



Desenvolvimento de metodologia para mapeamento de peptídeos por peso molecular utilizando Cromatografia Líquida de Alta Resolução e Baixa Pressão - FPLC

Matheus Cortez **Betioli**¹; Lucia de la **Hoz**²; Maria Elisa Caetano Silva **Abreu**³; Vera Sonia Nunes da **Silva**⁴; Maria Teresa Bertoldo **Pacheco**⁵

Nº 18224

RESUMO – Um dos elementos chave para a competitividade, lucratividade e responsabilidade ambiental das indústrias consiste no gerenciamento de resíduos e subprodutos. Uma das formas de reduzir o impacto dos subprodutos é através do reaproveitamento desses materiais, gerando assim nova possibilidade de renda, com agregação de valor a subprodutos anteriormente descartados. No caso da indústria cárnea alimentícia, os restos de carcaças de animais após o processamento geram uma grande quantidade de dejetos, que poderiam ser devidamente aproveitados através da quebra de alguns tipos específicos de proteínas, para mudar suas propriedades funcionais tecnológicas e biológicas. O objetivo desse trabalho é estabelecer uma metodologia para verificar o peso molecular dos peptídeos gerados pela hidrólise de proteínas de subprodutos na indústria de alimentos. A metodologia escolhida foi a cromatografia líquida de alta eficiência e baixa pressão (FPLC), sendo necessário definir os padrões de peso molecular, a coluna a ser utilizada, tipo de detector, a fase móvel e desenvolver um método de cálculo confiável. Foi criada uma planilha para os cálculos para tratar os dados brutos obtidos no processo analítico e organizar os resultados. A partir da construção de uma curva padrão de peso molecular foi estabelecida uma equação utilizada para determinar a faixa de distribuição de peso molecular de amostras hidrolisadas. Os padrões definidos foram a Albumina de soro bovino (BSA), Aprotinina, Vitamina B12 e L-β-4-Dihydroxy-Phenylalanine. A coluna escolhida foi a Superdex 30 Increase 10/300 GL.

Palavras-chaves: Cromatografia, Peptídeos, hidrolisados proteicos, FPLC,

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; matheusbetioli@gmail.com

2 Colaboradora, CCQA, ITAL, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP CP 139.

3 Colaboradora, CCQA, ITAL, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP CP 139.

4 Colaboradora, CCQA, ITAL, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP CP 139.

5 Orientadora, CCQA, ITAL, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP CP 139.



ABSTRACT – *One of the key elements to the competitiveness, lucrativity and environmental responsibility of the industries consists of management of waste and by-products. One way to reduce the impact of the by-products is through the reuse, creating a new possibility of income, added of value to previously discarded by-products. In the case of meat food industries, the remaining animal carcasses, after processing, generate a large amount of waste, which could be properly used, by breaking down some specific types of proteins, to change its technological and biological functional properties. The objective of this work is to establish a methodology to verificate the molecular weight of peptides, generated by the hydrolysis of proteins of by-products in the alimentary industry. The chosen methodology was the high performance low pressure liquid chromatography (FPLC), being necessary define the molecular weight standard, the column to be used, the mobile phase and to develop a reliable calculation method. A spreadsheet was created for the calculations, to handle the raw data obtained in the analytical process and to organize the results. A standard molecular weight curve was established allowing an equation to be obtained which was used to determine the molecular weight distribution range of hydrolyzed samples.*

Keywords: Chromatography, peptides, protein hydrolysates, FPLC

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, na indústria, existe uma necessidade de ampliar o aproveitamento de matérias primas, aumentando assim o lucro e a competitividade das empresas. Sendo assim, é essencial aumentar o aproveitamento integral de toda linha de produção e encontrar novos usos para materiais anteriormente descartados. A partir do processamento de alguns subprodutos proteicos da indústria alimentícia, é possível obter-se peptídeos, que, dependendo da origem, composição em aminoácidos e tamanho, desempenham atividades funcionais, tais como, o de antioxidantes, hipocolesterolêmicos, hipotensores (Li et al., 2008), proteção contra o câncer (Kobayashi et al., 2004), opióides e anti- inflamatórios (Udenigwe et al., 2009).

