 200 µl de HCl 6N para o fundo do frasco e juntar um cristal de fenol (que limita a destruição da tirosina)
- Enroscar a tampa no frasco (com a respectiva válvula aberta) e instalá-lo na *Workstation* . Seguindo as instruções dadas no ponto 2.4 do PO12MS, purgar e colocar no forno de hidrólise a 110°C durante 24 horas .
- Após a hidrólise, retirar os tubos, limpar o ácido que condensou nas paredes exteriores e secar sob vácuo para remoção do ácido que condensou dentro do tubo.

2.5.2. Hidrólise em fase líquida

A utilizar quando a amostra está em suporte sólido:

- Colocar a banda de PVDF contendo a amostra no fundo de um tubo de hidrólise;
- Pipetar 70 µl de solução de hidrólise (HCl 6N / 7% ácido tioglicólico) directamente sobre a membrana, para evitar que esta seja aspirada do tubo quando se aplicar o vácuo;
- Pipetar 200µl da mesma solução para o fundo de um frasco de hidrólise onde serão colocados os tubos com as amostras;
- Colocar a tampa no frasco e purgar na Workstation conforme descrito no ponto 2.4 do PO 12MS;
- Fechar a válvula e colocar o frasco no forno de hidrólise da Workstation a 110°C durante 24h;
- Após a hidrólise, secar a membrana no Sistema de Evaporação de Amostras por Vácuo.

2.5.3. Extração dos aminoácidos da membrana

- Pipetar para o tubo 180 µl de solução de extração (acetonitrilo 60% em solução aquosa de TFA 0.1%) de forma a que a membrana fique completamente submersa;
- Cobrir o tubo com película de parafilm e sonicar num banho de ultrasons durante 10 minutos;
- Destapar o tubo e com a ajuda de uma agulha hipodérmica descartável, retirar cuidadosamente a membrana de forma a que não haja perdas da solução de extração;
- Evaporar até à secura sob vácuo no Sistema de Evaporação de Amostras por Vácuo.

2.6. Derivatização com PITC

É feita em 2 passos:

1. Neutralização de eventuais resíduos de ácido que tenham subsistido na amostra e promoção do ambiente alcalino necessário à reacção com PITC:

- Adicionar 10 µl de solução de neutralização (metanol:acetato de sódio (1M):TEA na proporção 2:2:1 (v/v)) à amostra proveniente da hidrólise;
 - Evaporar sob vácuo.
2. Derivatização, que consiste na ligação do PITC ao grupo NH₂ de cada aminoácido, dando origem a PTC-AA (Feniltiocarbamil aminoácido) que apresenta elevada absorvência a 254 nm:
- Preparar solução de derivatização (metanol:H₂O:TEA:PITC na proporção 7:1:1:1 v/v). Esperar 5 minutos.
 - Adicionar 20 µl de solução de derivatização à amostra neutralizada;
 - Deixar reagir 20 minutos e evaporar sob vácuo na *Workstation* o tempo necessário para atingir valores de vácuo entre 50 e 70 mTorr (para garantir uma evaporação eficaz dos reagentes de derivatização).

2.7. Preparação de Padrões

A quantificação de aminoácidos baseia-se na análise cromatográfica dos PTC-AA obtidos por derivatização com PITC dos aminoácidos livres ou libertados na hidrólise da amostra. Paralelamente é analisado um conjunto de padrões (entre 1 e 20 µl de solução de referência referida em 2.7.1 ou 2.7.2) submetidos ao mesmo tratamento, para os quais são determinados factores de resposta e a partir dos quais se calculam as quantidades de cada aminoácido na amostra inicial. Para um conjunto de tubos de hidrólise são pipetados volumes convenientes da solução de referência e de outras substâncias de referência como norleucina e ácido cisteico (eventualmente outros aminoácidos e seus derivados que se queiram quantificar) de modo a que haja 5 concentrações diferentes de cada espécie. O seu registo é efectuado no Anexo 1 deste PO. Estes tubos são levados à secura, neutralizados e derivatizados, de acordo com o procedimento referido em 2.6.

2.7.1. Proteínas e Péptidos

Como glutamina e asparagina são convertidas respectivamente em ácido glutâmico e aspártico durante a hidrólise e são contabilizadas em conjunto com os respectivos ácidos.

Do conjunto de aminoácidos analisados fazem parte: L-Alanina, L-Arginina, L-Ácido Aspártico, L-Ácido Cisteico, L-Cistina, L-Ácido Glutâmico, Glicina, L-Histidina, L-Isoleucina, L-Leucina, L-Lisina, L-Metionina, L-Fenilalanina, L-Prolina, L-Serina, L-Treonina, L-Tirosina e L-Valina.

A solução de referência utilizada é *Aminoacid Standard H #20088* Pierce, L-Norleucina #N8513 Sigma e Ácido Cisteico # 30170 Sigma, ou equivalentes.

2.7.2. Aminoácidos Livres

Os aminoácidos geralmente analisados são: β -alanina, L-alanina, Ácido L- α -Aminoadípico, Ácido L- α -Amino-n-butírico, Ácido D,L- β - Aminoisobutírico, L-Asparagina, L-Ácido Aspártico, L-Citrulina, L-Cistina, L- Ácido Glutâmico, Glicina, Hydrohi-L-Prolina, L-Isoleucina, L-Leucina, L-Metionina, L-Fenilalanina, O-Fosfoserina, O-Fosfoetanolamina, L-Prolina, L-Sarcosina, L-Serina, Taurina, L-Treonina, L-Tirosina, L-Valina, Ácido γ - Amino-n-Butírico, L-Anserina, L-Arginina, L-Carnosina, L-Histidina, DL-Hidroxilisina, L-Lisina, 1-Metil-L-histidina, 3-Metil-L-histidina, L-Ornitina, L-Triptofano.

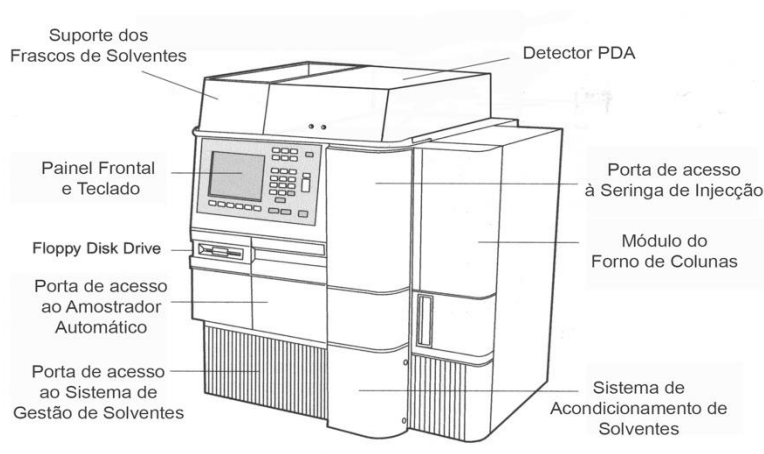
As soluções de referência utilizadas são: *Amino Acid Standard Solution (acidics and neutrals)* #A6407 Sigma, *Amino Acid Standard Solution (basics)* #A6282 Sigma, L-Norleucina #N8513 Sigma, ou equivalentes.

2.8. Quantificação

2.8.1. Equipamento

O equipamento utilizado neste laboratório para análise de aminoácidos é um sistema HPLC Alliance Waters constituído por (ver figura abaixo):

- Sistema de gestão e distribuição de solventes
- Sistema de gestão de amostras, com a capacidade de 120 *vials* que permite armazenar as amostras com refrigeração, até ao momento da sua injeção na coluna
- Forno de Coluna
- Detector de díodos 2996 Waters (PDA), com detecção simultânea de absorvências entre 180e 800 nm.



A este sistema está acoplado um computador com Software Empower que permite a programação do equipamento e a recolha e análise dos dados .

2.8.2. Programação do equipamento

O sistema de HPLC vai ser controlado a partir do Software Empower através do qual:

- São programadas as condições de trabalho de cada um dos módulos
- São recolhidos os “raw data” enviados pelo detector
- São tratados os “raw data” para quantificar cada um dos aminoácidos constituintes da amostra.

O ficheiro que contém a sequência de programação de injeção das amostras (*sample set*) e as condições de funcionamento do equipamento, deverá incluir na sua denominação o nº do estudo a que corresponde (PO 34LD).

2.8.3. Condições cromatográficas

A separação cromatográfica dos PTH-AA dá-se a 46 °C numa coluna Waters Nova-Pak® C18, 60 Å, 4 µm, de dimensões 3.9 x 300 mm (PN WAT010950, ou equivalente).

Após derivatização, a amostra é retomada num volume conveniente (100-200 µl) de solução tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7.5, de acordo com a quantidade de amostra disponível. Em seguida é filtrada (em filtro de nylon de poro 0.22 µm) directamente para o microtubo (PN WAT094170, ou equivalente) que, depois de introduzido no respectivo *vial* (Waters PN186000307 ou equivalente), é instalado no carrossel do amostrador automático onde se mantém com refrigeração a 8 °C até ser injectado na coluna.

Os programas que incluem o gradiente de separação, lavagem e equilíbrio da coluna são apresentados nas tabelas 1 e 2, sendo possível efectuar pequenas alterações no programa que permitam melhorar a separação de alguns picos, de acordo com o comportamento da coluna.

Tabela 1 - Gradiente para quantificação aminoácidos em Proteínas e Péptidos sendo Eluente A: acetato de sódio 0.14M, acetonitrilo 6%, TEA 0.05%, pH 6.4 e Eluente B: acetonitrilo 60%, ou equivalente da marca Waters

Time	Flow	%A	%B
0.01	1.00	100.0	0.0
1.0	1.00	100.0	1.0
21.0	1.00	54.0	46.0
21.5	1.00	0.0	100.0
22.0	1.50	0.0	100.0
26.0	1.50	0.0	100.0
26.5	1.50	0.0	100.0
39.0	1.50	100.0	0.0
39.5	1.00	100.0	0.0
45.0	1.00	100.0	0.0

Tabela 2 - Gradiente para quantificação de aminoácidos livres sendo Eluente A: acetato de sódio 70mM, acetonitrilo 2,5%, pH 6,55 e Eluente B: acetonitrilo 45%, Metanol 15% , ou equivalentes da marca Waters.

Time	Flow	%A	%B
0,01	1,00	100,0	0,0
13,5	1,00	97,0	3,0
24,0	1,00	94,0	6,0
30,0	1,00	91,0	9,0
50,0	1,00	66,0	34,0
62,0	1,00	66,0	34,0
62,5	1,00	0,0	100,0
66,5	1,00	0,0	100,0
67,0	1,00	100,0	0,0
87,0	1,00	100,0	0,0

Após separação cromatográfica, a detecção dos PTH-AA é efectuada a 254 nm.

Paralelamente são injectados volumes conhecidos de soluções de substâncias de referência preparadas como referido em 2.7. Através do Software Empower os dados recolhidos são tratados e construídas rectas de calibração que permitem relacionar a concentração de cada aminoácido com a respectiva absorvência lida a 254nm.

2.8.4. Cálculos

A adição de solução de referência de norleucina às amostras, no início da análise, irá permitir que os cálculos sejam efectuados pelo método do padrão interno ou externo, consoante as características do ensaio.

2.8.4.1. Proteínas e Péptidos

2.8.4.1.1. Determinação da composição em aminoácidos de Proteínas e Péptidos

A composição em aminoácidos de uma amostra é estimada com base no valor da respectiva massa molecular conhecida a partir da bibliografia ou calculada em laboratório por outra técnica, e da concentração de cada aminoácido obtida pelo tratamento dos dados da análise cromatográfica pelo Software Empower. Como neste laboratório não se faz quantificação de triptofano, o número de resíduos desta espécie terá de ser quantificado por outro processo.

Relacionando a concentração obtida para cada aminoácido com a concentração correspondente de um resíduo de elevada estabilidade, calcula-se um factor a partir do qual se obtém uma combinação de aminoácidos cuja massa molecular se aproxima da amostra em estudo. Este factor vai sendo modificado até se chegar a um valor de massa molecular o mais próximo

possível da conhecida. Como este é um processo iterativo por aproximações baseado em estimativas, a composição em aminoácidos obtida será uma aproximação da efectiva. Os passos a seguir são os seguintes:

- Dividir a massa molecular da amostra por 110 (massa molecular média de um aminoácido), para obter o nº aproximado de resíduos da molécula (F1)
- Escolher um resíduo com elevado rendimento de hidrólise e derivatização tal como Asp, Glu, His, Arg, Ala, Pro, Leu, Phe ou Lys
- Dividir a concentração de cada aminoácido pela concentração do resíduo que se escolheu para referência (Cr1, Cr2, Cr3, ...). Calcular o somatório destas razões (F2)
- Dividir F2 por F1, para obter um factor correctivo (N) que dá o nº aproximado de resíduos da molécula escolhida como referência
- Multiplicar os valores Cr1, Cr2, Cr3, ...respectivamente pelo factor N chegando a uma composição aproximada da pretendida
- Calcular a massa molecular correspondente a esta composição e comparar com o conhecido
- Variar o factor N e repetir os cálculos até chegar ao valor mais próximo possível do conhecido para a massa molecular da amostra em estudo

2.8.4.1.2. Determinação da concentração de amostra

Não havendo informação sobre a massa molecular da espécie a dosear, deve ser feita a quantificação de todos os aminoácidos numa determinada toma. O somatório da massa obtida para cada resíduo dividido pelo volume da mesma toma permite conhecer a concentração da amostra. Este procedimento obriga a quantificar todos os aminoácidos da amostra, o que é uma desvantagem quando não há técnicas implementadas para todos os resíduos (triptofano, no nosso caso).

Havendo dados bibliográficos sobre a composição em aminoácidos da proteína ou péptido a estudar, basta quantificar algumas das espécies mais estáveis à hidrólise e derivatização e relacioná-las com a massa total da amostra e respectivo volume, do seguinte modo (ver exemplos em PicoTag Amino Acid Analysis System-Operator's Manual 64MS)

1. A partir do nº de resíduos de cada tipo e da respectiva massa molecular, calcular a massa molar da amostra
2. Calcular a razão entre a massa molar da espécie e a da cada aminoácido
3. Para cada um dos resíduos mais estáveis e a partir da quantificação realizada pelo software Empower, calcular a respectiva massa para a toma considerada.
4. Dividir estes valores pelo volume da toma para obter a concentração dos resíduos mais estáveis

5. Multiplicar cada um destes valores pelo factor obtido no ponto 2 e calcular a média dos valores obtidos. Deste modo determina-se a concentração da amostra.

Tal como no caso anterior, os cálculos serão efectuados numa folha de cálculo.

Tanto os “raw data” como os resultados dos cálculos que os utilizam são armazenados em pastas criadas para o efeito e das quais são efectuados backups regulares.

2.8.4.2. Aminoácidos Livres

A concentração de cada aminoácido é calculada através do Software Empower, relacionando os dados de absorvência lida a 254 nm com as respectivas rectas de calibração construídas a partir das soluções de referência.

3. Documentos de referência

European Pharmacopoeia 5.0-2.2.56

A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing”, 2nd Edition (P. Matsudaira, ed.) Academic Press, 1993.

Chemical Modification of Proteins, Glazer at al. Elsevier Biomedical

The Pico•TagMethod® - A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis

PicoTag Amino Acid Analysis System-Operator's Manual

PO 04MS – Sequenciação do N-Terminal de Proteínas e Péptidos por Degradação de Edman usando um Sequenciador Automático- Preparação de Amostras

PO 11MS – Preparação de Material de Vidro para Realização de Análises de Aminoácidos

PO 12MS – Descrição e Funcionamento da Workstation Pico•Tag Waters

PO 24LD– Separação Electroforética de Amostras de Proteínas e Imunodeteção por Western Blot

PO 31LD – Validação de Folhas de Cálculo

PO 34LD – Operação de sistemas de HPLC

PO 88LA – Utilização e Manutenção do Sistema de Concentração de Amostras por vácuo.

REL MS 06/06 - Relatório de validação do método de quantificação de aminoácidos em proteínas e péptidos e determinação da concentração em proteína”

4. Documentos gerados por este procedimento e anexos

Anexo 1 - Registo de Preparação de Amostras e Padrões para Análise de Aminoácidos.

Anexo 2 - Preparação de amostras fisiológicas para determinação de aminoácidos na forma livre.

5. Historial do PO

PO:	Alterações	Autor	Data de aprovação
109LA	Novo, baseado no PO 20MS, que foi eliminado.	Paula Chicau	

CAPÍTULO 3

Validação do Método de Quantificação de Aminoácidos em Proteínas e Péptidos e Determinação da Concentração de Proteína

REL MS 06/06

Analista: Paula Chicau; **Estudo:** MS 06/06; **Nº Documento:** REL MS 06/06

Oeiras, Outubro de 2006

Neste capítulo é apresentado o documento original preparado em Outubro de 2006, para validação do método de quantificação de aminoácidos em proteínas e péptidos e determinação da concentração em proteína (REL MS 06/06) e que resulta de um plano de estudo previamente preparado e aprovado (PLA 06/06MS) que, devido à sua extensão, não consta deste relatório.

Alguns cromatogramas exemplificativos e alguns cálculos estatísticos são apresentados no Anexo 4.

Fui responsável pela realização de todo o trabalho experimental e quantificação de aminoácidos apresentada neste relatório. A elaboração da análise estatística e elaboração do relatório foi preparada em colaboração com a Doutora Ana Luisa Simplício (ASU)

Índice

1. Objectivo
2. Generalidades
3. Calendarização
4. Metodologia experimental
 - 4.1 Introdução
 - 4.2 Materiais
 - 4.2.1 Substâncias de referência
 - 4.2.2 Substância para estudo
 - 4.2.3 Reagentes
 - 4.3 Equipamento
- 4.4 Procedimentos operativos e outras referências
- 4.5 Preparação das soluções para estudo
- 4.6 Preparação das soluções de referência
5. Método de ensaio
6. Critérios de aceitação utilizados na validação do método analítico
7. Ensaio de validação e discussão de resultados
 - 7.1 Resolução e simetria
 - 7.2 Repetibilidade instrumental
 - 7.3 Linearidade
 - 7.4 Repetibilidade do método e precisão intermédia
 - 7.5 Estabilidade e robustez
 - 7.6 Exactidão
 - 7.7 Limites de detecção e quantificação instrumental
8. Conclusões

1. Objectivo

O objectivo deste estudo é a validação do método de quantificação de aminoácidos em proteínas e péptidos descrito no PO 10MS e no ponto 2.2.5.6 da Farmacopeia Europeia 5 (método de hidrólise 1 e método de derivatização 3), com vista à determinação da concentração de uma proteína em solução. O método não será validado para determinação de triptofano, cisteína e metionina.

