

**UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU
BACHARELADO EM QUÍMICA AMBIENTAL E TECNOLÓGICA**

PRISCILLA RIBEIRO ALVES

ESTÁGIO SUPERVISIONADO EM INDÚSTRIA

**Biorigin – Arte em Ingredientes Naturais
Orientador/Supervisor: Prof. Dr. Daniel Rinaldo**

Bauru

2021

PRISCILLA RIBEIRO ALVES

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA HIDRÓLISE DE
AMINOÁCIDOS TOTAIS POR EQUIPAMENTO DE MICRO-ONDAS

Relatório de Estágio
apresentado à UNESP
“Júlio de Mesquita
Filho” – campus Bauru,
como requisito para a
graduação em
Bacharelado em
Química Ambiental e
Tecnológica.

BAURU

2021

A474d

Alves, Priscilla Ribeiro

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA HIDRÓLISE DE
AMINOÁCIDOS TOTAIS POR EQUIPAMENTO DE
MICRO-ONDAS / Priscilla Ribeiro Alves. -- Bauru, 2021

34 p.: il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Química) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Ciências, Bauru

Orientador: Daniel Rinaldo

1. Desenvolvimento de método. 2. Hidrólise. 3. Aminoácidos.
4. Cromatografia. 5. Pesquisa e Desenvolvimento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

PRISCILLA RIBEIRO ALVES

RELATÓRIO DE CONCLUSÃO
ESTÁGIO EM INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Departamento de Química — Unesp Bauru



Prof. Dr. Luiz Carlos da Silva Filho
Departamento de Química – Unesp Bauru



Dra. Aline Garus Saint Clair Colimo
Pesquisadora — Biorigin

Bauru, 12 de agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, minha gratidão à Deus por alinhar meus sonhos aos dEle, e me permitir concluir essa longa jornada da graduação. Sem sua mão e graça não teria chego até aqui.

Aos meus pais, minha irmã e familiares que desde o início sempre me apoiaram, torceram pelo meu sucesso e fizeram esforços para que esse sonho se realizasse.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rinaldo por todo conhecimento transmitido durante a graduação e por seu inestimável apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

Agradeço à coordenadora de P&D, Rosangela C. C. de Camargo e também ao Gerente de P&D Vanderlei de Abreu, pela oportunidade de estagiar durante dois anos na empresa e por todo auxílio prestado durante minha formação profissional e pessoal. Muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório de Físico-Química, Mariana De Lucca, Aline Colimo, Regina Ferrari, Jéssica Prado, João Prenhaca, Ana Carolina Santos, só tenho a agradecer por me receberem na equipe e não medirem esforços para que eu pudesse desenvolver minhas habilidades, crescer pessoal e profissionalmente, e por toda orientação durante o tempo de estágio; serei eternamente grata por tudo!

Ao consultor Dr. Rodrigo Leite (ICTECH), que foi um dos pilares para o desenvolvimento do trabalho, prestando todo apoio e conhecimento técnico, muito obrigada!

Aos meus colegas da universidade e da vida, principalmente à Nathalia, Marcela e Edilaine, presto minha gratidão pela oportunidade de conviver durante esses anos onde a parceria e o apoio foram fundamentais durante o curso. Serei eternamente grata a todos!

RESUMO

O presente trabalho descreve o projeto desenvolvido durante o período de estágio supervisionado obrigatório para conclusão de graduação em Bacharelado em Química Ambiental Tecnológica, oferecido pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Bauru, na empresa Biorigin – Arte em Ingredientes Naturais, alocada em Macatuba-SP.

A Biorigin é uma empresa do ramo alimentício que promove saúde e bem-estar para seres humanos e nutrição animal através de processos biotecnológicos. Como uma empresa que visa desenvolvimento de alimentos, é de extrema importância que todos os produtos tenham seu perfil de nutrientes orgânicos bem definidos, bem como o perfil aminoacídico, que é traçado através da análise de aminoácidos livres e totais; em seu método tradicional o mesmo é realizado através da hidrólise ácida em bateria de extração e posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).

Entretanto, o método tradicional apresenta alguns pontos que apresentaram potencial de melhoria. Sendo assim, as atividades realizadas consistem no desenvolvimento de um método para hidrólise de aminoácidos totais por micro-ondas, visando otimizar o método original, reduzindo o tempo necessário para análise, redução de competição com outros ensaios e conservação externa do equipamento.

Palavras-chave: Leveduras; Aminoácidos; Hidrólise; Cromatografia;

ABSTRACT

The present work describes the project developed during the period of mandatory supervised internship to complete a Bachelor's Degree in Environmental Technological Chemistry, offered by the São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", campus Bauru, at the company Biorigin – Art in natural ingredients, allocated in Macatuba-SP.

Biorigin is a food company that promotes health and well-being for humans and animal nutrition through biotechnological processes. As a company that aims to develop food, it is extremely important that all products have their profile of well-defined organic nutrients, as well as the amino acid profile, which is traced through the analysis of free and total amino acids; in its traditional method, it is done through acid hydrolysis in an extraction battery and later analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD).

However, the traditional method has some points that showed potential for improvement. Thus, the activities carried out consist of the development of a method for hydrolysis of total amino acids by microwave, aiming to optimize the original method, reducing the time needed for analysis, reducing competition with other tests and external conservation of the equipment.

Keywords: Yeasts; Amino acids; Hydrolysis; Chromatography; Biorigin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura proteica.....	15
Figura 2 – Bateria Extratora.....	17
Figura 3 – Micro-ondas de alta pressão.....	19
Figura 4 – Cromatograma 1: Amostra controle.....	26
Figura 5 – Cromatograma 2: P9 – Curva de calibração.....	26
Figura 6 – Cromatograma 3: Hidrólise HCl 6mol/L.....	27
Figura 7 – Cromatograma 4: Hidrólise HCl 6mol/L.....	28
Figura 8 – Cromatograma 5: Hidrólise MSA 4mol/L.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCl	Ácido Clorídrico
MSA	Ácido Metanossulfônico
NaOH	Hidróxido de Sódio
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Aminoácidos essenciais e não essenciais.....	15
Tabela 2 – Amostra certificada (amostra controle)	20
Tabela 3 – Equipamentos e materiais.....	20
Tabela 4 – Reagentes e padrões analíticos.....	21
Tabela 5 – Varredura HCl 6mol/L.....	24
Tabela 6 – Varredura MSA 4mol/L.....	25
Tabela 7 – Resultados hidrólise HCl 6mol/L.....	28
Tabela 8 – Resultados hidrólise MSA 4mol/L.....	30
Gráfico 1 – Comparativo entre resultados obtidos – HCl 6mol/L.....	29
Gráfico 1 – Comparativo entre resultados obtidos – MSA 4mol/L.....	31

SUMÁRIO

1. SOBRE A BIORIGIN	12
2. INTRODUÇÃO	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	13
3.2 PROTEÍNAS.....	14
3.3 AMINOÁCIDOS	15
3.4 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	16
3.4.1 Importância na indústria alimentícia	16
3.4.2 Hidrólise de aminoácidos – Método tradicional.....	16
3.4.3 Técnica analítica – Cromatografia	17
3.4.4 Hidrólise em equipamento micro-ondas.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5.1 AMOSTRAS	20
5.2 EQUIPAMENTOS.....	20
5.3 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	21
5.4 MÉTODOS	22
5.4.1 Preparo de hidrolisados – método tradicional.....	22
5.4.2 Preparo de hidrolisados – método via micro-ondas	22
5.4.3 Etapas de neutralização e derivatização	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.1 HIDRÓLISE UTILIZANDO HCl 6M	27
6.2 HIDRÓLISE UTILIZANDO MSA 4%.....	29
7. CONCLUSÃO	32
8. TRABALHOS FUTUROS.....	32
9. REFERÊNCIAS	33

1. SOBRE A BIORIGIN

Fundada em 2003, a Biorigin é uma empresa que atua no ramo alimentício, conciliando conhecimento e tecnologia para desenvolver produtos que beneficiem a saúde humana e animal. Através da biotecnologia avançada, a Biorigin produz diversos ingredientes naturais com objetivo de melhorar a qualidade dos alimentos, com principal foco realce de sabor, redução do teor de sódio e maior tempo de vida útil aos produtos aos quais são empregados.

