



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ
Departamento de Zootecnia
LZT5862 – Análise e Composição de Alimentos



HPLC – High Performance Liquid Chromatography **(Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)** **para determinação de aminoácidos**

Discentes

Álvaro Bernardo da Silva Neto

Carlos Eduardo Cardoso Consentini

Docente

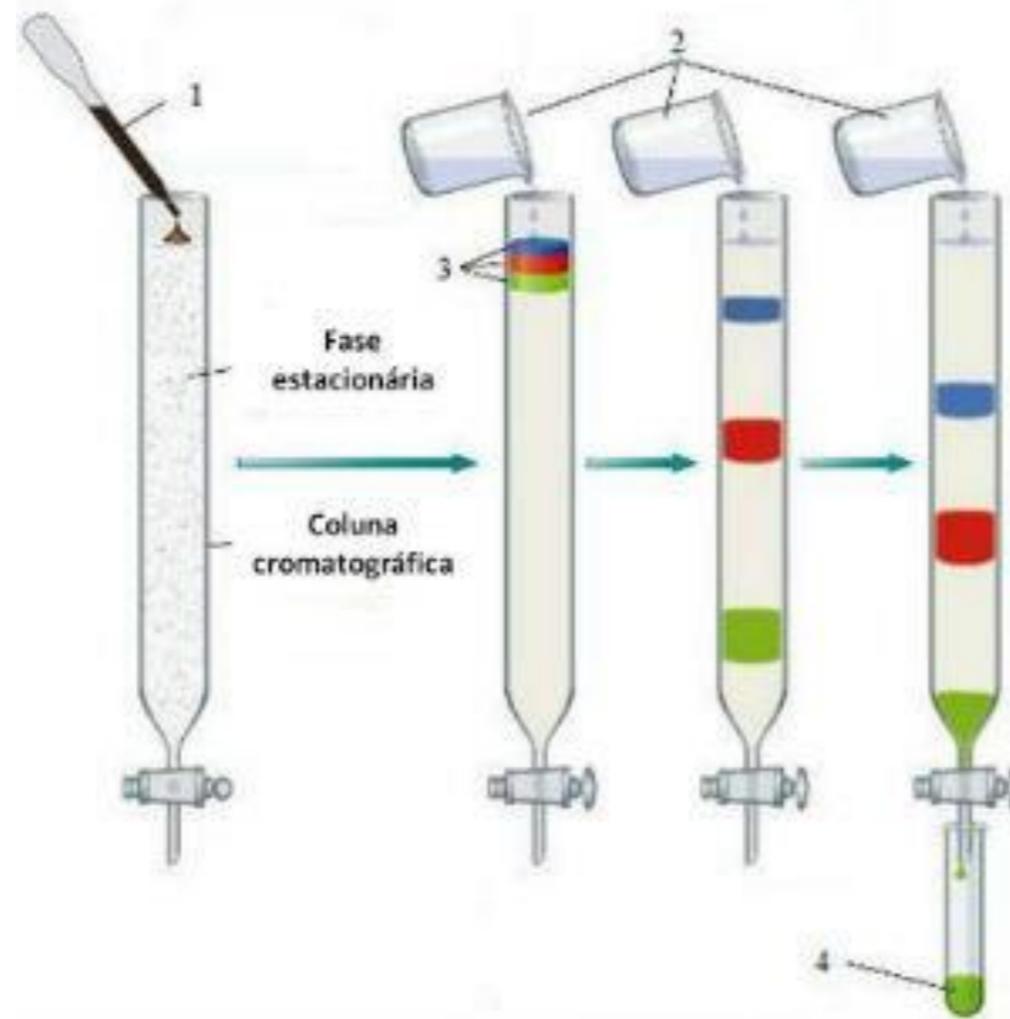
Prof. Dra. Carla Maris Machado Bittar

Cronograma da apresentação

- **Conceitos, princípios e funcionamento da cromatografia líquida**
- **HPLC para análise de aminoácidos**
 - Etapas
 - Considerações

Cromatografia

Diferença de velocidade de transporte entre as substâncias quando dissolvidas em fluido que atravessa determinado meio



Cromatografia



Mikhael Semenovich Tswett (1906)

Separação de componentes de extratos de folhas e gema de ovo

“Redescoberta” na década de 30

Kuhn & Lederer

Coluna recheada de carbonato de cálcio (fase estacionária)
e éter de petróleo (fase móvel)

Cromatografia

Cromatografia de troca iônica

Adams & Holmes (década de 30)

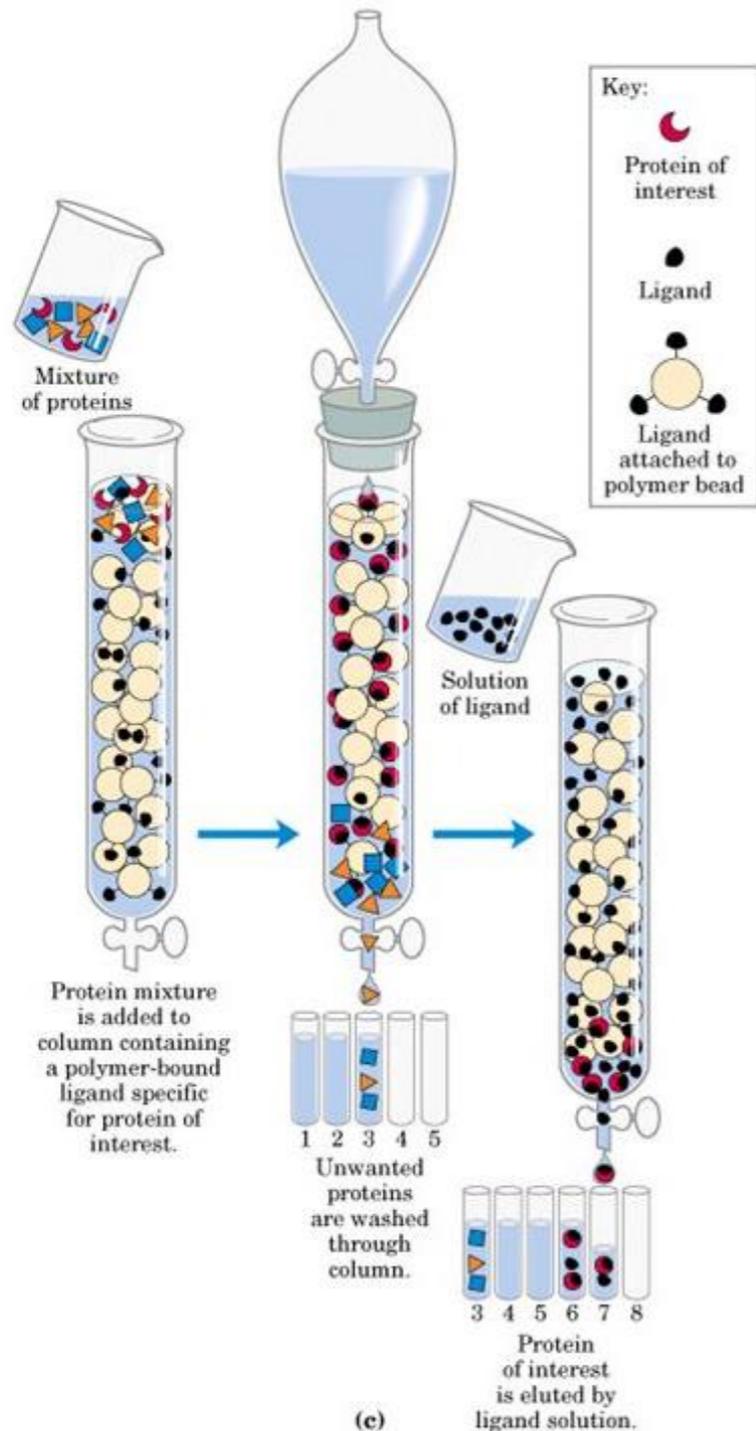
Primeiras resinas de troca iônica

Pressurização da fase móvel

Moore & Stein (1958) – introdução de bomba peristáltica e fotômetro para detecção

Hamilton & Andrews – bomba de pistão (similar à HPLC)