2. Generalidades

Patrocinador:

Unidade BPL IBET

Estação Agronómica Nacional

Av. da República-Quinta do Marquês

2784-505 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 96 38

Instalação de Ensaio:

Laboratório de Caracterização de Proteínas e Espectrometria de Massa (MS)

ITQB II

Estação Agronómica Nacional

Av. da República-Quinta do Marquês

2784-505 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 96 38

Responsável Técnico:

Ana Maria Varela Coelho (AVC)

Laboratório de Caracterização de Proteínas e Espectrometria de Massa (MS)

ITQB II

Estação Agronómica Nacional

Av. da República-Quinta do Marquês

2784-505 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 94 51

Fax: +351 21 443 96 38

Email: chicau@itqb.unl.pt

Analista:

Paula Maria Roldão Chicau (PCH)

Laboratório de Caracterização de Proteínas e Espectrometria de Massa (MS)

ITQB II

Estação Agronómica Nacional

Av. da República-Quinta do Marquês

2784-505 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 96 38

Fax: +351 21 443 36 44

Email: chicau@itqb.unl.pt

Director da Unidade:

Maria Teresa Crespo (TC)

Unidade GLP – IBET

Edifício ITQB II

Apartado 12

2871-901 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 95 51

Fax: +351 21 442 11 61

Email: tcrespo@itqb.unl.pt

Unidade de Garantia de Qualidade:

Ana Luisa Simplício (ALS)

Unidade GLP – IBET

Edifício ITQB II

Apartado 12

2871-901 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 97 41

Fax: +351 21 442 11 61

Email: anas@itqb.unl.pt

Arquivo:

Unidade GLP – IBET

Edifício ITQB II

Apartado 12

2871-901 Oeiras

Portugal

Tel: +351 21 446 97 41

Fax: +351 21 442 11 61

3. Calendarização

Data de início do estudo: 21 de Setembro de 2006

Data de início da parte experimental: 21 de Setembro de 2006.

Data de fim da parte experimental: 6 de Outubro de 2006.

Data finalização do estudo: 30 Outubro 2006

4. Metodologia experimental

4.1. Introdução

No processo de validação foram avaliados, com base no procedimento operativo 86LA, os seguintes parâmetros:

- resolução
- precisão (repetibilidade instrumental e repetibilidade do método, precisão intermédia),
- estabilidade de soluções de referência
- estabilidade de amostras
- robustez
- limites de detecção
- limites de quantificação.

A metodologia de análise foi realizada nos seguintes passos sequenciais: hidrólise da amostra, neutralização e derivatização, separação em RP-HPLC e detecção a 254 nm, de acordo com o descrito no respectivo plano de estudo (PLA 06/06MS). O método não foi validado para determinação de triptofano, cisteína e metionina por serem total ou parcialmente destruídos por hidrólise ácida.

Para efeitos de determinação da concentração em proteína usaram-se os aminoácidos asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutâmico, alanina, leucina, fenilalanina, lisina e arginina, por serem as espécies referidas na *Pharmacopoeia Europea* como mais adequadas para a determinação da concentração de proteína.

A quantidade de norleucina usada em cada ensaio foi igual à de cada aminoácido na substância de referência Amino Acid Standard H. Deste modo, pretendeu-se estudar o comportamento deste aminoácido para avaliar a eventualidade da sua posterior utilização como padrão interno. No entanto,

considera-se que nesta fase o método foi validado apenas para quantificação pelo método do padrão externo.

No final do processo de validação foram estabelecidos os parâmetros de controlo regular do método de análise para determinação da concentração de proteína e do número de resíduos de cada aminoácido.

4.2. Materiais

4.2.1. Substâncias de referência

Nome comum: Amino Acid Standard H (L-Alanina, L-Metionina, L-Fenilalanina, L-Prolina, L-Leucina, L-Lisina-HCL, L-Arginina, L-Ácido Aspártico, L-Cistina, L-Serina, L-Treonina, L-Tirosina, L-Valina, L-Ácido Glutâmico, Glicina, L-Histidina, L-Isoleucina).

Nº de Catálogo: 20088

Lote: BC43126

Armazenamento: -20°C

Validade: Março de 2007

Fabricante: Pierce

Fornecedor: Dagma

Código interno: P33a/06MS6

Nome comum: L-Norleucina

Nº de Catálogo: N8513

Número CAS: 327-57-1

Lote: BC43126

Armazenamento: Temperatura ambiente

Validade: Setembro de 2007

Fabricante: Pierce

Fornecedor: Dagma

Código interno: P35a/06MS6

4.2.2. Substância para estudo

Nome comum: Bovine Serum Albumin (BSA)

Nº de Catálogo: 23209

Número CAS: 9048-46-8

Lote: HE104691

Concentração: 2mg/ml em 0,9% NaCl

Armazenamento: Temperatura ambiente

Validade: Setembro de 2007

Fabricante: Pierce

Fornecedor: Dagma

Código interno: P30MS6

4.2.3. Reagentes

Ácido Clorídrico em ampolas para análise de aminoácidos~6M em água, Fluka, N° de Catálogo:84429, Código interno: R14MS6

- Fenol, puriss pa, Fluka, N° de Catálogo:77610, Código interno: R36MS6
- Metanol, gradient grade, Riedel-deHaën, N° de Catálogo: 34885, Código interno: R21MS6
- Acetato de sódio, SigmaUltra $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich, N° de Catálogo:241245, Código interno: R28MS6.
- Trietilamina, ampolas para análise de sequências de proteínas, $\geq 0,5\%$ (GC), Fluka, N° de catálogo:90338, Código interno: R39MS6
- Fenilisotiocianato (Reagente de Edman), Pierce, N° de Catálogo:26922, Código interno: R35MS6
- Acetonitrilo, gradient grade, Sigma-Aldrich, Código interno:R22MS6

4.3. Equipamento

- Workstation Pico•Tag, Waters (ITQB091)
- Sistema HPLC Alliance Waters (ITQB081)
- Detector de díodos 2996 Waters (ITQB082)
- Forno de coluna WATERS (ITQB083)
- Coluna Waters Nova-Pack® C18, 60Å, 4 μm , de dimensões 3.9X150 mm (CFL-1/03MS)
- Coluna Waters Nova-Pack® C18, 60Å, 4 μm , de dimensões 3.9X300 mm (CFL-1/06MS)
- Sistema de evaporação de amostras por vácuo, SpeedVac Savant (ITQB171)

4.4. Procedimentos operativos e outras referências

- European Pharmacopoeia 5.0-2.2.56
- PO10MS - Análise de aminoácidos em proteínas e péptidos
- PO11MS– Preparação de material de vidro para realização de análises de aminoácidos
- PO12MS – Descrição e funcionamento da Workststion PicoTag Waters

4.5. Preparação das soluções para estudo

As soluções para estudo utilizadas nesta validação foram preparadas em diferentes concentrações de acordo com o previsto no plano de estudo (PLA 06/06MS); os processos de hidrólise e derivatização foram realizados segundo o descrito no Procedimento Operativo 10MS.

4.6. Preparação de soluções de referência

As soluções de referência utilizadas nesta validação foram preparadas em diferentes concentrações de acordo com o previsto no plano de estudo (PLA 06/06MS). Além destas, foram preparadas outras soluções com o objectivo de afinar e confirmar alguns dos parâmetros de validação. A sua preparação é descrita nas tabelas 1, 2 e 3 foi realizada de acordo com o Procedimento Operativo 10MS.

Tabela 1 - Soluções de referência utilizadas em testes preliminares (Injection ID6119 a 6282)

Solução de referência	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Concentração em aminoácidos e norleucina (mM)	0,125	0,0875	0,0625	0,025	0,005	0,0005

Tabela 2 - Soluções de referência utilizadas em ensaios de validação (injection ID6898 a 7115)

Solução de Referência	P1b	P2b	P3b	P4b	P5b	P6b
Concentração em Aminoácidos e Norleucina (mM)	0,250	0,125	0,0625	0,025	0,005	0,0005

Tabela 3 - Soluções de referência utilizadas em ensaios de validação (injection ID7230 a 7262)

Solução de Referência	P1c	P2c	P3c	P4c	P5c	P6c
Concentração em Aminoácidos e Norleucina (mM)	0,250	0,15	0,1	0,075	0,05	0,025

Os valores de concentração apresentados dizem respeito às soluções de referência após derivatização e retoma em tampão fosfato de sódio, imediatamente antes da injeção no sistema cromatográfico.

5. Método de ensaio

A metodologia de análise inclui além da preparação das soluções de referência e para estudo já descritas, a análise cromatográfica por RP-HPLC com detecção a 254 nm.

Após derivatização, as soluções de referência e para estudo foram retomadas em 200 µl de solução tampão fosfato de sódio 5mM pH 7.5 e filtradas (em filtro de nylon de poro 0,22 µm), após o que foram injectadas alíquotas de 10 µl (em duplicado) em sistema de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A separação foi avaliada em colunas de fase reversa, Waters Nova-Pack® C18, 60Å, 4 µm de 15 e 30cm, a 38°C e 46°C, respectivamente, sendo os gradientes descritos nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Gradiente utilizado na separação de aminoácidos em coluna de 15cm

	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Evolução do gradiente
1	0,01	1,00	100,0	0,0	Linear
2	10,00	1,00	5,0	46,0	
3	10,20	1,00	0,0	100,0	
4	11,70	1,00	0,0	100,0	
5	12,00	1,50	0,0	100,0	
6	12,20	1,50	0,0	100,0	
7	12,50	1,50	100,0	0,0	
8	20,00	1,50	100,0	0,0	
9	20,50	1,00	100,0	0,0	
10	30,50	1,00	100,0	0,0	

Tabela 5 - Gradiente utilizado na separação de aminoácidos em coluna de 30cm

	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B	Evolução do gradiente
1	0,01	1,00	100,0	0,0	Linear
2	1,00	1,00	100,0	0,0	
3	21,00	1,00	54,0	46,0	Curva 5
4	21,50	1,00	0,0	100,0	Linear
5	22,00	1,50	0,0	100,0	
6	26,00	1,50	0,0	100,0	
7	26,50	1,50	100,0	0,0	
8	39,00	1,50	100,0	0,0	
9	39,50	1,00	100,0	0,0	
10	45,00	1,00	100,0	0,0	

6. Critérios de aceitação utilizados na validação do método analítico

Para avaliação dos testes de validação realizados foram seguidos os critérios de aceitação descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Critérios de aceitação utilizados na validação do método de análise de aminoácido

PARÂMETROS	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO
Repetibilidade instrumental	CV < 5% (para as áreas) e CV < 2% (para o tempo de retenção)
Repetibilidade do método	CV < 10% (áreas)
Linearidade	R ² > 0,9 ; resíduos < 10%
Exactidão	80 e 120% do valor previsto para cada aminoácido 95 a 105% do valor previsto para a proteína total
Resolução	R _s > 1,5
Robustez	CV entre os resultados a três tempos de hidrólises diferentes <10% para os aminoácidos individuais e 5% para a proteína total
Estabilidade de soluções	Cv < 10 % para soluções da substância de estudo

7. Ensaio de validação e discussão de resultados

A tabela 7 resume os ensaios realizados para validação dos vários parâmetros. Para cada ensaio de validação são apresentados os resultados experimentais obtidos, bem como o seu tratamento e discussão.

Tabela 7 – Ensaio realizados para o estudo dos parâmetros para validação

Parâmetro de validação	Solução de referência	Solução para estudo	Nº de injeções	Tempo de hidrólise (h)
Resolução e simetria	P1, P1b	-	1	-
Repetibilidade instrumental	P1, P3, P5	-	6	-
Linearidade	P1b-P5b, P1c-P6c	-	3	-
Repetibilidade do método	-	SP1_24h a SP3_24h b	2	24
Precisão intermédia	-	SP1_24h a SP3_24h b SP1_dia 2 a SP3_dia2 b SP1_dia 3 a SP3_dia3 b	2	24
Robustez	-	SP2_20,SP2_24,SP2_48,SP2_72	2	20, 24, 48, 72
Estabilidade	-	SP2, SP2d2, SP2d3	2	24
Exactidão	-	SP1_24h a SP3_24h b SP1_dia 2 a SP3_dia2 b SP1_dia 3 a SP3_dia3 b	2	24
LOQ e LOD	P5b e P6b	-	2	-

7.1. Resolução e simetria

Iniciaram-se os trabalhos com uma coluna de 15 cm que geralmente é utilizada para a quantificação de aminoácidos de origem proteica e permite efectuar corridas cromatográficas mais curtas. Tendo-se verificado que a resolução calculada entre picos consecutivos era inferior a 1,5 (ver tabela 8), optou-se por utilizar uma coluna de 30 cm.

Tabela 8 - Factores de resolução para uma mistura-padrão de aminoácidos relativos à coluna de 15 cm (injection ID 6121)

Aminoácido	Factor de Resolução
Asx	-
Glx	1,4
Ser	8,3
Gly	1,3
His	1,3
Arg	2,4
Thr	1,1
Ala	0,9
Pro	1,0
Tyr	7,8
Val	3,2
Met	2,2
Ile	1,4
Leu	0,8
Nor	1,7
Phe	2,6
Lys	4,5

As resoluções calculadas para os resultados obtidos utilizando a coluna de 30 cm estão apresentadas na tabela 9, Verificou-se que a resolução calculada entre picos consecutivos era superior a 1,5, valores dentro das especificações estipuladas no plano de validação.

Tabela 9 - Factores de resolução para uma mistura-padrão de aminoácidos relativos à coluna de 30 cm (injection ID 6898)

Aminoácido	Factor de resolução	Factor de simetria
Asx		1,28
Glx	2,50	1,21
Ser	12,67	1,39
Gly	2,74	1,29
His	2,16	1,92
Arg	5,08	1,30
Thr	4,32	1,30
Ala	1,99	1,22
Pro	4,71	1,35
Tyr	2,03	1,29
Val	5,27	1,26
Met	4,51	1,23
Ile	4,59	1,24
Leu	2,33	1,27
Nor	1,64	1,28
Phe	5,52	1,25
Lys	2,01	1,10

Na tabela 9 são também apresentados os factores de simetria calculados para cada pico. À excepção da histidina todos os aminoácidos apresentam picos com factores de simetria dentro dos critérios de aceitação. O pico da histidina apresenta um factor de simetria superior a 1,4, mas este facto não é relevante para este estudo porque a histidina não vai ser utilizada nos cálculos relativos à concentração da substância de estudo.

7.2. Repetibilidade instrumental

Apesar da baixa resolução da coluna de 15cm, os dados obtidos foram utilizados para avaliação da repetibilidade instrumental relativa às áreas e tempos de retenção. Os resultados são apresentados nas tabelas 10 e 11, respectivamente, sendo os coeficientes de variação (Cv) sempre inferiores a 5% para os cálculos relativos às áreas e inferiores a 2% no valores referidos aos tempos de retenção.

Tabela 10 – Resultados relativos a injeção de soluções de referência para avaliação da repetibilidade instrumental das áreas dos picos (injeções 6119 a 6129 para P1, 6140 a 6150 para P3 e 6160 a 6170 para P5)

	Amostra P1		Amostra P3		Amostra P5	
Quantidade injectada (pmol)	1250		625		50	
Aminoácido	Área do pico		Área do pico		Área do pico	
	Média	Coefficiente de variação (%)	Média	Coefficiente de variação (%)	Média	Coefficiente de variação (%)
Asx	969453,48	0,43	485022,76	0,72	39255,25	0,61
Glx	987611,69	0,59	498813,25	0,84	37382,75	1,04
Ser	932946,19	0,67	472564,43	0,74	40321,60	1,09
Gly	974473,09	0,89	491546,86	0,67	42247,09	1,14
His	1019276,39	0,52	515081,14	0,59	44269,11	0,68
Arg	996651,22	0,72	499998,49	0,86	42622,56	0,74
Thr	966837,13	2,47	486293,24	2,49	40969,57	2,68
Ala	1020362,82	0,29	515923,28	0,61	42891,09	0,40
Pro	1062755,93	0,89	542891,36	1,73	44787,10	0,64
Tyr	1071651,55	0,20	537301,95	0,26	42311,25	1,22
Val	1038924,65	0,23	517963,84	0,12	42034,20	0,46
Met	1072624,89	0,14	535231,05	0,17	41310,55	0,63
Ile	1061222,67	1,69	519653,98	2,07	43646,75	2,38
Leu	1100662,42	1,69	568195,65	1,62	44788,57	2,65
Nor	951781,36	0,25	612204,55	0,37	46346,95	0,69
Phe	1149464,10	0,22	614365,52	0,21	89275,00	0,53
Lys	1836418,25	0,25	909874,33	0,18	57478,50	1,58

Tabela 11 – Resultados relativos a injeção de soluções de referência para avaliação da repetibilidade instrumental dos tempos de retenção dos picos (injecções 6119 a 6129 para P1, 6140 a 6150 para P3 e 6160 a 6170 para P3)

	Amostra P1		Amostra P3		Amostra P5	
Quantidade injectada (pmol)	1250		625		50	
	Tempo de retenção		Tempo de retenção		Tempo de retenção	
	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)
Asx	1,74	0,25	1,74	0,31	1,74	0,26
Glx	1,94	0,21	1,94	0,25	1,94	0,23
Ser	3,27	0,15	3,27	0,16	3,27	0,17
Gly	3,48	0,15	3,49	0,15	3,49	0,16
His	3,70	0,15	3,70	0,15	3,72	0,16
Arg	4,12	0,14	4,12	0,14	4,12	0,17
Thr	4,31	0,14	4,31	0,14	4,31	0,15
Ala	4,48	0,13	4,48	0,13	4,48	0,14
Pro	4,67	0,12	4,67	0,11	4,67	0,14
Tyr	6,43	0,10	6,43	0,09	6,43	0,11
Val	7,01	0,09	7,01	0,08	7,01	0,11
Met	7,41	0,09	7,41	0,08	7,42	0,10
Ile	8,49	0,08	8,49	0,06	8,49	0,09
Leu	8,65	0,07	8,65	0,06	8,65	0,09
Nor	8,97	0,07	8,97	0,05	8,97	0,09
Phe	9,45	0,08	9,45	0,04	9,48	0,07
Lys	10,39	0,07	10,35	0,05	10,33	0,07

Os coeficientes de variação das áreas de cada pico e dos seus tempos de retenção são inferiores a 5 e a 2%, respectivamente, para todos os casos. Tendo em conta que estes valores estão compreendidos nos critérios de aceitação definidos no plano de validação, concluiu-se que existe repetibilidade instrumental para este sistema.

No entanto, dado que todo o trabalho passou a ser realizado na coluna de 30 cm, este teste irá ser repetido posteriormente.

7.3. Linearidade

Foi efectuado um primeiro ensaio utilizando as soluções de referência com a composição descrita na tabela 2 do ponto 4.6. O coeficiente de variação das áreas para cada concentração e para cada aminoácido foi inferior a 5% em todos os casos, conforme se pode ver na tabela 12 onde se apresentam os valores da média das áreas de três pontos para cada concentração e respectivos coeficientes de variação.