Atualmente a empresa conta com três fábricas no Brasil, localizadas em Lençóis Paulista, Macatuba e Quatá, ambas no interior paulista, e uma em Louisville, Estados Unidos.

2. INTRODUÇÃO

Um dos maiores objetivos da indústria alimentícia atual é apresentar aos seus clientes uma gama de produtos com alto valor nutricional, contribuindo para uma melhor qualidade de vida e saúde do consumidor final. Para isso, é de extrema importância que todo o perfil proteico dos produtos seja traçado. Uma das técnicas indispensáveis para tal, é a hidrólise de proteínas como parte do processo para determinação de aminoácidos em produtos – componentes que contribuem significativamente para o bom regulamento do organismo humano e animal.

Ultimamente o presente tema tem sido alvo de muitos estudos e avanços em questão à procedimentos de análise, bem como utilização de equipamentos, reagentes, preparo de amostras e hidrólise ácida. Um dos principais objetivos dos estudos é que através da hidrólise seja possível recuperar a maioria – se não todos os aminoácidos presentes, minimizando perdas de compostos; a redução no tempo de hidrólise também é um dos alvos do estudo.

O método tradicional de hidrólise de aminoácidos se utiliza de uma amostra do produto a ser analisado dissolvida em HCl 6 mol/L, com posterior aquecimento – entre 110°C a 200°C, durante 22h em bateria de extração ou

mufla aquecedora. Por ser classificado como método tradicional, é em suma o mais recomendado pela sociedade científica. Entretanto, como todos procedimentos laboratoriais, o mesmo é passível de melhorias para corrigir contratempos – como a possível destruição de compostos sulfurados como a cistina, metionina e triptofano.

Para fins de estudo e desenvolvimento, diversos laboratórios vêm adotando esta metodologia para que haja um ganho de tempo em relação ao método tradicional. Por não ser uma metodologia analítica consolidada pelos órgãos de regulamentação, como a AOAC, a produção científica em laboratório não é autorizada a se utilizar deste método, uma vez que o mesmo precisa de parâmetros para comparação e validação da nova técnica. (BERNARDI, 2000)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Com o crescimento do mercado alimentício, as indústrias possuem como objetivos unir desenvolvimento e sustentabilidade, avançando em inovações tecnológicas e possibilitando que as necessidades humanas sejam atendidas em suas totalidades afetando a níveis mínimos o meio ambiente. Sendo assim, há uma corrida para que novos processos biotecnológicos sejam desenvolvidos, onde o produto final seja obtido através de processos limpos e renováveis.

Um dos principais dilemas na indústria alimentícia é que em sua maioria, existe uma sobrecarga de sódio empregado nos produtos finais, instigando ao consumidor final a ingestão de uma maior quantidade de sal do que o essencial diário, o que acarreta em diversos problemas de saúde, doenças renais e vasculares e problemas de hipertensão. (SOARES, 2014)

Uma das alternativas para o aprimoramento dos produtos, é aplicando a utilização de leveduras em indústrias que se baseiam em processos fermentativos, como as cervejeiras, etanoicas, panificadoras, entre outras. O extrato de levedura derivado da *Saccharomyces Cerevisiae* é um importante produto industrial, que apresenta uma estrutura abundante em proteínas, sais minerais, vitaminas do complexo B, aminoácidos e nucleotídeos; é

diversamente aplicado em fermentações industriais, principalmente nas alimentícias. (OLIVEIRA, 2005)

A levedura *Saccharomyces Cerevisiae* é um microrganismo unicelular que se reproduz por brotamento a partir da fermentação alcoólica. Pertence ao reino fungi, família Saccharomycetaceae e gênero Saccharomyces. (PELCZAR, 1996)

Por possuírem características particulares em sua estrutura molecular, as leveduras reúnem diversos pontos que são favoráveis em sua aplicação na alimentação animal, proporcionando aumento da resistência imunológica, alto valor nutricional disponível para consumo, proporcionando um melhor desenvolvimento dos animais jovens. Já na alimentação humana, a levedura *Saccharomyces Cerevisiae* proporciona o conhecido sabor Umami, ou então, MSG (glutamato monossódico), que foi descoberto em 1908 através do químico Kikunae Ikeda na Universidade Imperial de Tóquio. Este químico observou que quando isolado de outras partículas provenientes de algas, o L-glutamato tinha um sabor particular, que foi chamado de Umami (delicioso em japonês). (SENA, 2009)

3.2 PROTEÍNAS

Durante anos o estudo das proteínas e de suas alterações químicas teve como principal objetivo determinar de maneira quantitativa a composição de seus aminoácidos; para que o desenvolvimento do estudo fosse possível, o método mais aplicado e vantajoso sempre foi a hidrólise total das proteínas, rompendo as ligações covalentes e abrindo a estrutura das mesmas.

As proteínas são componentes orgânicos coloidais e em sua estrutura estão presentes carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio. Podem ser consideradas polímeros que em sua generalidade são compostos por unidades denominadas *L-α-aminoácidos*. (Rodwell, 1996)

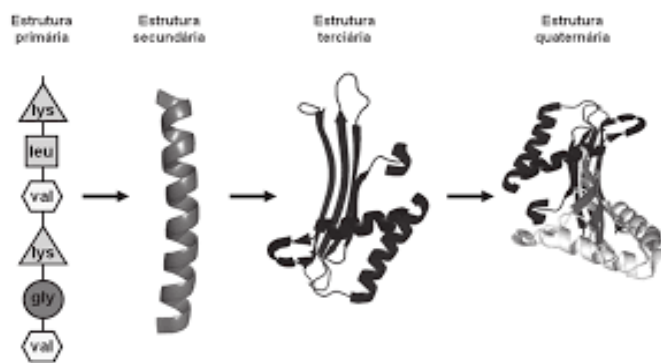


Figura 1: Estrutura proteica. Fonte: Fiocruz

As proteínas podem ser classificadas em dois tipos: simples, que possuem em sua estrutura somente polipeptídios e complexas, que são acompanhadas de grupos como lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos. (Harper, et. Al., 1982)

3.3 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são compostos presentes nos extratos a base de levedura; por serem unidades componentes das proteínas, classificam-se como moléculas orgânicas ligadas através de carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio. São diversas as funções no organismo, como construção de tecidos, transporte de substâncias, composição de anticorpos, regulação de hormônios, entre outras. (BENSON, et. Al., 1981).

Os aminoácidos são divididos em dois grupos, sendo 8 aminoácidos essenciais e 12 não essenciais; estão todos descritos na tabela 1.