Peptídeos podem ser produzidos a partir da hidrólise de proteínas, tanto de origem animal quanto vegetal. Dependendo do tipo de hidrólise e especificidade da enzima, podem ser obtidos peptídeos de diferentes tamanhos e composição em aminoácidos. De acordo com Li (2013), peptídeos de peso molecular menor apresentam uma maior atividade antioxidante. A adição de tais



peptídeos em alimentos e bebidas pode resultar na expressão de atividades biológicas, podendo agregar valor devido à grande procura de alimentos funcionais.

O colágeno, por exemplo, é uma proteína abundante nos animais, podendo chegar até mesmo a 30% das proteínas totais (Johnston-Banks, 1990). A maior parte do colágeno é encontrada nos tecidos conjuntivos, pele e cartilagens. Khiari (2014) desenvolveu um estudo para a obtenção e caracterização de hidrolisados de colágeno utilizando cabeças de peru como matéria prima.

Como o tamanho dos peptídeos obtidos após a hidrólise afeta tanto sua funcionalidade como sua biodisponibilidade, torna-se de interesse das empresas conhecer o tamanho dos peptídeos gerados pela hidrólise. Tal verificação pode ser feita através do uso de cromatografia e assim fazer um direcionamento para sua aplicação tecnológica. Atualmente, na indústria cárnea, os hidrolisados de colágenos destinados ao consumo humano, apresentam um valor superior ao do colágeno de origem animal, anteriormente destinados para fabricação de gelatinas.

A cromatografia surgiu em 1906 e é aprimorada ainda hoje. Existem diversos tipos de cromatografia como a de adsorção, a de troca iônica e a de exclusão molecular.

O fundamento de uso do FPLC consiste em passar a amostra com o auxílio de um fluxo de determinada substância (fase móvel) através de uma fase estacionária (coluna) preenchida com uma resina contendo poros de diversos tamanhos. A porosidade do material determina o tempo de saída com componentes da amostra, enquanto um detector analisa a saída de componentes da coluna. Os componentes menores entram nos poros, enquanto os maiores não, fazendo com que o tempo para que os componentes atravessem a coluna sejam diferentes de acordo com o tamanho. Dessa forma, componentes maiores, ou seja, mais pesados, saem primeiro, enquanto os mais leves levam mais tempo (Figura 1). Através do uso de padrões com peso molecular conhecido, é possível fazer uma curva de calibração, relacionando o tempo de eluição com o tamanho de massa molecular, para que se possa verificar a distribuição de peso molecular das amostras desconhecidas.

O estabelecimento de um método para uso em cromatógrafo passa por várias etapas, devido ao número de variáveis presentes na operação. Mudanças na coluna utilizada, na fase móvel, temperatura, concentração da amostra e até mesmo no tempo de operação surtem efeito nos resultados.

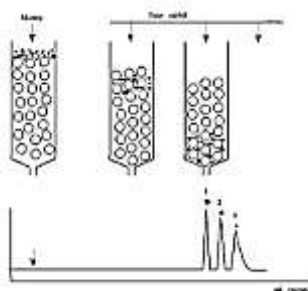


Figura 1. Representação da técnica de cromatografia de exclusão molecular e respectivo cromatograma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padrões

Como padrões para a elaboração do método foram utilizados, Vitamina B12, Aprotinina, Albumina de soro bovino (BSA) e L- β -4-Dihydroxy-Phenylalanine, todos da Sigma-Aldrich.

2.2. Equipamento/ Coluna e Condições cromatográficas

Foi utilizado um sistema ÄKTA Pure 25, equipado com um detector de UV de 280 nm, através do Software Unicorn 6.3. Utilizada uma coluna Superdex Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Como fase móvel foi utilizado Tampão Fosfato de Sódio 0,025 M/ 0,015 mol de NaCl e fluxo de 0,5 mL/min.

2.3 Cálculos

Foi elaborada uma tabela de cálculos no Excel, composta de 3 abas, para facilitar a inserção dos resultados provenientes do cromatograma e padronizar a interpretação dos resultados.