Verificou-se que era possível estabelecer rectas correlacionando as áreas obtidas com as respectivas concentrações (método do padrão externo) com coeficientes de determinação superiores a 0,99, no entanto as percentagens de desvio dos resíduos em relação às rectas para as soluções de concentração mais baixa eram superiores a 10% para todos os casos. Os cálculos foram refeitos independentemente eliminando os pontos de concentração mais elevada e mais baixa. Deste modo, foi possível estabelecer rectas que respeitam os critérios de aceitação estabelecidos para os resíduos (ver anexo 2, tabelas 1 a 16).

Assim sendo concluiu-se que se verifica existir linearidade independentemente nas gamas de trabalho de 0,025 a 0,25 mM e de 0,005 a 0,125 mM, quando se usar o método do padrão externo. Isto foi confirmado fazendo nova correlação na gama superior, mas com mais pontos nas concentrações: 0,25, 0,15, 0,10, 0,075, 0,05, 0,025 mM (Tabela 3). Como previsto, o coeficiente de variação das áreas para cada concentração e para cada aminoácido foi inferior a 5% em todos os casos (tabela 13), os coeficientes de determinação para todas as espécies são superiores a 0,99 e as percentagens de desvio dos resíduos em relação às rectas são inferiores a 10% para todos os casos (anexo 2, tabelas 17 a 19).

Tabela 12 – Avaliação da linearidade- médias e coeficientes de variação para os aminoácidos na gama de concentração descrita (Injection ID 6898 a 6930)

Aminoácido	Concentração (mM)									
	0,2500		0,1250		0,0625		0,0250		0,0050	
	Média	Cv(%)	Média	Cv(%)	Média	Cv(%)	Média	Cv(%)	Média	Cv(%)
Asx	1886924,37	0,03	985980,97	0,08	469295,57	0,66	206155,50	0,14	40240,10	4,81
Glx	1950751,08	0,07	958381,67	0,09	461892,52	0,91	202322,10	0,29	36777,96	0,83
Ser	1944654,81	0,14	950476,50	0,10	462344,36	1,00	200977,63	0,46	38961,80	0,37
Gly	1957868,81	0,03	955468,30	0,17	462345,41	0,44	199122,42	0,71	37717,35	1,26
His	1944610,67	0,36	955798,28	0,07	459994,84	0,61	193152,39	2,20	35597,68	0,13
Arg	2073636,87	0,07	1018387,04	0,11	493755,99	0,35	212847,62	2,04	39977,67	1,65
Thr	1940302,40	0,06	940450,62	0,13	457342,55	0,13	198101,32	0,29	38518,74	0,36
Ala	2045444,77	0,15	997713,09	0,12	482312,51	0,04	207021,61	0,10	39297,88	0,43
Pro	2110073,31	0,17	1020191,84	0,02	494736,36	0,04	216364,50	0,11	41260,67	1,24
Tyr	2153636,12	0,13	1057407,66	0,11	504947,62	0,14	221266,28	0,65	40824,83	0,13
Val	2150869,04	0,12	1039488,84	0,14	500638,24	0,23	217210,00	0,13	41804,00	0,78
Met	2162687,99	0,11	1041794,38	0,08	500767,29	0,10	215423,32	0,06	38549,33	1,43
Ile	2261461,88	0,26	1090121,72	0,36	532841,72	0,53	233738,67	0,10	46972,50	0,35
Leu	2144832,74	0,18	1037428,74	0,19	497872,72	0,29	215943,17	0,44	41133,76	1,33
Nor	2108207,89	0,40	995736,17	0,10	493250,50	0,10	204555,17	0,15	39124,67	0,79
Phe	2175781,07	0,11	1063088,09	0,15	504880,37	0,09	219989,64	0,62	42821,94	0,69
Lys	3854164,00	0,08	1887284,02	0,16	858254,68	0,14	367236,83	0,03	58490,00	1,16

Tabela 13 – Avaliação da linearidade- médias e coeficientes de variação para os aminoácidos na gama de concentração descrita (Injection ID 7230 a 7262)

Aminoácido	Concentração (mM)											
	0,25		0,15		0,10		0,075		0,05		0,025	
	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)
Asx	1976231,47	0,26	1193191,61	0,16	798890,78	0,15	601234,38	0,04	395455,50	0,05	190172,98	0,16
Glx	1924059,37	0,17	1166936,08	0,19	777354,56	0,23	589107,78	0,15	390223,16	0,01	185540,52	0,05
Ser	1914971,35	0,31	1168477,94	0,11	779729,35	0,23	593880,03	0,08	392023,03	0,09	188175,86	0,23
Gly	1936577,59	0,23	1172234,16	0,04	775380,30	0,19	592468,42	0,16	392169,68	0,12	187917,31	0,21
His	1883541,26	1,36	1120719,83	0,32	782476,36	0,22	550804,61	0,91	349775,44	0,32	169548,57	0,58
Arg	2048388,39	0,63	1269094,99	0,20	830908,82	0,22	651946,29	0,30	434516,56	0,28	206154,83	0,65
Thr	1913492,28	0,18	1163642,30	0,14	776855,56	0,32	589084,97	0,42	386646,82	0,08	187840,33	0,27
Ala	2012637,15	0,23	1217978,00	0,17	808258,78	0,28	618822,07	0,64	406135,15	0,14	194113,55	0,78
Pro	2071031,67	0,08	1256343,44	0,16	827700,02	0,24	637649,41	0,39	422394,40	0,06	201426,67	0,11
Tyr	2085183,95	1,07	1275235,30	0,91	853019,33	0,18	640164,67	0,07	419993,00	0,06	200173,83	0,05
Val	2098129,64	0,31	1263118,19	0,25	849583,67	0,27	638360,17	0,09	420535,50	0,33	198123,00	0,15
Met	2088051,14	0,25	1257703,67	0,13	841313,33	0,23	631603,17	0,01	414998,84	0,02	194949,69	1,06
Ile	2161948,51	0,22	1310467,80	0,20	882556,67	0,29	672707,85	0,07	452129,23	1,36	229788,66	4,78
Leu	2071669,01	0,20	1256720,04	0,13	836992,33	0,13	641168,32	0,03	421855,78	0,09	198442,01	0,18
Phe	2107207,01	0,31	1276264,33	0,27	861598,17	0,23	642494,83	0,02	425182,50	0,04	201494,67	0,10
Lys	3481025,89	3,40	2024261,76	0,19	1516969,84	0,26	980472,97	0,15	650985,75	0,19	295370,63	0,52

7.4. Repetibilidade do método e precisão intermédia

Com o objectivo de avaliar estes parâmetros foram efectuados ensaios de acordo com o descrito na tabela 2 do plano de validação. Para avaliação da precisão intermédia foram feitas repetições do ensaio em três dias diferentes.

Todos os resultados são apresentados nas tabelas 14, 15 e 16, respectivamente para cada uma das concentrações da solução para estudo.

Verificou-se que, no caso das duas concentrações mais baixas de BSA (0,02 e 0,10 mg/ml), para um dos replicados se obtiveram áreas significativamente diferentes das obtidas para os outros dois, não se verificando o mesmo para a norleucina. O operador tinha registado nos dados originais dificuldades na pipetagem do padrão de BSA, devido à viscosidade das soluções para estudo. A falta de repetibilidade observada foi atribuída a este efeito; assim sendo eliminaram-se os resultados correspondentes às alíquotas em que foram detectados problemas e não se apresentam os coeficientes de variação respectivos. Fazendo os cálculos dos coeficientes de variação para as três concentrações referentes ao dia 2, verifica-se que são inferiores a 10% para todos os casos. Mas como se suspeita de problemas nas pipetagens, decidiu-se que numa fase posterior este ensaio seria repetido para confirmar esta conclusão .

Para avaliação da precisão intermédia foram feitas repetições do ensaio em dois dias diferentes (consecutivos).. Nestes dados não se verificaram variações significativas nas áreas excepto numa alíquota de concentração 0,02 mg/ml (dia 3) em que se verificou de novo este efeito.

Por outro lado encontraram-se coeficientes de variação muito elevados (entre 19,9 e 33,8%) para a concentração de Norleucina nos cálculos que consideram amostras preparadas em dias diferentes. Comparando os resultados relativos a amostras preparadas apenas no primeiro dia e calculando o coeficiente de variação entre eles, obtemos um valor de 1,46% (ver tabela 17) pelo que podemos concluir que houve um erro na diluição da solução de Norleucina a partir da solução-mãe. Nos ensaios considerando resultados apenas dos outros dias esta variação já não se verificou. Isto explica o elevado valor de coeficiente de variação relativo à norleucina que iremos encontrar em todos os cálculos em que entram resultados relativos a amostras preparadas no dia 1.

Tabela 14 - Resultados relativos às injecções de BSA na concentração 0,02 mg/ml

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		média dos 3 dias	Cv dos 3 dias (%)
	média	Cv (%)	media	Cv (%)	media	Cv (%)		
Asx	0,014	na	0,016	3,9	0,014	na	0,015	6,2
Glx	0,021	na	0,022	3,4	0,021	na	0,021	4,2
Ser	0,007	na	0,007	2,8	0,007	na	0,007	3,5
Gly	0,005	na	0,005	4,5	0,005	na	0,005	4,5
His	0,005	na	0,005	4,5	0,004	na	0,005	4,2
Arg	0,006	na	0,006	4,1	0,006	na	0,006	4,0
Thr	0,009	na	0,009	3,9	0,009	na	0,009	2,9
Ala	0,12	na	0,013	3,4	0,012	na	0,013	4,9
Pro	0,008	na	0,008	4,0	0,008	na	0,008	4,0
Tyr	0,005	na	0,006	3,8	0,005	na	0,005	5,9
Val	0,009	na	0,010	2,9	0,009	na	0,009	4,3
Met	0,001	na	0,001	6,5	0,001	na	0,001	2,1
Ile	0,004	na	0,004	4,0	0,003	na	0,003	10,0
Leu	0,016	na	0,017	2,9	0,016	na	0,016	5,3
Nor	0,009	na	0,013	0,5	0,011	na	0,011	20,2
Phe	0,007	na	0,008	2,8	0,007	na	0,007	5,2
Lys	0,016	na	0,016	2,7	0,013	na	0,015	10,0
Recuperação (%)	89,0		94,0		89,2		90,7	3,1

Tabela 15 - Resultados relativos às injeções de BSA na concentração de 0,10 mg/ml

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		média dos 3 dias	Cv dos 3 dias (%)
	média	Cv (%)	media	Cv (%)	media	Cv (%)		
Asx	0,084	na	0,083	5,3	0,081	4,5	0,083	1,7
Glx	0,117	na	0,118	5,0	0,115	3,7	0,117	1,3
Ser	0,040	na	0,039	5,3	0,038	3,7	0,039	3,1
Gly	0,026	na	0,026	5,2	0,025	3,1	0,025	1,6
His	0,023	na	0,023	5,0	0,022	3,6	0,023	2,9
Arg	0,034	na	0,034	5,8	0,033	3,6	0,034	1,7
Thr	0,052	na	0,049	5,0	0,048	3,9	0,050	3,6
Ala	0,070	na	0,070	4,8	0,068	3,4	0,070	1,5
Pro	0,043	na	0,043	4,6	0,043	3,1	0,043	0,8
Tyr	0,030	na	0,030	4,6	0,029	3,4	0,030	2,4
Val	0,054	na	0,053	4,7	0,051	3,5	0,052	2,8
Met	0,006	na	0,006	4,6	0,006	4,6	0,006	2,3
Ile	0,021	na	0,022	4,9	0,021	2,6	0,021	1,8
Leu	0,092	na	0,092	4,5	0,089	3,7	0,091	2,1
Nor	0,046	na	0,069	1,7	0,063	1,2	0,059	20,3
Phe	0,041	na	0,041	4,5	0,040	3,4	0,041	2,1
Lys	0,086	na	0,087	4,5	0,086	4,5	0,086	0,8
Recuperação (%)	99,2		99,6		99,4		99,4	0,2

Tabela16 - Resultados relativos às injecções de BSA na concentração de 0,25 mg/ml

	Dia 1		Dia 2		Dia 3		média dos 3 dias	Cv dos 3 dias (%)
	média	Cv (%)	media	Cv (%)	media	Cv (%)		
Asx	0,211	4,1	0,181	1,2	0,194	2,4	0,192	5,2
Glx	0,282	2,2	0,270	0,8	0,276	2,0	0,276	2,2
Ser	0,096	1,9	0,092	0,7	0,093	0,9	0,094	2,2
Gly	0,062	1,7	0,060	1,4	0,062	1,6	0,062	1,9
His	0,061	0,5	0,059	0,9	0,060	3,5	0,060	2,1
Arg	0,083	0,8	0,083	0,4	0,082	2,4	0,083	0,6
Thr	0,124	1,1	0,118	0,4	0,118	2,5	0,120	3,0
Ala	0,171	0,7	0,169	0,7	0,168	2,2	0,169	0,8
Pro	0,106	0,9	0,105	0,9	0,105	2,3	0,105	0,6
Tyr	0,074	0,3	0,074	0,3	0,072	1,8	0,074	1,9
Val	0,129	0,8	0,128	0,4	0,125	1,3	0,127	1,9
Met	0,015	0,3	0,015	1,2	0,015	1,8	0,015	1,2
Ile	0,052	1,1	0,053	1,0	0,051	1,1	0,052	1,5
Leu	0,225	0,8	0,225	0,6	0,221	1,7	0,223	1,0
Nor	0,091	0,7	0,136	0,2	0,123	1,6	0,117	19,9
Phe	0,101	0,9	0,101	0,2	0,098	1,5	0,100	1,5
Lys	0,203	1,9	0,209	0,4	0,205	3,8	0,206	1,5
Recuperação (%)	96,0		95,1		98,3		96,5	

Tabela 17 - Valores de recuperação da Norleucina preparadas no dia 1 de ensaios para diferentes testes de validação (cada um destes resultados de concentração diz respeito à média de 3 alíquotas injectadas em duplicado)

Amostras preparadas no dia 1	20h de hidrólise	24h de hidrólise	48h de hidrólise	72h de hidrólise	Deriv em 27/9	Deriv em 28/9	Média	Coeficiente de variação (%)
Concentração (mM)	0,046	0,046	0,047	0,046	0,047	0,046	0,046	1,46
% de Recuperação	76,0	72,8	76,6	74,8	71,6	70,4	-	-

Para estas alíquotas, foi também calculado o número de resíduos de cada aminoácido, com base no conhecimento da massa molecular da substância de estudo e segundo um processo iterativo descrito no procedimento operativo 10MS. Como neste trabalho não estamos a validar cisteína, triptofano nem metionina, utilizámos o número de resíduos conhecidos para estes aminoácidos. Os resultados encontram-se nas tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18 – Número de resíduos obtidos para os ensaios ao longo dos 3 dias para 0,02 mg/ml

	Nº Resíduos previstos	Número de resíduos calculados						Média	Cv (%)
		Dia 1	Desvio ao nº previsto	Dia 2	Desvio ao nº previsto	Dia 3	Desvio ao nº previsto		
Asx	54	55	1,9	58	7,4	58	7,4	57,0	3,0
Glx	79	81	2,5	82	3,8	85	7,6	82,7	2,5
Ser	32	27	-15,6	27	-15,6	28	-12,5	27,3	2,1
Gly	17	18	5,9	18	5,9	19	11,8	18,3	3,1
His	17	18	5,9	18	5,9	18	5,9	18,0	0,0
Arg	26	22	-15,4	23	-11,5	23	-11,5	22,7	2,5
Thr	34	35	2,9	34	0,0	36	5,9	35,0	2,9
Ala	48	48	0,0	49	2,1	50	4,2	49,0	2,0
Pro	28	30	7,1	31	10,7	32	14,3	31,0	3,2
Tyr	21	21	0,0	21	0,0	21	0,0	21,0	0,0
Val	38	37	-2,6	36	-5,3	37	-2,6	36,7	1,6
Met	5	5	0,0	5	0,0	5	0,0	5,0	0,0
Ile	15	14	-6,7	13	-13,3	12	-20,0	13,0	7,7
Leu	65	64	-1,5	64	-1,5	65	0,0	64,3	0,9
Phe	30	29	-3,3	29	-3,3	29	-3,3	29,0	0,0
Lys	60	61	1,7	60	0,0	56	-6,7	59,0	4,5
Cys	35	35	0,0	35	0,0	35	0	35,0	0,0
Trp	3	3	0,0	3	0,0	3	0	3,0	0,0
Desvio à massa molec (%)	-	-	0,7	-	0,2	-	0,5	0,1	-

Tabela 19 - Número de resíduos obtidos para os ensaios ao longo dos 3 dias para 0,10 mg/ml

Conc SP2	Nº Resíduos previstos	Número de resíduos calculados						Média	Cv (%)
		Dia 1	Desvio ao previsto	Dia 2	Desvio ao previsto	Dia 3	Desvio ao previsto		
Asx	54	58	7,4	58	7,4	58	7,4	58,0	0,0
Glx	79	82	3,8	82	3,8	82	3,8	82,0	0,0
Ser	32	28	-12,5	27	-15,6	27	-15,6	27,3	2,1
Gly	17	18	5,9	18	5,9	18	5,9	18,0	0,0
His	17	16	-5,9	16	-5,9	16	-5,9	16,0	0,0
Arg	26	24	-7,7	24	-7,7	24	-7,7	24,0	0,0
Thr	34	36	5,9	34	0,0	34	0,0	34,7	3,3
Ala	48	49	2,1	49	2,1	49	2,1	49,0	0,0
Pro	28	30	7,1	30	7,1	31	10,7	30,3	1,9
Tyr	21	21	0,0	21	0,0	21	0,0	21,0	0,0
Val	38	37	-2,6	37	-2,6	36	-5,3	36,7	1,6
Met	5	5	0,0	5	0,0	5	0,0	5,0	0,0
Ile	15	15	0,0	15	0,0	15	0,0	15,0	0,0
Leu	65	64	-1,5	64	-1,5	64	-1,5	64,0	0,0
Phe	30	29	-3,3	29	-3,3	28	-6,7	28,7	2,0
Lys	60	60	0,0	61	1,7	61	1,7	60,7	1,0
Cys	35	35	0,0	35	0,0	35	0,0	35,0	0,0
Trp	3	3	0,0	3	0,0	3	0,0	3,0	0,0
Desvio à massa molec (%)			0,41		0,17		0,04	0,18	

Tabela 20 – Número de resíduos obtidos para os ensaios ao longo dos 3 dias para 0,25 mg/ml

	Nº Resíduos previstos	Número de resíduos calculados						Média	Cv (%)
		Dia 1	Desvio ao previsto	Dia 2	Desvio ao previsto	Dia 3	Desvio ao previsto		
Asx	54	57	5,6	53	-1,9	56	3,7	55,3	3,8
Glx	79	81	2,5	79	0,0	80	1,3	80,0	1,3
Ser	32	28	-12,5	27	-15,6	27	-15,6	27,3	2,1
Gly	17	18	5,9	18	5,9	18	5,9	18,0	0,0
His	17	18	5,9	17	0,0	18	5,9	17,7	3,3
Arg	26	24	-7,7	24	-7,7	24	-7,7	24,0	0,0
Thr	34	36	5,9	35	2,9	35	2,9	35,3	1,6
Ala	48	49	2,1	49	2,1	49	2,1	49,0	0,0
Pro	28	30	7,1	31	10,7	31	10,7	30,7	1,9
Tyr	21	21	0,0	22	4,8	21	0,0	21,3	2,7
Val	38	37	-2,6	38	0,0	37	-2,6	37,3	1,5
Met	5	5	0,0	5	0,0	5	0,0	5,0	0,0
Ile	15	15	0,0	15	0,0	14	-6,7	14,7	3,9
Leu	65	65	0,0	65	0,0	64	-1,5	64,7	0,9
Phe	30	29	-3,3	30	0,0	29	-3,3	29,3	2,0
Lys	60	58	-3,3	61	1,7	61	1,7	60,0	2,9
Cys	35	35	0,0	35	0,0	35	0,0	35,0	0,0
Trp	3	3	0,0	3	0,0	3	0,0	3,0	0,0
Desvio à massa molec (%)	-	-	0,24	-	0,02	-	0,01	0,08	-

Para avaliação da precisão intermédia, verificou-se que ao longo dos 3 dias as variações foram sempre inferiores a 5%

Quanto à repetibilidade do método, verifica-se que o coeficiente de variação é sempre inferior a 10% (sendo apenas superior a 5% nos pontos correspondentes à isoleucina, histidina e a asparagina. (Tabela 21)

No que diz respeito ao nº de resíduos verifica-se que para concentrações a partir de 0,25 mg/ml se obtêm composições que correspondem a uma massa molecular da proteína muito próxima da prevista, com variações inferiores a 0,1%.