Aminoácidos essenciais	Triptofano, valina, fenilalanina, treonina, lisina, leucina, isoleucina e metionina
Aminoácidos não essenciais	Alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, cisteína, glutamina, glicina, prolina, serina, tirosina e histidina

Tabela 1: Classificação - aminoácidos essenciais e não essenciais. Meramente ilustrativo

3.4 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

3.4.1 Importância na Indústria alimentícia

Por se tratarem de compostos altamente importantes para nutrição, as indústrias alimentícias buscam desenvolver métodos eficazes e assertivos para quantificação das espécies e possibilitar que estejam disponíveis ao consumidor final.

3.4.2 Hidrólise de aminoácidos – método tradicional

Para realização da análise de aminoácidos em *Saccharomyces cerevisiae*, o processo de hidrólise da estrutura proteica se faz necessário, pois o mesmo possibilita que ligações peptídicas da proteína (polímero) sejam rompidas, liberando seus monômeros (aminoácidos). O procedimento de *lise* (quebra) da proteína pode ser realizado utilizando-se de enzimas, meio reacional alcalino ou ainda – foco deste trabalho, hidrólise em meio reacional ácido.

Essa técnica se dá por modo ser eficaz pois, ataca diretamente as ligações peptídicas, desestabilizando as estruturas e fazendo com que os aminoácidos sejam extraídos. (FARFÁN, 1994)

O método foi introduzido em 1820 pelo químico francês e também farmacêutico Henri Branconnot, que realizou hidrólise ácida de proteínas com ácido sulfúrico; os primeiros aminoácidos que foram identificados através deste método foram a glicina e a leucina. Alguns anos depois, em 1949 o ácido clorídrico começou a ser utilizado com maior frequência para que fosse determinado o perfil aminoacídico de amostras.

Desde então diversos estudos foram realizados com intuito de entender fatores considerados críticos, tais como: tempo, temperatura, concentração e pureza dos reagentes, presença de impurezas como metais e matéria inorgânica, cinética, matriz proteica, entre outros. (GEHRKE, et. Al., 1985)

Segundo citado por Savoy et. Al., (1975), Kellner et. Al., (1994) e Nakazawa et. Al., (1992) o método tradicional proposto para hidrólise ácida a partir de HCl 6N é denominado de “Método Moore et. Al., 1958”.

Durante estudos onde a temperatura foi a variável, observou-se uma perda significativa na recuperação aminoácidos sulfurados; portanto, agentes adicionais foram testados para melhoria do método, como por exemplo, a implementação de agentes protetores, como o ácido mercaptoetanossulfônico.

3.4.3 Técnica analítica - Cromatografia

O controle analítico dos alimentos é um ponto crucial na prática dos conhecimentos científicos, sendo assim, cada vez mais são buscadas técnicas rápidas e eficientes para que o banco de informações seja cada vez mais completo.

As propriedades físico-químicas dos elementos são a base para que um método analítico seja desenvolvido e aplicado à uma prática instrumental, seja ela quantitativa ou qualitativa. Muitos desses métodos se baseiam em propriedades térmicas, de condutividade, de absorção ou emissão luminosa, onde quantitativamente se utilizam das mesmas para estabelecer uma correlação com as concentrações utilizadas nas análises. (ARAÚJO, 2007)

Por sua vez, métodos tradicionais trazem consigo alguns fatores que pesam na efetividade e qualidade dos resultados finais, como tempo de análise, quantidade de insumos utilizados, custos, entre outros. Sendo assim, laboratórios e indústrias têm optado por técnicas cromatográficas na determinação do perfil proteico, como a CLAE.

A cromatografia tem como princípio separar e identificar compostos presentes em uma mistura; a técnica se baseia na migração dos compostos, os quais podem apresentar diferentes interações com as duas fases, a móvel e a estacionária. Cada um dos componentes é seletivamente adsorvido pela fase estacionária, as substâncias com menor afinidade pelo solvente movem-



Figura 2 – Bateria extratora.
Fonte: Solab.com

se mais lentamente; já as com maior afinidade movem-se mais rapidamente. (BRAITHWAITE, 1985)

Para determinação dos aminoácidos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – CLAE) é muito utilizada. A técnica possui alta efetividade por separar e analisar quantitativamente um gama de compostos em baixa escala de tempo, proporcionando resultados assertivos – por ser um método sensível e de alta resolução. Nos cromatógrafos são utilizadas colunas que possuem em seu interior componentes previamente determinados e, a fase móvel que será utilizada terá sua eluição sob alta pressão. (ARAÚJO, 2007)

Algumas das vantagens desta técnica é por sua precisão (acima de +/- 0,5%), proporcionando a reprodutibilidade, exatidão e precisão dos resultados.

No geral, para as indústrias a cromatografia traz inúmeras vantagens que refletem em custo-benefício. Por se tratar de um método inovador e de alta tecnologia, as análises necessitam de uma pequena quantia de amostra para que sejam realizadas, é uma técnica abrangente onde pode-se analisar desde partículas de alimentos até drogas, extratos de tecidos, inseticidas, entre outros; além disso, através da cromatografia as amostras podem ser analisadas individualmente após sua separação – até mesmo de misturas complexas, e purificação.

3.4.4 Hidrólise em equipamento de micro-ondas

Equipamentos de micro-ondas trabalham com diferentes técnicas, surtindo efeitos variados como a possibilidade de refletir materiais metálicos, transpassar vidros e plásticos – o que irá depender do seu coeficiente dielétrico, entre outros. Na maioria dos casos, o equipamento utiliza uma faixa de radiação eletromagnética que pode variar de 300MHz até 300GHz.

Durante a utilização da técnica podemos observar alguns efeitos como vibração e rotação em moléculas polares, movimentação de íons nos campos eletromagnéticos gerados e absorção de energia produzida pelas micro-ondas; todos estes citados são indispensáveis para que a substancia a ser hidrolisada seja aquecida.



Figura 3 – Micro-ondas de alta pressão.
Fonte: Anton-Paar

Os primeiros testes de hidrólise de aminoácidos em equipamento micro-ondas utilizavam-se de um curto período de tempo – no máximo 5 minutos e era possível obter resultados próximos aos do método tradicional; entretanto, como todos os estudos científicos, eram necessários ajustes finos como controle de pressão e potência, temperatura, pois inicialmente o equipamento foi

desenvolvido para análise de metais e minerais. (CHEN, et. Al., 1987)

Desenvolver o método para hidrólise de proteínas através do equipamento de micro-ondas representa um grande avanço no estudo de métodos mais eficazes e rápidos para análises laboratoriais, pois além da praticidade de operação, diminui a contaminação das amostras a serem analisadas, erros técnicos e ainda apresentam resultados mais confiáveis, pois ao avaliar os resultados e comparar com a técnica tradicional nota-se bandas cromatográficas bem definidas e um gráfico livre de interferentes.

4. OBJETIVO

Com intuito de colaborar para o desenvolvimento do centro de pesquisa e desenvolvimento – Biorigin, o presente estudo objetivou estudar e comparar as metodologias para hidrólise de aminoácidos tradicional – hidrólise ácida em bateria de extração a 200°C por 22h e a metodologia alternativa, via equipamento de micro-ondas pressurizado PMD System (Anton Paar KG, Áustria).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental que envolveu o estudo e testes das metodologias para hidrólise ácida de aminoácidos, bem como seu preparo,

separação e quantificação via CLAE foram realizados no laboratório de análises físico-químicas do centro de pesquisa e desenvolvimento da Biorigin, em Macatuba/SP.