Na primeira aba (Figura 2A), os tempos de retenção e pesos moleculares dos padrões irão gerar uma linha de tendência no gráfico. A partir da equação dessa linha, o programa irá gerar os pesos moleculares médios dos picos no cromatograma. Os pesos moleculares seguem uma tendência logarítmica em relação ao tempo de retenção.

A segunda aba (Figura 2B) requer os resultados do cromatograma, que são exportados no formato ASCII, sendo necessário que haja uma substituição no formato dos números exportados, visto que o software do aparelho usa o padrão americano, separando os decimais por um ponto no lugar da vírgula. Os resultados do cromatograma expressam o tempo de retenção e a intensidade do analito, captada pelo detector do aparelho. Também é gerado um gráfico dos resultados do cromatograma.

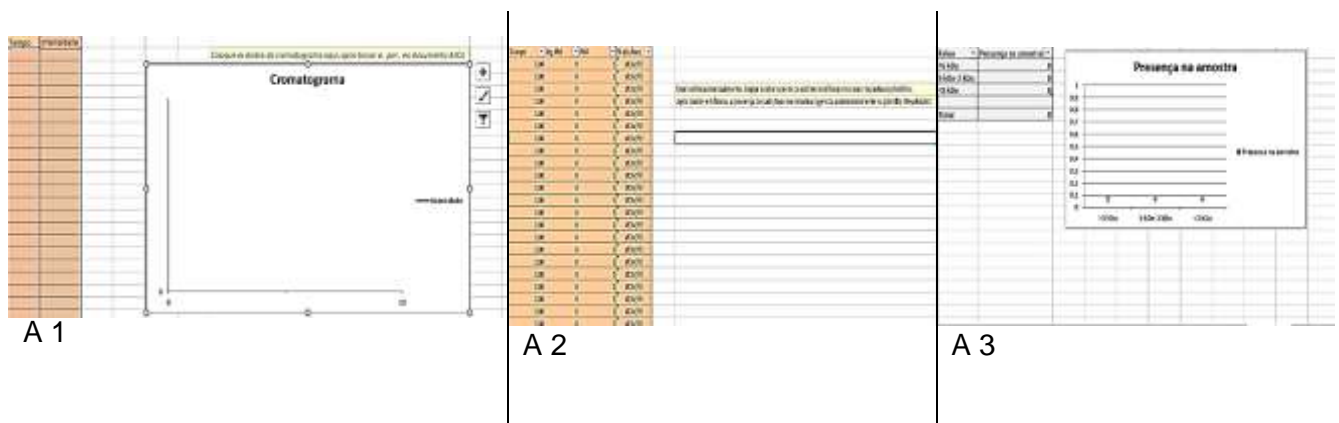


Figura 2. Representação gráfica dos dados exportados ao programa Excel pelo software do equipamento de cromatografia com coluna de exclusão molecular. A1) curva de calibração de acordo com os padrões utilizados; A2) tempo de retenção e a intensidade do analito, captada pelo detector do aparelho; A3) resultados obtidos a partir dos dados inseridos na planilha baseados na curva de calibração e representação do agrupamento realizado de acordo com as faixas de peso molecular de interesse.

Com os resultados da segunda aba, é gerada automaticamente uma tabela com os pesos moleculares dos componentes na terceira aba (Figura 2). O cálculo da área das faixas é feito através da Equação 1.

$$\text{Área} = (Intensidade T2 - Intensidade T1) \div 2 \times (T2 - T1) \tag{1}$$

Com esses dados, as faixas de peso são definidas de acordo com a necessidade. Para o exemplo, foram definidas as seguintes faixas: 1) maior que 5 kDa (quilo daltons), 2) de 5 a 2 kDa e 3) menores que 2 kDa. Portanto, a partir dos dados gerados, a divisão por faixas é feita manualmente, e os resultados são gerados automaticamente na planilha 'Resultados' (Figura 2C).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas análises nos padrões individualmente e em uma mistura contendo os quatro padrões. Com o resultado da mistura de padrões demonstrado na Figura 5, foi calculada a curva de calibração.