Tabela 21 – Número de resíduos obtidos para os ensaios do dia 2 nas 3 concentrações previstas para avaliação da repetibilidade do método

	Nº Resíduos previstos	Nº Resíduos calculados			Média	Cv (%)
		0,02 mg/ml	0,10 mg/ml	0,25 mg/ml		
Asx	54	58	58	53	56	5,1
Glx	79	82	82	79	81	2,1
Ser	32	27	27	27	27	0,0
Gly	17	18	18	18	18	0,0
His	17	18	16	17	17	5,9
Arg	26	23	24	24	24	2,4
Thr	34	34	34	35	34	1,7
Ala	48	49	49	49	49	0,0
Pro	28	31	30	31	31	1,9
Tyr	21	21	21	22	21	2,7
Val	38	36	37	38	37	2,7
Met	5	5	5	5	5	0,0
Ile	15	13	15	15	14	8,1
Leu	65	64	64	65	64	0,9
Phe	30	29	29	30	29	2,0
Lys	60	60	61	61	61	1,0
Cys	35	35	35	35	35	0,0
Trp	3	3	3	3	3	0,0

7.5. Estabilidade e robustez

Para avaliar a estabilidade de soluções após hidrólise e derivatização, tomaram-se duas alíquotas de BSA de concentração SP2 (0,10 mg/ml) hidrolizadas durante 24h que só se derivatizaram ao fim de 24 horas e 48h aproximadamente. Cada alíquota foi injectada duas vezes.

Foram calculadas as concentrações de BSA e o número de resíduos da amostra com base nesses resultados (tabelas 22 e 23) e não se detectaram diferenças significativas nestas condições em comparação com uma solução que foi derivatizada imediatamente. A diferenças entre os resultados do primeiro dia e dos dias seguintes foram sempre inferiores a 10%. Conclui-se que as soluções hidrolizadas são estáveis pelo menos durante dois dias, mesmo após derivatização.

Tabela 22 – Comparação das concentrações obtidas em alíquotas de BSA de 0,10 mg/ml hidrolisadas nas mesmas condições e derivatizadas em três dias consecutivos para avaliação da estabilidade das soluções

	Derivatizada no dia (média)	Derivatizada após 24h (média)	Derivatizada após 48h (média)	média dos 3 dias	Cv dos 3 dias (%)
Asx	0,078	0,077	0,085	0,080	5,0
Glx	0,110	0,108	0,120	0,113	4,9
Ser	0,037	0,037	0,040	0,038	4,8
Gly	0,024	0,023	0,026	0,024	4,6
His	0,022	0,021	0,023	0,022	4,5
Arg	0,033	0,031	0,034	0,032	4,8
Thr	0,047	0,046	0,050	0,047	4,3
Ala	0,066	0,065	0,071	0,067	4,2
Pro	0,041	0,040	0,044	0,042	5,2
Tyr	0,029	0,027	0,030	0,029	4,3
Val	0,050	0,048	0,053	0,050	3,9
Met	0,006	0,006	0,007	0,006	5,5
Ile	0,021	0,020	0,021	0,021	2,6
Leu	0,087	0,085	0,093	0,088	3,9
Nor	0,070	0,045	0,044	0,053	25,6
Phe	0,040	0,037	0,041	0,039	4,0
Lys	0,083	0,080	0,087	0,083	3,8
% de Recuperação	-	-	-	96,1	-

Tabela 23 - Número de resíduos obtidos para amostras 0,10 mg/ml hidrolisadas nas mesmas condições e derivatizadas em três dias consecutivos para avaliação da estabilidade das soluções.

Data de derivatização	Nº resíduos teórico	Número de resíduos calculados			Média	Cv (%)
		Derivatização no dia	Derivatização após 24h	Derivatização após 48h		
Asx	54	58	58	57	57,7	1,0
Glx	79	83	84	83	83,3	0,7
Ser	32	28	28	27	27,7	2,1
Gly	17	18	18	18	18,0	0,0
His	17	16	16	16	16,0	0,0
Arg	26	23	23	24	23,3	2,5
Thr	34	35	34	34	34,3	1,7
Ala	48	49	49	49	49,0	0,0
Pro	28	30	31	30	30,3	1,9
Tyr	21	21	21	21	21,0	0,0
Val	38	37	36	37	36,7	1,6
Met	5	5	5	5	5,0	0,0
Ile	15	15	15	15	15,0	0,0
Leu	65	65	64	65	64,7	0,9
Phe	30	28	28	29	28,3	2,0
Lys	60	61	60	61	60,7	1,0
Cys	35	35	35	35	35,0	0,0
Trp	3	3	3	3	3,0	0,0

Com vista a avaliar a robustez do método no efeito do tempo de hidrólise, testaram-se tempos de 20, 24, 48 e 72 horas. Usou-se uma concentração e fizeram-se três repetições para cada tempo. Foram realizados os cálculos em termos de concentração e do número de resíduos (ver tabelas 24 e 25).

Verificou-se que às 20 horas o coeficiente de variação entre as três repetições é bastante elevado (maior que 10%), o que não se passou nos outros casos, o que se deve provavelmente a uma hidrólise incompleta. Tomando como referência a hidrólise durante 24h, verificou-se que as diferenças na quantificação às 48 e às 72h são inferiores a 5.2% . Os únicos aminoácidos em que isto não se verifica são a serina que se degrada fortemente com a hidrólise (o que se vê com o aumento de cv ao longo do tempo) e a treonina que também se degrada. Assim sendo, os resultados podem ser considerados equivalentes do ponto de vista da concentração Esta conclusão não é, no entanto, extrapolável para outras proteínas e o estudo da influência do tempo de hidrólise deverá sempre ser avaliada.

Observando a tabela relativa ao número de resíduos (Tabela 25) pode ver-se que, regra geral, também não há um desvio muito elevado relativamente aos resultados das 24 horas, excepto para a serina e a isoleucina cujo coeficiente de variação (cv) aumenta ao longo do tempo de hidrólise. Principalmente no caso da serina deverá considerar-se sempre o valor obtido para o menor tempo de hidrólise, embora para os outros, os resultados se possam considerar equivalentes.

Tabela 24 -Efeito do tempo de hidrólise em amostras de 0,10 mg/ml (avaliação do ponto de vista da concentração de proteína)

	20h			24h		48h			72h		
	Média	Cv (%)	Dif relat 24h (%)	Média	Cv (%)	Média	Cv (%)	Dif relat 24h	Média	Cv (%)	Dif relat 24h (%)
Asx	0,076	11,3	8,2	0,083	5,3	0,085	1,4	2,6	0,083	2,9	0,7
Glx	0,107	11,0	8,8	0,118	5,0	0,121	1,7	3,0	0,117	2,8	0,7
Ser	0,038	11,4	2,4	0,039	5,3	0,038	2,1	1,1	0,034	1,6	12,9
Gly	0,024	10,8	6,8	0,026	5,2	0,026	2,1	2,7	0,026	3,0	0,2
His	0,022	11,5	3,0	0,023	5,0	0,024	1,6	3,7	0,023	3,2	1,2
Arg	0,032	11,0	6,8	0,034	5,8	0,035	2,5	2,0	0,033	2,7	2,5
Thr	0,049	11,2	0,6	0,049	5,0	0,051	1,8	4,7	0,046	2,6	5,7
Ala	0,066	10,5	5,5	0,070	4,8	0,072	1,9	3,1	0,069	2,7	1,2
Pro	0,041	10,6	4,1	0,043	4,6	0,045	2,1	4,7	0,043	2,4	0,4
Tyr	0,028	10,4	8,5	0,030	4,6	0,031	1,6	2,8	0,029	2,4	3,0
Val	0,048	11,0	8,8	0,053	4,7	0,055	2,0	4,7	0,053	2,4	1,5
Met	0,006	14,2	5,7	0,006	4,6	0,007	2,1	13,5	0,006	4,7	5,0
Ile	0,020	11,2	9,0	0,022	4,9	0,023	2,8	3,1	0,022	3,1	2,6
Leu	0,086	10,6	6,9	0,092	4,5	0,095	1,9	3,2	0,091	2,5	1,2
Phe	0,038	10,7	7,2	0,041	4,5	0,042	1,5	2,3	0,040	2,5	2,4
Lys	0,082	10,4	5,6	0,087	4,5	0,089	1,0	2,0	0,086	2,5	1,1
% recuperação	94,9	-	4,7	99,6	-	104,8	5,2	-	100,9	3,9	-

Tabela 25 -Efeito do tempo de hidrólise em amostras de 0,10 mg/ml (avaliação do ponto de vista do número de resíduos)

	Resíduos previstos	20h		24h	48h		72h	
		Resíduos calculados	Diferença relativa às 24h (%)	Resíduos calculados	Resíduos calculados	Diferença relativa às 24h (%)	Resíduos calculados	Diferença relativa às 24h (%)
Asx	54	56	3,4	58	58	0,0	58	0,0
Glx	79	79	3,7	82	82	0,0	82	0,0
Ser	32	28	0,0	28	26	7,1	24	14,3
Gly	17	18	0,0	18	19	-5,6	19	-5,6
His	17	17	-6,3	16	17	-6,3	17	-6,3
Arg	26	23	4,2	24	24	0,0	24	0,0
Thr	34	36	0,0	36	35	2,8	33	8,3
Ala	48	49	0,0	49	49	0,0	49	0,0
Pro	28	31	-3,3	30	31	-3,3	31	-3,3
Tyr	21	21	0,0	21	22	-4,8	21	0,0
Val	38	36	2,7	37	37	0,0	38	-2,7
Met	5	5	0,0	5	5	0,0	5	0,0
Ile	15	17	-13,3	15	16	-6,7	17	-13,3
Leu	65	64	0,0	64	64	0,0	64	0,0
Phe	30	28	3,4	29	28	3,4	28	3,4
Lys	60	61	-1,7	60	60	0,0	61	-1,7
Cys	35	35	0,0	35	35	0,0	35	0,0
Trp	3	3	0,0	3	3	0,0	3	0,0

7.6. Exactidão

A exactidão foi avaliada em termos da recuperação de cada aminoácido a partir da solução padrão de BSA e em termos da recuperação face ao cálculo da proteína total. Os cálculos foram efectuados sobre a média de três replicados, para as três concentrações testadas. (Ver tabelas do ponto anterior)

Verificou-se que é possível cumprir o critério de recuperação de aminoácidos (80 a 120%) em todos os casos, excepto em situações pontuais para a concentração mais baixa e para o caso da metionina e da serina, arginina, lisina.

Nos ensaios efectuados com as soluções de concentração 0,10 mg/ml e 0,25 mg/ml, verifica-se que na quantificação dos diferentes aminoácidos, as percentagens de recuperação variaram entre 80,9 e 109.5% . Sendo assim, não se prevê um erro superior a $\pm 10\%$ na determinação de qualquer dos

aminoácidos testados. Sendo assim, conclui-se que só é possível garantir uma exactidão melhor que $\pm 10\%$ para concentrações superiores a 0,10mg/ml

No cálculo da proteína total, seguiu-se o método sugerido na farmacopeia em que se usa um número restrito de aminoácidos para determinar, face ao número de resíduos esperados, a concentração inicial em proteína. Após calcular a média destes resultados e o desvio percentual de cada determinação face à média, eliminam-se sucessivamente os pontos cujo desvio seja superior a 5%, até que todos estejam dentro dessa gama.

Sendo assim calcularam-se as médias das concentrações de cada aminoácido em cada série de replicados e a concentração em proteína foi determinada a partir delas. O critério de aceitação (95 a 105%) foi cumprido em todos os casos na análise das soluções 0,10 e 0,25 mg/ml (variando entre 95,1 e 104,8) mas no caso da solução 0,02 mg/ml as recuperações foram tipicamente menores (89,0 a 94,0%). Sendo assim sempre que se fizer uma determinação a partir de uma solução cuja concentração (após retoma para análise) seja inferior a 0,10mg/ml, espera-se que a contribuição da exactidão para incerteza pode ser até 11%. Nos casos em que a concentração (após retoma para análise) esteja compreendida entre 0,10 e 0,25 mg/ml, não se espera que a contribuição da exactidão para a incerteza seja superior a 5%.

7.7 Limites de detecção e quantificação instrumental

O limite de detecção de cada aminoácido foi calculado a partir dos parâmetros obtidos nos cálculos de linearidade, utilizando a expressão: $L_d = (3,3 \times S_{y1}) / b$, sendo S_{y1} = desvio padrão residual da recta da calibração linear e b = declive da mesma recta.

O limite de quantificação foi calculado a partir dos mesmos parâmetros, mas utilizando a expressão: $L_q = (10 \times S_{y1}) / b$, sendo S_{y1} e b os mesmos parâmetros da expressão anterior.

Os valores obtidos para L_d e L_q , são apresentados na tabela 26.

Tabela 26 - Limites de detecção e quantificação (calculados com base nos cromatogramas correspondentes a injection ID6898 a 7116)

	Ld (mM)	Lq (mM)
Asx	0,002	0,008
Glx	0,002	0,006
Ser	0,002	0,005
Gly	0,002	0,005
His	0,002	0,005
Arg	0,002	0,005
Thr	0,002	0,005
Ala	0,002	0,005
Pro	0,002	0,006
Tyr	0,002	0,007
Val	0,002	0,006
Met	0,002	0,006
Ile	0,002	0,005
Leu	0,002	0,006
Nor	0,001	0,002
Phe	0,002	0,007
Lys	0,001	0,002

Para confirmar os valores dos limites de detecção obtidos, foi analisada uma solução de referência de concentração 0,0005 mM (após retoma para análise). Como se pode ver pela figura 3 do Anexo1, todos os aminoácidos são claramente detectáveis para esta concentração.

Para confirmar os valores dos limites de quantificação obtidos, foi analisada uma solução de referência de concentração 0,005 mM (Injection ID 6160 na figura 4 do Anexo 1). Esta solução é detectável e quantificável. Para além disso, foi verificada a repetibilidade deste ponto com 6 injeções consecutivas (Injection ID 6160 a 6170), conforme se pode observar na tabela 10.

Em conclusão, consideram-se válidos estes limites de detecção e quantificação.

8. Conclusões

Face aos resultados obtidos nos testes de validação, podemos concluir que o método estudado neste trabalho é válido para soluções de referência de aminoácidos na gama de trabalho entre 0,005 e 0,25 mM (após derivatização e retoma) e para quantificação da concentração de soluções de BSA na gama de 0,02 a 0,25 mg/ml.

Concluiu-se que, para quantificação de aminoácidos de concentrações superiores a 0,0625mM se deve usar uma recta de calibração traçada na gama de 0,025 a 0,25 mM, enquanto que para quantificação de concentrações inferiores a 0,0625 mM se deve usar uma recta de calibração traçada na gama de 0,005 a 0,125 mM, sempre que se usar o método do padrão externo.

No que diz respeito ao cálculo da concentração de BSA, verificou-se que só é possível garantir uma exactidão melhor que $\pm 10\%$ para concentrações superiores a 0,10mg/ml, pelo que é aconselhável trabalhar acima desse valor.

Dos cálculos realizados conclui-se também que sempre que se trabalhar com soluções para estudo cuja concentração seja inferior a 0,10mg/ml, a contribuição da exactidão para a incerteza pode ir até aos 11%. Nos casos em que a concentração esteja compreendida entre 0,10 e 0,25 mg/ml a contribuição da exactidão para a incerteza não será superior a 5%.

Relativamente ao cálculo do número de resíduos pode concluir-se que para concentrações a partir de 0,25 mg/ml se obtêm composições que correspondem a uma massa molecular da proteína muito próxima da prevista, com variação inferior a 0,1%, pelo que será vantajoso trabalhar com amostras de concentração superior a este valor.

Tomando como referência a hidrólise durante 24h, verificou-se que as diferenças na quantificação às 48 e às 72h são inferiores a 5.2%. Os únicos aminoácidos em que isto não se verifica são a serina que se degrada fortemente com a hidrólise (o que se vê com o aumento de cv ao longo do tempo) e a treonina que também se degrada. Assim sendo, os resultados podem ser considerados equivalentes do ponto de vista da concentração Esta conclusão não é, no entanto, extrapolável para outras proteínas e o estudo da influência do tempo de hidrólise deverá sempre ser avaliada.

CAPÍTULO 4

Conclusões e Notas Finais

Neste capítulo, para além de uma avaliação geral dos resultados dos trabalhos apresentados neste documento, é feita uma pequena reflexão sobre o meu percurso profissional, perspectivas futuras e seu enquadramento no âmbito deste Mestrado.

Relativamente à técnica de Análise de Aminoácidos que escolhi como fio condutor para a elaboração deste relatório, e que está descrita detalhadamente no Capítulo 2, foi também descrita a validação com vista a determinação da concentração de proteína. Dos resultados obtidos conclui-se que o método é válido para quantificação da concentração de soluções de BSA na gama de 0,02 a 0,25 mg/ml. Relativamente ao cálculo do número de resíduos concluiu-se que para concentrações a partir de 0,25 mg/ml se obtêm composições que correspondem a uma massa molecular da proteína muito próxima da prevista, pelo que é vantajoso trabalhar com amostras de concentração superior a este valor.