5.1 AMOSTRAS

Uma amostra de extrato de levedura X1 foi utilizada como controle para análise de aminoácidos livres e totais e empregada nos testes de hidrólise ácida via micro-ondas.

Produto	Lote
Extrato de levedura	X1

Tabela 2 – Amostra certificada (controle).

Fonte: Autoral

5.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento da hidrólise de proteínas em micro-ondas foram listados na tabela abaixo:

Equipamentos/materiais	Modelo	Marca
Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-DAD)	<i>Ultimate 3000</i>	ThermoFisher
Software	Chromeleon™	6.8
Software Minitab	Minitab	Versão 6.1.7601
Coluna	Poroshell C-18	Agilent
Micro-ondas de alta potência	Multiwave-Go	Anton-Paar

Tabela 3 – Equipamentos e materiais utilizados.

Fonte: Autoral

5.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

Para o desenvolvimento do método analítico foram utilizados os seguintes reagentes:

Padrões/reagentes	Part Number	Lote	Marca	Grau analítico
L-Serine	S4500	SLBX9952	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (HPLC)
Glycine	50046	SLBX4949	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (NT)
L-Arginine	A5131	SLCB1979	Sigma-Aldrich®	≥ 98% (HPLC)
L-Aspartic acid	A9256	BCBZ4729	Sigma-Aldrich®	≥ 98% (HPLC)
L-Glutamic acid	G1251	SLBZ7490	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (HPLC)
L-Threonine	T8625	SLBR2767V	Sigma-Aldrich®	≥ 98% (HPLC)
L-Alanine	05130	BCBV0750	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (NT)
L-Proline	P0380	SLBZ8461	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (HPLC)
L-Cystine	30200	BCBW6246	Sigma-Aldrich®	≥ 99.7% (TLC)
L-Lysine	62929	BCCB2964	Sigma-Aldrich®	≥ 99.5% (AT)
L-Tyrosine	93829	BCBW7745	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (NT)
L-Methionine	M9625	SLBZ1683	Sigma-Aldrich®	≥ 98% (HPLC)
L-Valine	94619	BCBZ8642	Sigma-Aldrich®	≥ 99.5% (NT)
L-Isoleucine	58879	BCBZ4588	Sigma-Aldrich®	≥ 99.5% (NT)
L-Leucine	61819	BCBV1129	Sigma-Aldrich®	≥ 99.5% (NT)
L-Phenylalanine	78019	BCBZ7338	Sigma-Aldrich®	≥ 99% (NT)
Ácido Clorídrico	01A1028.01.BJ	239507	LabSynth®	P.A.

Ácido Metanossulfônico	471356	STBJ8575	Sigma-Aldrich®	≥ 99%
Solução derivatizante 6-Aminoquinolyl	275581	SHBG2624V	Sigma-Aldrich®	≥ 98%

Tabela 4 – Reagentes e padrões analíticos.

Fonte: Autoral

5.4 MÉTODOS

5.4.1 Preparo dos hidrolisados – método tradicional

Inicialmente pesou-se em um balão de fundo chato aproximadamente 150,0mg (+/- 0,0005mg) da amostra controle X1, e em seguida cerca de 50mL de água ultra pura *Milli-Q* e 50mL de HCl 6mol/L foram adicionados. Com a solução já pronta, pérolas de bórax foram inseridas para evitar a ebulição turbulenta. As amostras foram levadas à bateria de extração durante 22h a 200°C.

Após o fim da hidrólise ácida e seu devido resfriamento, uma alíquota de aproximadamente 15mL foi passada para tubo de ensaio para armazenamento e posterior neutralização e derivatização.

5.4.2 Preparo dos hidrolisados – método via micro-ondas

Em tubo digestor próprio do equipamento de micro-ondas, foram pesadas as amostras a serem hidrolisadas. Foram pesados cerca de 0,02g (+/- 0,0005g) e a massa foi anotada. Em seguida, adicionou-se com auxílio de uma micropipeta volumétrica 8mL de MSA 4mol/L; a massa foi novamente anotada, uma vez que os cálculos foram realizados com base massa/massa.

O tubo foi selado com um septo próprio e inserido no equipamento micro-ondas, onde a amostra foi digerida em um processo de aproximadamente 40 minutos a 1200rpm. Após a digestão, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente e a solução digerida foi transferida para um tubo de centrífuga de 15mL.

5.4.3 Etapas de neutralização e derivatização

Para as amostras analisadas via método tradicional, a etapa de neutralização se deu da seguinte forma:

- 0,5mL NaOH 6mol/L
- 0,5mL hidrolisado com HCl 6mol/L
- 9,0mL H₂O ultrapura

Para as amostras analisadas via método alternativo – Micro-ondas, a etapa de neutralização foi realizada nas seguintes condições:

- 0,5mL NaOH 4mol/L
- 0,5mL hidrolisado com MSA 4mol/L
- 9,0mL H₂O ultrapura

Para ambos os métodos, foi realizada a última etapa de bancada, a derivatização. As amostras foram homogeneizadas em agitador, filtradas em microfiltro millex (μm) e derivatizadas em vials de 1,5mL para posterior análise via CLAE. A derivatização das amostras foi realizada nas seguintes proporções:

- 0,06mL solução tampão borato
- 0,01mL filtrado (amostra hidrolisado)
- 0,01mL solução padrão interno
- 0,02mL solução derivatizante

A etapa de derivatização é de extrema importância pois os aminoácidos não absorvem em região de UV-Vis em lâmpadas como as utilizadas no estudo (tungstênio e deutério); portanto, com a realização desta etapa, um grupo cromóforo irá se unir à molécula do aminoácido, que poderá ser visualizado em região UV-Vis.

As amostras devidamente prontas, foram à estufa a vácuo por 20 minutos a 60°C para estabilização e logo após foram inseridas em cromatógrafo para quantificação.

Como um dos principais objetivos, o método foi testado com diversas variáveis, sendo elas tempo, temperatura e massa – sempre em duplicata. Os testes são descritos nas tabelas a seguir:

Testes com HCl	“Ramp time” (min)	“Hold time” (min)	Tempo total (min)	Temperatura (°C)	Diluição	Massa(g)
Teste 1	5	10	15	130	160	0,05
Teste 2	5	10	15	140	160	0,05
Teste 3	5	10	15	150	160	0,05
Teste 4	5	10	15	155	160	0,05
Teste 5	5	10	15	160	160	0,05
Teste 6	5	10	15	170	160	0,05
Teste 7	5	10	15	180	160	0,05
Teste 8	5	10	15	130	3200	0,05
Teste 9	5	10	15	140	3200	0,05
Teste 10	5	10	15	150	3200	0,05
Teste 11	5	10	15	160	3200	0,05
Teste 12	5	10	15	170	3200	0,05
Teste 13	5	10	15	180	3200	0,05
Teste 14	5	15	20	140	3200	0,05
Teste 15	5	15	20	150	3200	0,05
Teste 16	5	15	20	160	3200	0,05
Teste 17	5	5	10	140	3200	0,05
Teste 18	5	5	10	150	3200	0,05
Teste 19	5	5	10	160	3200	0,05
Teste 20	5	15	20	130	3200	0,05
Teste 21	5	5	10	170	3200	0,05
Teste 22	5	25	30	130	3200	0,05