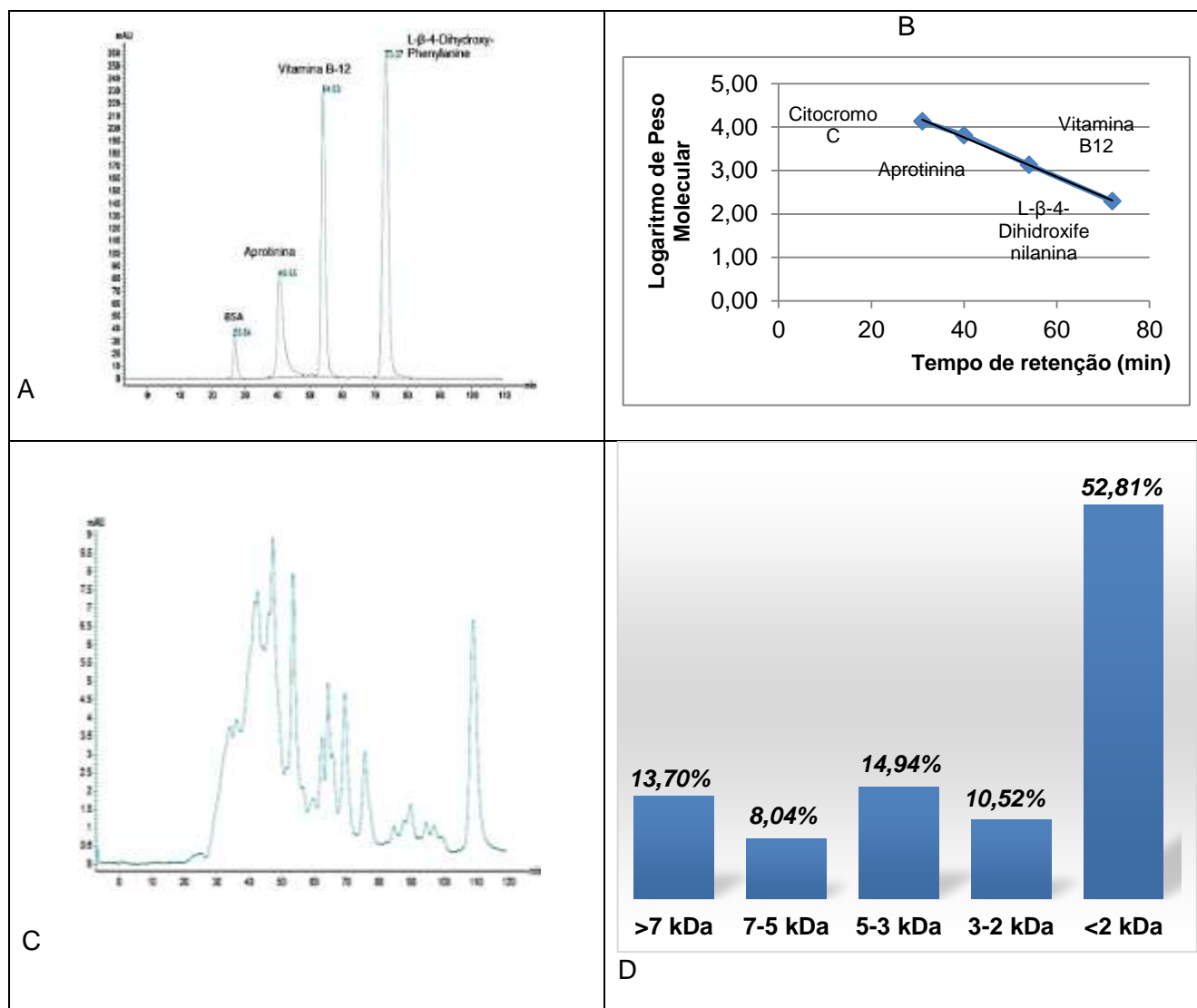


Figura 3. Cromatograma obtido nas condições estabelecidas: A) mistura de padrões; B) Curva de calibração obtida a partir dos tempos de retenção dos padrões; C) tempo de retenção da amostra teste; D) faixas de peso molecular do hidrolisado proteico da amostra teste.



