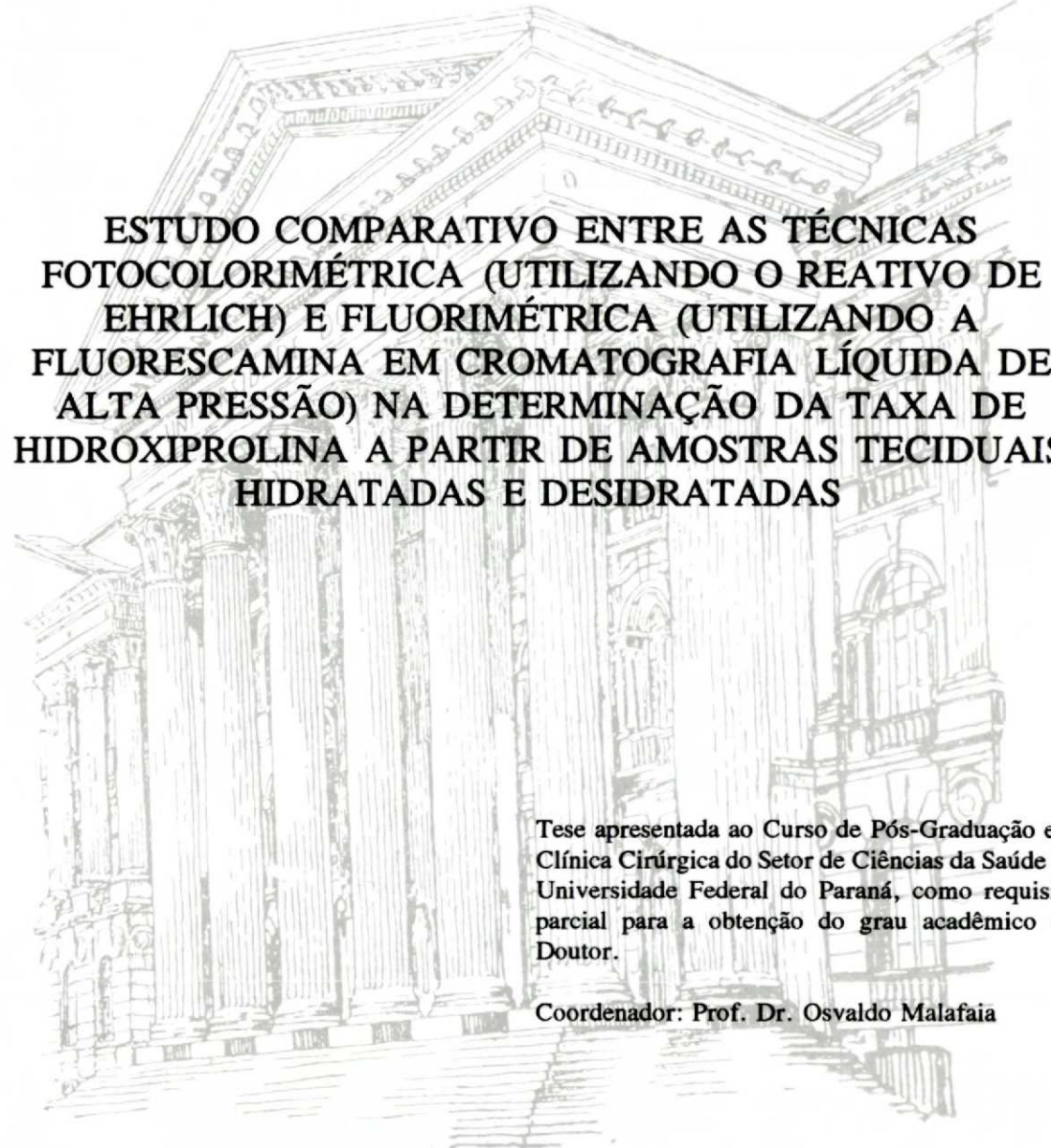


**ULRICH ANDREAS DIETZ**



**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS  
FOTOCOLORIMÉTRICA (UTILIZANDO O REATIVO DE  
EHRlich) E FLUORIMÉTRICA (UTILIZANDO A  
FLUORESCAMINA EM CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE  
ALTA PRESSÃO) NA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE  
HIDROXIPROLINA A PARTIR DE AMOSTRAS TECIDUAIS  
HIDRATADAS E DESIDRATADAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para a obtenção do grau acadêmico de  
Doutor.

Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

**CURITIBA**  
1995

**ULRICH ANDREAS DIETZ**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS  
FOTOCOLORIMÉTRICA (UTILIZANDO O REATIVO DE  
EHRlich) E FLUORIMÉTRICA (UTILIZANDO A  
FLUORESCAMINA EM CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE  
ALTA PRESSÃO) NA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE  
HIDROXIPROLINA A PARTIR DE AMOSTRAS TECIDUAIS  
HIDRATADAS E DESIDRATADAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para a obtenção do grau acadêmico de  
Doutor.

Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

**CURITIBA**  
1995

**Orientador:**

**Prof. Dr. Nicolau Gregori Czezko**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka**

*Wie oft müssen die Waffen nicht geändert werden, bald muß man arbeiten,  
bald warten, bald muß man trotzen, bald bitten!*

(Com que freqüência as armas não precisam ser mudadas, uma vez precisa-se trabalhar, outra vez esperar, uma vez ser obstinado, outra vez pedir!)

*Sören Kierkegaard (1813-1855)*

*Zwar sind gewonnene Erkenntnisse und Erfahrungen, deren man sich  
nachträglich bewußt wird, nur Abstraktionen vom eigentlichen, vom gelebten  
Leben selbst. Aber wie Vergessenkönnen wohl eine Gnade ist, so gehört doch  
das Gedächtnis, das Wiederholen empfangener Lehren,  
zum verantwortlichen Leben.*

(Conhecimentos adquiridos e a experiência acumulada, que se nos tornam conscientes, não deixam de ser abstrações do principal, da vida em si vivida. Mas, como saber esquecer é uma dádiva, assim a lembrança, o reviver de aprendizados passados, é intrínseco à vida responsável.)

*Dietrich Bonhoeffer (1906-1945)*

**Aos meus pais**

**Astrid e Emil**

**Ao meu irmão Thomas**

**e às minhas irmãs Tina e Lidia**

## AGRADECIMENTOS

*"Rendei graças ao Senhor, porque ele é bom,  
porque a sua misericórdia dura para sempre."*

Salmo 136:1

Ao Prof. Dr. **Nicolau Gregori Czczko**, amigo e orientador deste trabalho, que pela sua paciência e sabedoria, mostrou-me limitações e ajudou-me a superá-las.

Ao Prof. Dr. **Oswaldo Malafaia**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela confiança em mim depositada e pela constante porta aberta, amiga e conselheira.

Ao Prof. Dr. **João Carlos Domingues Repka**, pela amizade e pelos constantes conselhos técnicos, fundamentais para as dosagens bioquímicas.

À Sra. Dra. **Vera Lúcia Kamienski Mesadri**, Chefe do Laboratório de Análise de Resíduos do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, cuja orientação e auxílio foram decisivos na execução dos trabalhos de laboratório. À Sra. **Iracê Rocha** e às estagiárias deste simpático Laboratório do TECPAR.

Aos colegas Dr. **Paulo Afonso Nunes Nassif**, Dra. **Luciane Bittencourt Carias de Oliveira**, Dra. **Graciela Medina Insfrán de Riera** e Dra. **Ana Bordón de Corvalán**, bem como aos acadêmicos da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, **Marcel Heibel**, **Pablo Fabian Aviles Cabrera** e **Magnum Zanelatto**, pelo auxílio nas incontáveis horas de laboratório.

Ao amigo Prof. Dr. med. **Orlando Jorge Martins Torres**, pela amizade e pelo aprendizado de vida que pude auferir nestes ricos anos de convívio.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Teodoro Beck**, pelo inestimável auxílio nos trabalhos mecanográficos.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Brenner**, ao Prof. Dr. **Ari Leon Jurkiewics**, ao Prof. Dr. **Coriolano Caldas Silveira da Motta**, ao Prof. Dr. **João Carlos Simões** e ao Dr. **Jurandir Marcondes Ribas Filho**, pelo exemplo de vida e de médicos. Vocês marcaram de forma decisiva minha formação.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xv</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xvii</b>
	<b>RESUMO</b>	<b>xviii</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>xix</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Literatura relacionada à técnica fotocolorimétrica</b>	<b>4</b>
<b>2.2</b>	<b>Literatura relacionada à técnica fluorimétrica</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Obtenção das amostras teciduais, das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e das soluções brancas</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Indução anestésica e morte dos animais</b>	<b>26</b>

3.2.2	Retirada e acondicionamento dos fragmentos teciduais	26
3.2.2	Recorte, desidratação e pesagem das amostras teciduais	27
3.2.3.1	Análise do grau de desidratação das amostras teciduais desidratadas	28
3.2.4	Obtenção das soluções-padrão e das soluções brancas	28
3.2.4.1	Soluções-padrão utilizadas na técnica fotocolorimétrica	29
3.2.4.2	Soluções-padrão utilizadas na técnica fluorimétrica	29
<b>3.3</b>	<b>Hidrólise ácida das amostras</b>	<b>31</b>
3.3.1	Preparo dos reagentes	31
3.3.2	Neutralização e diluição dos hidrolisados protéicos	32
3.3.3	Amostras em pool	32
<b>3.4</b>	<b>Dosagem da hidroxiprolina pela técnica fotocolorimétrica</b>	<b>33</b>
3.4.1	Reagentes utilizados	33
3.4.2	Oxidação	33
3.4.3	Formação do pirrol	34
3.4.4	Leitura em espectrofotômetro	34
3.4.5	Cálculo da taxa de hidroxiprolina	35
<b>3.5</b>	<b>Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fluorimétrica</b>	<b>36</b>