Em termos de desvantagens, este protocolo, além de muito trabalhoso e conseqüentemente bastante demorado, só é válido em ensaios com concentrações de proteína superiores a 0,25 mg/mL.

Este protocolo de análise foi aplicado no artigo apresentado no Anexo 1 e em cuja parte prática participei, "Biochemical Characterization of Plasma in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Amino Acid and Protein Composition". Nele foi realizado um estudo da composição de aminoácidos na forma livre e na forma proteica, do plasma de um grupo de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Foram feitas análises comparativas entre um grupo de pessoas saudáveis e um grupo de pessoas portadoras de diferentes doenças neurodegenerativas. Verificou-se que havia grandes alterações no teor de aminoácidos entre os vários grupos.

Os resultados obtidos sugerem que a administração de suplementos em aminoácidos pode ter efeitos benéficos no decurso da doença.

No laboratório do ITQB, realizei a parte experimental correspondente à análise de aminoácidos das diferentes amostras. Preparei as amostras de plasma, às quais, após adição de padrão de Norleucina, extraí a fracção de aminoácidos que se pretendia analisar, em coluna de fase sólida (SPE), de acordo com o plano referido no procedimento operativo 109LA, seguido de derivatização e análise cromatográfica. Duplicados de cada uma destas amostras, sem qualquer tipo de extração, foram submetidos a hidrólise ácida com ácido clorídrico 6N, de acordo com o protocolo descrito no mesmo procedimento operativo, para análise de aminoácidos totais, seguido de derivatização e análise cromatográfica. Por diferença, chegou-se à composição de aminoácidos na forma livre e proteica em cada fracção.

Como conclusão deste relatório, faço uma pequena reflexão sobre os aspectos que considero mais importantes na evolução do meu percurso profissional até ao presente e perspectivas futuras.

Nesta análise pude observar que ao longo destes anos, a minha actividade profissional foi evoluindo em duas vertentes:

1. por um lado, a aquisição de competências para o desenvolvimento de métodos numa vasta gama de técnicas, a par com a formação e aplicação dos princípios de boas práticas de laboratório. Os conhecimentos (e hábitos) adquiridos durante a minha colaboração com a unidade de boas práticas de laboratório (ASU), levaram-me a adoptar um elevado rigor no que respeita à organização do laboratório, ao planeamento de cada trabalho e à estruturação de relatórios. A organização do espaço de trabalho, a inventariação e verificação minuciosa dos equipamentos e acessórios e respectivos registos de utilização, bem como registos minuciosos de resultados, são práticas que passei a considerar absolutamente fundamentais para um bom desempenho técnico. Outras características que desenvolvi, foram a capacidade de trabalhar em equipa, a capacidade organizacional, o espírito crítico e a adaptação a vários ambientes sociais. Esta aprendizagem resultou na participação em vários projectos académicos e de colaboração com a indústria farmacêutica.
2. por outro lado, a vertente relativa à formação de alunos, que quase não referi, mas que tem feito parte das minhas actividades de forma natural, tendo em conta que um dos objectivos principais do ITQB é a formação de alunos de doutoramento, mestrado e de pós-graduação e também a divulgação das nossas actividades científicas organizando estágios de verão. Por considerar que este é um aspecto relevante na minha actividade, frequentei o curso “Formação Pedagógica Inicial de Formadores” do Instituto do Emprego e Formação Profissional, com o objectivo de adquirir competências para transmitir aos alunos conhecimentos teóricos e práticos de forma mais clara e eficiente.

Relativamente a perspectivas futuras, tenho a noção de que é fundamental ter espírito aberto à mudança e considero importante manter-me em constante actualização relativamente a novas estratégias de abordagem das questões que surgem no dia-a-dia. Isto pode ser conseguido através de pesquisa bibliográfica, frequência de seminários, *workshops* e cursos de formação.

Fazendo agora um enquadramento do meu percurso neste curso de Mestrado:

A minha actividade profissional enquadra-se no âmbito do mestrado em Engenharia Química e Bioquímica, nomeadamente na parte de gestão laboratorial e colaboração com empresas, o que permitiu reforçar a minha capacidade de resolução de problemas e aquisição de competências complementares à minha formação académica. Quanto à colaboração com empresas, durante a minha colaboração com a ASU, foram realizados trabalhos de desenvolvimento e transferência de métodos em parceria com várias empresas da indústria farmacêutica. Nomeadamente, a validação do método descrito neste relatório (entre outras) foi realizada a pedido da indústria farmacêutica para quantificação de uma biomolécula a ser usada num medicamento e enquadra-se assim nos objectivos do Mestrado Integrado em Engenharia Química e Bioquímica

ANEXOS

Anexos

Anexo 1	“Biochemical Characterization of Plasma in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Amino Acid and Protein Composition”	A - 3
Anexo 2	Trabalhos Realizados e Colaborações	A - 13
Anexo 3	Acções de Formação	A - 21
Anexo 4	Cromatogramas e Cálculos Estatísticos relativos a “Validação do Método de Quantificação de Aminoácidos em Proteínas e Péptidos e Determinação da Concentração de Proteína” descrita no Capítulo 3	A - 25

ANEXO 1

Biochemical Characterization of Plasma in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Amino Acid and Protein Composition

Artigo Publicado em *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2005; 6: 104–110

ANGELINA PALMA¹, MAMEDE DE CARVALHO^{2,3}, NUNO BARATA¹, TERESINHA EVANGELISTA², PAULA CHICAU¹, MANUELA REGALLA¹ & JULIA COSTA^{1,4}

¹Laboratory of Glycobiology, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, ²Department of Neurology, Hospital de Santa Maria, Lisboa, ³EMG Laboratory, IMM, FML, Lisboa, and ⁴Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal

ORIGINAL ARTICLE

Biochemical characterization of plasma in amyotrophic lateral sclerosis: Amino acid and protein composition

ANGELINA PALMA¹, MAMEDE DE CARVALHO^{2,3}, NUNO BARATA¹,
TERESINHA EVANGELISTA², PAULA CHICAU¹, MANUELA REGALLA¹ &
JÚLIA COSTA^{1,4}

¹Laboratory of Glycobiology, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, ²Department of Neurology, Hospital de Santa Maria, Lisboa, ³EMG Laboratory, IMM, FML, Lisboa, and ⁴Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Oeiras, Portugal

Abstract

In this work, we have studied the amino acid and protein composition of the plasma from a group of 32 ALS patients. As controls, groups of 10 healthy subjects (HC) and 32 patients with other neuromuscular disorders have been analysed. When the HC group was compared with the ALS group there were significant decreases of His (39 ± 18 to 24 ± 9 μM , $p < 0.01$) and Ala (313 ± 62 to 237 ± 66 μM , $p < 0.05$), and a significant increase of Asn (89 ± 41 to 118 ± 24 μM , $p < 0.05$), for the ALS group. When the three groups were compared, we observed significant decreased concentrations of Ser, His, Thr, Ala, Arg, Tyr, Met, Cys, Ile, and significant increases of Asn, Phe and Lys. An increase of proteolytic products of $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -M), an acute-phase serum glycoprotein that functions as a protease inhibitor, has been observed for a subgroup of ALS patients by Western blot. Furthermore, the detection of $\alpha 2$ -M during disease progression has shown increases of the intact subunit and of a proteolytic product for two of the four patients analysed. Another acute-phase glycoprotein, haptoglobin, which regulates haemoglobin degradation, was not increased for the same group of patients. The results obtained suggested that diet supplementation with His and Ala and modulation of $\alpha 2$ -M might have some beneficial effects on the course of ALS.

Key words: Plasma, amino acid, $\alpha 2$ -macroglobulin, haptoglobin

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a severe neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of motor neurons in the motor cortex, brainstem and spinal cord. In 90–95% of patients there is no apparent genetic linkage (sporadic ALS, SALS), but in the remaining 5–10% of cases the disease is inherited in a dominant manner (familial ALS, FALS) (reviewed by Bruijn et al.) (1). The aetiology of the disease is unknown but several molecular approaches have led to the identification of genes that are differentially expressed in ALS. Among these are genes involved in antioxidant systems, regulation of motor neuron function, lipid metabolism, protease inhibition (2), and in inflammation and apoptosis processes (3). In ALS, neuro-inflammatory changes occur, as observed in other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's

disease. In particular, there is accumulation of reactive microglia and macrophages in the degenerating spinal cord, which is not observed in the spinal cord from controls (1). Even if the inflammation is not the cause of the disease, it is probably part of the degenerative process, which might anticipate the potentialities for anti-inflammatory therapeutic agents.

No biological marker has been identified in ALS, either for diagnosis or to measure disease progression. Plasma analysis can be useful in the identification of amino acids or proteins that are deregulated in ALS. Altered levels of plasma amino acids have been reported in ALS by several groups, but discrepancies are observed for certain amino acids (4–7). Moreover, increased levels of proteins potentially involved in the inflammatory process have been identified, such as soluble E-selectin (8), prostaglandin E(2) (9) and monocyte-chemoattractant protein

Correspondence: J. Costa, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2781-901 Oeiras, Portugal. Fax: 351 21 4411277. E-mail: jcosta@iqb.utl.pt

(Received 11 August 2004; accepted 15 December 2004)

ISSN 1466-0822 print/ISSN 1471-180X online © 2005 Taylor & Francis Group Ltd
DOI: 10.1080/14660820410021320

(MCP-1) (10). In addition, also the proteins neuronal Tau (11), proteins from the neurofilaments (12) and the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) (13) have been described as increased in ALS. However, decreased levels of the glial S100 beta (11) were found in the serum and CSF of ALS patients. Furthermore, a set of 20 biomarker proteins was found that exhibited statistical differences between the control and ALS patient groups (14).

In this work we have characterized biochemically the plasma of a group of ALS patients, and compared this with healthy controls and patients with other chronic neuromuscular disorders associated with muscle atrophy. The most striking findings were the decrease in His and Ala concentrations and increase of Asn in the plasma of the ALS patients, as well as increased proteolytic processing of the acute-phase protease inhibitor α 2-macroglobulin (α 2-M).

Materials and methods

ALS patients and controls

All of the ALS patients used in this study had probable or definite disease, according to the revised El Escorial criteria (15). Four of them had familial ALS.

A set of 21 ALS patients (10 females and 11 males) were submitted to amino acid analysis. Their ages ranged from 31 to 90 years (mean 57 years, SD 15). Disease duration ranged from 1 to 11 years (mean 3.5 years, SD 2.4). All these patients were taking riluzole. Nine subjects constituted the healthy control group (mean age 59 years, SD 10). The other diseases control group included 19 patients, with other neuromuscular disorders, aging from 17 to 76 years (mean age 50 years, SD 19). This group contained patients with muscular dystrophy (8), hereditary sensory-motor neuropathy type I (3), familial amyloid neuropathy-type I (1), Machado-Joseph disease (1), chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (1), idiopathic myalgia (1), monomelic motor neuron disease (1), spinal muscular atrophy (1) and idiopathic ataxia (1). Patients with other medical conditions were excluded from this study.

For plasma protein analysis the ALS group was enlarged and comprised 32 patients, 10 females and 22 males. Their ages ranged from 32 to 90 years (mean 58 years, SD 14). The healthy control group included 7 individuals (mean 45 years, SD 11). The other diseases control group was enlarged and included 31 patients with other neuromuscular disorders, aging from 17 to 82 years (mean 52 years, SD 17). This group contained patients with muscular dystrophy (8), hereditary sensory-motor neuropathy type I (9), familial amyloid neuropathy-type I (2), Machado-Joseph disease (3), chronic

Plasma amino acids and proteins in ALS 105

inflammatory demyelinating polyneuropathy (2), idiopathic myalgia (1), monomelic motor neuron disease (2), spinal muscular atrophy (1), Guillain-Barré syndrome (1) and idiopathic ataxia (1).

The patients were not on tube feeding, nor were they taking any other supplementals. They did not have gastrostomy tubes, nor were they in wheelchair or in bed. Their weights were stable.

Biochemical analysis

Blood was collected to a tube containing ethylenediaminetetra-acetic acid, centrifuged at $1000 \times g$, 10 min, and the supernatant consisting of plasma was conserved at -80°C .

Amino acid analysis

Analyses of free amino acids from the plasma were performed by liquid chromatography in a Waters Pico-Tag Amino Acid Analysis System. Samples were previously cleaned-up of low molecular weight contaminants with C18 Sep-Pak cartridges. Aliquots were dried, and derivatized with phenylisothiocyanate (PITC); PITC-amino acids were separated in a C18 reverse phase column (3.9×30 mm), followed by UV detection at 254 nm.

Protein analysis

Unfractionated plasma (1.25 μl of plasma that contained approx. 75 μg protein) was analysed by SDS-PAGE. The gel contained 10% acrylamide. The proteins were visualized with Coomassie Blue R-250. For protein amino terminal sequencing the plasma proteins separated by SDS-PAGE electrophoresis were electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and stained with Coomassie Blue R-250. The bands of interest were excised and N-terminal sequencing of the proteins was performed on Applied Biosystems Procise 491 HT, in the pulsed-liquid mode, according to manufacturer's specifications. The sequences were identified using the short sequence alignment of the NCBI Blast program.

For Western blot analysis, α 2-macroglobulin (α 2-M) and haptoglobin (Hp) were detected after transfer from the SDS-PAGE gels (10% and 12% acrylamide for α 2-M and Hp, respectively) to PVDF membranes. These were incubated for 1 h, in blocking buffers that consisted of PBS containing 5% (w/v) milk powder, and 0.2 or 0.1% (w/v) Tween 20 for α 2-M or Hp, respectively. The membranes were then incubated with the primary antibodies anti-human α 2-M (1:1000) or anti-human Hp (1:2000), developed in goat (Sigma), in blocking buffer. Washes were done with 0.2 or 0.1% (w/v) Tween 20 in PBS, for α 2-M or Hp blots, respectively. As secondary antibody anti-goat IgG

conjugated to horseradish peroxidase (1:15000, Pierce) was used, for 2 h. Detection was performed by the ECL method according to the manufacturer's instructions (Super Signal West Pico, Pierce, or ECL kit, Amersham).

Statistical analysis

One-way Anova was used to compare the results from the three groups and Tukey's multiple comparison test was used for post-hoc analysis when appropriate. A statistical significance was considered for $p < 0.05$. The software used was the GraphPad Prism. Values are expressed as means \pm standard deviation (SD).

Results

Amino acid analysis

The amino acid concentrations from the plasma of 21 ALS patients have been determined and compared to healthy controls (HC) or controls with other diseases (ODC). The results with the corresponding statistical analysis by the one-way ANOVA method are summarized in Figure 1. We observed significantly decreased concentrations of Ser

($p < 0.0001$), His ($p < 0.0001$), Thr ($p < 0.0004$), Ala ($p < 0.001$), Arg ($p < 0.0001$), Tyr ($p < 0.0006$), Met ($p < 0.0001$), Cys ($p < 0.0001$), and Ile ($p < 0.0056$). On the other hand, significant increases of Asn ($p < 0.0001$), Phe ($p < 0.0001$) and Lys ($p < 0.024$) have been observed. When the HC group was compared with the ALS group there were significant decreases of His (39 ± 18 to $24 \pm 9 \mu M$, $p < 0.01$) and Ala (313 ± 62 to $237 \pm 66 \mu M$, $p < 0.05$), and a significant increase of Asn (89 ± 41 to $118 \pm 24 \mu M$, $p < 0.05$).

Protein analysis

Plasma proteins have been analysed by SDS-PAGE and stained on gel with Coomassie Blue R-250 (Figure 2). The protein patterns were compared and several proteins have been sequenced (indicated on the right side of Figure 2 with an arrow-head; the amino terminal sequences are shown at the bottom of Figure 2). Slight increases were observed for $\alpha 2$ -M. One patient had a high amount of serum amyloid A protein. Apolipoprotein A-I and transthyretin remained essentially unchanged. Haptoglobin (Hp) had a heterogeneous profile. Since SDS-PAGE has a limited resolution and different proteins might migrate with identical

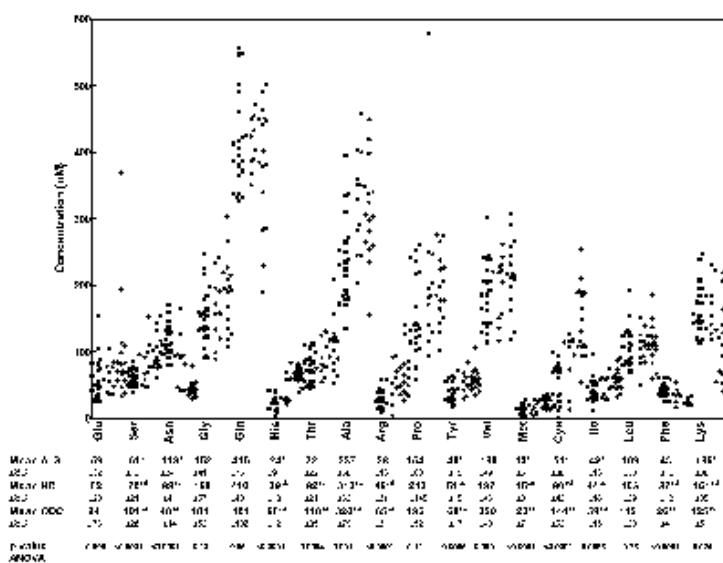


Figure 1. Plasma amino acid levels for individual patients in the ALS (■) and control groups, healthy (HC, ●) or with other diseases (ODC, ★). Mean \pm SD values were calculated for each aa from each group and they are presented in the lower part of the figure. The values indicated with * are significantly different ($p < 0.05$) between ALS and the HC and ODC control groups (p is indicated in the lower line) using the one-way ANOVA analysis. The superscript letters correspond to the p values obtained using the Tukey's multiple comparison test ALS vs. HC or ALS vs. ODC: * $p < 0.001$; ¹ $p < 0.01$; ² $p < 0.05$ and ³ $p > 0.05$.