Para testar os resultados na planilha de cálculos, foi feita uma análise de um hidrolisado proteico de soro de leite. Com os resultados dos tempos de retenção dos padrões, foi criada a curva de calibração demonstrada na Figura 3B. O resultado da curva mostra um coeficiente de determinação (R^2) obteve um valor de 0,9039, considerado relativamente baixo para métodos analíticos. Tal valor se deve ao uso da Albumina de Soro Bovino (BSA), que elui no volume morto da coluna, ou seja, não interage com os poros da resina por possuir um peso molecular elevado. Devido ao alto peso molecular (66000 Da), o logaritmo do peso tende a sofrer uma quebra na tendência. Se fosse usado um padrão com um peso menor, mas que ainda não interagisse com a coluna, como por exemplo o Citocromo C (13500 Da), o valor de R^2 tenderia a se aproximar muito de 1 e apresentar um R^2 mais apropriado. O hidrolisado proteico testado (Figura 3C) na planilha de cálculos proposta apresentou a distribuição de peso molecular do hidrolisado, como apresentado na Figura 3D.

As ligações peptídicas, principal ligação de proteínas e peptídeos, absorvem um comprimento de onda na faixa de 214 nm, enquanto os anéis aromáticos dos aminoácidos absorvem um comprimento de 280 nm. Neste estudo, foi utilizado um detector de 280 nm, fato que pode ter influenciado os resultados, devido a necessidade da presença do anel aromático.

4. CONCLUSÃO

A metodologia foi validada para apenas uma amostra, sendo necessário um maior número de testes amostrais. A planilha de cálculos funcionou como esperado, facilitando a análise dos resultados e possibilitando que a mesma possa ser replicada. Os padrões definidos durante a pesquisa interagiram bem com a coluna escolhida, sendo ideal que o padrão de maior peso molecular fosse mais próximo do limite superior de exclusão da coluna. Os resultados permitiram estipular o perfil molecular da amostra teste, sendo necessário avaliar diferentes hidrolisados de fontes proteicas variadas.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida. Ao ITAL pela oportunidade de aprendizado e crescimento.



6. REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. Technical Overview: Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages. Agilent Technologies technical data, [s. l.], v. 1, p. 1–4, 2011. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-7890EN.pdf>>
- ARRUDA, M.N. Extração, caracterização e modificação química da queratina extraída das penas de frango. [s. l.], p. 88, 2010.
- ASPEVIK, Tone; EGEDE-NISSEN, Henning; OTERHALS, Åge. A Systematic Approach to Comparison of the Cost Efficiency of Endopeptidases to Hydrolyze Atlantic Salmon (*Salmo salar*) By-Products. *Food Technology and Biotechnology*, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 421–431, 2016.
- CHI, Chang Feng et al. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 11211–11230, 2014.
- DALIRI, Eric; OH, Deog; LEE, Byong. Bioactive Peptides. *Foods*, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 32, 2017.
- DEL, Rosângelis et al. Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos de leite em pó desnatado. [s. l.], v. 40, 2004.
- DENIS, Alain et al. Molecular weight determination of hydrolyzed collagens. *Food Hydrocolloids*, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 989–994, 2008.
- DONG, Michael W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2006. p 2.
- DYBKA, Katarzyna; WALCZAK, Piotr. Collagen hydrolysates as a new diet supplement. *Food Chemistry and Biotechnology*, [s. l.], v. 73, n. 1058, p. 83–91, 2009.
- GE HEALTHCARE. Size exclusion chromatography: Principles and Methods. *GE HealthCare Handbooks*, [s. l.], p. 139, 2012.
- HONG, Paula; KOZA, Stephan; BOUVIER, Edouard S. P. A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, [s. l.], v. 35, n. 20, p. 2923–2950, 2012.
- HONG, Y.; LEE, K.; LEE, C. Molecular Weight Distribution of Protein Hydrolysate by the Enzymic Hydrolysis of Weakly Acid-Treated Wheat Gluten. *Food Science and Technology Research*, v. 7, n. 2, p. 126–130, 2001.
- JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 278–293, 2012.
- JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatine. In: HARRIS, Peter (Ed.). *Food Gels*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990. p. 233–289.
- JUN, Shin Young et al. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, [s. l.], v. 219, n. 1, p. 20–26, 2004.
- KAUSDANG, O. et al. Characteristics of gelatin from swim bladder of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) as influenced by extracting temperatures. *Italian Journal of Food Science*, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 366–374, 2015.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

KHIARI, Zied; NDAGIJIMANA, Maurice; BETTI, Mirko. Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolyses of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. *Poultry Science*, [S.L.], v. 93, n. 9, p. 2347-2362, set. 2014.