Cromatografia por troca iônica



Fase estacionária altamente carregada

Diferenças nas afinidades eletrostáticas entre a FE e os íons da FM

Afinidade pode ser controlada alterando-se o pH

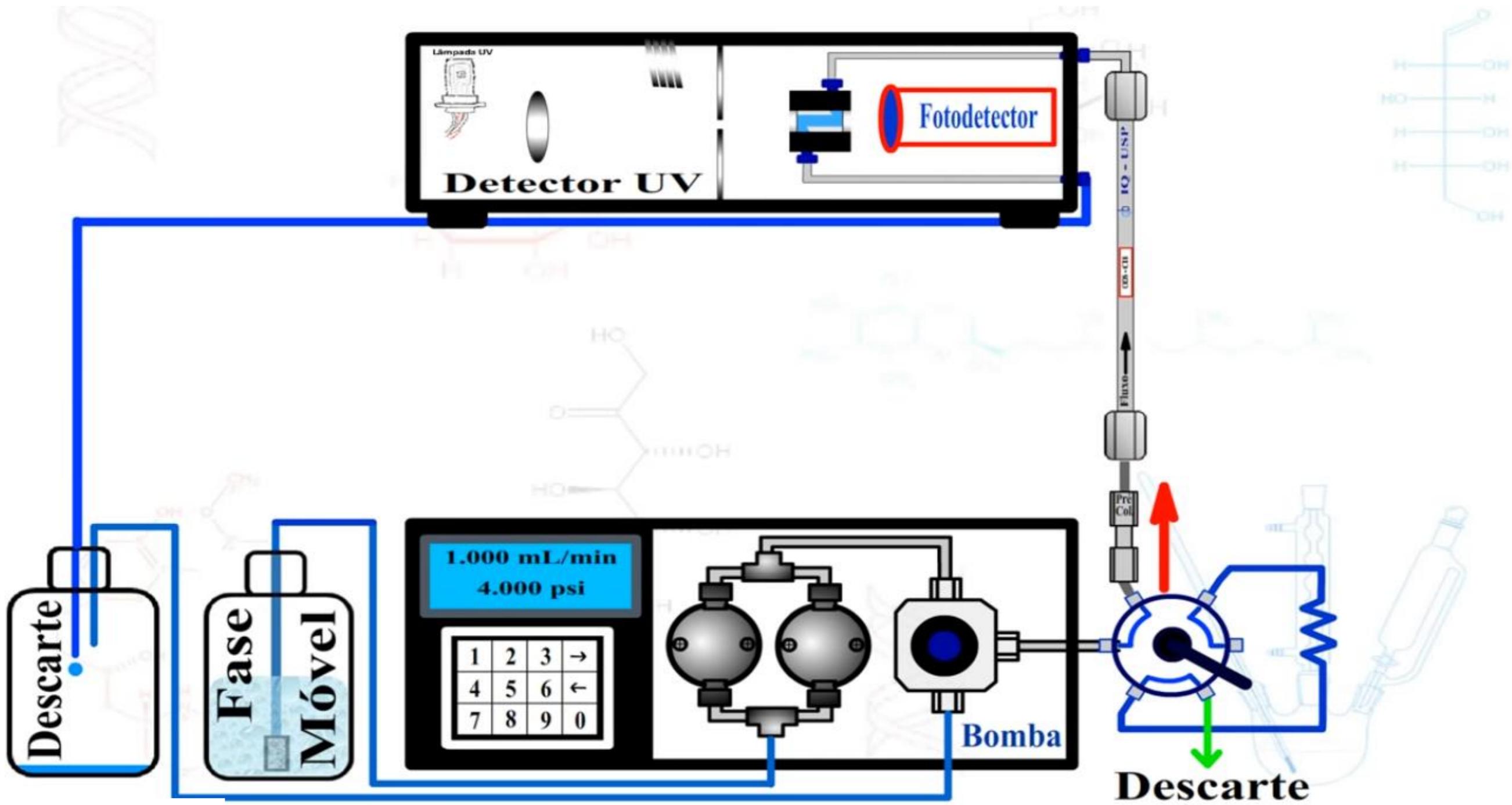
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



Avanço na técnica de cromatografia líquida em coluna

- Rapidez das análises (pressão)
- Reutilização das colunas
- Permite alterar a fase móvel ou realizar misturas no próprio equipamento
- Pode ser automatizada





Solventes - HPLC



Água tamponada

Metanol

Acetonitrila

THF

**Mistura de dois ou três
solventes**

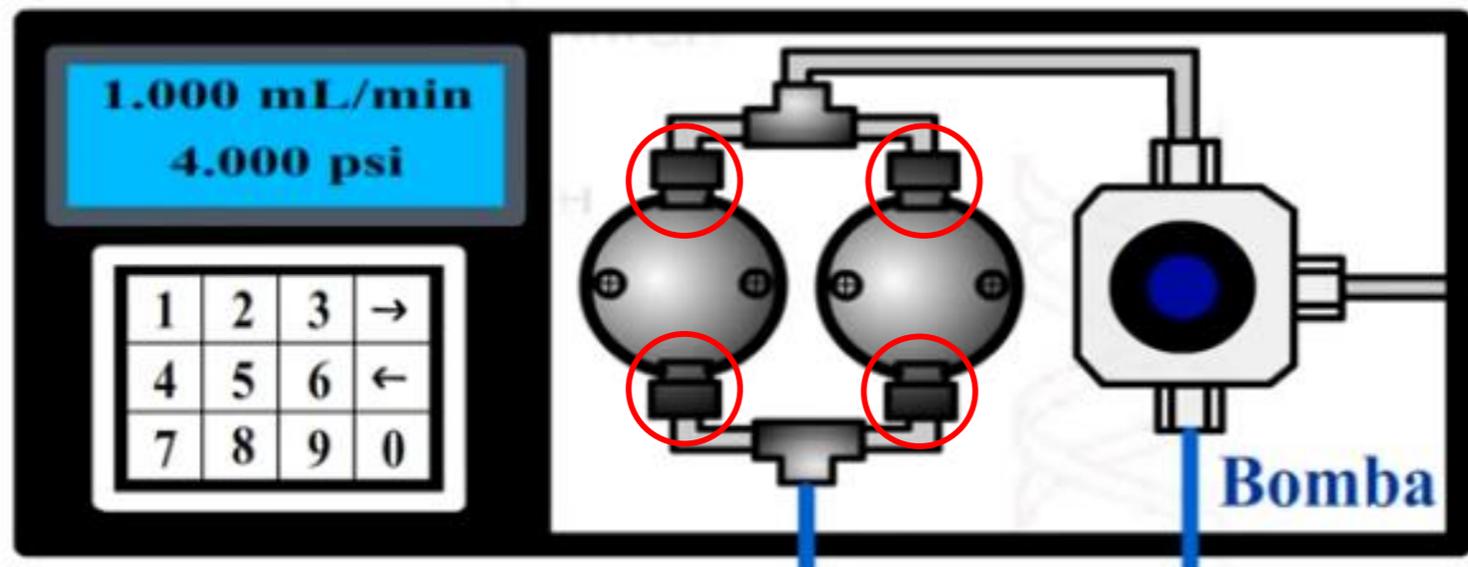
MODO ISOCRÁTICO (!)