Tabela 5 – Testes de varredura com HCl 6mol/L. Fonte: Autoral

Testes Com MSA	“Ramp time” (min)	“Hold time” (min)	Tempo total (min)	Temperatura (°C)	Diluição	Massa (g)
Teste 1	5	40	45	160	3200	0,05
Teste 2	5	30	35	160	3200	0,05
Teste 3	5	20	25	160	3200	0,05
Teste 4	5	10	15	160	3200	0,05
Teste 5	5	30	35	150	3200	0,05
Teste 6	5	20	25	150	3200	0,05
Teste 7	5	10	15	150	3200	0,05
Teste 8	5	10	15	150	3200	0,05
Teste 9	5	40	45	140	3200	0,05
Teste 10	5	30	35	140	3200	0,05
Teste 11	5	20	25	140	3200	0,05
Teste 12	5	10	15	140	3200	0,05
Teste 13	5	50	60	130	3200	0,05
Teste 14	5	40	45	130	3200	0,05
Teste 15	5	30	35	130	3200	0,05
Teste 16	5	20	25	130	3200	0,05
Teste 17	5	30	35	140	3200	0,02
Teste 18	5	30	35	145	3200	0,02
Teste 19	5	30	35	140	3200	0,02

Tabela 6 – Testes de varredura com MSA 4mol/L. Fonte: Autoral

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método para hidrólise de aminoácidos foi estudado onde, através de testes, foram variados tempo e temperatura (tabelas 6 e 7), que são considerados como condições primordiais a quebra das proteínas. A análise dos gradientes foi realizada em etapas.

O cromatograma 1 refere-se à amostra controle realizada hidrólise em bateria de extração – método tradicional; o mesmo é utilizado como parâmetro comparativo aos testes via micro-ondas com HCl 6mol/L e MSA 4mol/L.

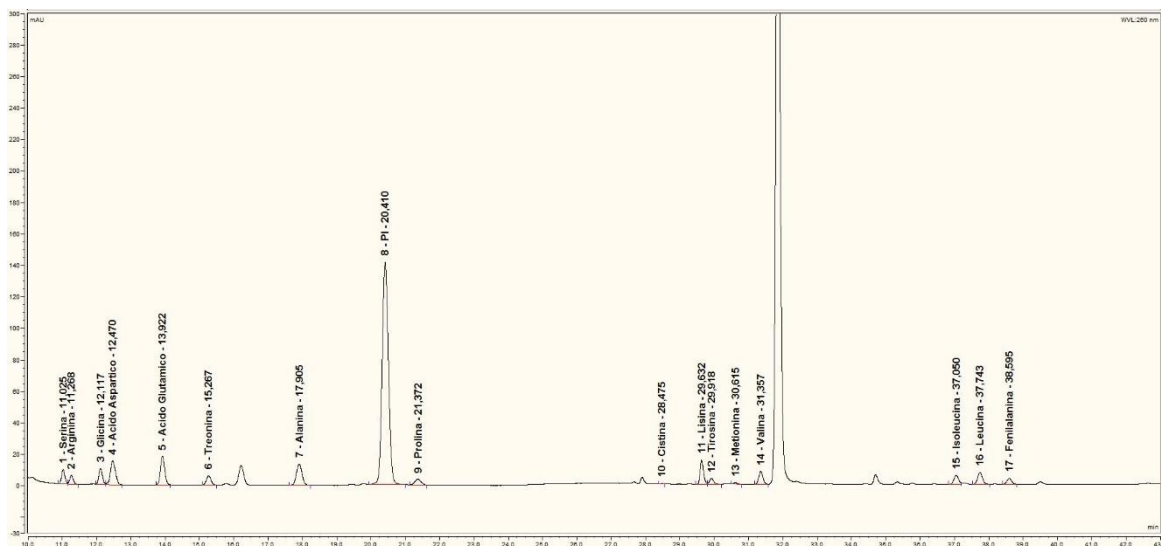


Figura 4 – Cromatograma 1: amostra controle.

Fonte: Autoral

A curva de calibração determina a concentração de um analito em uma amostra (x) a partir da resposta obtida em (y) que pode ser, área, intensidade, condutividade, dentre outros. A curva foi construída através da diluição de padrões analíticos e composta por no mínimo 4 pontos que serão utilizados na calibração.

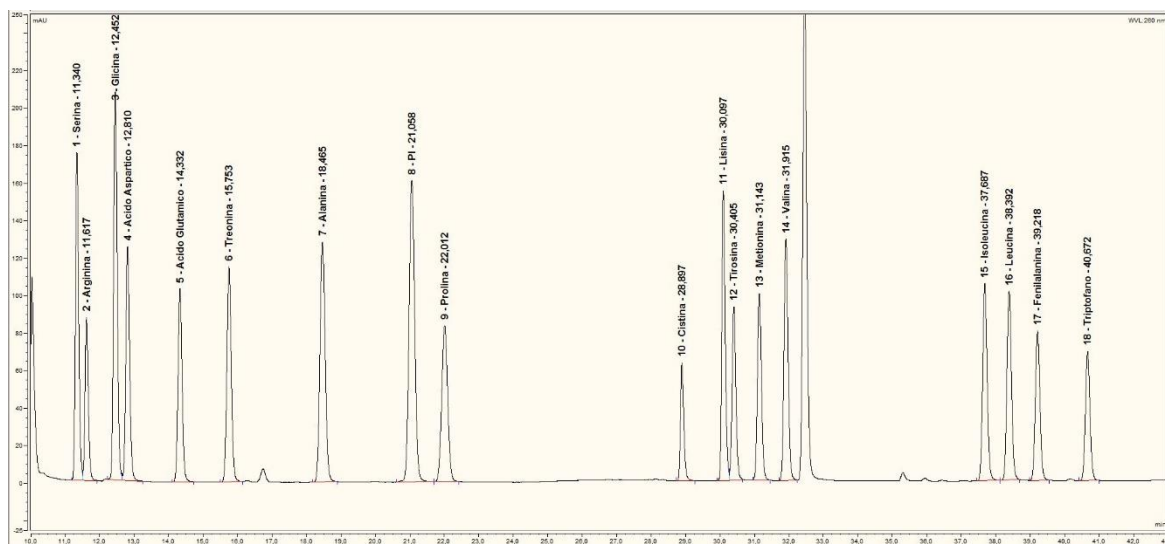


Figura 5 – Cromatograma 2: P9 curva de calibração.

Fonte: Autoral

6.1 HIDRÓLISE UTILIZANDO HCL 6MOL/L

Os testes se iniciaram com o uso de HCl, que foi desenvolvido e adaptado por Marconi; Panfili; Bruschi; Vivanti e Pizzoferrato (1994), uma vez que o mesmo era utilizado como reagente no método tradicional utilizado para determinação de aminoácidos totais.

Foi realizada uma varredura em termos de temperatura (tabela 6), partindo de 130°C até 180°C com tempo estabelecido em 10 minutos de corrida. Após o primeiro momento, outros testes foram realizados variando o tempo de corrida da hidrólise. Em temperaturas amenas, observou-se que com o tempo estimado houve apenas quebra parcial e não total das proteínas, impossibilitando a recuperação final; por outro lado, em temperaturas maiores – aproximadamente 180°C, notou-se a degradação da maior parte dos aminoácidos, e os valores de recuperação estouraram os limites para curva de calibração do teste, representado no cromatograma 3.