3.5.1	Preparo da fase móvel	36
3.5.2	Preparo dos reagentes	36
3.5.3	Descrição da coluna	37
3.5.4	Descrição do equipamento de cromatografia líquida de alta pressão	38
3.5.5	Condições da cromatografia	38
3.5.6	Descarboxilação da hidroxiprolina em amina primária	39
3.5.7	Derivação da amina primária com fluorescamina	39
3.5.8	Leitura em equipamento de cromatografia líquida de alta pressão	39
3.5.9	Cálculo da taxa de hidroxiprolina	40
<b>3.6</b>	<b>Análise regressiva dos dados</b>	<b>41</b>
<b>3.7</b>	<b>Avaliação estatística</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Peso das amostras teciduais</b>	<b>43</b>
4.1.1	Peso das amostras teciduais hidratadas (h)	43
4.1.2	Peso das amostras teciduais desidratadas (d)	44
4.1.3	Análise regressiva dos dados	45
<b>4.2</b>	<b>Técnica fotolorimétrica</b>	<b>47</b>
4.2.1	Soluções-padrão	47
4.2.2	Solução branca	49

4.2.3	Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido hidratado	50
4.2.4	Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido desidratado	51
4.2.5	Amostras em pool	52
<b>4.3</b>	<b>Técnica fluorimétrica</b>	<b>52</b>
4.3.1	Soluções-padrão	52
4.3.2	Solução branca, água destilada, glicina e fluorescamina	54
4.3.3	Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido hidratado	56
4.3.4	Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido desidratado	59
4.3.5	Amostras em pool	61
<b>4.4</b>	<b>Resultados comparativos</b>	<b>62</b>
4.4.1	Taxa de hidroxiprolina tecidual	62
4.4.2	Análise regressiva	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Generalidades</b>	<b>65</b>
<b>5.2</b>	<b>Obtenção das amostras teciduais</b>	<b>66</b>
5.2.1	Estado de hidratação das amostras teciduais	67
5.2.2	Peso das amostras teciduais	68
5.2.3	Soluções-padrão de hidroxiprolina	70
5.2.3.1	Na técnica fotolorimétrica	70
5.2.3.2	Na técnica fluorimétrica	71

<b>5.3</b>	<b>Hidrólise ácida das amostras</b>	<b>72</b>
<b>5.4</b>	<b>Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fotocolorimétrica</b>	<b>73</b>
5.4.1	Oxidação	73
5.4.2	Formação e extração do pirrol	75
5.4.3	Leitura espectrofotométrica	75
5.4.4	Taxas de hidroxiprolina tecidual	77
<b>5.5</b>	<b>Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fluorimétrica</b>	<b>78</b>
5.5.1	Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)	79
5.5.2	Derivação pré-colunar	81
5.5.3	Fluorescamina e aminas secundárias	81
5.5.4	Procedimentos bioquímicos para a fluorimetria	83
5.5.4.1	Descarboxilação oxidativa	84
5.5.4.2	Reação fluorimétrica	85
5.5.6	Taxas de hidroxiprolina tecidual	86
<b>5.6</b>	<b>Análise regressiva dos dados</b>	<b>87</b>
<b>5.7</b>	<b>Análise comparativa das taxas de hidroxiprolina tecidual em ambas as técnicas estudadas</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>93</b>

## LISTA DE TABELAS

1	Distribuição das amostras teciduais conforme o segmento do canal alimentar, o estado de hidratação, a técnica de processamento bioquímico à qual foram submetidas e a sua respectiva identificação	27
2	Distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina nas diversas concentrações (em microgramas por mililitro) e das soluções brancas, bem como suas respectivas identificações numéricas, na técnica fotocolorimétrica	29
3	Distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina nas diversas concentrações (em microgramas por mililitro) e das soluções brancas, bem como suas respectivas identificações numéricas, na técnica fluorimétrica	30
4	Identificação das amostras teciduais hidratadas (n <sup>o</sup> ) e seu respectivo peso em gramas	43
5	Distribuição do peso hidratado e desidratado das amostras teciduais submetidas à desidratação (em gramas), a porcentagem do peso desidratado das amostras e a porcentagem de hidratação das amostras, conforme as suas identificações	45

6	Correlação entre o número da amostra ( $n^{\circ}$ ), a porcentagem do peso desidratado da amostra (%d), a porcentagem de hidratação da amostra (%h), o índice de regressão ao peso desidratado das amostras teciduais hidratadas (IRd) e o índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas (IRh)	46
7	Correlação entre a média da porcentagem de hidratação das amostras teciduais estudadas ( $\%h_m$ ), o índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas (IRh) e o índice de correlação (IC) correspondente, em porcentos	47
8	Correlação entre o volume da solução padrão de estoque de hidroxiprolina, a concentração das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina e os valores de absorbância obtidos pela leitura espectrofotométrica	48
9	Taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras teciduais hidratadas pela técnica fotocolorimétrica	50
10	Taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras desidratadas pela técnica fotocolorimétrica	51
11	Correlação entre o volume da solução padrão de estoque de hidroxiprolina, a concentração das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta obtida pela leitura fluorimétrica e a área relativa da curva	53
12	Correlação entre as amostras teciduais hidratadas, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta da curva e a área relativa da curva (%)	57
13	Taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras teciduais hidratadas pela técnica fluorimétrica	58
14	Correlação entre as amostras teciduais desidratadas, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta da curva e a área relativa da curva (%)	59

15	Taxa de hisroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras teciduais desidratadas pela técnica fluorimétrica	60
16	Correlação entre os pools das amostras teciduais hidratadas e desidratadas, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta da curva e a área relativa da curva (%)	61
17	Taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para os pools de amostras teciduais hidratadas e desidratadas	62
18	Taxa de hidroxiprolina tecidual das amostras hidratadas e desidratadas, em miligramas por grama de tecido, processadas pelas técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica	63

## LISTA DE FIGURAS

1	Correlação (r) das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, na técnica fotocolorimétrica.	49
2	Microplaca com os cromógenos, pronta para a realização da leitura espectrofotométrica.	49
3	Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente à concentração de 72 $\mu\text{g/ml}$ , liberada pela coluna, em função do tempo relativo (x).	52
4	Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente à concentração de 9 $\mu\text{g/ml}$ , liberada pela coluna, em função do tempo relativo (x).	53
5	Correlação (r) das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina na técnica fluorimétrica.	54
6	Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à amostra branca, em função do tempo relativo (x).	55
7	Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à água destilada, em função do tempo relativo (x).	55
8	Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à solução de glicina, em função do tempo relativo (x).	56

9	Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à solução de fluorescamina, em função do tempo relativo (x).	56
10	Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente às amostras 2bh e 3bh, liberadas pela coluna, em função do tempo relativo (x).	58
11	Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente às amostras 4bd e 11bd, liberadas pela coluna, em função do tempo relativo (x).	61
12	Fórmula estrutural da hidroxiprolina.	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

*N* = normal

*M* = molar

pH = potencial de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

KCl = cloreto de potássio

KOH = hidróxido de potássio

H<sub>2</sub>O = água

μg = micrograma

Na<sup>+</sup> = íon sódio

NaCl = cloreto de sódio

nm = nanômetro

mg = miligrama

g = grama

kg = quilograma

mm = milímetro

μl = microlitro

cm = centímetro

cm<sup>2</sup> = centímetro quadrado

°C = graus centígrados

q.s.p. = quantidade suficiente para

## RESUMO

O presente estudo objetiva avaliar, comparativamente, as técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica, na determinação da taxa de hidroxiprolina encontrada em hidrolisados protéicos a partir de amostras teciduais não cicatriciais. A técnica fotocolorimétrica utilizada foi a proposta por IBBOTT (1974). A técnica fluorimétrica adotada foi descrita por FELIX, TOOME e DeBERNARDO (1975) e adaptada para as condições do Laboratório do Instituto de Tecnologia do Paraná. O procedimento experimental constou da retirada e armazenamento de fragmentos teciduais de duodeno, jejuno e colo descendente de dois cães. As amostras teciduais foram pesadas e a metade delas submetida à desidratação em estufa a 80°C. Em seguida, as amostras teciduais hidratadas e desidratadas foram submetidas à hidrólise ácida, sendo que em seguida, os hidrolisados teciduais foram processadas bioquimicamente para a determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual conforme duas técnicas distintas: a primeira, fotocolorimétrica (utilizando o reativo de Ehrlich e análise em leitor de microplacas) e a segunda, fluorimétrica (mediante descarboxilação oxidativa com *N*-clorosuccinamida e uso de fluorescamina em cromatografia líquida de alta pressão). A análise dos resultados obtidos a partir das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina apresentou a correlação  $r=0,9970$  na técnica fotocolorimétrica e  $r=0,9962$  na técnica fluorimétrica. A taxa de hidroxiprolina média encontrada na técnica fotocolorimétrica foi de 3,303 mg/g de tecido para as amostras hidratadas e de 12,193 mg/g de tecido para as amostras desidratadas; na técnica fluorimétrica, estas taxas foram de 4,217 mg/g de tecido e 12,018 mg/g de tecido, respectivamente. Nas amostras processadas como pool pela técnica fotocolorimétrica, a taxa de hidroxiprolina tecidual foi de 3,889 mg/g de tecido nas amostras hidratadas e de 12,500 mg/g de tecido nas amostras desidratadas; na técnica fluorimétrica estes resultados formam 2,622 mg/g de tecido e 13,500 mg/g de tecido, respectivamente. Não houve diferença significativa entre estes resultados. Ambas as técnicas apresentaram tempo de processamento em laboratório semelhante. Finalmente, a análise regressiva dos dados permite dizer que há uma correlação entre a taxa de hidratação ou desidratação de uma amostra tecidual e a taxa de hidroxiprolina tecidual encontrada em ambos os estados, em função da variação de peso da amostra, como demonstrado pelo Índice de Correlação (102,26%); por outro lado, índices regressivos não permitem que se realize a extrapolação de resultados esperados, sinalizando a importância da determinação individual dos valores.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to compare two different biochemical techniques in determining the tissue hydroxyprolin rate. The photolorimetric technique used was the one described by IBBOTT (1974). The fluorimetric technique used was proposed by FELIX, TOOME and DeBERNARDO (1975). The steps of the experiment were: a) Tissue samples of the duodenum, jejunum and colon descendens of dogs were obtained, dried with absorbent paper and weighed; half of the samples were submitted to dehydration in an oven (80°C) and had their dry weight determined. b) The wet and dry samples were hydrolized with HCl and equivalent volumes of the hydrolisates were submitted to both of the biochemical techniques. In the photolorimetric technique the steps involved the oxidation with chloramine-T and final color reaction with Ehrlich's reagent. In the fluorimetric technique hydroxyprolin was decarboxilized with N-chlorosuccinimide, the pre-column derivatization was realized with fluorescamine and the final determination of the fluorescence done with high pressure liquid chromatography. The high sensibility of both techniques was demonstrated by the correlation rate obtained within the hydroxyprolin standards ( $r = 0.9970$  and  $0.9962$ , respectively). In the photolorimetric technique the mean hydroxyprolin rate was 3.303 mg/g for the wet and 12.193 mg/g for the dry samples; in the fluorimetric technique the rates were 4.217 mg/g and 12.018 mg/g, respectively. The tissue hydroxyprolin rate obtained by the pool of all the samples was 3.889 mg/g for the wet and 12.500 mg/g for the dry samples in the photolorimetric technique and 2.622 mg/g and 13.500 mg/g, respectively, in the fluorimetric technique. Regarding the final results, there was no difference between both biochemical techniques. Finally, the regressive analysis shows first, a proportion between the rate of hydration of the samples and the tissue hydroxyprolin rate (correlation index = 102,26%), and second, outlines that it is important to determine the individual tissue hydroxyprolin rates of the samples.