KIM, Se Kwon et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 1984–1989, 2001.

KOBAYASHI, Hiroshi et al. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clinical and Experimental Metastasis*, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 159–166, 2004.

KUWABA, Kumiko et al. Effects of collagen peptide ingestion on skin properties-placebo-controlled double-blind trial. *Japanese Pharmacology and Therapeutics*, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 995–1004, 2014.

LEMIEUX, L. et al. Separation of a casein hydrolyzate by HPSEC with a new mobile phase and characterization of peptides by FABMS. *Analytica Chimica Acta*, [s. l.], v. 352, n. 1–3, p. 399–409, 1997.

LI, Yanhong et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 444–450, 2008.

LI, Zhongrui et al. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. *Food Research International*, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 283–293, 2013.

MATSUDA, Naoya et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *Journal of nutritional science and vitaminology*, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 211–215, 2006.

MOEIN, Mohammad Mahdi; EL BEQQALI, Aziza; ABDEL-REHIM, Mohamed. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, [s. l.], v. 1043, p. 3–11, 2017.

MOLDOVEANU, Serban C.; DAVID, Victor. Start of the Implementation of a New HPLC Method. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis, [s. l.], p. 1–29, 2017.

MOSKOWITZ, Roland W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 87–99, 2000.

MUNASINGHE, Kumudini a.; SCHWARZ, Jurgen G.; NYAME, Anthony K. Chicken Collagen from Low Market Value By-Products as an Alternate Source. *Journal of Food Processing*, [s. l.], v. 2014, p. 1–6, 2014.

NALINANON, Sitthipong et al. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 124, n. 4, p. 1354–1362, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.089>>

ROSENBERG, Saul et al. Further Studies in the Use of Gelatin in the Treatment of Brittle Nails. *A. M. A. Archives of Dermatology*, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 330–335, 1957.

RUSS, Winfried; MEYER-PITTRUFF, Roland. Utilizing Waste Products from the Food Production and Processing Industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 57–62, 2004.

SAHU, Prafulla Kumar et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. [s.l.]: Elsevier B.V., 2018. v. 147 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>>

SHIMOTORI, Koichi et al. Quantification and characterization of coastal dissolved organic matter by high-performance size exclusion chromatography with ultraviolet absorption, fluorescence, and total organic carbon analyses. *Limnology and Oceanography: Methods*, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 637–648, 2016.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

SIBILLA, Sara et al. An Overview of the Beneficial Effects of Hydrolysed Collagen as a Nutraceutical on Skin Properties: Scientific Background and Clinical Studies. *The Open Nutraceuticals Journal*, [s. l.], v. 8, p. 29–42, 2015.

STRUPAT, Kerstin. Molecular weight determination of peptides and proteins by ESI and MALDI. *Methods in Enzymology*, [s. l.], v. 405, n. 5, p. 1–36, 2006.

THIANSILAKUL, Yaowapa; BENJAKUL, Soottawat; SHAHIDI, Fereidoon. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadi*). *Food Chemistry*, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 1385–1394, 2007

TIRUMALAI, Radhakrishna S. et al. Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, [s. l.], v. 2, n. 10, p. 1096–1103, 2003.

WANG, Qing et al. Enzymatic hydrolysis of human-like collagen and molecular weight distribution of hydrolysates. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 278–282, 2014.

YAMAMOTO, Shoko et al. Absorption and Urinary Excretion of Peptides after Collagen Tripeptide Ingestion in Humans. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 428–434, 2016.

YANG, Bao et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 551–555, 2011.

ZHANG, Zhongkai; LI, Guoying; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 23–28, 2006.