Bomba - HPLC

Bomba de pistão (*check valves*)

Ajuste de pressão e fluxo da fase móvel

Válvula de purga

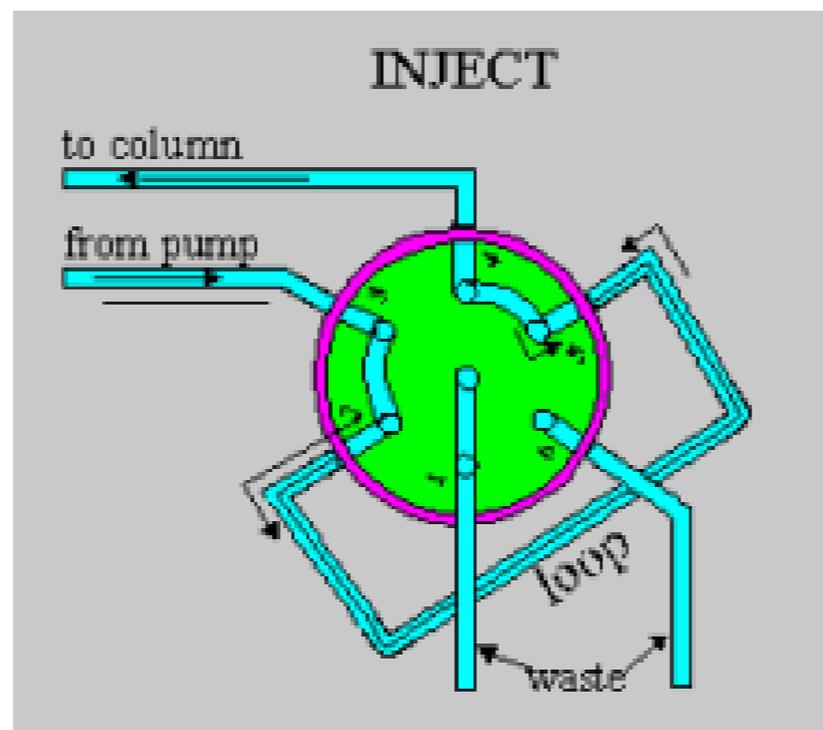
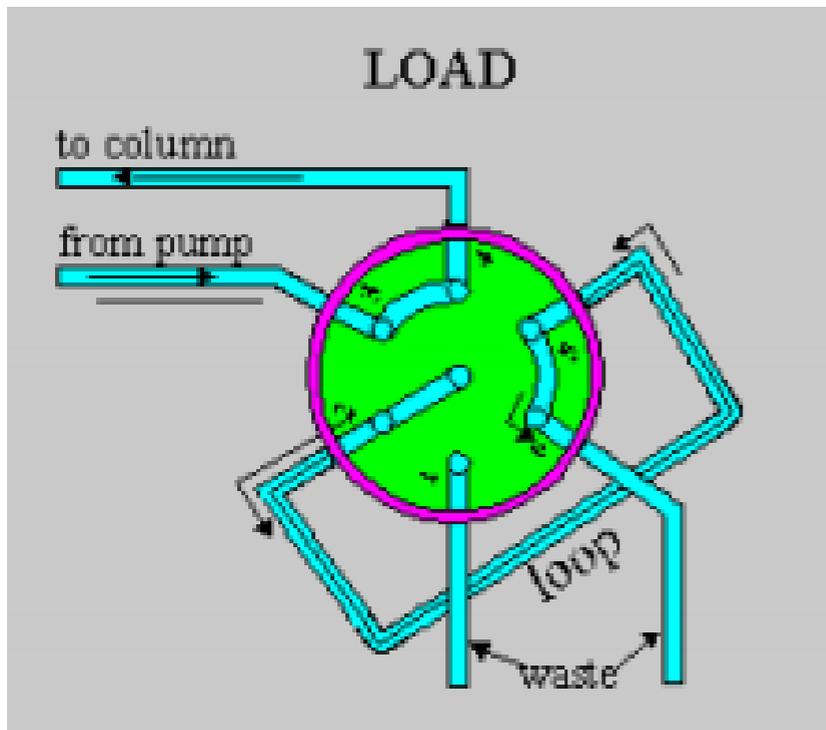


Injetor - HPLC

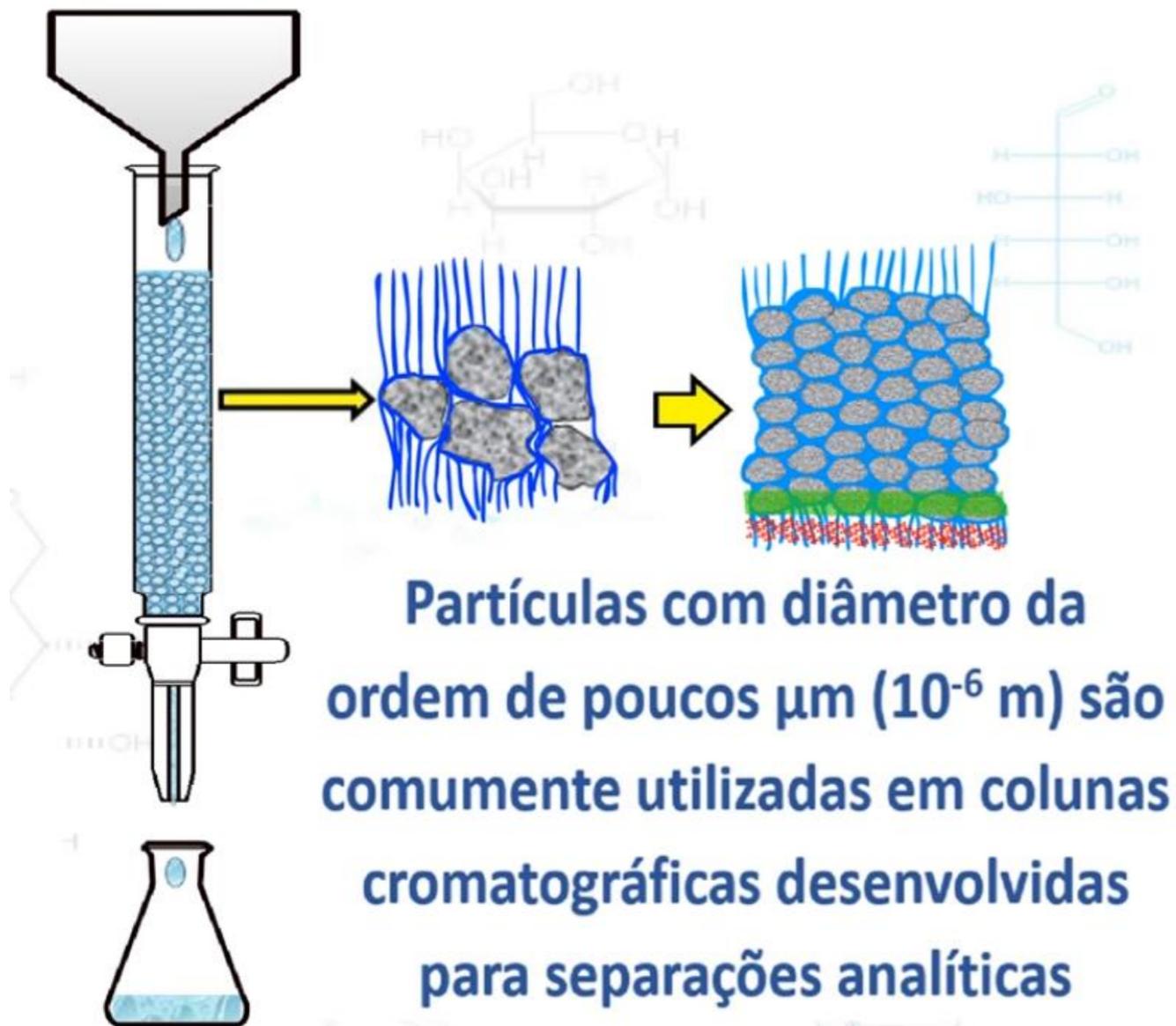
Seletor de duas posições (carga e injeção)

Alça de amostra – entre 5 e 20 μL

Excesso de amostra é descartada (lavagem)



Coluna - HPLC

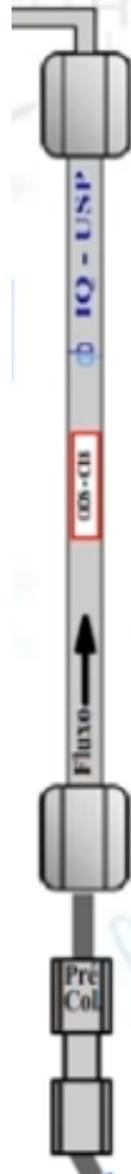


Partículas de 5 – 10 μm → PRESSÃO

Partículas de 2 μm → UPLC

Matriz rígida de estireno-divinilbenzeno, ou silicone, ou fluorcarbono, modificado com grupos trocadores sulfônicos ou amônio quaternário