## 1 INTRODUÇÃO

A prática bioquímica há muito faz parte da rotina do médico clínico e do pesquisador. Ela oferece subsídios de alerta diagnóstico, quantifica elementos, monitora transcurso. Indica momentos de intervenção e sugere a interrupção de terapias. Enfim, ela incorpora, com ar de precisão matemática, a possibilidade de enquadrar a complexidade química dos seres vivos no micro-universo do domínio humano.

Por outro lado, pede a ciência que o domínio científico se submeta a constantes reavaliações, abrindo o caminho para estudos, sempre novos.

Assim, no decorrer das últimas décadas iniciou-se o desenvolvimento do estudo da importância da hidroxiprolina como componente da proteína colágena. FISCHER (1902), apud DAKIN (1920), foi o primeiro autor a isolar a hidroxiprolina, a partir de uma amostra de gelatina. Seguiram-se estudos para a identificação colorimétrica da presença de hidroxiprolina com LANGHELD (1909), apud LANG (1933), que foi o primeiro autor a demonstrar que o hipoclorito transforma a oxiprolina em *n*-oxipirrolina; LANG (1933) realiza a reação formadora de cor com *p*-dimetilaminobenzaldeído; em 1934, WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI descobrem que na realidade a oxidação da oxiprolina não dá origem à *n*-oxipirrolina e sim a um pirrol. Coube a McFARLANE e GUEST (1939) o início dos estudos de quantificação de hidroxiprolina mediante espectrofotometria, utilizando o *p*-dimetilaminobenzaldeído. Seguem autores como NEUMAN e LOGAN (1950); GRUNBAUM e GLICK (1956); STEGEMANN (1958) apud WOESSNER Jr. (1961); PROCKOP e UDENFRIEND (1960); KIVIRIKKO, LAITINEN e PROCKOP (1967) e diversos outros, que aperfeiçoaram a técnica fotocolorimétrica para a quantificação de quantidades mínimas do aminoácido em hidrolisados protéicos. Esta técnica, com algumas modificações, é utilizada até o presente momento nas

avaliações das taxas de hidroxiprolina em fluidos orgânicos e tecidos (IBBOTT, 1974; DIETZ, 1993).

Em 1958, MOORE, SPACKMAN e STEIN são os primeiros a utilizarem colunas pulverizadas com resinas de poliestireno sulfonado na separação hidráulica de aminoácidos; utiliza-se nesta fase a ninidrina como reativo formador de cor. ROTH, em 1971, apresenta uma técnica para a determinação de aminoácidos, mediante uso de *o*-phthaldialdeído. Após estudos iniciais onde demonstraram a formação de fluorescência na quantificação de aminoácidos, WEIGELE, DeBERNARDO, TENGI e LEIMGRUBER (1972) apresentam a fluorescamina, uma substância fluorogênica que reagem com aminas primárias; a limitação do uso da fluorescamina para a determinação da taxa de hidroxiprolina foi superada um ano mais tarde, com os estudos de WEIGELE, DeBERNARDO e LEIMGRUBER, em 1973, que transformaram aminoácidos secundários em aminas primárias, as quais formam fluoróforos mediante reação com a fluorescamina, mediante a reação com agentes halogenantes. Esta fase culmina com FELIX e TERKELSEN (1973) que apresentam um analisador fluorométrico de aminoácidos de coluna única, com uso da fluorescamina (um antecessor dos modernos equipamentos de cromatografia líquida de alta pressão).

A quantificação da taxa de hidroxiprolina tecidual permite o estudo da qualidade da cicatrização, oferecendo um parâmetro para a avaliação comparativa de técnicas de anastomose ou a influência de drogas sobre a reparo cicatricial. A literatura sobre a análise da taxa de hidroxiprolina tecidual, está dividida quanto à maneira de se expressar a sua quantificação: esta pode ser a partir de amostras teciduais hidratadas ou desidratadas, em miligramas por grama de tecido ou em miligramas por área de tecido ou ainda taxa de nitrogênio.

O presente estudo objetiva avaliar, comparativamente, as técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica, na determinação da taxa de hidroxiprolina encontrada em hidrolisados protéicos a partir de amostras teciduais não cicatriciais. Pode-se agrupar os objetivos deste protocolo, formulados à maneira de questionamentos, em três grupos de perguntas principais: em primeiro, perguntas relacionadas à execução das técnicas bioquímicas; em segundo, perguntas relacionadas aos resultados de concentração de hidroxiprolina obtidos, comparativamente; e em terceiro, questões relacionadas à elaboração e análise conjunta final dos dados levantados no presente estudo.

Perguntas relacionadas à execução das técnicas bioquímicas:

1. Sobre a análise comparativa das curvas-padrão de hidroxiprolina em ambas as técnicas: Há diferenças no índice de regressão linear destas dosagens nas duas técnicas? Esta diferença é significativa?

2. Qual a diferença no tempo necessário para a execução de ambas as técnicas? Após quantos minutos de retenção em coluna, apresenta-se o pico de leitura relativo à hidroxiprolina, na técnica fluorimétrica?

Perguntas relacionadas aos resultados de concentração de hidroxiprolina obtidos:

3. Quais são os resultados da taxa de hidroxiprolina tecidual obtidos, comparativamente, pelas técnicas fotolorimétrica e fluorimétrica, nos hidrolisados protéicos estudados individualmente?

4. Qual a relação entre a taxa de hidroxiprolina encontrada nas amostras teciduais hidratadas e desidratadas?

5. Como são os resultados comparativos da taxa de hidroxiprolina tecidual obtidos pela análise da média das determinações individuais *versus* a análise única, em um pool das amostras, em ambas as técnicas?

Questões relacionadas à elaboração e análise conjunta final dos dados levantados no presente estudo:

6. Quais são as principais desvantagens identificadas na técnica fotolorimétrica? E na técnica fluorimétrica?

7. Com base nos aspectos avaliados, qual das técnicas apresentou os melhores resultados, em relação à sensibilidade e à facilidade de execução?

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Literatura relacionada à técnica fotolorimétrica

FISCHER (1902), apud DAKIN (1920), foi o primeiro autor a isolar a hidroxiprolina, a partir de uma amostra de gelatina, encontrando como produto final uma quantidade de 3% de hidroxiprolina. DAKIN observa que segundo o processo proposto por FISCHER, a maior parte da hidroxiprolina transforma-se num éster, e assim é perdida.

DAKIN (1920) apresenta uma metodologia pioneira no estudo dos aminoácidos constituintes da gelatina e descreve em detalhes procedimentos específicos para a identificação de cada um destes aminoácidos, com especial ênfase à forma de sua extração. Segundo o autor, a hidroxiprolina pode ser extraída de hidrolisados de gelatina, em forma de éster pelo álcool butílico e subseqüentemente recuperada por processos de liberação do éster. Pela extração com o álcool butílico sob pressão normal, pode-se remover facilmente a alanina, a leucina e a fenilalanina, ao passo que sob baixa pressão extrai-se a prolina. Mediante o uso de álcool propílico completa-se a extração da hidroxiprolina. DAKIN sugere que a gelatina apresenta como produto final 14% de hidroxiprolina.

Até a publicação dos trabalhos de LANG (1933), não era possível a microanálise de prolina e oxiprolina, devido à falta de reações colorimétricas típicas e específicas. À exceção da técnica da extração pelos ésteres, dependia-se exclusivamente de técnicas indiretas de análise. FÜRTH e MINNIBECK (1932),

apud LANG, foram os primeiros a proporem uma técnica de separação para estes aminoácidos, porém esta metodologia não era precisa e necessitava de uma amostra inicial de várias gramas de proteína. LANG sugere demonstrativamente que a pirrolina e a oxipirrolina podem ser mensuradas em quantidades muito pequenas mediante reações colorimétricas e desta forma pode-se realizar a determinação quantitativa da prolina e da oxiprolina. Para o autor, a pirrolina e a oxipirrolina são condensados em um pigmento de coloração violeta mediante a reação com *p*-dimetilaminobenzaldeído em solução ácida. A reação descrita por LANG fundamenta-se nas seguintes etapas: a) a amostra inicial de um hidrolisado protéico é tratada com hipoclorito; com esta reação formam-se a pirrolina e a oxipirrolina, que são extraídas pela destilação hídrica; b) uma parte do destilado é usada para a determinação da soma de pirrolina e oxipirrolina pela reação com o *p*-dimetilaminobenzaldeído; c) a outra parte do destilado é utilizada para a determinação isolada de oxipirrolina mediante a condensação com isatina em ácido sulfúrico. A diferença das duas reações determina a quantidade de pirrolina. LANG ressalta que não há diferença nos resultados se a hidrólise da proteína é realizada com solvente ácido ou básico. A leitura da quantidade de cor formada deve ser realizada imediatamente, pois ocorre uma perda rápida na intensidade de cor.

WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI (1934) realizam uma análise crítica à técnica descrita por LANG em 1933; observam que este permite apenas a determinação de oxiprolina e não de prolina e sustentam esta afirmação em experimentos próprios, nos quais utilizam solução de prolina livre de impurezas de oxiprolina e não observam a formação de cor. Os autores também demonstram que pela ação do hipoclorito sobre a oxiprolina não se forma oxipirrolina e o produto final desta reação é na verdade o pirrol. Em estudos de recuperação, os autores conseguem obter valores correspondentes a no máximo 80% do pirrol inicial, e desta forma concluem que a técnica proposta por LANG tem sua utilidade limitada à determinação qualitativa de hidroxiprolina.

NEUMAN e LOGAN (1950a) apresentam uma técnica colorimétrica simples para a determinação da taxa de hidroxiprolina em hidrolisados com diminuto conteúdo de colágeno. Para os autores, a oxidação mediante o uso de

peróxido de sódio, leva à formação de produtos que formam intensa cor em presença de *p*-dimetilaminobenzaldeído. Neste estudo os autores utilizam os seguintes reagentes: a) soluções padrão de hidroxiprolina; b) solução de sulfato de cobre 0,01M; c) hidróxido de sódio 2,5N; d) peróxido de hidrogênio a 6%; e) ácido sulfúrico a 3,0N; e f) *p*-dimetilaminobenzaldeído a 5% em *n*-propanol. Para o presente procedimento descrito por NEUMAN e LOGAN, são necessários nove tubos de vidro (18 x 150 mm) para a análise de cada amostra em estudo. Acrescenta-se a cada tubo em estudo (branco; concentrações prévias de hidroxiprolina conhecidas; e solução desconhecida) 1 ml de sulfato de cobre, 1 ml de hidróxido de sódio e 1 ml de peróxido de hidrogênio. As amostras são misturadas durante 5 minutos e então colocadas em banho-maria a 80°C durante outros 5 minutos. O aquecimento e o agitação vigorosos destroem o excesso de peróxido. Após resfriamento dos tubos, acrescenta-se 4 ml da solução de ácido sulfúrico, sob agitação constante, para em seguida acrescentar 2 ml de *p*-dimetilaminobenzaldeído. Após resfriamento os tubos são levados para leitura em colorímetro fotoelétrico. A quantidade de hidroxiprolina em 1 ml de solução desconhecida é estabelecida mediante a transposição dos dados à curva formada pela leitura das soluções conhecidas.

NEUMAN e LOGAN (1950b) descrevem uma técnica colorimétrica para a determinação de colágeno tecidual com intervalo de confiança em torno de  $\pm 5\%$ . O colágeno é tornado solúvel pela hidrólise com água, formando gelatina e purificado da elastina e outros componentes não dissolvidos pelo processo. Realizam a estimativa do conteúdo colágeno a partir do conteúdo de hidroxiprolina do extrato de hidrolisado ácido. Como previamente demonstrado pelos autores (NEUMAN e LOGAN, 1950a), a quantidade de hidroxiprolina contida no colágeno de vários mamíferos corresponde a  $13,5 \pm 0,24\%$  e aparentemente não está presente em mais nenhuma proteína, à exceção da elastina. A hidroxiprolina pode ser convertida em equivalência ao colágeno pela multiplicação pelo fator 7,46. Os autores descrevem a taxa de colágeno encontrada em diferentes tecidos da vaca, porco e rato, e em pele de humanos, porco da guiné, cão e rato; paralelamente realizam estimativas do conteúdo de elastina dos mesmos tecidos.

Segundo GRUNBAUM e GLICK (1956), a alta concentração de hidroxiprolina presente no colágeno faz das técnicas de sua estimativa uma maneira muito prática para se estimar as taxas do colágeno, o qual provavelmente é a única proteína que contém hidroxiprolina. Os autores argumentam que o procedimento de NEUMAN e LOGAN (1950a) é muito útil na determinação de valores em escala micro, e de acordo com a técnica proposta é possível reduzir a quantidade de amostra requerida para a análise em mais de mil vezes (pico). Os autores confirmam a especificidade da cor produzida pela reação do *p*-dimetilaminobenzaldeído com a hidroxiprolina hidrolisada pelo peróxido de hidrogênio e ressaltam que uma concentração de peróxido de hidrogênio menor do que a recomendada leva à formação de uma coloração mais intensa e reduz para menos de 1% a interferência da tirosina eventualmente presente na amostra. Os autores concluem que a curva de absorvância da hidroxiprolina em diversas concentrações demonstra linearidade.

RADHAKRISHNAN e MEISTER (1957) foram os primeiros autores a proporem que o produto da oxidação da hidroxiprolina é o ácido pirrol-2-carboxílico e sugerindo que a *D*-aminoácido-oxidase renal hidrolisa a hidroxiprolina em um componente intermediário que parece ser o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico. Descrevem os experimentos da formação do ácido pirrol-2-carboxílico por técnicas diversas, quais sejam: pela oxidação enzimática, pela transaminação enzimática e não-enzimática e pela oxidação não enzimática da hidroxiprolina pelo peróxido de hidrogênio. Em seguida apresentam uma descrição das diversas etapas destas reações.

PROCKOP e UDENFRIEND (1960) apresentam uma técnica quantitativa simples que pode ser aplicada diretamente sobre tecidos naturais ou hidrolisados de proteínas contendo menos do que 0,01% de hidroxiprolina ou à urina contendo menos de 2  $\mu\text{g/ml}$  de hidroxiprolina. Para os autores, apesar da sensibilidade das técnicas disponíveis, é comum a obtenção de resultados alterados dado à dificuldade em se controlar a etapa da oxidação; apresentam a fórmula química da reação da oxidação da hidroxiprolina em pirrol: hidroxiprolina  $\rightarrow$  ácido  $\Delta^1$  pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico  $\rightarrow$  ácido pirrol-2-carboxílico  $\rightarrow$  pirrol. Neste estudo, a oxidação da hidroxiprolina se dá em presença de um excesso conhecido de

alanina e conseqüentemente a presença de aminoácidos ou substâncias afins na urina e em hidrolisados de tecidos não têm influência sobre a quantidade do pirrol formado. A especificidade desta reação é conseguida mediante a extração do pirrol em tolueno. Dado que os produtos iniciais da oxidação da hidroxiprolina (ácido  $\Delta^1$  pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico e ácido pirrol-2-carboxílico) não são solúveis em tolueno, materiais que possam interferir na reação são extraídos em tolueno antes da formação do pirrol. Estas precauções possibilitam a análise de 5  $\mu\text{g}$  de hidroxiprolina em soluções contendo mais do que 50 mg de outros aminoácidos. Os autores utilizam as seguintes soluções: a) soluções tampão de pirofosfato de sódio com pH 8,7 e tampão borato de potássio com pH 8,7; b) solução de alanina; c) solução de cloramina-T a 0,02 M; d) tiosulfato de sódio a 3,6 M; e) reagente de Ehrlich; f) precipitador de humina; e g) aminoácidos diversos. No delineamento que se segue, os autores realizam dois experimentos, o primeiro para estudar a hidroxiprolina em soluções purificadas e o segundo para o estudo da hidroxiprolina em urina e outras soluções complexas; ambos baseiam-se na hidrólise do material em análise em HCl, seguida de centrifugação e neutralização, oxidação da hidroxiprolina e extração em tolueno. Os autores determinam a recuperação da hidroxiprolina pela adição de uma quantidade de hidroxiprolina aproximadamente igual à presente na solução. Mesmo com pesos moleculares acima de 300.000 a técnica é capaz de detectar um único resíduo de hidroxiprolina por molécula de proteína.

Em seu estudo da determinação da hidroxiprolina, WOESSNER Jr. (1961) desenvolve uma técnica com a finalidade de eliminar interferências originadas pela presença de tirosina e outros aminoácidos, que possam ser considerados como impurezas, na presença de quantidades pequenas de hidroxiprolina. O procedimento exposto por WOESSNER Jr., corresponde a duas técnicas consecutivas: a) técnica I: redução na concentração do HCl, aumento na concentração do *p*-dimetilaminobenzaldeído e aumento no tempo de aquecimento; b) técnica II: inclusão da extração pelo benzeno e do tratamento com peróxido, permitindo desta forma a análise da hidroxiprolina em amostras contendo grandes quantidades de outros aminoácidos.

BERGMAN e LOXLEY (1963) apresentam uma metodologia baseada nos

trabalhos de STEGEMANN (1958) e de NEUMAN e LOGAN (1950), para a determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina. Os autores observam que há mais de 18 técnicas descritas, baseadas na oxidação da hidroxiprolina em um componente relacionado ao pirrol e sua subsequente condensação com o reagente de Ehrlich para a formação de um corante avermelhado. Ressaltam que o espectro de cores obtido é altamente proporcional à concentração de hidroxiprolina, independentemente de diferenças maiores de concentração. Observam que a leitura espectrofotométrica deve ser realizada em 558 nm. Ressaltam que a formação de cor depende da temperatura de aquecimento, da concentração ácida ou do tipo de solvente orgânico empregado.

Segundo KIVIRIKKO, LAITINEN e PROCKOP (1967), a hidroxiprolina pode ser convenientemente oxidada a um pirrol e este pirrol pode ser convertido em um cromógeno relativamente específico com *p*-dimetilaminobenzaldeído; neste estudo, os autores descrevem algumas alterações para a metodologia original proposta por PROCKOP e UDENFRIEND (1960), as quais tornam o procedimento mais rápido, sem contudo acarretar em perdas na sua especificidade e acurácia. As soluções utilizadas são: a) tampão borato de potássio com pH 8,7; b) alanina a 10%; c) cloramina-T 0,2M em metil-celossolve; d) tiosulfato de sódio a 3,6M em 100 ml de água destilada; e e) reagente de Ehrlich. O procedimento inclui três etapas principais: a hidrólise da amostra com HCl, a oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T e a reação colorífica do pirrol extraído em tolueno com o reativo de Ehrlich e leitura em espectrofotômetro em 560 nm. A modificação da técnica introduzida pelos autores consiste na eliminação da etapa da precipitação da humina, na redução dos volumes pela metade e em mudanças nas condições de oxidação para a obtenção de cor. A técnica também pode ser usada para a avaliação de amostras teciduais, porém para tanto deve-se submeter a amostra a uma hidrólise ácida com HCl 6N durante pelo menos 10 horas, a 120°C.