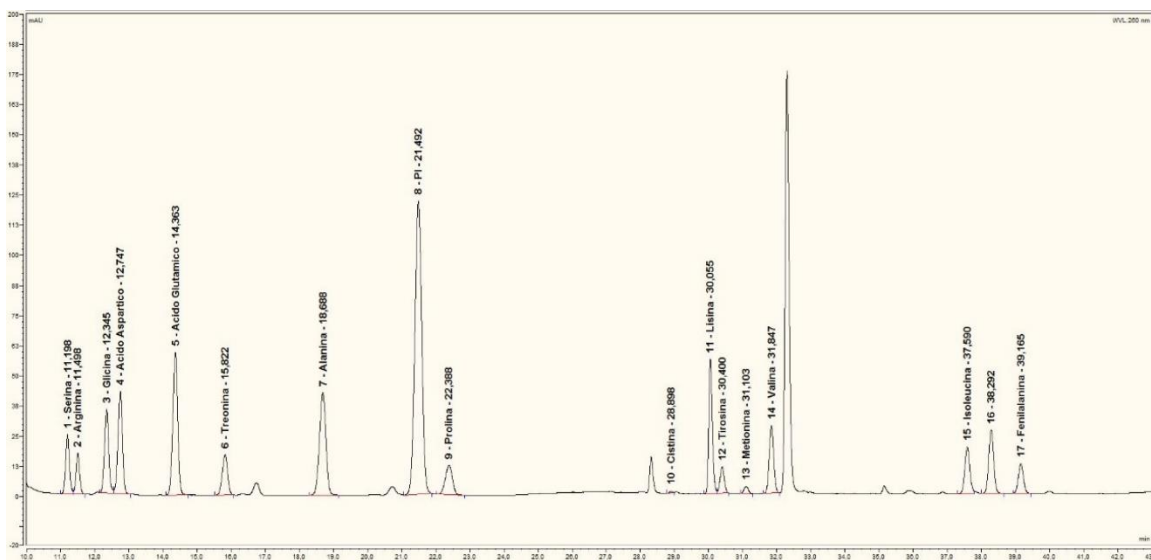


Figura 6 – Cromatograma 3: Hidrólise HCl 6mol/L. Fonte: Autoral

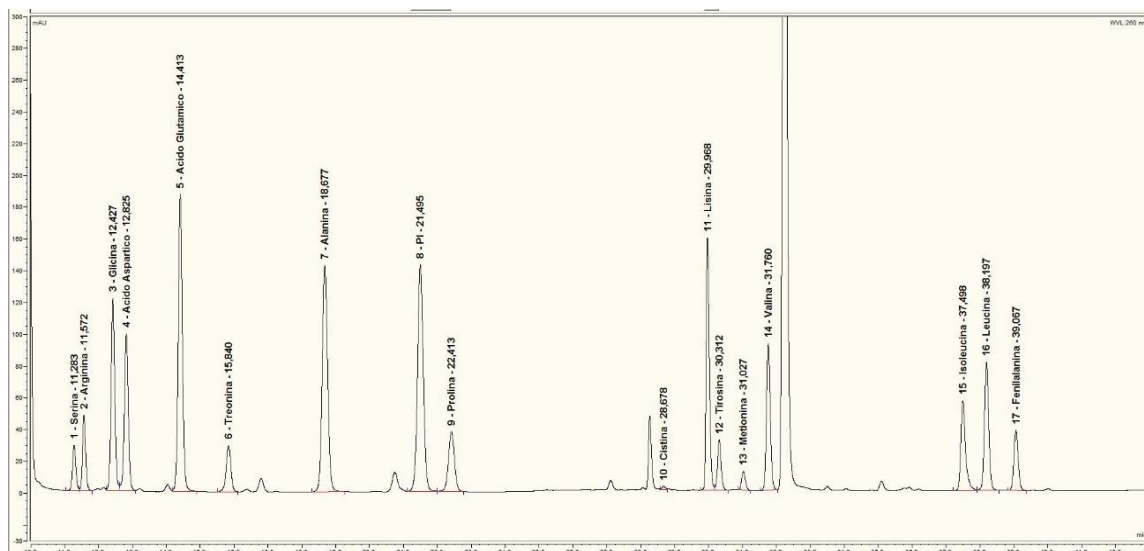


Figura 7 –Cromatograma 4: Hidrólise HCl 6mol/L. Fonte: Autoral

Concluiu-se que em temperaturas medianas (faixa de 140°C a 155°C), os resultados foram satisfatórios, onde foi possível a quebra das proteínas e suas perdas minimizadas. Portanto, definiu-se como base a temperatura de 140°C a 10 minutos, onde a maioria dos compostos alcançaram recuperação $\geq 95\%$ e apenas 3 compostos tiveram recuperação $\leq 90\%$. Na tabela a seguir poderemos fazer um comparativo entre os 3 resultados – Método tradicional, laboratório externo e teste micro-ondas.

Analito	Laboratório FQ	Laboratório externo	Método proposto	% recuperado	DPR (%)
Serina	2,88	2,89	2,77	95,94	0,82
Arginina	2,74	2,63	2,51	95,57	1,90
Glicina	2,75	2,77	2,7	97,51	1,54
Ác. Aspártico	5,87	6,02	4,69	77,89	2,41
Ác. Glutâmico	10,64	10,8	9,8	90,72	2,45
Treonina	3,14	3,12	2,92	93,55	1,52
Alanina	6,5	6,09	5,83	95,78	1,68
Prolina	2,7	2,71	2,6	95,82	1,17
Cistina	0,3	0,51	0,18	35,25	1,14
Lisina	4,55	4,66	4,2	90,04	2,28
Tirosina	2,03	1,93	1,98	102,40	2,03
Metionina	0,98	0,83	0,56	67,7	13,93
Valina	3,97	3,66	3,5	95,63	1,79

Isoleucina	3,26	3,04	2,99	98,33	2,32
Leucina	4,28	4,22	4,27	101,14	2,07
Fenilalanina	2,57	2,48	2,50	100,89	1,45

Tabela 7 – Resultados hidrólise HCl 6mol/L 140°C. Fonte: Autoral

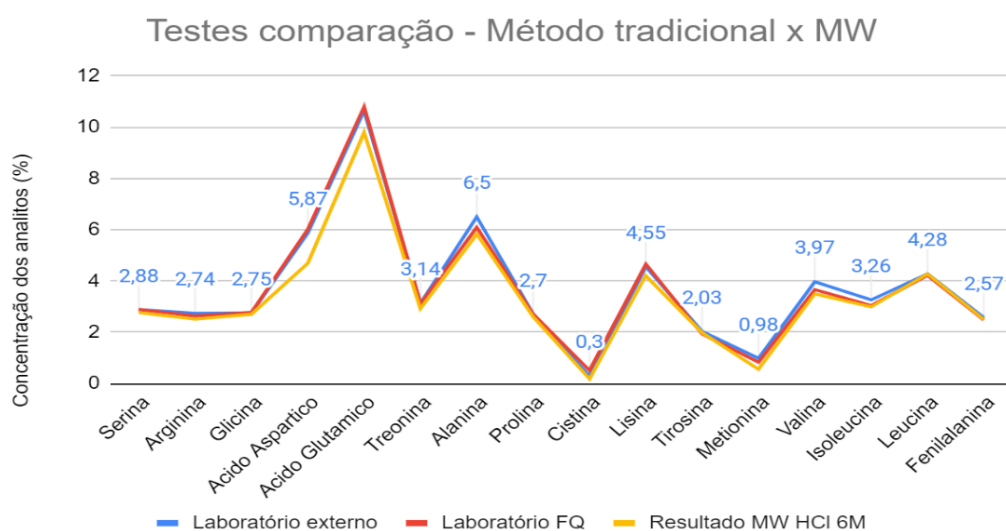


Gráfico 1 – Comparativo entre resultados obtidos para HCl 6mol/L. Fonte: Autoral

No gráfico 1 é possível observar um comparativo entre os resultados para métodos tradicional, de laboratório referência (terceiros) e método via micro-ondas. Dois compostos em particular obtiveram uma queda na recuperação, a cistina e metionina; entende-se que por serem compostos sulfurados, na presença do ácido clorídrico os mesmos são degradados não atingindo o valor esperado. O método de hidrólise via micro-ondas com HCl obteve considerável sucesso, uma vez que se recuperou a maior parte dos aminoácidos quando comparado ao método tradicional.