Coluna - HPLC

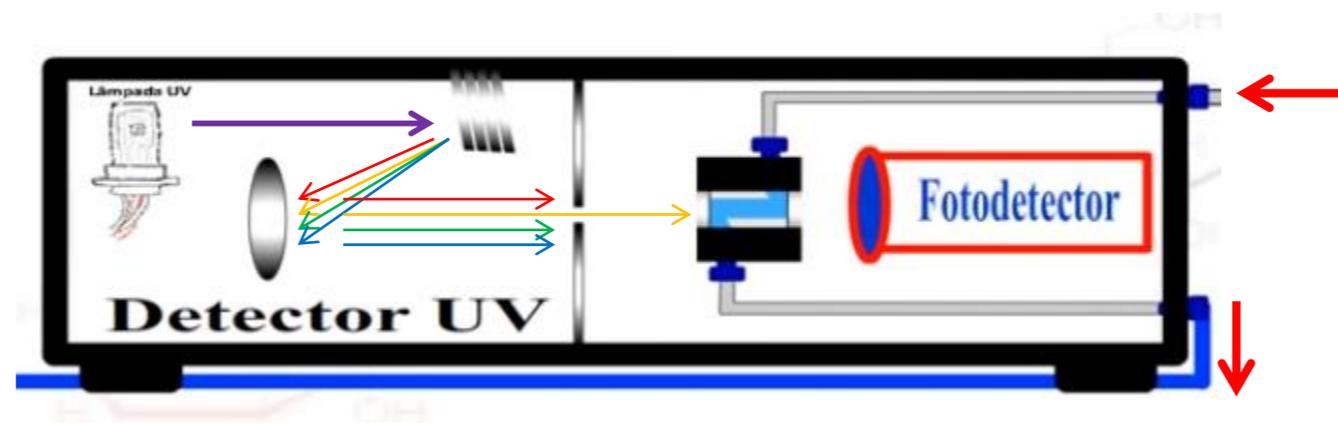


Fotodetector - HPLC

Detector espectrofotométrico

Lâmpada emissora de luz ultravioleta + filtro de comprimento de onda

Leitura dos dados conforme a absorbância do comprimento de onda selecionado pelos analitos → computador



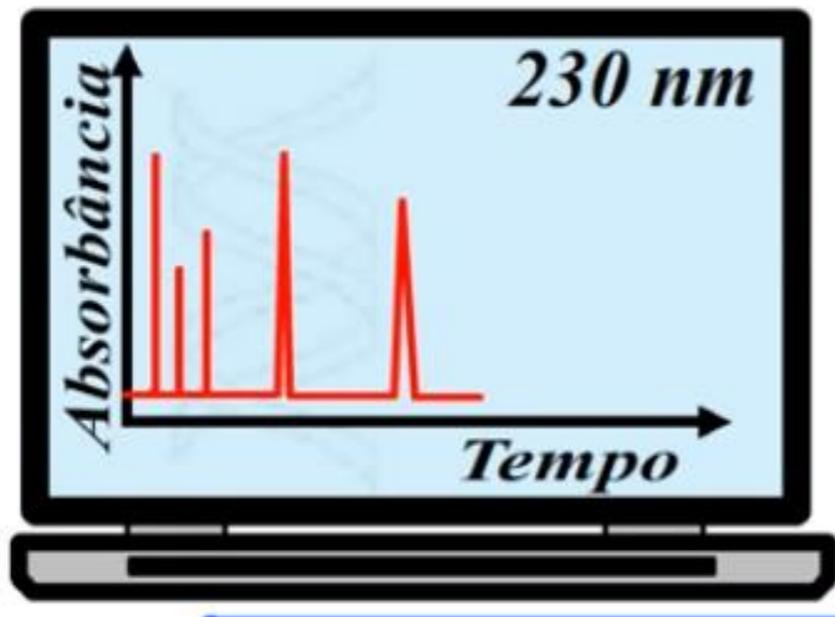
Interpretação das leituras - HPLC

Computador com programa instalado

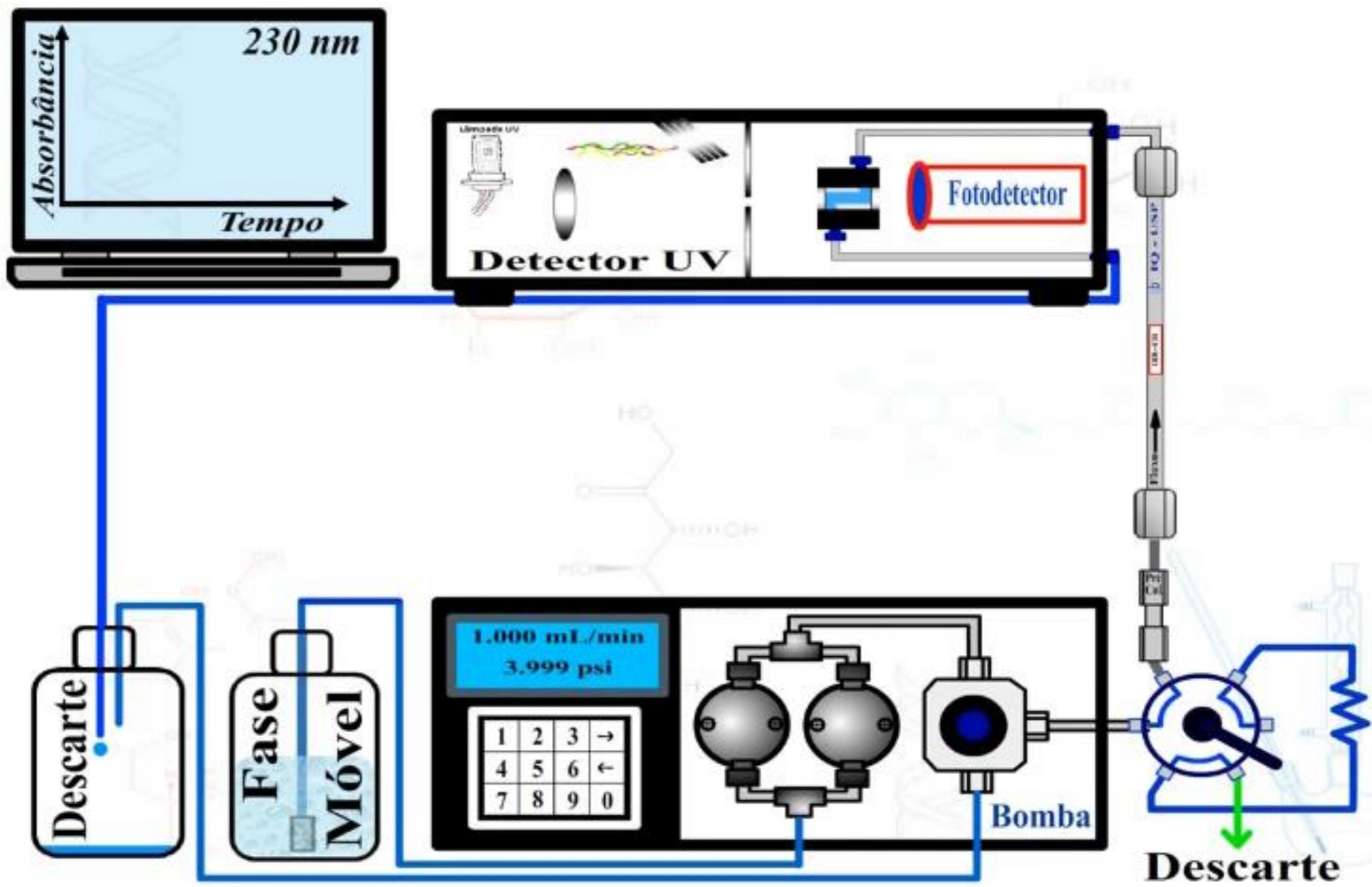
Registro dos picos de absorbância quando da passagem de um analito pela célula de fluxo

