

Avaliação de Colunas de Acesso Restrito Imobilizadas com Albumina Sérica Bovina para Exclusão de Proteínas de Ovos de Galinha.

Fernando C. C. R. de Paula (PG)*, Quezia B. Cass (PQ) – nandocampos82@yahoo.com.br

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Caixa Postal 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP.

Palavras Chave: Fases de acesso restrito, Ovos, Injeção direta

Introdução

Colunas de acesso restrito (RAM) tem se destacado na análise de fármacos em biofluidos (plasma humano, leite, urina) por CLAE, pois permitem injeções diretas e repetitivas de amostras não tratadas no sistema cromatográfico uma vez que promovem a exclusão não adsorvida de macromoléculas com retenção das micromoléculas de interesse¹. Revisões recentes tem destacado a variedade das aplicações das colunas RAM^{2,3}.

A monitorização de resíduos de antibióticos em alimentos tem sido uma preocupação crescente e muito importante devido a seu potencial impacto na saúde humana. Assim sendo, em testes comprobatórios da ausência de antibióticos em ovos de galinha há a necessidade de longas etapas de pré-tratamento como extração líquido-líquido e extração em fase sólida. Isto se deve à complexidade da matriz biológica, cujos componentes, como as proteínas e gorduras, devem ser eliminados previamente a fim de evitar a interferência na separação e detecção dos analitos e o entupimento e a perda da eficiência das colunas analíticas.

Para a matriz ovo não existem estudos que permitam a injeção direta em sistemas cromatográficos.

Resultados e Discussão

Como matriz ovo, os de galinha foram selecionados, para análise de resíduos de antibióticos. Isto se justifica devido à vasta aplicação destes para a prevenção e tratamento de infecções em galinhas poedeiras.

As colunas RAM-BSA C₆, C₁₈ e fenil, com 10 cm de comprimento, vem sendo usadas no nosso grupo com grande eficiência para exclusão de macromoléculas em matrizes biológicas^{1,3,4} e foram preparadas de acordo com o protocolo anteriormente descrito⁴. A quantificação da exclusão protéica foi realizada utilizando-se o método de Bradford⁵.

O desempenho das colunas extratoras foi avaliado utilizando-se somente água como fase móvel a 1,0 mL.min⁻¹ para diferentes volumes de amostras injetadas (100 e 200 µL).

Por se tratar de uma mistura muito viscosa, o ovo foi diluído com água (1:1 v/v) e centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos.

Os percentuais de exclusão protéica foram na faixa de 92-100% em 5 minutos de eluição. Entretanto, foi observada elevação da pressão da coluna, a cada injeção, o que limitaria sua vida útil.

Considerando a grande carga lipídica das gemas, a mistura clara/gema foi diluída com acetonitrila (1:1 v/v) e em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. Com esse simples pré-tratamento, maiores volumes de injeção da amostra (300 µL) foram conseguidas, sem elevação da pressão da coluna. O cromatograma mostrado na Figura 1 exemplifica a exclusão protéica obtida.

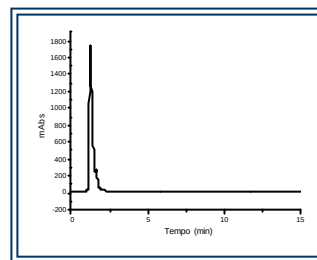


Figura 1: Cromatograma do perfil de exclusão protéica do ovo de galinha na coluna C₁₈-BSA.

Conclusões

Este trabalho demonstrou a eficiência da exclusão das proteínas pelas colunas de acesso restrito preparadas, utilizando somente água como fase móvel, para amostras de ovo de galinha.

Para maior vida útil das colunas RAM-BSA foi necessário um pré-tratamento suave das amostras de ovo, facilitando dessa forma a utilização destas em análise de resíduos de exógenos.

Agradecimentos

Os autores agradecem FAPESP, CAPES e CNPq pelas bolsas e suporte financeiro.

¹ Lima, V.V.; Cassiano, N.M.; Cass, Q.B.; *Química Nova*, **2006**, 29(1), 72.

² Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.; *J. Chrom. B*, **2004**, 801(2), 141.

³ Cassiano, N.M.; Lima, V.V.; Cass, Q.B.; Oliveira, R.V.; De Pietro, A.C.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006** (no prelo).

⁴ Pereira, A.V.; Cass, Q.B.; *J. Chrom. B*, **2005**, 826 (1-2), 139.

⁵ Bradford, M. M.; *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248.