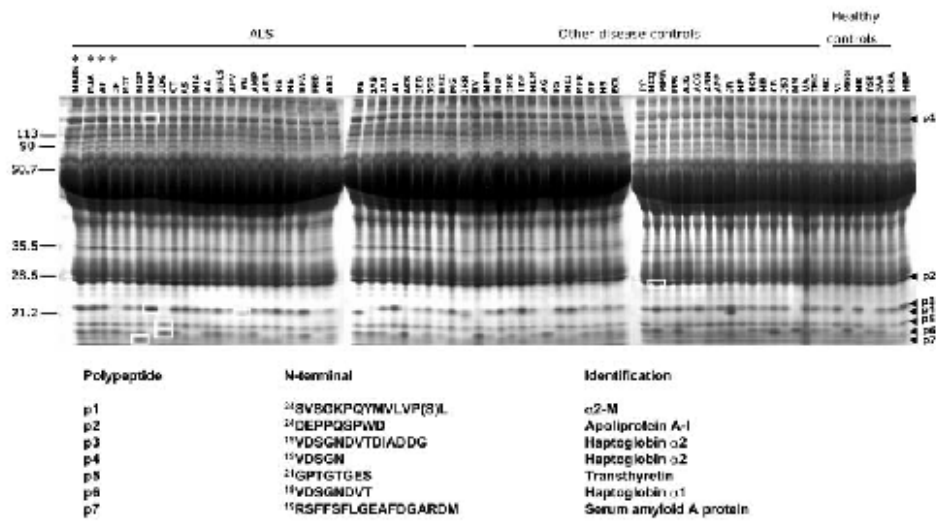


Figure 2. SDS-PAGE analysis of unfractionated plasma from ALS patients. Patients with ALS, other disease controls, and healthy controls are indicated on top of the figure. Patients indicated with * had familial ALS. The designations of the patients are indicated on top of each lane. Bands corresponding to sequenced proteins are surrounded by white squares. The N-terminal sequences were identified using the short sequence alignment of the NCBI Blast program. Sequenced proteins are indicated on the right and the N-terminals are shown at the bottom. The gel contained 10% acrylamide and was stained with Coomassie Blue R-250. Each lane contained 1.25 μ l plasma (approx. 75 μ g protein).

molecular masses, we have monitored the variation of the serum acute-phase proteins α 2-M and Hp by Western blot with specific antibodies (Figures 3,4,5). Human α 2-M is a glycosylated tetramer composed of four 180 kDa subunits (16). The molecular mass of the non-glycosylated unprocessed precursor is 163278. In this work, α 2-M was detected with a polyclonal antibody as a major band with an apparent molecular mass between 205 and 121 kDa that corresponded to the intact subunit (Figure 3). For several individuals, additional bands were detected at approximate molecular masses of 121 kDa (A in Figure 3), between 121 and 90 kDa (B in Figure 3) and between 90 and 74 kDa (C in Figure 3). We have observed that a subgroup of ALS patients (MARS, AF, JF, MIT, MGP, MAP, CT, AS, MIA, AA, HSC, MG, JRR) had higher amounts of the proteolytic products B and/or C, than most of the ODC and the HC control groups (Figure 3). This subgroup of patients had FALS (with unknown

mutations, AF and JF being of the same kindred) and SALS patients. The analysis of ALS type (FALS or SALS, spinal or bulbar), time of progression (slow or fast), predominance of the first neuron, did not allow any conclusions to be drawn about any common feature between patients who exhibited higher α 2-M proteolysis. However, patient AF with FALS (age 62 years) who developed the disease three years earlier, showed higher amounts of α 2-M+A+B+C than his brother (age 61 years) who only developed the disease one year earlier. These results suggested that the progression of disease was associated with increases in α 2-M expression and proteolysis.

In order to test this hypothesis, we have also monitored α 2-M during the progression of disease for four other patients (Figure 4). We have observed for two of the four patients analysed, GRM and PFF, that there was an increase of α 2-M+A+B. The disease in these two patients started in the lower

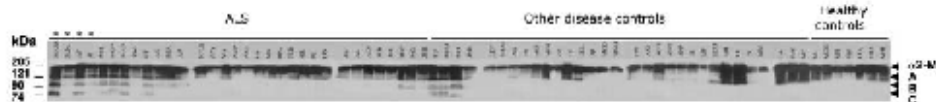


Figure 3. Western blot analysis of α 2-M from unfractionated plasma of ALS patients. Patients with ALS, other disease controls, and healthy controls are indicated on top of the figure. Patients indicated with * had familial ALS. The designations of the patients are indicated on top of each lane. The gel contained 10% acrylamide. Detection was performed by the ECL method. On the right, the α 2-M subunit and proteolytic products A, B, and C are indicated. Each lane contained 1.0 μ l plasma (approx. 60 μ g protein).

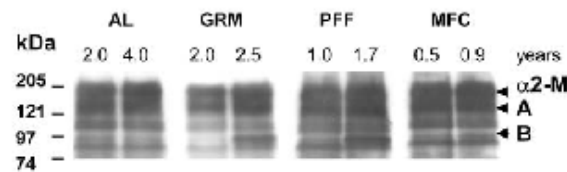


Figure 4. Western blot analysis of α 2-M from unfractionated plasma of ALS patients. Designations of patients AL, GRM, PFF and MFC, and time after diagnosis of ALS are indicated on top of the lanes. The designations of the patients are indicated on top of each lane. The gel contained 10% acrylamide. Detection was performed by the ECL method. Each lane contained 0.33 μ l plasma (approx. 20 μ g protein).

limbs, in contrast to the other two. One of the patients had a fast and the other a slow progression of the disease. Some of the controls with hereditary sensory-motor neuropathy also had higher levels of α 2-M (Figure 3, MB and CB). To our knowledge an association between this type of neuropathy and α 2-M has not been previously described in the literature.

For the Hp protein, we have detected 3 bands at apparent molecular masses of 42, 22 and 18 kDa with an antibody anti-Hp by Western blot (Figure 5). These corresponded to Hp β , Hp α 2 and Hp α 1 (17,18). We did not observe large alterations in the detection level of haptoglobin between the ALS patients and the controls. However, a slight decrease for some of the SALS patients was evident.

Discussion

In the ALS patients analysed in the present work, His and Ala concentrations were significantly decreased. Camu et al. (5) also observed such decreases for ALS patients, being particularly striking in the bulbar type. The levels of Cys and Arg were slightly decreased in ALS similarly to that found by others (5,6), but in contrast to the observation that reported no changes for Cys (4). Cys is a limiting factor for glutathione synthesis which acts at the cellular level as an antioxidant. Oxidative stress has been associated with the development of ALS as well as with other neurodegenerative diseases (1). The decrease of Cys in the plasma could be associated with increased concentrations of reactive oxygen species which are known to be associated with the disease. However, results

from therapeutic trials of ALS with antioxidants lacked substantial clinical trial evidence to support their clinical use (19). In the population studied, the excitatory amino acid Glu remained unaltered as described before by others (5,7).

All the ALS patients in the present work were taking riluzole. Other authors have observed that riluzole caused a significant decrease in plasma Ser and a significant increase in Ile; the other amino acids remained unchanged (20). Therefore, the conclusions drawn above for His and Ala should not be the consequence of riluzole treatment.

Our results suggested that diet supplementation with His and Ala might have some beneficial effects on the course of ALS.

The α 2-M is a serum glycoprotein composed of four subunits of 180 kDa, and is found at 2–4 mg/ml concentration in the plasma. α 2-M functions as a 'molecular trap' for a large variety of proteases including trypsin, chymotrypsin, pancreatic and neutrophil elastase, and matrix metalloproteases. It exposes a peptide called the 'bait region' that serves as the binding site for the protease then constituting its substrate. The bound protease is still active towards small substrates but not large proteins. However, the complex is rapidly cleared by hepatocytes and degraded (reviewed by Sottrup-Jensen (16)). α 2-M is a good substrate of matrix metalloproteinases (MMPs) (16,21), a sub-family of metalloproteinases that are involved in the degradation and remodelling of the extracellular matrix. For ALS patients, increased levels of MMP-9 have been detected in the plasma and CSF (13,22), possibly reflecting the degeneration of motor neurons and muscles. It has been observed that the cleavage of the α 2-M by the MMPs generated fragments of 98

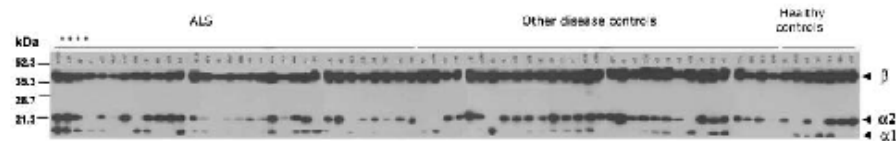


Figure 5. Western blot analysis of haptoglobin from unfractionated plasma of ALS patients. Patients with ALS, other disease controls, and healthy controls are indicated on top of the figure. On the right, Hp subunits α 1, α 2 and β are indicated. Patients indicated with* had familial ALS. The gel contained 10% acrylamide. Detection was performed by the ECL method. Each lane contained 0.33 μ l plasma (approx. 20 μ g protein).

and 80 kDa in reducing SDS-PAGE (21). It is possible that the bands B and C identified in Figure 3 were the proteolytic products of $\alpha 2$ -M catalysed by plasma MMP-9. Since an additional band has been detected at approximately 121 kDa, it is possible that other proteases/proteolytic events were associated with $\alpha 2$ -M processing. Amino acid sequencing of the immunoprecipitated polypeptides might provide information about the occurring proteolytic events.

We have observed that proteolytic processing of $\alpha 2$ -M was more extensive for a subgroup of ALS patients (Figure 3). Furthermore, an individual (AF) with FALS for a longer time than his brother (JF) had higher amounts of $\alpha 2$ -M+A+B+C than his brother (Figure 3). Finally, progression of ALS appeared to be associated with an increase of $\alpha 2$ -M+A+B for half of the patients analysed (Figure 4). These results together suggested that there was an increase of $\alpha 2$ -M proteolysis for a relatively large group of ALS patients probably associated with inhibition of proteases such as MMPs as discussed in the paragraph above. This was a feature common to FALS and SALS. Furthermore, the progression of the disease caused augmented $\alpha 2$ -M proteolysis, possibly concomitant to increased expression of the protein.

$\alpha 2$ -M has been shown to be increased in the brains of patients with Alzheimer's disease. $\alpha 2$ -M binds A β very specifically and promotes its clearing both intra- and extra-cellularly (23). For ALS our results are contradictory to those presented by others where no significant changes were observed for $\alpha 2$ -M between patients with ALS and a healthy control group (24), or where reduced levels of $\alpha 2$ -M were observed for the ALS patients (25). These discrepancies might arise from different techniques used for the determination of $\alpha 2$ -M. We consider that our technique is more reliable since it allows the visualization of not only the intact subunits of $\alpha 2$ -M but also the processed products that arise after conjugation with proteases.

It has been proposed that $\alpha 2$ -M might augment an existing potential for proteinase clearance (16). Therefore, and in view of our results, modulation of $\alpha 2$ -M might have beneficial effects on the course of ALS.

Hp is an acute-phase glycoprotein found in the serum at 1–1.5 mg/ml concentration, and it participates in haemoglobin transport. Human Hp is a tetramer linked by disulfide bonds between two α and two β chains. There are two types of α chains, $\alpha 1$ (83 aa, predicted molecular mass from the sequence 9.1 kDa), and $\alpha 2$ (142 aa, predicted molecular mass from the sequence 16 kDa) (17) that vary within the population, therefore providing the basis for 3 Hp phenotypes, Hp 1-1 ($\beta 2\alpha 1_2$), Hp 2-1 ($\beta 2\alpha 1\alpha 2$) and Hp 2-2 ($\beta 2\alpha 2_2$). The β chains (245 aa, predicted molecular mass from the sequence 27.3 kDa, 4

potential N-glycosylation sites) are conserved for the three phenotypes (18). The overestimation we have observed for the apparent molecular masses of Hp subunits ($\alpha 1$, $\alpha 2$ and β at 18, 22 and 42 kDa, respectively) were probably due to O-glycosylation for Hp $\alpha 2$ and Hp $\alpha 1$, and O- + N-glycosylation for Hp β . Even if Hp is an acute phase glycoprotein it was not possible to observe its increase, contrary to that observed for $\alpha 2$ -M. On the contrary, for some of the ALS patients it appeared that there was a slight decrease in the amount of Hp β . To our knowledge no connection has been reported between ALS and Hp levels in the plasma. For other neurodegenerative diseases, the levels of Hp were similar between Alzheimer's disease patients and normal controls (26); however, elevated levels of haptoglobin have been observed in Duchenne muscular dystrophy (27). It is possible that these two acute-phase proteins are differently induced by cytokines during inflammation. On the other hand, the increased amounts of $\alpha 2$ -M in the serum might result from failure of the blood-brain barrier. A similar increase in serum $\alpha 2$ -M has been observed after osmotic opening of the blood-brain barrier, contrary to that observed for Hp (28). In order to investigate the origin of serum $\alpha 2$ -M in ALS patients a study of $\alpha 2$ -M glycosylation can be performed, since it is known that glycosylation of nervous tissue has several distinguishing characteristics (29).

Acknowledgements

This work has been funded by grant POCTI/CBO/43952/2002 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Portugal. AP was recipient of a PhD fellowship, FCT, Portugal.

References

1. Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unravelling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:723-49.
2. Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem*. 2001;77:132-45.
3. Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, et al. Differential expression of inflammation and apoptosis related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2002;80:158-67.
4. Perry TL, Krieger C, Hansen S, Tabatabaei A. Amyotrophic lateral sclerosis: fasting plasma levels of cysteine and inorganic sulfate are normal, as are brain contents of cysteine. *Neurology*. 1991;41:487-90.
5. Camu W, Billiard M, Baldy-Moulinier M. Fasting plasma and CSF amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis: a subtype analysis. *Acta Neurol Scand*. 1993;88:51-5.
6. Garrel C, Faure H, Favier A, Besson G. Decrease of plasma cysteine values in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients could be the early event leading to an oxidative stress. *ALS Other Motor Neuron Disord*. 2001;2(Suppl 2):132-3.

7. Ilzecka J, Stelmasiak Z, Soldki J, Wawrzycki S, Szpemar M. Plasma amino acids percentages in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Sci.* 2003;24:293-5.
8. Ikeda J, Kohriyama T, Nakamura S. Elevation of serum soluble E-selectin and amsulfoglucuronyl paragloboside antibodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2000;7:541-7.
9. Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, Przedborski S. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology.* 2002;58:1277-9.
10. Wilms H, Sievers J, Dengler R, Butler J, Deuschl G, Lucius R. Intrathecal synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in amyotrophic lateral sclerosis: further evidence for microglial activation in neurodegeneration. *J Neuroimmunol.* 2003;144:139-42.
11. Süssmuth SD, Tumani H, Ecker D, Ludolph AC. Amyotrophic lateral sclerosis: disease stage related changes of tau protein and S100 beta in cerebrospinal fluid and creatine kinase in serum. *Neurosci Lett.* 2003;37-60.
12. Norgren N, Rosengren L, Strigbrand T. Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res.* 2003;987:25-31.
13. Beuche W, Yushchenko M, Mader M, Maliszewska M, Felgenhauer K, Weber F. Matrix metalloproteinase-9 is elevated in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 2000;11:3419-22.
14. Ranganathan S, Jordan K, Sarthanoori R, Henry S, Wood P, Urbinelli L, et al. Identification of ALS specific biomarkers by protein profiling of cerebral spinal fluid. *ALS and Other Motor Neuron Disord.* 2003;4(Suppl 1):12.
15. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munoz TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *ALS and Other Motor Neuron Disord.* 2000;1:293-300.
16. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem.* 1989;264:11539-42.
17. Black JA, Dixon GH. Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobins. *Nature.* 1968;218:736-41.
18. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry.* 1996;42:1589-600.
19. Orrell R, Lane J, Ross M. Antioxidant treatment for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2004; CD002829.
20. Ilzecka J, Stelmasiak Z, Soldki J, Wawrzycki S, Szpemar M. Effect of riluzole (Rilutek) treatment on plasma amino acid percentages in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Sci.* 2003;24:290-2.
21. Enghild JJ, Salvesen G, Brew K, Nagae H. Interaction of human rheumatoid synovial collagenase (matrix metalloproteinase 1) and stromelysin (matrix metalloproteinase 3) with human alpha 2-macroglobulin and chicken ovomarin. Binding kinetics and identification of matrix metalloproteinase cleavage sites. *J Biol Chem.* 1989;264:8779-85.
22. Yushchenko M, Weber F, Mader M, Schöll U, Maliszewska M, Tumani H, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human cerebrospinal fluid (CSF): elevated levels are primarily related to CSF cell count. *J Neuroimmunol.* 2000;110:244-51.
23. Kovacs DM. Alpha 2-macroglobulin in late-onset Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology.* 2000;35:473-9.
24. Adachi N, Shoji S. Studies of protease inhibitors in the sera of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1989;89:165-8.
25. Pestoff BW. Occurrence of reduced alpha 2-macroglobulin and lowered protease inhibiting capacity in plasma of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;421:369-76.
26. Giometto B, Argenteo V, Sanson F, Ongaro G, Tavolato B. Acute-phase proteins in Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 1988;28:30-3.
27. John HA, Purdom IF. Elevated plasma levels of haptoglobin in Duchenne muscular dystrophy: electrophoretic variants in patients with a severe form of the disease. *Electrophoresis.* 1989;10:489-93.
28. Cucullo L, Marchi N, Marroni M, Fazio V, Namura S, Janigro D. Blood-brain barrier damage induces release of (alpha) 2-macroglobulin. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2:234-41.
29. Finne J. Carbohydrate units of nervous tissue glycoproteins. In: Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H, editors. *Glycoproteins II.* Amsterdam: Elsevier, 1997: pp.55-67.

ANEXO 2

Trabalhos Realizados e Colaborações

Publicações em co-autoria

Resumo das colaborações técnica em projectos de investigação e trabalhos publicados

Resumo das colaborações técnicas em Estudos da Unidade de Serviços Analíticos (ASU)

Publicações em co-autoria

- C.M. Gomes, A. Faria, J.C. Carita, J. Mendes, M. Regalla, P.Chicau, H. Huber, K.O. Stetter and M. Teixeira: Di-cluster, seven-iron ferredoxins from hyperthermophilic Sulfo-lobales. Journal of Biological Inorganic Chemistry 3, 499-507 (1998).
- Angelina Palma, Mamede de Carvalho, Nuno Barata, Teresinha Evangelista, Paula Chicau, Manuela Regalla & Júlia Costa Biochemical characterization of plasma in amyotrophic lateral sclerosis: amino acid and protein composition.
- Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2005;6: 104-110.
- Tavares, L.; Carrilho, D.; Tyagi, M.; Barata, D.; Serra, A.T.; Duarte, C.M.M.; Duarte, R.O.; Feliciano, R.P.; Bronze, M.R.; Chicau, P.; Espírito-Santo, M.D.; Ferreira, R.B.; dos Santos, C.N. (2010). Antioxidant Capacity of Macaronesian Traditional Medicinal Plants. *Molecules*, 15: 2576-2592.
- Alves M, Chicau P, Matias H, Passarinho J, Pinheiro C, Ricardo CP (2011) Metabolic analysis revealed altered amino acid profiles in *Lupinus albus* organs as a result of boron deficiency. *Physiol Plantarum* (2011).