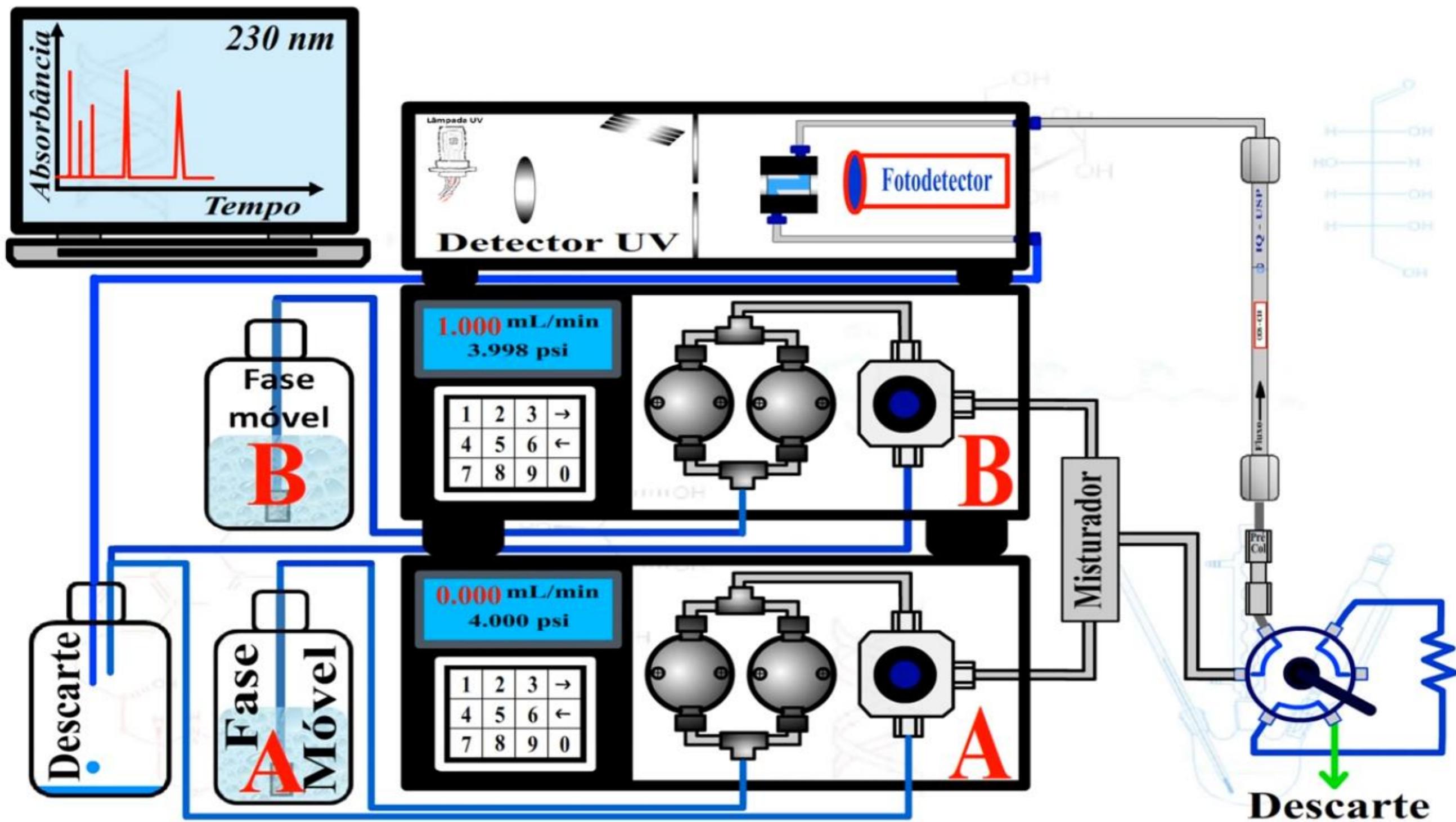
Posição no eixo “tempo” → velocidade de transporte

Altura do pico → quantidade do analito



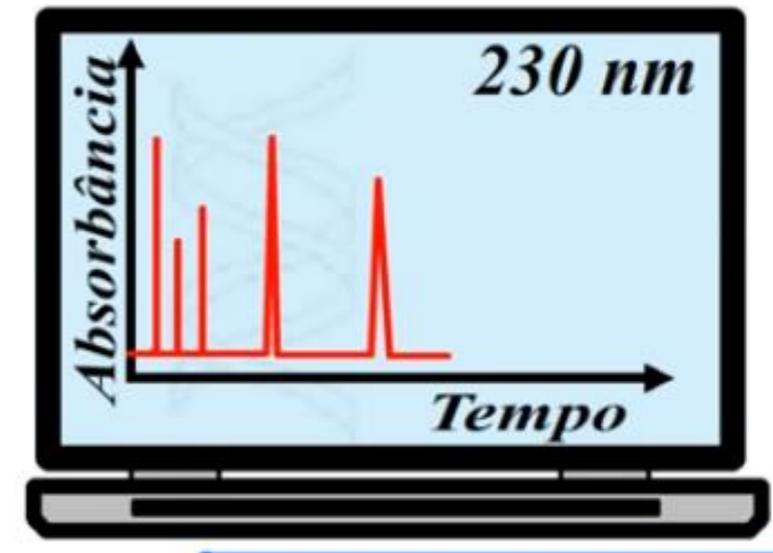
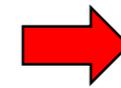
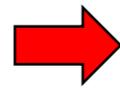
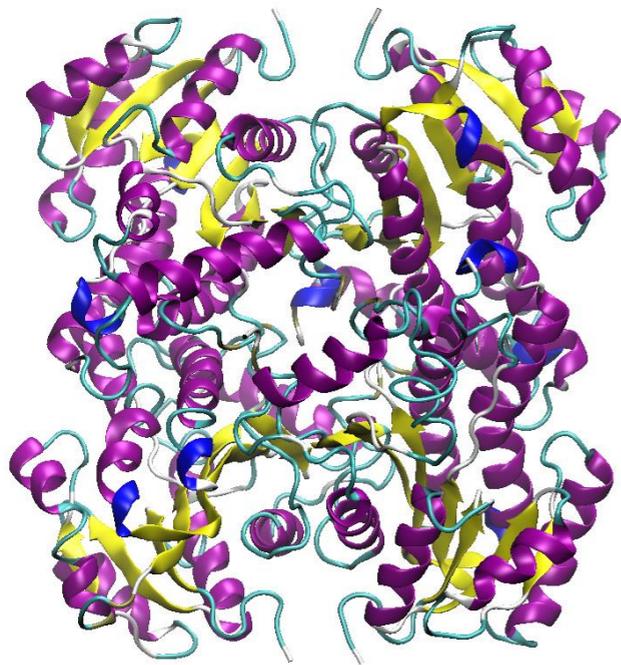
Picos próximos: mudar a força do solvente para separar os analitos







HPLC para determinação de aminoácidos



Etapas - HPLC para AA

- **Preparo da amostra**
- **Hidrólise proteica**
- **Derivatização (pré ou pós coluna)**
- **Separação dos AA individuais por cromatografia**
- **Detecção e quantificação dos AA separados**

Preparo da amostra - HPLC para AA

➤ Amostras líquidas

- Alíquota diretamente no tubo de hidrólise
- Secagem
 - Liofilização → amostras inicialmente congeladas (pois amostras já líquidas borbulham no vácuo) e amostras termossensíveis.
 - Concentrador centrífugo → amostras líquidas não congeladas (vantagem na HPLC que usa solventes orgânicos que não congelarão ou não se manterão congelados durante a secagem)
- Proteínas precipitadas → Secagem e tratadas como amostras secas

Preparo da amostra - HPLC para AA

➤ Amostras secas

- Amostras moídas e homogeneizadas
- Cuidados:
 - **GARANTIR A PASSAGEM DE TODO MATERIAL PELO MOINHO**, evitando separação de partículas e não homogeneização da amostra
 - **NÃO PROVOCAR AQUECIMENTO DO MOINHO**, provocando alterações nos aminoácidos/proteínas e reações com açúcares presentes na amostra
 - **Mais de 10% de EE → RETIRAR A GORDURA COM SOLVENTE** ou SOXTEC (**evitar devido à alta temperatura**)

Preparo da amostra - HPLC para AA

➤ Amostras fisiológicas

- **Digesta e fezes** → Liofilização e moagem
- **Sangue total (com anticoagulante) urina e saliva** → Alíquota direto no tubo de hidrólise e posterior liofilização ou secagem no concentrador centrífugo
- **Plasma** → Separação da proteína por precipitação com solventes (metanol, etanol, acetona e acetonitrila) ou ácidos (5-sulfosalísilico, ácido pícrico e ácido perclórico) → Centrifugação para separação da proteína precipitada.