STEGEMANN e STALDER (1967) reavaliam uma metodologia proposta anteriormente por um dos autores (STEGEMANN, 1958) para a análise da hidroxiprolina de hidrolisados de tecidos, plasma sanguíneo e urina apresentando algumas modificações que tornam a técnica mais rápida e mais sensível. As

questões discutidas são as seguintes: a) a concentração ideal de cloramina-T é de 0,017M e um aumento da mesma só irá ser de utilidade se a quantidade de hidroxiprolina na amostra for muito grande e será no sentido de acelerar a velocidade da reação; b) o valor do pH da reação deverá ser próximo do neutro; c) o tempo de ação da cloramina-T como oxidante não afeta a reação, permitindo assim que seja processado um grande número de amostras simultaneamente; d) um aumento na concentração do reativo de Ehrlich não aumenta a estabilidade do cromógeno formado; e e) em função de uma melhor estabilidade da solução para períodos de até anos, os autores substituem o metil-celossolve (éter glicol-monometílico) pelo n-propanol.

PIKKARAINEN (1968) estuda o conteúdo colágeno de amostras de tecidos de doze espécies de mamíferos, na tentativa de demonstrar a correlação filogenética entre as mesmas. Para tanto utiliza-se da técnica de determinação de hidroxiprolina segundo STEGEMANN (1958) e modificada por WOESSNER Jr. (1961). O colágeno é a proteína mais importante dos mamíferos e corresponde a um terço do total protéico do organismo. Pode-se estimar o total de colágeno por duas maneiras: a) multiplicando-se o total de hidroxiprolina por 7,3; ou b) multiplicando-se o total de nitrogênio por 5,55.

Em estudos sobre a recuperação da resistência à insuflação de ar em anastomoses cólicas, CRONIN, JACKSON e DUNPHY (1968) encontram um aumento na resistência da parede intestinal não só ao nível da anastomose, mas também nos segmentos proximal e distal da parte lesada. A resistência do intestino está na dependência da camada colágena contida na tela submucosa. A metodologia empregada pelos autores compreende 5 grupos de 30 ratos, os quais são submetidos a uma anastomose cólica em plano único contínuo e avaliados nos dias 3, 5, 7, 10 e 14 de pós-operatório. Realizam a mensuração da resistência à insuflação de ar e a dosagem de hidroxiprolina no segmento intestinal estudado. Para o processamento bioquímico, realizam a pesagem das peças e posterior desidratação, seguida de hidrólise em HCl e a determinação da dosagem de hidroxiprolina conforme a metodologia preconizada por WOESSNER Jr. (1961). Com relação à determinação do conteúdo colágeno do segmento intestinal anastomosado, durante os primeiros três dias de pós-operatório a taxa de

colágeno da reduz em até 40%, fenômeno este também observado nos segmentos justa-anastomóticos.

BERGMAN e LOXLEY (1970) apresentam uma metodologia adaptada para a dosagem fotocolorimétrica de hidroxiprolina para utilização em escala comercial em laboratórios de análises clínicas. Os reagentes propostos neste estudo são: a) soluções-padrão, com diluições de 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  etc., de hidroxiprolina diluída em isopropanol; b) solução oxidante, composta por 57 g de acetato de sódio (3  $\text{H}_2\text{O}$ ), 37,5 g de citrato trissódico (2  $\text{H}_2\text{O}$ ), 5,5 g de ácido cítrico ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e 385 ml de isopropanol, acrescidos de um volume de água para completar um litro; esta solução-tampão é estável por tempo indefinido; imediatamente antes da execução da técnica, preparar uma solução a 7% de cloramina-T: a solução oxidante é obtida mediante a mistura de uma parte de cloramina-T para quatro partes de solução-tampão; c) reagente de Ehrlich (para desenvolvimento de cor a  $60^\circ\text{C}$ ): 17,6 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído são dissolvidos em 40,8 g de ácido perclórico a 60% e completados a um volume total de 100 ml com isopropanol; para o desenvolvimento de cor durante o período da noite: 10,6 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído são dissolvidos em 24,5 g de ácido perclórico; esta mistura é completada a 100 ml com isopropanol. Com relação ao procedimento de neutralização da solução, os autores preferem o hidróxido de lítio ao hidróxido de sódio, pois este último pode ocasionar a precipitação de eventuais sais. Os autores argumentam que o produto da oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T é mais estável do que o produto gerado pela peróxido-oxidação alcalina catalisada pelo cobre (1,2-dehidrohidroxiprolina). Finalmente, os autores sugerem que o emprego de concentrações elevadas de reativo de Ehrlich e de isopropanol favorecem o surgimento e aumentam a estabilidade da cor.

IBBOTT (1974) ressalta que a única proteína mamífera que contém quantidades significantes de hidroxiprolina é o colágeno e aceita os produtos da oxidação da hidroxiprolina como sendo pirrol e ácido pirrol-2-carboxílico. A metodologia proposta por IBBOTT para a dosagem da hidroxiprolina a partir de amostras de urina ou tecidos, baseia-se na descrição de KIVIRIKKO et al. (1967). Inicialmente submete a amostra a uma hidrólise ácida, em seguida retira

pigmentos precipitados mediante centrifugação e realiza a oxidação da hidroxiprolina com cloramina-T e interrompe a oxidação pela adição de tiosulfato e em seguida retira impurezas pela extração com tolueno. Os produtos iniciais da oxidação da hidroxiprolina, ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-2-carboxílico e ácido pirrol-2-carboxílico não são solúveis em tolueno. Após aquecimento, o pirrol produzido é extraído em tolueno e a reação colorífica é realizada com reativo de Ehrlich. A técnica é altamente específica para hidroxiprolina, mesmo havendo na solução a presença de quantidades 10.000 vezes maior de outros aminoácidos. A taxa de recuperação de hidroxiprolina adicionada à urina observada é de 90-104%. Os reagentes utilizados pelo autor são: a) HCl 1N e 0,05N; b) fenolftaleína; c) tampão borato de potássio com pH 8,7; d) alanina a 10%; e) cloramina-T 0,2 M; f) tiosulfato de sódio 3,6 M; g) reagente de Ehrlich; h) solução-padrão de estoque a 36 mg / 100 ml e de trabalho a 36  $\mu$ g / ml. A metodologia envolve a hidrólise ácida da amostra em estudo, seguida de neutralização e saturação com KCl. Segue o acréscimo de alanina e a subsequente oxidação com cloramina-T, mantida com tiosulfato de sódio. Após uma primeira extração de impurezas pelo tolueno, IBBOTT submete a amostra ao aquecimento para a formação do pirrol, o qual é retirado por uma nova extração por tolueno e pelo acréscimo de reativo de Ehrlich leva à formação de coloração rósea. A leitura em espectrofotômetro é realizada após repouso por 30 minutos e a absorção é lida contra tolueno como branco a 560 nm. Para IBBOTT, a absorção deve ficar entre 0,1-0,6 e se a leitura for muito alta, recomenda uma diluição do extrato de tolueno.

BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977) descrevem três técnicas para a determinação de hidroxiprolina marcada com  $^{14}\text{C}$ . Descrevem também uma técnica para a determinação da protocólágeno-prolina-hidroxilase, uma para a determinação de lisina marcada com  $^{14}\text{C}$ , uma para a determinação de pró-colágeno-lisina-hidroxilase assim como uma técnica para a avaliação da galactosil-colagenase e da glucosil transferase. Os autores lançam mão dos seguintes reagentes: a) utilizam a solução de tampão borato com pH 8,7 (61,84 g de ácido bórico e 225 g de KCl são misturadas em 800 ml de água destilada e o pH é ajustado para 8,7 com solução de KOH, completando-se em seguida o volume para 1000 ml com água destilada); b) solução de alanina 0,112M (10 g de alanina

são dissolvidos em 90 ml de água destilada, o pH é ajustado para 8,7 e o volume final ajustado para 1000 ml com água destilada); c) tampão borato-alanina (realizam a mistura de 100 ml da solução de tampão-borato com 50 ml da solução de alanina); d) tampão de pirofosfato a 0,2M e a 1M, com pH ajustado para 8,0; e) tampão de ácido cítrico (50 g de ácido cítrico  $1H_2O$  é acrescido a 12 ml de ácido acético 96%, 120 g de acetato de sódio  $3H_2O$  e 34 g de NaOH e a mistura final diluída em 1000 ml de água destilada); f) solução de cloramina-T a 0,2M; e g) reagente de Ehrlich. No desenvolvimento da metodologia realizam a hidrólise transnoite de amostras de urina, cartilagens e colágeno purificado, em HCl 6N a 118°C; em seguida submetem as amostras à evaporação a 60°C em câmara de vácuo e realizam a determinação da dosagem de hidroxiprolina conforme descrito por KIVIRIKKO (1967).

JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT (1978) realizam um estudo para comparar a influência de anastomoses em plano único contínuas ou em pontos separados, em colo de 193 ratos Sprague Dawley. As anastomoses são realizadas com fio de polipropileno e o período de avaliação correspondeu ao 5º, 7º, 10º, 14º e 28º dias pós-operatórios. Os autores realizam a determinação da taxa de colágeno segundo PIKKARAINEN (1968) e submetem as peças a uma desidratação prévia a 100°C durante 3-4 dias, até a obtenção de um peso constante. O registro da concentração da taxa de hidroxiprolina é assinalado em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tecido desidratado. Os autores ressaltam que a tela submucosa da parede intestinal é uma membrana fibrosa resistente, constituída principalmente por colágeno e fibras elásticas e apresenta a maior resistência tênsil dentre todas as camadas do intestino. Os autores demonstram que após uma ressecção de colo esquerdo seguida de anastomose, ocorre uma redução importante nas taxas de hidroxiprolina nas proximidades da anastomose, redução esta que corresponde a 30% na sutura contínua e a 23% na sutura em pontos separados. Os níveis de hidroxiprolina tecidual retornam aos padrões normais entre o décimo e décimo quarto dias de pós-operatório. JIBORN et al. sugerem que a redução precoce nas taxas de hidroxiprolina deve estar relacionada a um aumento na lise da mesma, devida a um provável aumento na quebra da molécula de hidroxiprolina.

ANGELELI, BURINI e OLIVEIRA (1982) realizam estudos referentes

às várias fases da técnica proposta por BERGMAN e LOXLEY (1970) para dosagem de hidroxiprolina e analisam esta técnica com base em amostras de urina humana e de ratos, avaliando a linearidade da curva de absorção em vários aparelhos de espectrofotometria. Na metodologia empregada as etapas são as seguintes: a) hidrolisação da urina com HCl 6N, mantendo em estufa a 110°C durante 24 horas; b) neutralização com solução de hidróxido de lítio; c) a 1 ml do hidrolisado de urina, 1 ml de solução branca e 1 ml de solução-padrão, adiciona-se 2 ml de isopropanol e 1 ml de solução oxidante (cloramina-T); d) após 4 minutos adiciona-se 2 ml de reagente de Ehrlich e incuba-se a mistura a 60°C durante 21 minutos; e) repouso da solução por 60 minutos e leitura nos diversos espectrofotômetros a 562 nm. Os autores realizam estudo de recuperação da hidroxiprolina e não observam diferença nos resultados obtidos pelas leituras nos diversos aparelhos em estudo, demonstrando que a técnica é confiável e de fácil execução. ANGELELI et al. observam que os picos de absorção máxima situam-se entre 558 e 562 nm e chamam a atenção para o fato de o padrão de hidroxiprolina ser lábil e não poder ser armazenado por muito tempo.

NARESSE, LUCCHIARI, ANGELELI, BURINI, RODRIGUES, CURI e KOBAYASI (1988) realizam estudo da cicatrização de uma anastomose do intestino delgado e utilizam 32 cães mestiços, divididos em três grupos avaliados no 3º, 7º, 14º e 28º dias de pós-operatório. O procedimento é sutura contínua em plano único extra-mucoso, sutura com pontos separados em plano único extra-mucoso e sutura contínua em dois planos (um total e um seromuscular), realizadas com fio de nylon 4/0. Os autores avaliam a qualidade da cicatrização mediante a resistência à força de ruptura em extensômetro de resistência elétrica; mediante a determinação da fração de hidroxiprolina tecidual segundo a metodologia de BERGMANN e LOXLEY (1963) modificada por ANGELELI et al. (1982); e estudo histológico pelas colorações de MASSON e hematoxilina-eosina. NARESSE et al. observam que a análise estatística da dosagem de hidroxiprolina tecidual não mostra diferenças significativas entre as três técnicas empregadas.

DIETZ (1993) determina a taxa de hidroxiprolina tecidual presente em diversos segmentos do canal alimentar de cães. Para a determinação bioquímica

da hidroxiprolina, utiliza-se da técnica proposta por KIVIRIKKO et al. (1967) e modificada por IBBOTT (1974). As amostras teciduais (hidratadas) são pesadas e submetidas a uma hidrólise ácida, sendo que em seguida, os hidrolisados teciduais são processados bioquimicamente para a determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual. O autor realizou a leitura da absorbância espectrofotométrica das amostras e a determinação final da taxa de hidroxiprolina dos hidrolisados teciduais. A análise dos resultados obtidos a partir das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (36, 18, 9 e 4,5  $\mu\text{g/ml}$ ) apresentou alta correlação ( $r=0,9875$ ), demonstrando assim a sensibilidade da técnica. A concentração média de hidroxiprolina presente nas amostras teciduais foi de 6,298 mg/g para o esôfago cervical; 8,688 mg/g para o esôfago torácico; 6,385 mg/g para o estômago; 2,187 mg/g para o duodeno; 3,716 mg/g para o jejuno-íleo; 6,154 mg/g para o colo transversal; 7,289 mg/g para o colo descendente; e 8,253 mg/g para o reto.

## 2.2 Literatura relacionada à técnica fluorimétrica

MOORE, SPACKMAN e STEIN (1958) apresentam algumas modificações às técnicas cromatográficas previamente conhecidas e tornam possível uma análise completa de aminoácidos de hidrolisados de peptídeos ou proteínas em 24 a 48 horas. Os autores são os primeiros a utilizarem colunas pulverizadas com resinas de poliestireno sulfonado a 8% na separação hidráulica de aminoácidos e ressaltam a importância do uso de partículas de tamanhos pequenos, que permitem velocidades de fluxo maiores; da mesma forma os autores salientam a importância da escolha de eluentes específicos, simplificando as operações.

ROTH, em 1971, apresenta uma técnica para a determinação de aminoácidos. Segundo o autor, *o*-phthaldialdeído reage com aminoácidos em meio alcalino e na presença de substâncias redutoras como por exemplo o 2-mercaptoetanol, dá origem a componentes altamente fluorescentes. Os iminoácidos prolina e hidroxiprolina, todavia, não são determinados por esta

técnica, por não darem origem a derivados fluorescentes. Segundo ROTH, a técnica apresentada pode ser utilizada em substituição à técnica da ninidrina, o qual até esta data foi a única empregada para a determinação quantitativa de  $\alpha$ -aminoácidos. Na prática, isto tornou possível o uso de técnicas fluorométricas para a detecção de aminoácidos separados pela técnica clássica de SPACKMAN, STEIN e MOORE (1958), com a mesma especificidade do que a reação da ninidrina. Todavia, ROTH não descreve o tipo de reação envolvida.

WEIGELE, BLOUND, TENGI, CZAJKOWSKI e LEIMGRUBER (1972) ressaltam que a reação da fenilalanina com a ninidrina na presença de peptídeos leva à formação de materiais fluorescentes. Segundo os autores, ficou demonstrado que a condensação de aminas primárias (incluindo peptídeos) com a ninidrina e fenilacetaldéido, isto é, o produto da descarboxilação oxidativa da fenilalanina, dá origem a produtos ternários de alta fluorescência. Esta reação é utilizada por WEIGELE et al. em numa nova técnica fluorométrica automatizado para o estudo de aminas primárias, particularmente importante na determinação de quantidades em níveis de nanomoles. Os autores descrevem a fórmula estrutural desta reação, onde ocorre a formação de três substâncias: a) um componente fluorescente principal (70%); b) um componente fluorescente menor (22%); e c) um componente não fluorescente (8%). O uso deste reagente é restrito a sistemas não-aquosos, pois o composto é rapidamente destruído pela hidrólise.

WEIGELE, DeBERNARDO, TENGI e LEIMGRUBER (1972), baseados na formação de pirrolinonas fluorescentes a partir da reação da ninidrina e do fenilacetaldéido com aminas primárias, desenvolveram uma nova técnica para a análise de peptídeos. Segundo os autores, a necessidade do uso de duas substâncias (ninidrina mais fenilacetaldéido) acrescidas às características oxidantes da ninidrina, são fatores limitantes nas reações até então desenvolvidas. No presente estudo, WEIGELE et al. apresentam um novo reagente, denominado de espirolactona **10** {4-phenylspiro[furan-2(3H),1'-phtalan]-3,3'-dione}, que possui a característica de originar uma reação fluorescente com aminas primárias. Na prática, as principais vantagens deste reagente residem no fato de que a fluorescência é formada eficientemente em meio aquoso e à temperatura

ambiente, em pH ótimo entre 8-9. O reagente é dissolvido em solução hidrossolúvel, não hidroxílica, como por exemplo a acetona, o dioxane ou acetonitrila.

UDENFRIEND, STEIN, BÖHLEN, DAIRMAN, LEIMGRUBER e WEIGELE (1972) apresentam a fluorescamina como um novo reagente para a determinação de aminas primárias em unidades de picomoles. Segundo os autores, sua reação com as aminas é praticamente instantânea à temperatura ambiente e em meio aquoso. Os produtos derivados são altamente fluorescentes, enquanto que o reagente e seus produtos de degradação não são fluorescentes. UDENFRIEND et al. ressaltam que a fluorescamina {4-phenylspiro [furan-2-(3H), 1'-phthalan]-3,3'-dione} reage com aminas primárias para formar os mesmos fluoróforos que são gerados pela reação das mesmas com a ninidrina e o fenilacetaldéido. Num pH de 9, a reação da fluorescamina com aminas primárias ocorre à temperatura ambiente, numa velocidade de metade de uma fração de segundos (100-500 msec). Concomitantemente o excesso de reagente é destruído num tempo correspondente a alguns segundos (5-10s), ao passo que tanto a fluorescamina quanto seus produtos de hidrólise são não-fluorescentes. O procedimento descrito por UDENFRIEND et al. envolve o tamponamento de aminas primárias a um pH apropriado ( $\geq 7$ ), acrescentando-se fluorescamina (diluída em solução hidrófila, não hidroxílica, como por exemplo acetona). Em uma fração de milissegundos, à temperatura ambiente, a reação é completada e, em menos de um minuto, as sobras são destruídas. Os fluoróforos formados são estáveis por várias horas. Para os autores, os peptídeos apresentam fluorescência máxima num pH próximo de 7, enquanto que aminoácidos apresentam maior fluorescência geralmente num pH próximo de 9. Além de peptídeos, também já foram preparados anticorpos marcados com fluorescamina.