Resumo das colaborações técnicas em projectos de investigação e trabalhos publicados

- "Effect of alcoholic fermentation products on the fisiology and methabolism of oenococcus oeni". M.C.Leitão, P.Chicau, M.Regalla, M.V.San Romão. Conference on lactic acid bacteria. Cork , Irlanda. 1995.
- "Interactions between yeasts and lactic acid bacteria".Fifth Symposium on lactic acid bacteria". M.C.Leitão, P.Chicau, M.Regalla, M.V.San Romão. Veldhoven, Holanda. Set 1996.
- "Estudo de redutases de sulfito - Marcadores de bactérias redutoras de sulfato". Projecto financiado pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica.
- "Caracterização de três proteínas contendo novos tipos de centros de ferro". Contrato n° STRDA/BIO/359. Projecto financiado pela JNICT.
- "Proteólise nos Presuntos - Seu Controle e Implicações na Tecnologia de Fabrico". Projecto desenvolvido por um consórcio formado pela firma DAMATTA, Produtos Alimentares Lda / IBET / ITQB e Faculdade de Medicina Veterinária.
- "Estudo do mecanismo metabólico intermediário, o sistema de regeneração da tetrahydropterina e suas implicações em patologia humana" realizado pelo Grupo de Bioquímica-Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge (isolamento e purificação da enzima em estudo).
- "Mecanismos de adaptação de bactérias lácticas do vinho. Papel do etanol e outros metabolitos da fermentação alcoólica"- Projecto PIDDAC código 706/96.

- Colaboração com o IBET no Projecto "Use of Natural Aggregation and Macroporous Supports in Animal Cell Technology" (Out 1994 - Out 1996) na determinação de consumos específicos de metabolitos secundários em diferentes condições de cultura celular.
- Colaboração com o IBET no Projecto " Development of Virus-Like Particle (VLP) Candidate vaccines for Human Immunodeficiency Virus (HIV) Produced by Baculo Multigene Expression Vector "(Dez 1994-Jul 1997), no sentido da comparação de diferentes meios de cultura sem soro, após a fase de adaptação das células de insecto a esses meios, com vista à escolha do meio de cultura a usar em condições industriais.
- Colaboração com o IBET no Projecto "Controlled Growth and Production in Mammalian Cell Culture" (Jan 1996 -), na comparação dos consumos específicos de aminoácidos antes e após a indução da inibição celular, como parte do estudo do metabolismo celular nessas condições.
- Colaboração com o IBET no Projecto "Production of Antibody Cytokine Fusion Protein for Tumour Therapy"(Jan 1997 -), na determinação dos consumos específicos de aminoácidos para a optimização do metabolismo celular em reactores operados em "fed-batch", em condições de operação industriais.
- Colaboração com o Departamento de Silvicultura do Instituto Superior de Agronomia no estudo do comportamento de eucaliptos sujeitos a diferentes níveis de fertilização, objectivamente na quantificação dos aminoácidos livres nos diversos órgãos das plantas.
- Campos A.P., Aguiar A.P., Hervás H., Regalla M., Navarro J.A., Ortega J.A., Xavier A.V., DeLa Rosa M. And Teixeira M(1993). Cytochrome c6 from *Monoraphidium braunii*. A cytochrome with an unusual heme axial coordination. Eur. J. Biochem, 216, 329-341 (1993). FEBS 1993
- Caldeira J., Palma P.N., Regalla M., Lampreia J., Calvete J., Schafer W., LeGall J., Moura I., and Moura J.J. (1994). Primary sequence, oxidation-reduction potentials and tertiary-structure prediction of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 flavodoxin. Eur.J. Biochem, FEBS 1994.
- Saraiva L.M., Fauque G., Besson and Moura I.(1994). Physico-chemical and spectroscopic properties of the monohemic cytochrome c552 from *Pseudomonas nautical* 617.Eur.J.Biochem., 224,1011-1017.
- Saraiva L.M., Besson S., Fauque G. and Moura I.(1994). Characterization of the dihemic cytochrome c549 from the marine dinitrifying bacterium *Pseudomonas nautica* 617. Biochem Biophys. Res.Comm.,199, 1289-1296.
- Dina M. P. Carrilho and Maria C. Duque-Magalhães (1999) "LASI-1 and LASI-2: Two novel metalloproteinase protein inhibitors of small molecular mass".(Painel seleccionado para Comunicação oral apresentado no International Proteolysis Society First General Meeting. Mackinac Island, Michigan,USA)
- Monteiro S., Piçarra-Pereira MA, Loureiro V., Teixeira. A, Ferreira R.B. 2001. Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes. J.Agric Food Chem 2003, 51,4046-4053.
- Monteiro S., Piçarra-Pereira MA, Loureiro V., Teixeira. A, Ferreira R.B. 2001
- The wide diversity of the wine proteins does not originate from a common precursor , rather it increases from maturity to earlier stages of development. J.Agric.Food Chem.

- Monteiro S., Piçarra-Pereira MA, Loureiro V., Teixeira. A, Ferreira R.B.2001.
- Analysis of the polypeptide composition during grape development and ripening by two-dimension electrophoresis. Am J.Enol Vitic.
- Phil A.P.Jackson, Carla I.R.Galinha, Cristina S.Pereira, Ana Fortunato, Nelson C.Soaes, Sara B.Q. Amâncio and Cândido P.Pinto Ricardo."Rapid Deposition of Extensin during The Elicitation of Grapevine Callus Cultures Is Specifically Catalyzed by a 40 Kilodalton Peroxidase". Plant Physiology, November 2001, Vol 127, pp1065-1076.
- Dina M. P. Carrilho and Maria C. Duque-Magalhães (2001) "Characterization of a new metalloendopeptidase protein inhibitor from the lupin seed" European Journal of Biochemistry, 268, supplement 1, pág.192.
- Pereira C.I., Pereira S., San Romão, M.V. and Crespo, M.T.B.
- "Peptidolytic System of *Lactobacillus* meat strains : how different is it from dairy isolates?" in Congresso Nacional de Microbiologia 5-8 Dez 2001, Póvoa de Varzim, pág 145.
- Carrilho, D. M. P.; C. P. P. Ricardo; Duque-Magalhães, M. C. (2002) "Thermolysin-affinity chromatography for purification of protein protease inhibitors from the lupin seed".Comunicação oral apresentada no XIII Congresso Nacional de Bioquímica. Lisboa.
- Neves C., Santos H., Vilas-Boas L., Amâncio S. (2002) Involvement of free and conjugated polyamines and free amino acids in the adventitious rooting of micropropagated cork oak and grapevine shoots. Plant Physiol. Biochem.40: 1071-1080.
- Neves C., da Costa M.S. & Santos H., Biosynthesis of compatible solutes in the hyperthermophilic archaeon *Palaeococcus ferrophilus*: effect of the medium salinity and growth temperature, Poster apresentado no 4thInternational Congress on Extremophiles, Naples, Itália, (2002), pp. 403.
- "Quantitation of proteins by Amino Acid Analysis and Colorimetric Assays" - Association of Biomolecular Resource Facilities AAA2003 Study (www.abrf.org/ResearchGroups/AminoAcidAnalysis/Eposters/abrf2003_poster.pdf).
- Carrilho, D. M. P. and Duque-Magalhães, M. C. (2003) "The human matrix-metalloproteinase-type 9 is strongly inhibited by small peptides from the lupin seed" Comunicação oral apresentada no I Luso-Spanish Workshop on the Structure and function of proteins. A Coruña (Espanha).
- "Characterisation of a novel compatible solute in the thermophilic bacterium *Picrotoga miotherma*". "Thermophiles 2003". Carla Jorge, Pedro Lamosa, Helena Santos. Exeter, UK.
- "Characterisation of a novel compatible solute in the thermophilic bacterium *Picrotoga miotherma*". "Thermophiles 2003". Carla Jorge, Pedro Lamosa, Helena Santos. Exeter, UK.
- Characterization of 293 Cell Metabolism During Growth and AV Infection - Tiago B. Ferreira, Paula M. Alves & M.J.T. Carrondo, 18th ESACT meeting, Granada, Spain (2003).
- Optimized Refeeding Strategies For Adenovirus Production At High Cell Densities - Tiago B. Ferreira, Paula M. Alves, Ana L. Ferreira1 & M.J.T. Carrondo, IX Cell Culture Engineering, Cancun, Mexico (2004).

- Ferreira T.B., Vieira H.L.A., Ferreira A.L., Carrondo M.J.T., Alves P.M. (2004), "Refeed and binding time effect on adenovirus production at high cell densities", 3rd European BioTechnology Workshop (ETW), Ittingen, Switzerland.
- Ferreira T.B., Alves P.M., Ferreira A.L., Carrondo M.J.T. (2004), "Adenovirus production at high cell densities: The cell density effect", Vecto EuroTrain, 3rd European Conference and Course, Advanced Methods for Industrial Production, Purification and Characterisation of Gene Vectors, Evry, France.
- Veloso MM, Pego SE, Eiras-Dias JE, Carneiro LC, Rosa E, Baeta J (2005) Preserving biodiversity in the farming system through sustainable management. XVII International Botanical Congress. Vienna, Austria, 17- 23 Julho P2497.
- Ferreira T.B., Ferreira A.L., Carrondo M.J.T., Alves P.M. (2005) "Effect of refeed strategies and non-ammonigenic medium on adenovirus production at high cell densities", Journal of biotechnology., 119:272-280.
- Ferreira T.B., Serra M., Ferreira A.L., Carrondo M.J.T., Cruz P.E., Alves P.M. (2005) "Development of a cost effective process for the production and purification of recombinant adenovirus vectors", 13th Annual Congress of the ESGT, Prague, Czech Republic.
- Ferreira T.B., Ferreira A.L., Peixoto C.C., Lameiro M.H., Melo E., Carrondo M.J.T., Alves P.M. (2005), "Development of a cost effective process for the production of a heat stable oral veterinary vaccine based on recombinant adenovirus", 19th ESACT – European Society for Animal Cell Technology, Harrogate, United Kingdom.
- Pires, R.H., Venceslau S., Morais F., Teixeira M., Xavier A.V. and Pereira I.A.C. (2006) Characterization of the *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 DsrMKJOP complex - a membrane-bound redox complex involved in sulfate respiration, *Biochemistry*, 45,249-262 .
- Ana R. Correia, Salvatore Adinolfi, Annalisa Pastore and Cláudio Gomes. (2006) Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *Biochem.J.*(2006)398.
- Ana R. Correia, Chiara Pastore, Salvatore Adinolfi, Annalisa Pastore and Cláudio Gomes. Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS Journal* (2008).

Resumo das colaborações técnicas em Estudos da Unidade de Serviços Analíticos (ASU)

- MS 01/06 – Determination of structural and physicochemical properties of recombinant Protein Q. Evaluation of its stability.
- LA 01/08 - Analytical method validation of p-aminobenzoic acid, 4-hidroxibenzoic acid and hypoxantine impurities in isoprinosine sirup (50ml/ml).
- LA 03/08 – Análise de tocoferóis em deodestilados por HPLC.
- LA 05/08 – Validação do método espectrofotométrico para a quantificação de nimodipina presente em comprimidos revestidos (30mg) e submetidos a ensaios de dissolução.

- LA 03/09 – “Performance of the Hestrin method for the quantification of Vi polysaccharide in Vi intermediate”
- MS 01/09 – "Analysis of a batch of recombinant Protein Q at several time points from two different environmental conditions"
- LA 05/09 – Quantificação de seleno-Metionina e seleno-Cisteína em amostras de Plantago (Tanchagem)
- LA 10/09 - Implementation of an analytical method for cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) quantification in Vi intermediate samples
- LA 04/10 – Estimativa de limites de deteção e de quantificação do gadolínio
- LA 06/10 – “Development of an analytical method for the quantification of benzalkonium chloride (BAK) in ophthalmic suspension (Brinzolamide 10mg/mL)
- LA 05/11 – “Validation of an HPLC method with diode array detection for quantification of benzalkonium chloride in ophthalmic suspension (Brinzolamide 10mg/mL)
- LA 10/11 - Validação de um método de HPLC com deteção por díodos para a determinação do teor de telmisartan e hidroclorotiazida em comprimidos Telmisartan R + Hidroclorotiazida submetidos a ensaios de dissolução"
- LA 11/11 - Validation of a HPLC method with diode array detection for quantification of benzalkonium chloride (150ug/g) in ophtalmic suspension (Brinzolamide, 10mg/mL)
- LA 13/11 – Identificação e doseamento do Acetonido de Fluocinolona e dos seus compostos de degradação em Synalar e Synalar N
- LA 14/11 – “Validation of an HPLC method with diode array detection for identification and assay of trepibutone and its degradation compounds and second identification of trepibutone in Choliatron[®] tablets (40mg)”
- LA 16/11 - “Validation of an HPLC method with diode array detection for quantification of trepibutone in Choliatron[®] tablets (40mg) for uniformity content evaluation”
- LA 07/12 - “ Doseamento de formaldeído em Metanol por GC-FID”
- Colaboração em mais de 50 projectos com as plataformas Bayer Healthcare e Merck.

ANEXO 3

Acções de Formação

Acções de formação relevantes

- Food Technology Techniques:" Operações de Separação na Indústria Alimentar ", Lisboa - Portugal, Set 88 – Mai 89;
- "Separation and Sequencing of Peptides and Proteins" – Estudos Avançados em Biotecnologia, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra, Setembro de 1990;
- "High Performance Liquid Chromatography "– Soquímica (Sociedade de Representações de Química), Lisboa, Portugal, Novembro de 1991;
- Jornadas sobre Proteínas – Aspectos Estruturais e Funcionais, Sociedade Portuguesa de Bioquímica, (Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra), Janeiro de 1992;
- Seminário de Cromatografia - Pharmacia Biotech Europe GmbH, Outubro de 1997;
- "Zweidimensionale Elektrophorese fur die Proteomeanalyse"- curso de Electroforese Bidimensional para análise de Proteomas. Universidade Técnica de Munique, Freising-Weihenstephan, Fev-Março 2000;
- "The Proteomeworks System - Tools and Technology for Protein Discovery" – Bio-Rad/PACI, Março de 2000;
- "Formação Pedagógica Inicial de Formadores" (90 horas); Instituto do Emprego e Formação Profissional, Novembro - Dezembro de 2000;
- "Validação de Métodos e Instrumentos em Cromatografia", RELACRE, Dezembro de 2000;
- "Segurança em Laboratórios de Química; Comissão de Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho do ITQB; UNL, Maio de 2001;
- "Utilização de Software Millenium 3.2 – Utilização Avançada"; Hucoa-Erloss Equipamentos Científicos, Lda ,Sacavém, Junho de 2001;
- "Procise Training", Applied Biosystems, Maio de 2002;
- European Proteomics Seminar Tour 2002 – Amersham Biosciences Europe, Novembro de 2002;
- Acção de Formação "Validação de Métodos Cromatográficos", IBET, Outubro de 2003;
- PROTEOMICS IN PRACTICE (leccionado por Anne Hesseling-Meinders from Microbiology & Genetics Department, Groningen University, The Netherlands), Oeiras, Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB-UNL) , Junho de 2004;
- "Detecção por Fotodiodos em HPLC", Hucoa Erloss, Sacavém, Setembro de 2004;
- "Utilização Avançada de Software Empower®", Hucoa Erloss, Sacavém, Outubro de 2004;
- "Identification of Proteins using Mass Spectrometry Data", ITQB (ITQB-UNL), Oeiras, Janeiro de 2005;
- "Acreditação de Laboratórios e a NP EN ISO/IEC 17025" Specanalítica/UBIA , Janeiro - Fevereiro de 2006;
- "Boas Práticas de Laboratório e a sua aplicação na Unidade BPL do IBET", IBET Maio de 2006;
- "Análise Técnica de Colunas", Hucoa-Erloss, Novembro de 2006;

- "Gestão Documental, CAPA, incertezas e OOS na Unidade BPL", IBET, Fevereiro de 2007;
- "Micropipetas - Utilização e Calibração ", IBET, Novembro de 2007;
- "Quantificação da Incerteza em Ensaio Físico-Químicos", IBET, Janeiro de 2008;
- "Preparação de amostras - Técnica de SPE", Hucoa-Erloss, 25 de Fevereiro de 2008.;
- "Noções teóricas e participação em ensaios práticos de validação de métodos para a indústria farmacêutica", IBET, 2 a 17 de Setembro de 2008;
- "Sequenciação de proteínas", ITQB, 3 a 7 de Dezembro de 2008, 15 horas;
- "Validação de Métodos Analíticos", IBET, 16, 17, 28 de Abril e 15 de Maio de 2009;
- "Preparação de amostras – utilização de Vivaspin", IBET, 8 de Maio de 2009;
- "Quantificação de Vi pela técnica de Hestrin", IBET, 8 a 15 de Maio de 2009;
- "Excel 2007 Avançado", NHK Formação e Novas Tecnologias, 21 a 27 de Abril de 2009;
- "Abordagem aos Requisitos de Gestão da NP EN ISSO 17025", IBET, Março 2010;
- "Quality Control in Analytical Methods", IBET, Ricardo Bettencourt da Silva, Junho-Julho de 2010;
- "Validação de Métodos Analíticos", IBET, António Ferreira, Maio de 2011;
- "Boas Práticas de Fabrico", IBET, Gabriela Lourenço, Fevereiro de 2012;
- "Fundamentals of SPE / Part 1-Introduction to SPE", Waters, Abril de 2013;
- "Fundamentals of SPE / Part 2-SPE Troubleshooting Techniques", Waters, Abril de 2013;
- "PCR Techniques", IBET, Teresa Crespo, Maio de 2013;
- "Aplicação da BPF ao desenvolvimento de medicamentos experimentais", IBET, Eduardo Correia, Maio de 2013;
- "Quality Risk Management System", IBET, Eduardo Correia e Ana Luísa Simplício, Outubro de 2014;
- "21 CFR Part 11: Understanding the ERES Regulation for Compliance Success, IT Compliance and Validation for QPharma, Inc., Janeiro de 2016;
- Labcollector P; AgileBio, Fevereiro de 2016;
- Workshop "Bionanosystems Characterization", Paralab, FCT, Oct 2016.
- Anything but Conventional Chromatography, FCT/IST/ iBB/UCIBIO, 22-24 November 2017;
- Análise Térmica para a caracterização de polímeros, compósitos e resinas, Paralab, 1 de Março de 2018

ANEXO 4

**Cromatogramas e Cálculos Estatísticos relativos
a “Validação do Método de Quantificação
de Aminoácidos em Proteínas e Péptidos
e Determinação da Concentração
de Proteína” descrita no Capítulo 3**

ANEXO I - Cromatogramas

Dado o elevado número de cromatogramas obtido neste trabalho, e que estão devidamente arquivados em suporte informático, apenas será apresentado um exemplo relativo a uma injeção da mistura de substâncias de referência (Amino Acid Standard H e L-Norleucina) e um exemplo relativo a uma injeção da substância de estudo (BSA).

Os cromatogramas apresentados nas figuras que se seguem correspondem a aquisição de dados a 254 nm.