6.2 HIDRÓLISE UTILIZANDO MSA 4MOL/L

De semelhante modo ao primeiro teste, uma segunda vertente foi estudada, na qual houve a substituição do primeiro reagente – HCl 6mol/L por MSA 4mol/L. O MSA pode ser utilizado como reagente alternativo devido à algumas propriedades diferirem do HCl, sendo considerado um ácido mais fraco e degradando em menor quantidade os aminoácidos sulfurados. Como é possível observar no método

tradicional, alguns compostos como a cistina, metionina e triptofano apresentam perdas significativas e, com a utilização do método partindo da hidrólise com MSA, os mesmos podem ter um aumento considerável em sua concentração. (CHIOU, 1988).

Na tabela 7, podemos verificar as varreduras realizadas com MSA 4mol/L, onde o tempo foi variado entre 10 e 40 minutos, e as temperaturas entre 130°C e 160°C.

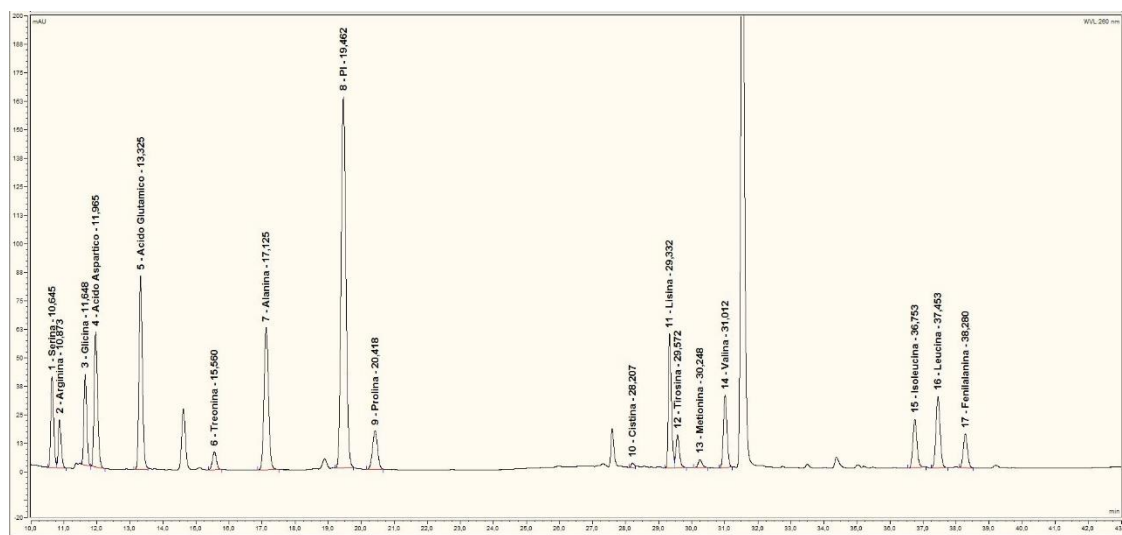


Figura 8 – Cromatograma 5: Hidrólise MSA 4mol/L.
Fonte: Autoral

Após testes em varredura, foi possível concluir que a melhor condição para hidrólise de aminoácidos totais em micro-ondas com MSA 4mol/L foi em corridas de 30 minutos e temperaturas de 140°C e 145°C. A junção dos fatores – tempo de corrida prolongado e ácido mais fraco possibilitou que as proteínas tivessem sua quebra total – e não apenas parcial; com a utilização do MSA, ao contrário do HCl, alguns compostos sulfurados como a cistina e metionina tiveram melhor recuperação (observar tabela 9).

Analito	Laboratório FQ	Laboratório externo	Método proposto	% recuperado	DPR (%)
Serina	2,88	2,89	2,78	96,0	0,76
Arginina	2,74	2,63	2,79	106,1	3,63
Glicina	2,75	2,77	2,96	107,0	7,18
Ác. Aspártico	5,87	6,02	5,25	87,2	5,84

Ác. Glutâmico	10,64	10,8	10,64	98,5	1,77
Treonina	3,14	3,12	2,98	95,4	0,71
Alanina	6,5	6,09	6,26	102,7	2,23
Prolina	2,7	2,71	2,68	99,0	2,00
Cistina	0,3	0,51	0,31	60,8	13,69
Lisina	4,55	4,66	4,60	98,8	2,34
Tirosina	2,03	1,93	2,71	140,4	9,78
Metionina	0,98	0,83	0,62	74,7	4,56
Valina	3,97	3,66	3,73	102,0	2,95
Isoleucina	3,26	3,04	3,13	103,1	3,26
Leucina	4,28	4,22	4,34	102,9	2,28
Fenilalanina	2,57	2,48	2,57	103,5	2,66