Trabalhando nesta mesma linha de pesquisa, WEIGELE, DeBERNARDO e LEIMGRUBER, em 1973, descrevem uma técnica para a transformação de aminoácidos secundários em aminas primárias, as quais formam fluoróforos mediante reação com a fluorescamina. Os autores realizam a descarboxilação oxidativa dos aminoácidos secundários mediante a reação com agentes halogenantes: as iminas resultantes são então hidrolisadas em aminas primárias,

que subseqüentemente reagem com a fluorescamina para dar origem a pirrolinonas fluorescentes. WEIGELE et al. descobriram que, quando soluções de prolina são submetidas à oxidação pela *N*-clorosuccinimida (ou outras fontes de halógenos ativos) e subseqüentemente acrescentadas de fluorescamina a pH 9,0, ocorre a formação de alta fluorescência. O tipo de fluorescência observado nesta reação (390nm excitação; 475nm emissão) é do mesmo tipo que a observada na reação da fluorescamina com aminas primárias. Para os autores, a *N*-clorosuccinimida causa a descarboxilação oxidativa da prolina pela via da *N*-cloroprolina, resultando na formação de  $\Delta^1$ -pirroline, o qual fica em equilíbrio com 4-amino-*n*-butiraldeído, em solução aquosa.

GEORGIADIS e COFFEY (1973) apresentam um sistema de uma coluna cromatográfica única, para a separação de aminoácidos de hidrolisados protéicos, que pode ser usado em conjunto com a técnica fluorométrica pela fluorescamina, na determinação dos mesmos. Segundo os autores, muitos dos sistemas de coluna única em uso, requerem uma solução tampão de alta força iônica para separar aminoácidos básicos, em um período de tempo não muito longo. A acetona usada como solvente para a fluorescamina limita a utilidade das soluções tampão eluentes de alta força iônica nos sistemas anteriores, pois durante a mistura da acetona com tampões contendo altas concentrações de NaCl, ocorre a precipitação de sais no sistema analítico. Assim, GEORGIADIS e COFFEY mantêm o tempo de análise por amostra em limites razoáveis, variando apenas o fluxo de eluição da coluna. A coluna usada é de aço inoxidável e resiste a altas pressões; desta forma os tampões eluentes podem ser bombeados pela luz do fino tubo (2,6 mm de diâmetro) num débito relativamente alto (10 ml/h), sem a necessidade do uso de tampões de alta força iônica.

FELIX e TERKELSEN, em 1973, apresentam um analisador fluorométrico de aminoácidos de coluna única, com uso da fluorescamina. Este sistema pode ser usado para a análise de todos os aminoácidos, inclusive a prolina. Os autores conectam um sistema de bomba, capaz de acrescentar uma solução de *N*-clorosuccinimida à solução de aminoácidos (prolina) em fluxo contínuo, antes de sua entrada na coluna (pré-colunar). Para os autores, a concentração ótima de *N*-clorosuccinimida para a detecção de prolina é de

$1,0 \times 10^{-4}M$  em solução  $0,05M$  de HCl. As análises foram realizadas em um analisador colorimétrico de aminoácidos, permitindo a redução do tempo de análise de 7 horas para aproximadamente 4 horas.

Neste mesmo ano, FELIX e TERKELSEN realizam a adaptação do analisador fluorométrico de aminoácidos para a determinação de hidroxiprolina. A análise fluorométrica em coluna simples requer um sistema de quatro tampões e (da mesma forma como para a prolina) a introdução específica de *N*-clorosuccinimida no sistema de fluxo. A importância biológica da *trans*-4-hidroxi-L-prolina incentivou os autores a criarem uma modificação em sua técnica anterior, a fim de incluir este aminoácido na lista dos possíveis de análise. Os autores utilizam a *N*-clorosuccinimida diluída em HCl  $0,05M$  na concentração de  $1,0 \times 10^{-4}M$ , realizando o preparo diariamente antes de seu uso. FELIX E TERKELSEN utilizam um analisador de aminoácidos fluorométrico com coluna única e acrescentam uma solução tampão de citrato de sódio, pH 2,60  $0,2M$   $Na^+$ , para permitir a diferenciação da hidroxiprolina do ácido aspártico. Para FELIX e TERKELSEN a presença do HCl  $0,05M$  na solução de *N*-clorosuccinimida é necessária para a obtenção de um pH 2 para a oxidação da prolina e da hidroxiprolina. A reação final de fluorescência é obtida mediante o acrescentamento de tampão borato e fluorescamina à reação. Com este aparelho os autores determinam quantidades correspondentes a 250 pmoles de hidroxiprolina.

DeBERNARDO, WEIGELE, TOOME, MANHART e LEIMGRUBER (1974) ressaltam que a fluorescamina, um componente não-fluorescente, reage com aminas primárias ( $RNH_2$ ) para formar pirrolinonas que mediante excitação a 390 nm emitem forte fluorescência entre 475-490 nm. Esta reação ocorre a temperatura ambiente em soluções aquosas e permite o estudo de concentrações de aminas (aminoácidos e proteínas) em níveis sub-micromolares. Neste estudo, DeBERNARDO et al. investigam algumas das variáveis que influenciam a quantidade e a intensidade da formação de fluoróforo nesta reação. As propriedades singulares da fluorescamina fazem dela um reagente usado na determinação de aminas estruturalmente muito diferentes. Para se obter resultados ótimos em cada um destes casos, as técnicas devem ser adaptadas

individualmente. Um dos principais problemas encontrado pelos autores refere-se ao fato de que em meio aquoso a reação formadora do fluoróforo, entre a fluorescamina e a amina primária, compete com a desativação hidrolítica concomitante do reagente. Assim, os autores ressaltam a importância do uso de fluorescamina diluída em solvente hidrófilo não hidroxílico (a acetona e dioxana não apresentam impurezas fluorogênicas em quantidades importantes). Os autores demonstram que a fluorescamina é estável em acetona durante 12 semanas e em dioxane durante 2 semanas. Para DeBERNARDO et al., um segundo fator de interferência muito importante é o pH em que se procede a reação (ideal entre 8-9,5). Se o pH for muito baixo ocorre a protonação da amina e ela se torna inefetiva para a reação. Por outro lado, se o pH for muito alto, haverá predominância da hidrólise do reagente e haverá uma formação muito reduzida de fluorescência. Aminas alifáticas e peptídeos geralmente requerem um pH entre 8-8,5, enquanto que aminoácidos e proteínas requerem um pH ótimo entre 8,5-9,5. Todavia, enquanto que a reação fluorogênica é muito suscetível às variações de pH, a intensidade de fluorescência dos produtos resultantes varia muito pouco em função do pH. Finalmente, os autores consideram a concentração do reagente, pois, como a fluorescamina é hidrolisada rapidamente em meio aquoso, requer-se uma alta concentração da mesma para a formação de fluorescência ideal.

McHUGH, SANDMANN e HANEY (1976) ressaltam que desde a sua criação, a fluorescamina foi utilizada em estudos com cromatografia de finas placas, cromatografia líquida de alta performance e em fluorimetria direta. Para os autores, a ampla aceitação experimentada pela fluorescamina, é devido à sua velocidade de reação surpreendentemente alta à temperatura ambiente e em soluções aquosas, formando derivados com intensa fluorescência. Este trabalho foi realizado com a finalidade de estudar a determinação de aminoácidos mediante a separação de seus produtos oriundos da reação com a fluorescamina. A análise das soluções no sistema proposto pelos autores apresenta dois picos gráficos, separados de forma incompleta. Provavelmente os dois produtos da reação com a fluorescamina, representados pelos dois picos, relacionam-se de forma reversível e esta reação reversível parece desenvolver-se melhor sob condições alcalinas. Para McHUGH et al., as evidências levam a crer que o segundo produto da reação entre a fluorescamina e os aminoácidos seja a lactona.

Para FROEHLICH e CUNNINGHAM (1976) a fluorescamina é um reagente útil e versátil para a determinação rápida e sensível de amins primárias, reagindo rapidamente com uma grande variedade de espécies, incluindo aminoácidos, peptídeos e drogas, formando derivados fluorescentes que são altamente estáveis, enquanto o reagente e seus produtos de hidrólise não fluorescem. Para os autores, a hidrólise da fluorescamina compete com a formação do fluoróforo desejado, porém o uso de quantidades excessivas de reagente em solvente pode compensar esta deficiência. A retirada de água das amostras geralmente não é viável nas análises de rotina e as soluções tampão necessárias nos processos são geralmente aquosas. Neste estudo, FROEHLICH e CUNNINGHAM referem-se à análise da influência de solventes aquosos contendo dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a intensidade de fluorescência de alguns derivados da fluorescamina. Os autores concluem com base no modelo utilizado, que o DMSO é um solvente útil para a fluorescamina e que as derivações de fluorescência pela fluorescamina devem ser mensuradas em soluções contendo 30-50% de DMSO, por apresentarem melhor desempenho ante as aquosas puras.

Para SAMEJIMA, KAWASE, SAKAMOTO, OKADA e ENDO (1976) a determinação de diaminas e poliaminas que ocorrem na natureza é complexa, pois estas possuem propriedades químicas muito semelhantes. Desta forma são necessárias técnicas de separação eficientes, entre as quais encontra-se a cromatografia líquida de alta velocidade (HPLC). Os autores estudam a separação de diaminas e poliaminas pela reação com a fluorescamina pela cromatografia líquida de alta velocidade em amostras biológicas (fígado de ratos, soro humano e urina humana). Inicialmente realizam a desidratação das amostras mediante evaporação, em ácido acético. Em seguida, realizam a dissolução do resíduo em 100 $\mu$ l de tampão borato de sódio a 0,1 M (pH 8,0); 20 $\mu$ l desta solução são adicionados a 10 $\mu$ l de fluorescamina (2mg/ml em acetona), à temperatura ambiente. Os autores ressaltam a importância da adição rápida destas soluções, seguida de mistura imediata. Em se tratando de poliaminas, os autores acrescentam 5 $\mu$ l de tampão acetato de sódio 1 M (pH 4,5). A leitura da fluorescência é realizada 10 minutos após a adição, mediante alíquota introduzida no equipamento de HPLC. Para a execução da leitura mediante cromatografia líquida de alta velocidade, SAMEJIMA et al. utilizam metanol (10-40%) em

tampão borato 0,1 M (pH 8,0) [preparado com 0,1 M de ácido bórico e hidróxido de sódio 6 N] como fase móvel e os fluoróforos eluentes são determinados em seqüência, num fluoro-microfotômetro.