Figura 1- Cromatograma relativo à injeção de solução de referência de concentração 0.125 mM (ID 6907)

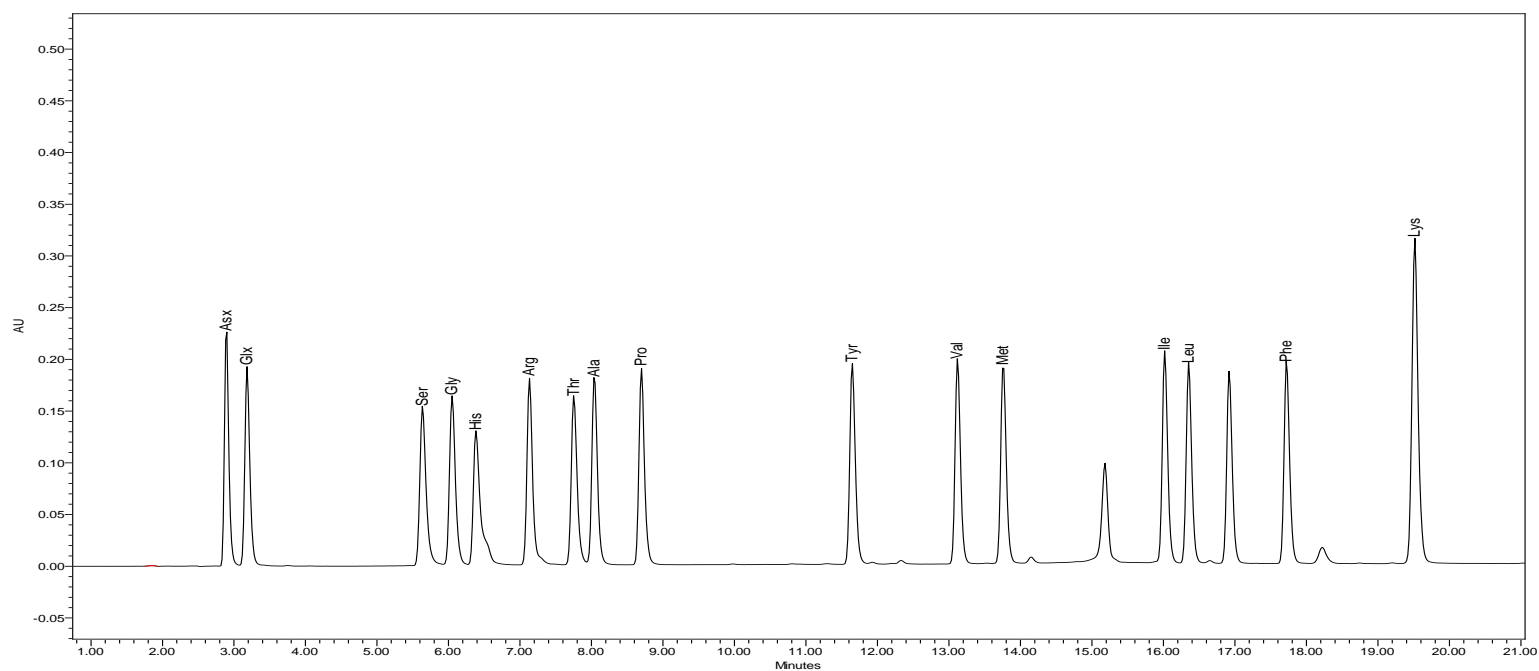


Figura 2- Cromatograma relativo à injeção de solução de estudo de concentração 0.10 mg/ml (ID 6820)

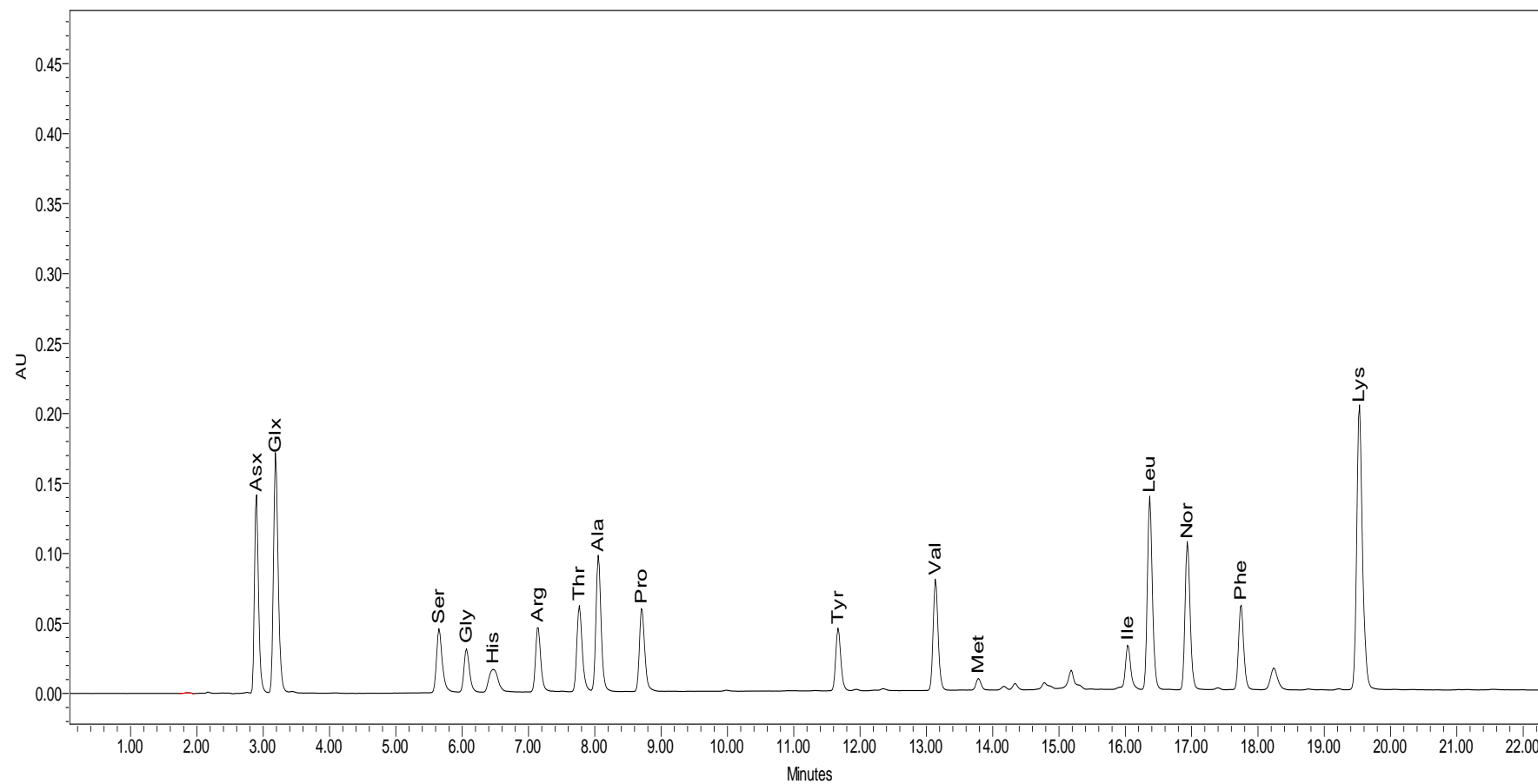


Figura 3 - Cromatograma relativo à injeção de solução de referência de concentração 0.0005mM (ID 6933) para confirmação dos limites de detecção

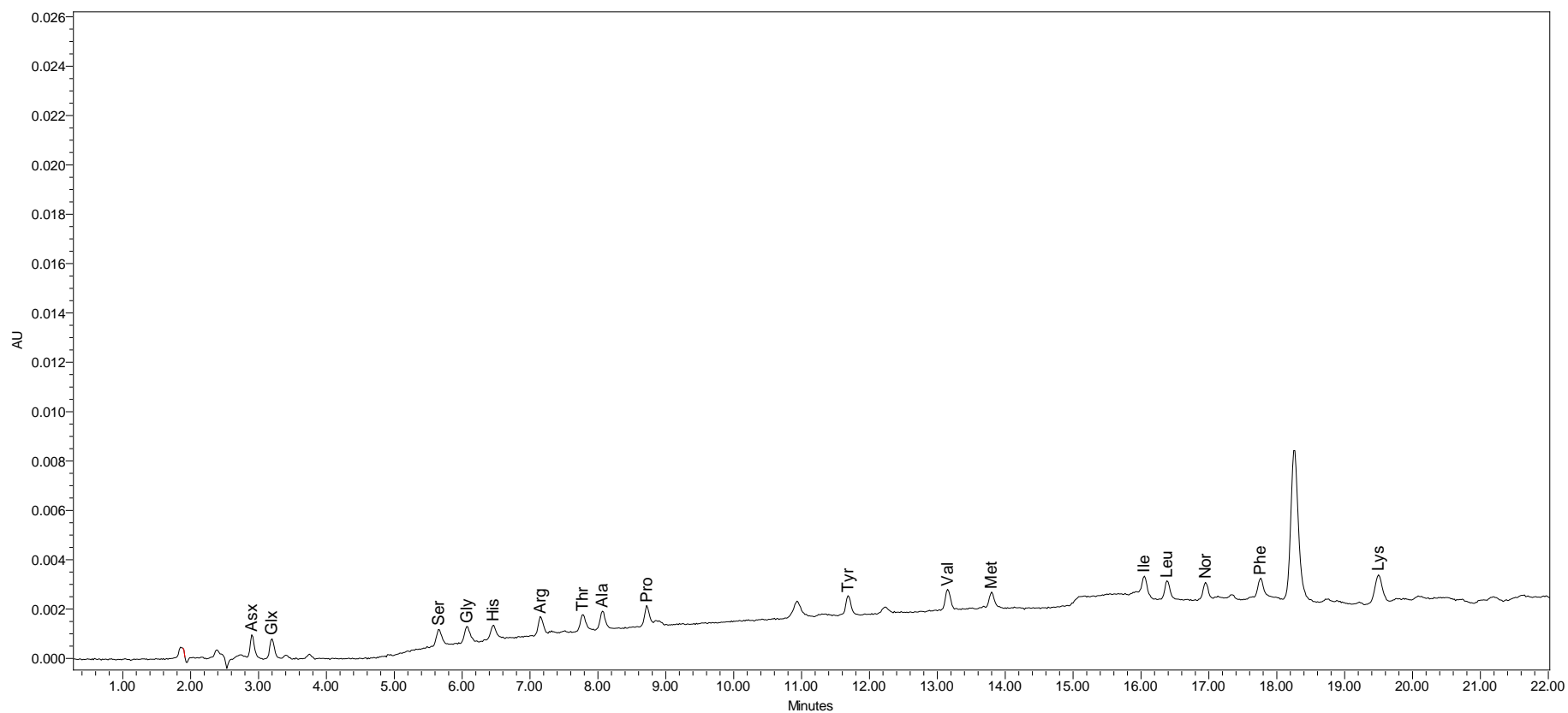
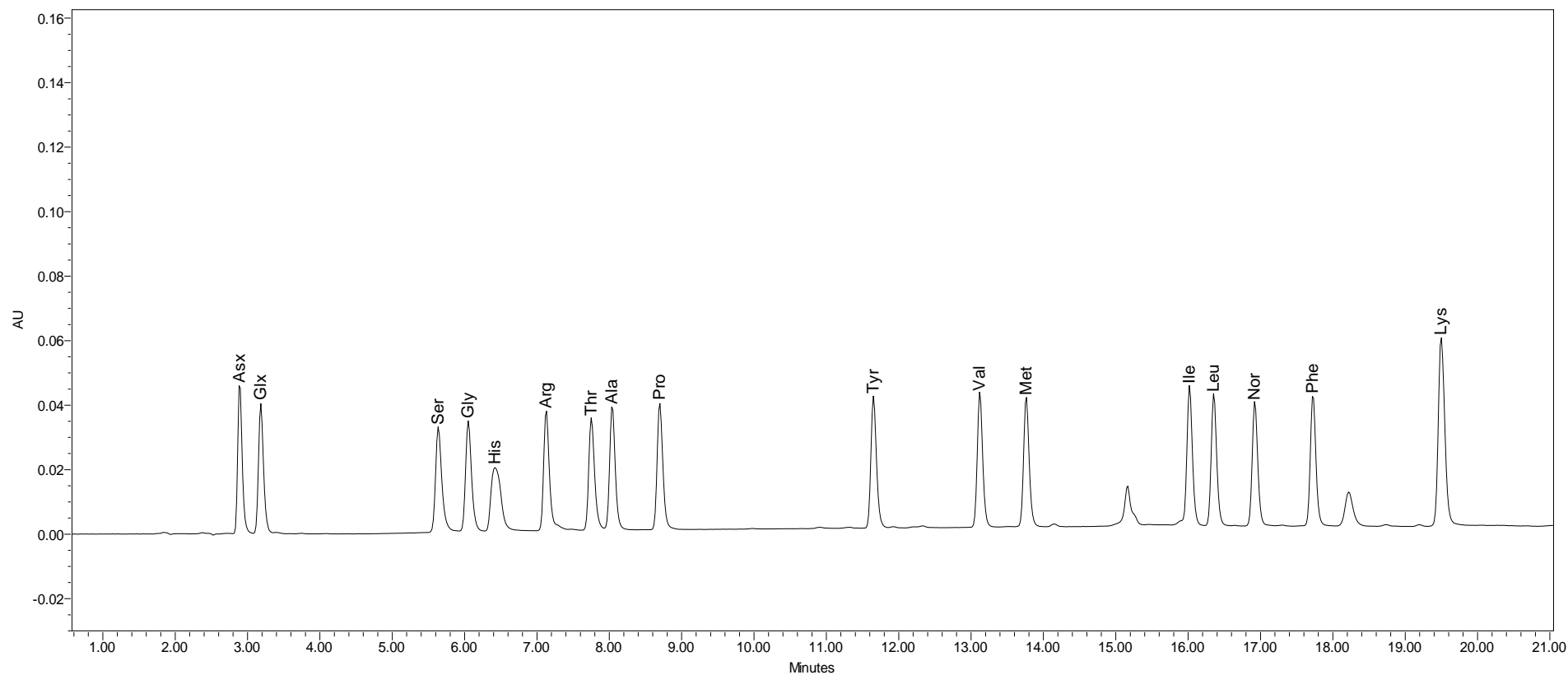


Figura 4 - Cromatograma relativo à injeção de solução de referência de concentração 0.025mM (ID 6919) para confirmação dos limites de quantificação



Anexo II - Cálculos Estatísticos

Nas tabelas que se seguem são apresentados os resultados da análise estatística (estatística das regressões e % residuais) para estudo da linearidade de acordo com o referido em 7.3 deste relatório, para o caso da Serina (os resultados de todos os outros aminoácidos estão guardados em suporte informático).

Tabela 1- Estudo de linearidade para Ser (a partir das soluções de referência P1b- P5)

Concentração	Área	Cálculo com todos os pontos				Cálculo com os pontos de concentração superior				Cálculo com os pontos de concentração inferior			
		RESULTADO RESIDUAL				RESIDUAL OUTPUT				RESIDUAL OUTPUT			
		<i>Obs</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>	<i>%Residual</i>	<i>Obs</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuais</i>	<i>%Residual</i>	<i>Obs</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuais</i>	<i>%Residual</i>
0,25	1941649,83	1	1935222,27	6427,56	0,33	1	1937031,46	4618,37	0,24	1	946227,95	4222,38	0,45
0,25	1947010,91	2	1935222,27	11788,63	0,61	2	1937031,46	9979,45	0,52	2	946227,95	3295,72	0,35
0,25	1945303,70	3	1935222,27	10081,43	0,52	3	1937031,46	8272,24	0,43	3	946227,95	5227,56	0,55
0,13	950450,33	4	964184,53	-13734,20	-1,42	4	962689,01	-12238,68	-1,27	4	474513,02	-14786,71	-3,12
0,13	949523,66	5	964184,53	-14660,87	-1,52	5	962689,01	-13165,35	-1,37	5	474513,02	-14864,98	-3,13
0,13	951455,51	6	964184,53	-12729,02	-1,32	6	962689,01	-11233,50	-1,17	6	474513,02	-6854,28	-1,44
0,06	459726,31	7	478665,66	-18939,36	-3,96	7	475517,79	-15791,48	-3,32	7	191484,06	10106,16	5,28
0,06	459648,03	8	478665,66	-19017,63	-3,97	8	475517,79	-15869,75	-3,34	8	191484,06	8427,27	4,40
0,06	467658,74	9	478665,66	-11006,93	-2,30	9	475517,79	-7859,05	-1,65	9	191484,06	9947,30	5,19
0,03	201590,22	10	187354,34	14235,87	7,60	10	183215,05	18375,16	10,03	10	40535,28	-1655,61	-4,08
0,03	199911,33	11	187354,34	12556,99	6,70	11	183215,05	16696,28	9,11	11	40535,28	-1657,59	-4,09
0,03	201431,36	12	187354,34	14077,01	7,51	12	183215,05	18216,31	9,94	12	40535,28	-1407,22	-3,47
0,01	38879,67	13	31988,30	6891,36	21,54								
0,01	38877,69	14	31988,30	6889,38	21,54								
0,01	39128,06	15,00	31988,30	7139,76	22,32								
			<i>Estatística de regressão</i>				<i>Regression Statistics</i>				<i>Regression Statistics</i>		
			R múltiplo	0,9998			Multiple R	0,9998			Multiple R	0,9997	
			Quadrado de R	0,9997			R Square	0,9996			R Square	0,9994	
			Quadrado de R ajustado	0,9996			Adjusted R Square	0,9996			Adjusted R Square	0,9994	
			Erro-padrão	13568,8307			Standard Error	14662,4783			Standard Error	9067,4382	
			Observações	15,0000			Observations	12,0000			Observations	12,0000	

Tabela 2- Estudo de linearidade para Ser (a partir das soluções de referência P1c- P6c)

SER				
CONC (mM)	RESIDUAL OUTPUT			
	Observation	Predicted Y	Residuals	%R
0,25	1	1923850,15	-6759,6984	-0,35
0,25	2	1923850,15	-4362,1191	-0,23
0,25	3	1923850,15	-15514,59	-0,81
0,15	4	1158456,82	11140,049	0,96
0,15	5	1158456,82	10313,9666	0,89
0,15	6	1158456,82	8609,36405	0,74
0,1	7	775760,15	3158,37454	0,41
0,1	8	775760,15	2749,78755	0,35
0,1	9	775760,15	5999,44815	0,77
0,075	10	584411,816	9919,15392	1,70
0,075	11	584411,816	9544,79716	1,63
0,075	12	584411,816	8940,70083	1,53
0,05	13	393063,483	-1243,6193	-0,32
0,05	14	393063,483	-1251,8278	-0,32
0,05	15	393063,483	-625,92084	-0,16
0,025	16	201715,149	-13317,26	-6,60
0,025	17	201715,149	-13253,918	-6,57
0,025	18	201715,149	-14046,688	-6,96
<i>Regression Statistics</i>				
		Multiple R	0,99987313	
		R Square	0,99974627	
		Adjusted R Square	0,99973041	
		Standard Error	9639,805	
		Observations	18	