Tabela 8 – Resultados hidrólise MSA 4mol/L 145°C. Fonte: Autoria própria

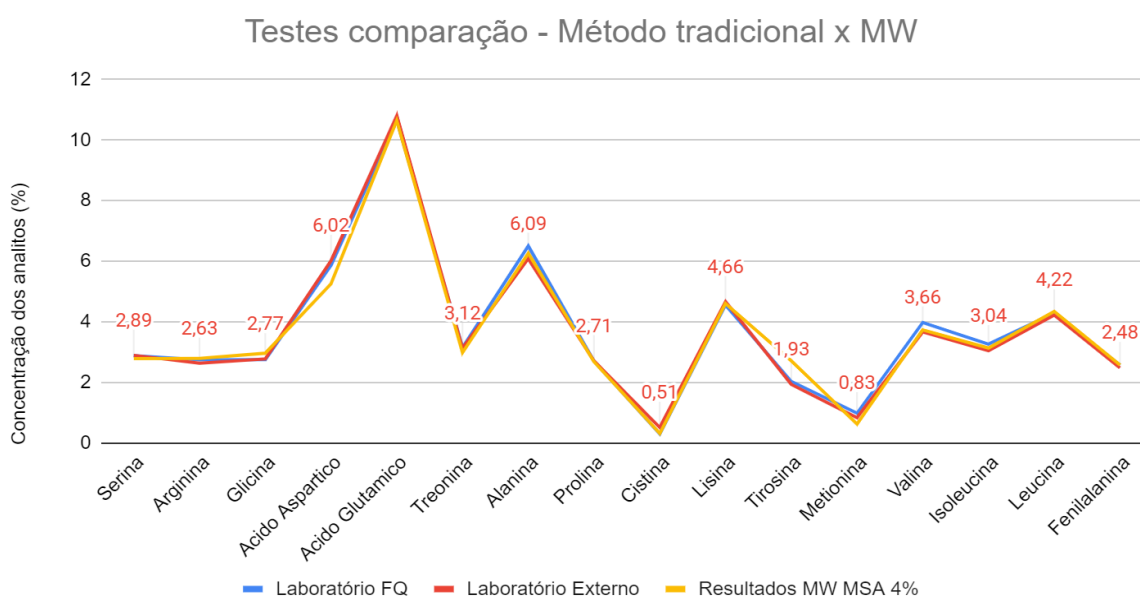


Gráfico 2 – Comparativo entre resultados obtidos MSA 4mol/L. Fonte: Autoral

Com a análise do gráfico 2 pode-se entender que o método via micro-ondas traz resultados promissores onde, aproximadamente 82% dos analitos foram recuperados com sucesso via hidrólise por MSA 4mol/L. Assim como estudado, ambos os reagentes – HCl 6mol/L e MSA 4mol/L quando aplicados na hidrólise via micro-ondas possuem vantagens na hidrólise, trazendo resultados que podem substituir com efetividade o método tradicional.

7. CONCLUSÃO

Foi possível concluir a efetividade do método hidrólise de aminoácidos por micro-ondas de alta pressão como sendo alternativo ao método tradicional, realizado em bateria extratora nas bases de extrato de levedura e posteriormente analisados em cromatografia líquida de alta eficiência.

O método desenvolvido com a utilização do MSA 4mol/L apresentou resultados compatíveis e promissores quando comparados ao método tradicional, alcançando os valores de referência internos e externos, podendo então ser considerado preciso quando baseado em valores de recuperação obtidos. Também foi possível otimizar o tempo de hidrólise, que no método tradicional era de 22 horas, passando a ser de 40 minutos quando realizado no equipamento de micro-ondas. Por fim, como também benefício, a não utilização da bateria de extração evita seu desgaste e oxidação devido à utilização do ácido, que corrói sua superfície externa.

Por fim, o método pode ser considerado uma alternativa viável e promissora, com altos níveis de eficiência, garantindo resultados confiáveis e rápidos para determinação de aminoácidos totais em amostras de extrato de levedura, e pode ser empregado para análises de rotina, pesquisa e desenvolvimento e também ao controle de qualidade dos produtos.

8. TRABALHOS FUTUROS

Como maior objetivo deste trabalho, o intuito foi de desenvolver e entender o funcionamento da hidrólise via micro-ondas de alta potência como método alternativo ao tradicional, em bateria de extração. Como concluiu-se a possibilidade de recuperar os aminoácidos com menor tempo de hidrólise, trazendo vantagens no setor industrial, o próximo passo se dará por testes de linearidade, estabilidade, exatidão e também em outras matrizes para que se obtenha uma gama mais detalhada de informações até que o método esteja garantido para validação. Outros pontos a serem estudados são a utilização de protetores como o 2-mercaptoetanol para uso de protetor 2-mercaptoetanol para

preservar os compostos metionina e cistina; também a utilização de solução de padrão interno durante a hidrólise para normalizar a destruição dos aminoácidos.

9. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. A. G.; JÚNIOR, F. I. A.; SOBREIRA, G. F. Fundamentos e métodos para análise de aminoácidos. Revista eletrônica Nutritime, v.4, nº 2, p. 395-404, 2007.

BENSON, J.; LOUIE, P. C. & BRADSHAW, R. A. Amino acid analysis of peptides. In: The Peptides. Vol. 4, Academic Press, 1981.

BERNARDI, C. R. Preparo de hidrolisados proteicos e análise de aminoácidos por duas metodologias. Centro de Ciências Agrárias, UFSC, 2000.

BRAITHWAITE, A. & SMITH, F. J. Chromatographic methods. 4 ed. London: Chapman and Hall, 1985. 414 p

CHEN, S. T.; CHIOU, S. H.; CHU, Y. H. & WANG, K. T.. Rapid hydrolysis of proteins and peptides by means of microwave technology and its application to amino acid analysis. Int. J. Peptide Protein Res. Vol. 30, pg. 572-576, 1987.

CHIOU, S. H., WANG, K. T. Simplified protein hydrolysis with methanesulphonic acid at elevated temperature for the complete amino acid analysis of proteins. National Taiwan University and Institute of Biological Chemistry, 1988.

CSAPÓ, J.; CSAPÓ-KISS, Z.; FOLESTAD, S. & TIVESTEN, A. Mercaptoethanesulphonic acid as a protecting and hydrolysing agent for the determination of the amino acid composition of proteins using an elevated temperature for protein hydrolysis. Analytica Chimica Acta. Vol. 289, no. 1, pg. 105-111, 1994

FARFÁN, J. A. Química de Proteínas Aplicada à Ciência e Tecnologia dos Alimentos. 2 ed. Campinas: Unicamp, 1994. 134 p.

FOUNTOULAKIS, M. & LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. J. of Chromatography A. Vol. 826 (1998), pg. 109-134, 1998.

GEHRKE, C. W.; WALL, L. L.; ABSHEER, J. S.; KAISER, F. E & ZUMWALT, R. W. Sample preparation for chromatography of amino acids: acid hydrolysis of proteins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 68, no. 5, pg. 811-821, 1985.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W. & MAYES, P. A. Manual de química fisiológica. 5 ed. Tradução de J. Reinaldo Magalhães. São Paulo: Ateneu, 1982. 736 p

KELLNER, R.; MEYER, H. E. & LOTTSPREICH, F. Amino acid analysis. In: KELLNER, R.; LOTTSPREICH, F. & MEYER, H. E. Microcharacteristics Proteins [s. n.]: VCH Weinheim, cap. 3.1, pg. 93-113, 1994.

MARCONI, E., PANFILI, G., BRUSCHI, L., VIVANTI, V., & PIZZOFERRATO, L. Comparative study on microwave and conventional methods for protein hydrolysis in food. Università degli Studi del Molise, 1994

NAKAZAWA, M. & MANABE, K. The direct hydrolysis of proteins containing tryptophan on polyvinylidene difluoride membranes by mercaptoethanesulfonic acid in the vapor phase. Analytical Biochemistry. Vol. 206, no. 1, pg. 105-108 1992.

OLIVEIRA, A. M.; GÓMEZ, R. J. H. C. Otimização da Extração de Proteínas da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ciências Agrárias, Londrina, 26, 521-534, 2005.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações, São Paulo: Makron Books, 1996.

RODWELL, V. W. Amino acids. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. & RODWELL, V. W. Harper's biochemistry. 24 ed. Stamford: Appleton & Lange, 1996. 868 p.

SAVOY, C. F., HEINIS, J. L. & SEALS, R. G. Improved Methodology for Rapid and Reproducible Acid Hydrolysis of Food and Purified Proteins. Analytical Biochemistry. Vol. 68, pg. 562-571, 1975.

SENA, Claudia. Pesquisadora do Centro de pesquisa e desenvolvimento da Biorigin. Bionews Ed.3, 2009. Acesso em 27/03/2021. Disponível em: www.biorigin.com.net.

SOARES, A.; MONASSA, J. M. O emprego da levedura na indústria Food e Feed. Revista eletrônica de graduação UNIVEM. Engenharia de Produção, Marília, 144-159, 2014.