Hidrólise - HPLC para AA

- Quebrar as ligações peptídicas e liberar os AA
- Moore and Stein (1948, 1951) → Hidrólise ácida
 - HCl (6 M), “oxygen free”, 110°C, por 18-24 horas

AA não estáveis à hidrólise

(Asparagina, Glutamina, Serina, Treonina, Cisteína, Metionina, Tirosina, Valina, Isoleucina, Triptofano, Lisina)



Modificações químicas

Asp e Glut Tri Tir Lis
(Deaminação, destruição, oxidação, halogenação, não clivagem, reações de Maillard)
Ser e Tre Met Val e Iso

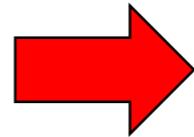


Sub ou super-estimados

Hidrólise - HPLC para AA

➤ Estratégias de hidrólise → Pouco sucesso

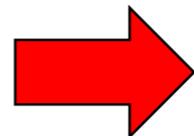
Hidrólise automática
usando resinas sólidas de
troca catiônica super forte



70-75% de recuperação em
comparação com a hidrólise ácida

Masuda, A and Dohmae, N (2010)

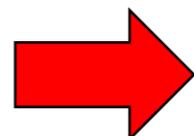
Hidrólise rápida (HCl) a
160°C por 60 minutos



98,4% de recuperação, porém,
baixa repetibilidade

Marino et al. (2009)

Microwave-assisted acid
hydrolysis (150°C por 3 h
ou 160°C por 5 min)



85% de recuperação, porém, poucos
tipos de amostra e AA avaliados

Messia et al. (2008), Damm et al. (2010), Kabarra et al. (2011)

Hidrólise - HPLC para AA

- **Garantindo o ambiente livre de oxigênio**
- **Sparging inert gas (Nitrogênio)**
 - Borbulhar o gás inerte na amostra com pipeta de Pasteur
 - Amostra pode ser perdida na ponta da pipeta**
 - Inocular o gás inerte no espaço acima da amostra no tubo
 - Não retira o oxigênio presente na amostra em si**
 - Borbulhar o gás inerte na solução de hidrólise antes de adicioná-la na amostra e durante a hidrólise e inocular o gás no espaço acima da amostra

Hidrólise - HPLC para AA

- **Garantindo o ambiente livre de oxigênio**
- **Sparging inert gas and degassing with vacuum**
 - Exige tubos especializados para hidrólise, conectados à entrada do gás inerte, e tampa de rosca
 - Aplica-se o vácuo e quando parar de borbulhar → Inocula-se o gás inerte. OBS: pode-se repetir o processo
 - Processo eficiente, porém, exige tubos especializados e pode haver vazamento pela tampa de rosca.

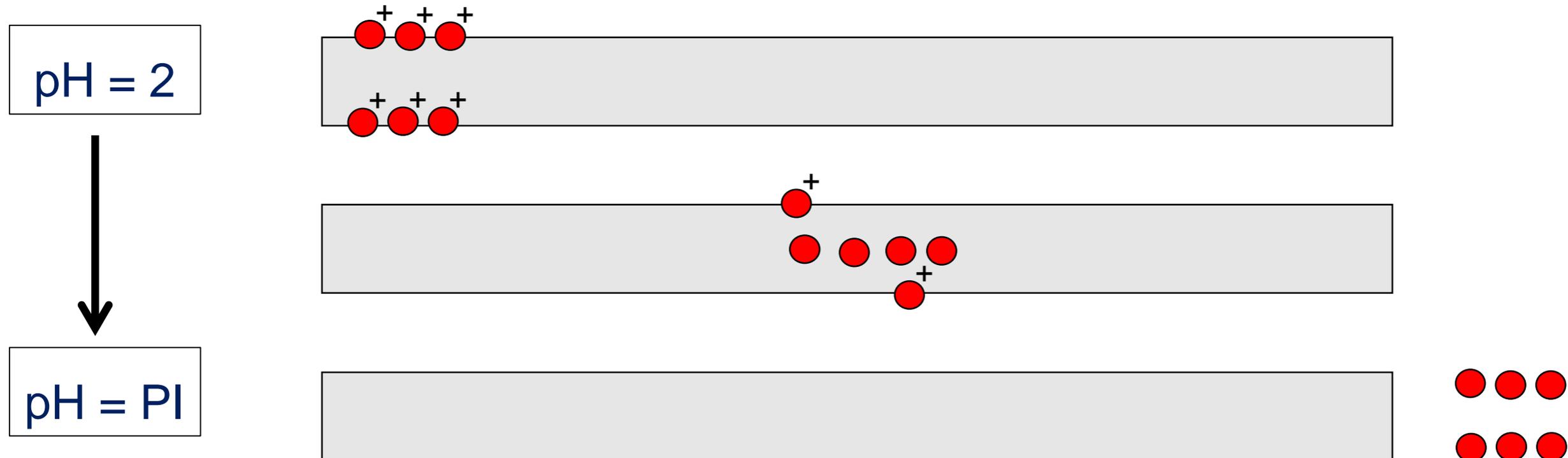
Hidrólise - HPLC para AA

- **Garantindo o ambiente livre de oxigênio**
- **Sealed-tube approach**
 - Ponta do tubo na forma de flecha
 - Conectar o tubo (amostra + HCl) em uma bomba de vácuo → Após o borbulhamento cessar → Derreter a ponta do tubo

Cromatografia - HPLC para AA

➤ SEPARAÇÃO POR TROCA IÔNICA (DERIVATIZAÇÃO PÓS-COLUNA)

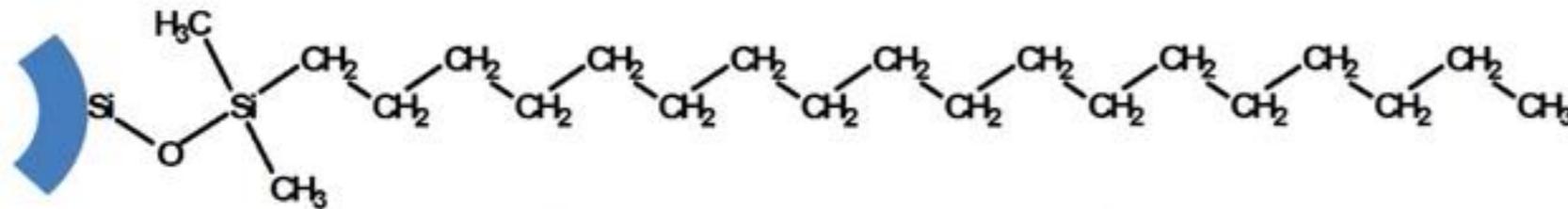
- Coluna de troca catiônica
- Utiliza a propriedade de zwitterion dos AA → Dependendo do pH → Carregados + ou - devido aos grupamentos amino e carboxil



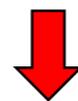
Cromatografia - HPLC para AA

➤ CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA (DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA)

- Utiliza a propriedade de polaridade dos AA
- Coluna C18 – Hidrocarboneto (18C) ligado à sílica



- Fase móvel sempre mais polar do que fase estacionária
- Somente triptofano, tirosina e fenilalanina são separados com eficiência



Derivatização pré-coluna para tornar os AA mais hidrofóbicos

Cromatografia - HPLC para AA

➤ DERIVATIZAÇÃO

- Tornar os AA mais hidrofóbicos na pré-coluna (HPLC de fase reversa)
- Permitir detecção utilizando absorvância ou fluorescência

- AA não são naturalmente cromóforos

- Princípio:



Niidrina

OPA (o-phtaldialdeído)

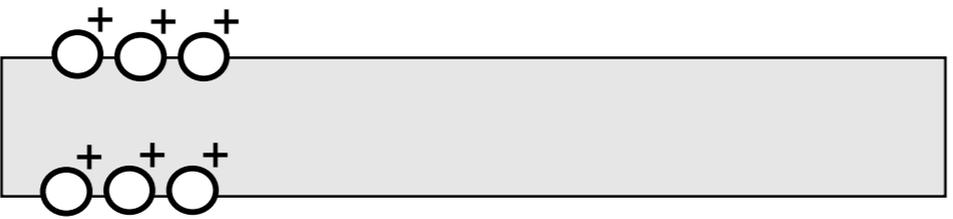
PITC (Fenilisotiocianeto)*

AQC (6-aminoquilonil-N-Hidroxissuccinimidyl)*

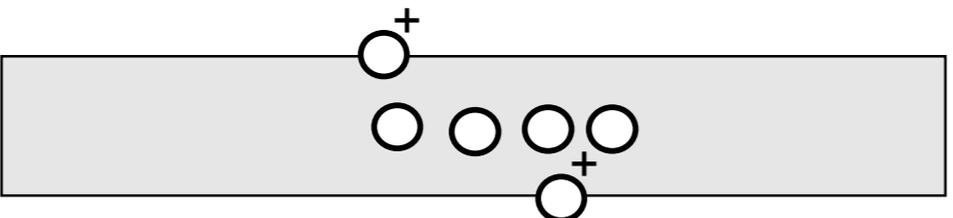
FITC (Fluoresceina isotiocianeto)*

Composto detectável

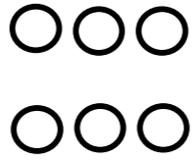
pH = 2



pH = PI

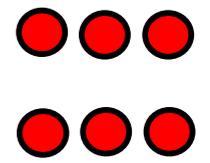
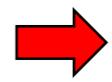


**Derivatização pós coluna
(HPLC – separação iônica)**

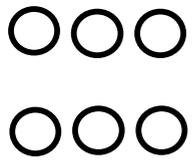


+

Reagente

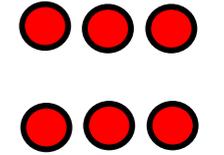
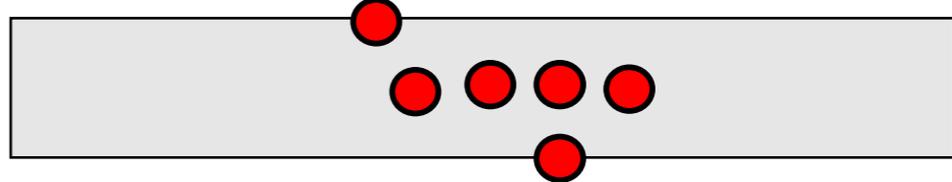
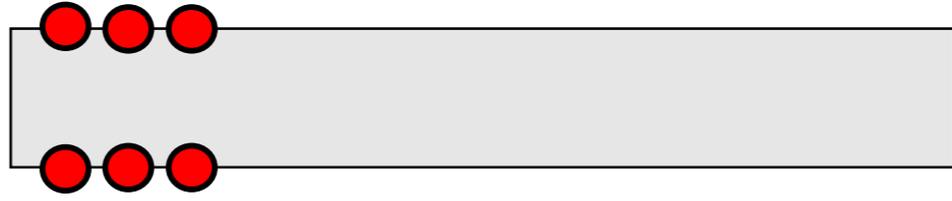
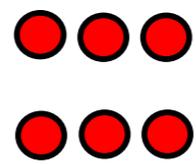
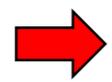


**Derivatização pré coluna
(HPLC – fase reversa)**



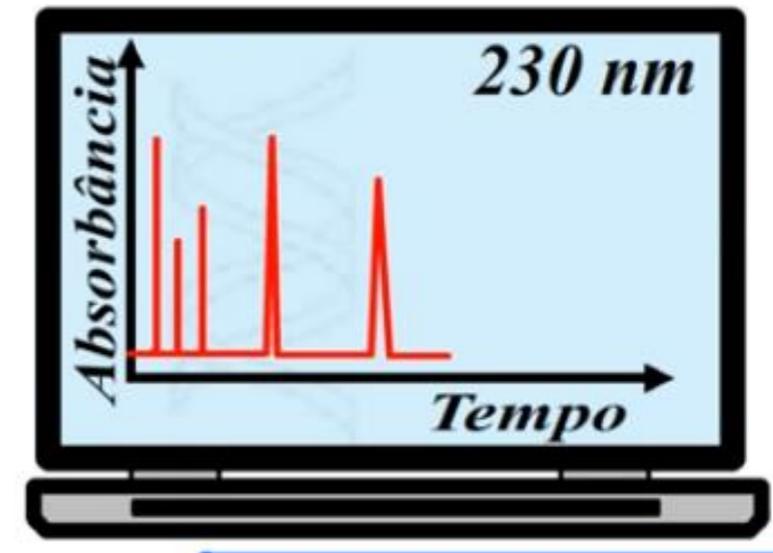
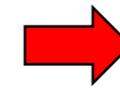
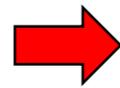
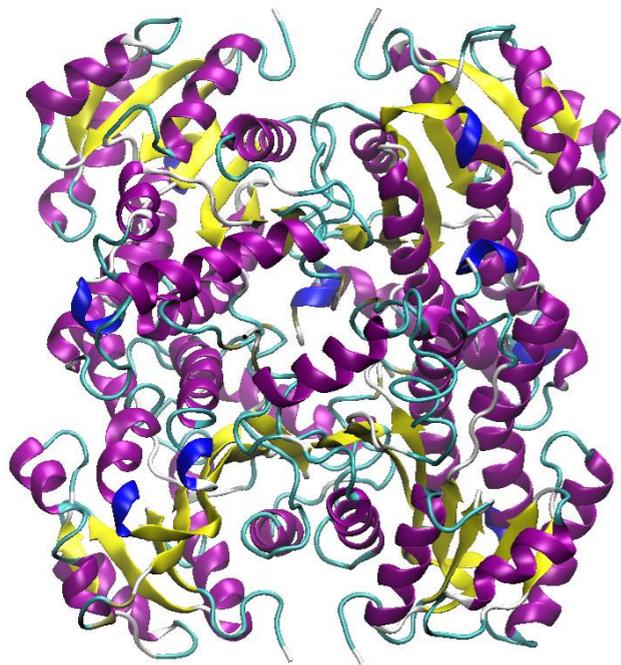
+

Reagente



Considerações finais

HPLC para determinação de aminoácidos



Preparo da amostra

Tipo de amostra

Homogeneização

Processamento/Qualidade

Armazenamento

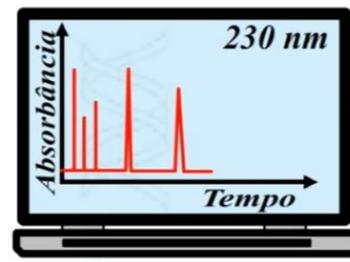
Hidrólise

HCl (6 M), "oxygen free", 110°C, por 18-24 h

Quais aminoácidos quer analisar?

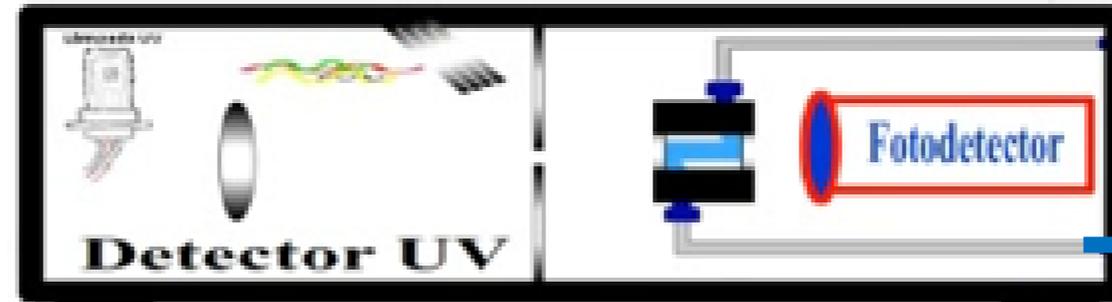
Tipo e número de amostras

"Oxygen-free"



Detecção dos AA

Especificidade (AA não-proteico e compostos c/ função amino)
Espectrometria de massa?



Derivatização (pós-coluna)



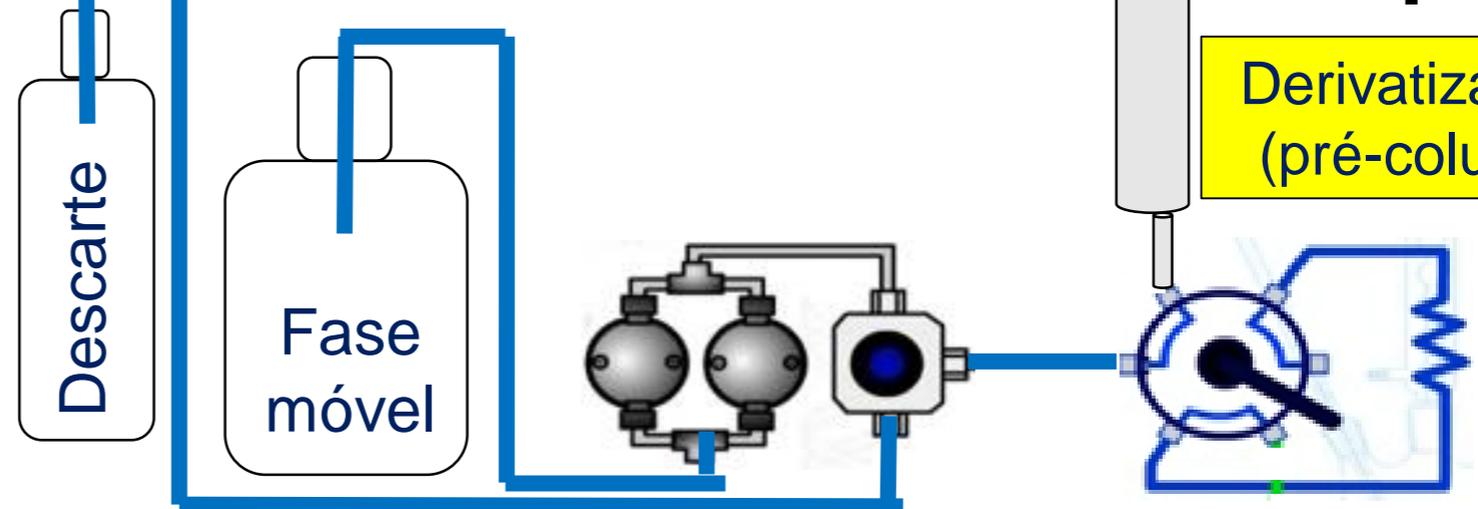
Separação iônica dos AA

ou

Separação por polaridade



Derivatização (pré-coluna)



Preparo da amostra

Tipo de amostra

Homogeneização

Processamento/Qualidade

Armazenamento

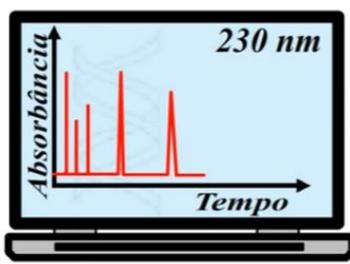
Hidrólise

HCl (6 M), "oxygen free", 110°C, por 18-24 h

Quais aminoácidos quer analisar?

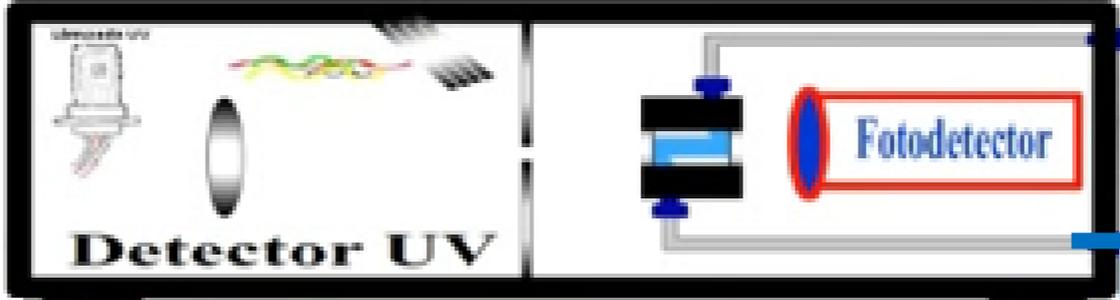
Tipo e número de amostras

"Oxygen-free"



Detecção dos AA

Especificidade (AA não-proteico e compostos c/ função amino)
Espectrometria de massa?



Derivatização (pós-coluna)



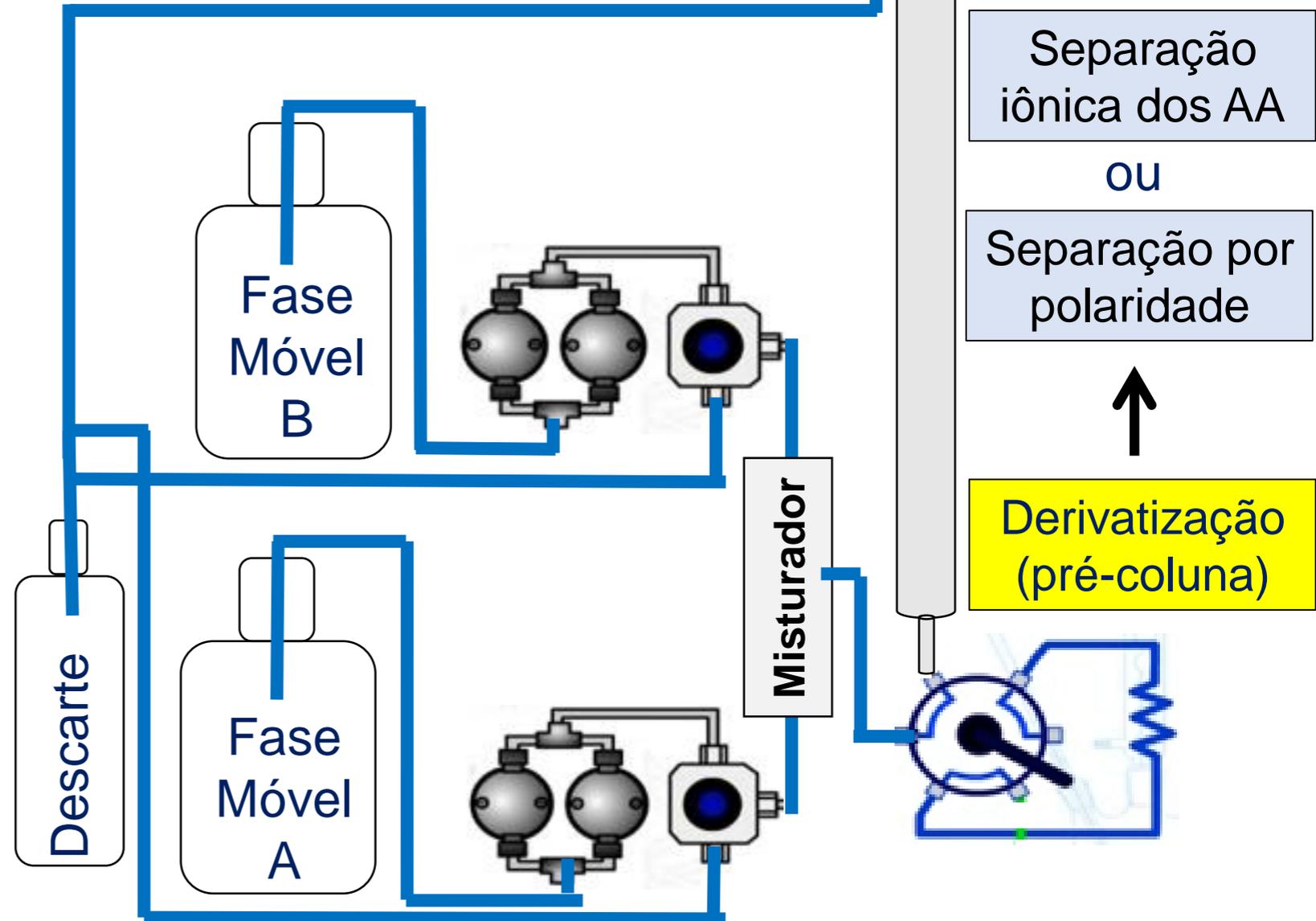
Separação iônica dos AA

ou

Separação por polaridade



Derivatização (pré-coluna)



Obrigado pela atenção

Álvaro Bernardo da Silva Neto

alvarobernardo@usp.br

12 9 8285 0371

Carlos Eduardo Cardoso Consentini

carlos.consentini@usp.br

19 9 9826 2082