SCHILTZ, SCHNACKERZ e GRACY, em 1977, realizam um estudo para comparar os reagentes ninidrina, fluorescamina e *o*-phtalaldialdeído quanto à sua sensibilidade em detectar aminoácidos e peptídeos em finas placas de celulose ou sílica gel; às diferenças na recuperação dos peptídeos; e aos efeitos destes reagentes sobre a composição dos peptídeos recuperados. Segundo os autores, todos os três reagentes permitem a detecção, em níveis de picomoles, de aminoácidos e peptídeos. A prolina, detectada pela ninidrina e pelo *o*-phtalaldialdeído apenas em grandes quantidades, foi facilmente detectada pela fluorescamina. A fluorescência gerada por aminoácidos tratados pela fluorescamina permanece estável à temperatura ambiente por várias horas, à exceção da prolina, que desaparece mais rapidamente. Para SCHILTZ et al. a principal vantagem da fluorescamina, usada em cromatografia de finas placas, não reside primariamente em sua sensibilidade, mas sim no fato de que após a recuperação e a hidrólise, a composição completa do peptídeo pode ser determinada sem ambigüidade. Os autores concluem que a estrutura do peptídeo é importante na variação da sensibilidade das técnicas.

SEILER em um artigo de revisão publicado em 1977, no subitem sobre derivados fluorescentes de aminas para a separação em finas placas ou colunas cromatográficas, apresenta alguns princípios sobre seus comportamentos. Os reagentes comumente utilizados para a marcação fluorescente de aminas (e aminoácidos) são utilizados tanto para a formação de fluorescência quanto de cor. A especificidade das reações bem como a formação de impurezas durante a formação dos derivados é, a princípio, a mesma para derivados coloridos ou fluorogênicos. Para SEILER, a grande vantagem dos derivados fluorogênicos é a sua maior sensibilidade de detecção, bem como o limite amplo de linearidade entre a quantidade da substância e a intensidade de fluorescência gerada. O autor ressalta que o uso de reagentes cromogênicos e fluorescentes envolve as mesmas estratégias: a primeira etapa é a reação do reagente com o hidrolisado tecidual, após a qual devem seguir procedimentos de separação sobre os derivados

formados; ou um grupo de componentes é pré-separado mediante extração em solventes, troca iônica, cromatografia em colunas, etc.; e a leitura final da reação se dá sobre os componentes pré-separados. Segundo revisão extensa feita pelo autor, as informações contidas na literatura não permitem discutir-se com segurança sobre vantagens absolutas de um determinado reagente em relação ao outro. Da fluorescamina, SEILER comenta sobre sua especificidade para componentes que contenham grupos amina primários, e o pH ideal para a sua reação (entre 8-8,5), com um máximo de absorção a 390 nm e um máximo de fluorescência a 475 nm.

CASTELL, CERVERA e MARCO (1979) apresentam os resultados de uma reavaliação dos parâmetros principais que afetam a reação de amins primárias com a fluorescamina, com ênfase em aspectos práticos. Comparam a aplicação da fluorescamina na dosagem de proteínas a outras técnicas. Revelam que as hidrólises ácida e alcalina diminuem a variabilidade da reação demonstrada por diversas proteínas e desta forma aumentam a sensibilidade da técnica. Álcoois (por serem nucleofílicos) interferem com a fluorescamina de forma reversível, levando a uma diminuição da velocidade da reação com as amins. O anel lactona, presente na molécula da fluorescamina, é responsável pela perda de fluorescência em meios com pH menor do que 6. Na opinião dos autores, com variações de pH ocorre a abertura e fechamento reversíveis do anel lactona da molécula de fluorescamina, levando à formação reversível de compostos fluorescentes (pH 8) e não fluorescentes (pH abaixo de 6): neste processo não está envolvida a dissociação do ácido carboxílico. Uma outra propriedade da fluorescamina é que o excesso do reagente é hidrolisado na mistura da reação tanto mais rápido quanto maior o pH, levando à formação de um produto não reativo com amins. Os autores concluem que a fluorescamina é apropriada para a determinação de dosagens protéicas em concentrações muito reduzidas.

BIDLINGMEYER, COHEN e TARVIN (1984) descrevem uma nova técnica para derivação pré-colunar e análise de aminoácidos a partir de hidrolisados protéicos. A técnica baseia-se na formação de um derivado feniltiocarbamil de aminoácidos primários e secundários. O sistema de cromatografia líquida permite uma separação fase-dependente rápida dos

aminoácidos comuns em um tempo de 12 minutos, mediante detecção por ultravioleta. Em todas estas abordagens pela cromatografia líquida, a derivação pós-colunar requer câmaras de reação especiais como parte do sistema cromatográfico. Uma outra técnica é a derivação dos aminoácidos antes de sua separação, o que é denominado de derivação pré-colunar. Após a formação do derivado, a separação ocorre em uma coluna convencional de alta-performance e em fase reversa. Derivados da feniltiohidantoína e do dansil têm a desvantagem de serem pouco estáveis. O *o*-phtalaldialdeído é muito útil na análise de aminoácidos primários, porém a sua não-reação com aminoácidos secundários pode ser uma desvantagem importante. BIDLINGMEYER et al. descrevem uma nova técnica de derivação pré-colunar para análise de aminoácidos, baseada na formação do derivado feniltiocarbamil (PTC) dos mesmos, a partir de hidrolisados (ácidos) de proteínas. Os reagentes utilizados são standards de aminoácidos, ácido hidrocloreto, acetato de sódio, ácido acético glacial, e água destilada. A hidrólise ácida é realizada em vapor aquoso de ácido hidrocloreto. Os autores realizam a análise de uma solução contendo uma mistura de aminoácidos e várias soluções contendo apenas um aminoácido. Segundo a metodologia empregada, a determinação da composição de aminoácidos da mistura pode ser completada em 20 minutos, à temperatura ambiente. Para a leitura final, os autores utilizam um sistema de cromatografia líquida, com dois eluentes: a) acetato de sódio 0,14M e pH 6,35; e b) acetonitrila. BIDLINGMEYER et al. realizaram três leituras de cada amostra e obtêm o resultado final pela análise da área média das três amostras, com coeficiente de linearidade de 0,999.

INGLES e GALLIMORE (1985) aplicam a separação de aminas marcadas com fluorescamina pela cromatografia líquida de alta performance a diaminas alifáticas e poliamidas e a algumas catecolaminas, usando gradientes de eluição e tampões a pH 8,0. Sob estas condições, os derivados da fluorescamina são cromatografados como as suas formas de sais de sódio. Os autores obtêm melhores resultados mediante a cromatografia em solventes ácidos, quando o tipo de derivado cromatografado é o ácido carboxílico II livre. Solventes ácidos também demonstram vantagens na cromatografia de finas placas de fluoróforos ácido-induzidos de derivados da fluorescamina de 2-(4-imidazol)etil-aminas.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O procedimento experimental constou da análise bioquímica de fragmentos teciduais de duodeno, jejuno e colo descendente de cães para a determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual correspondente. A taxa de hidroxiprolina tecidual foi determinada em miligramas por grama de tecido hidratado e em miligramas por grama de tecido desidratado, a partir de cada uma das amostras teciduais. Realizou-se, comparativamente, ambas as dosagens mediante duas técnicas distintas: uma, fotolorimétrica e outra, fluorimétrica.

Aplicou-se as Normas para Referências Bibliográficas e Abreviatura de Títulos e Periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR-6023) de 1989 e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1992) bem como a Nomina Anatomica Veterinária (1983).

#### 3.1 Animais

Utilizou-se 2 cães (*Canis familiaris*) sem raça definida, adultos, do sexo masculino, com peso corpóreo de 7 e 7,5 kg, sem sinais de doença, provenientes do Canil da Prefeitura Municipal de Curitiba.

## 3.2 Obtenção das amostras teciduais, das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e das soluções brancas

### 3.2.1 Indução anestésica e morte dos animais

O cão foi trazido à sala de cirurgia experimental e amordaçado com fita crepe. Em seguida, realizou-se a secção dos pelos rente à pele, na face lateral do terço distal de um de seus membros pélvicos para a punção percutânea da veia metatársica plantar<sub>IV</sub>, realizada com *butterfly* nº 21. Induziu-se a anestesia com solução de tiopental sódico (Thiopental®, Cristália, São Paulo), por via intravenosa, na dose de 25 mg para cada quilograma de peso corpóreo.

Após a indução da anestesia, o cão foi morto mediante a injeção, por via intravenosa, de 20 ml de cloreto de potássio a 19,1%. O animal apresentou parada cardíaca seguida de parada respiratória. Assim procedeu-se de forma a não propiciar sofrimento ao animal e para obter amostras de peças com a qualidade de uma biópsia cirúrgica.

### 3.2.2 Retirada e acondicionamento dos fragmentos teciduais

Constatado o óbito do animal, colocou-se o mesmo sobre uma mesa cirúrgica. A via de acesso foi uma incisão mediana xifo-púbica e realizou-se a retirada de segmentos tubulares de segunda porção do duodeno, jejuno (distanto 15 cm do ângulo duodeno-jejunal) e colo descendente, com aproximadamente 6 cm de comprimento cada um, constituindo os **fragmentos teciduais**. Os fragmentos teciduais foram acondicionadas em solução fisiológica a 0,9% em frascos individuais e guardados em congelador a -20°C.

### 3.2.3 Recorte, desidratação e pesagem das amostras teciduais

Os fragmentos teciduais foram descongelados à temperatura ambiente e secos com papel-toalha absorvente. A partir de cada fragmento tecidual, obteve-se seis fragmentos menores, medindo cerca de 2 x 4 mm cada e constituindo as **amostras teciduais** (nº 1 a 18).

Determinou-se o peso hidratado de todas as amostras teciduais. Em seguida realizou-se a desidratação em estufa a 80°C durante 20 horas, de metade das amostras teciduais (amostras nº 1d a 18d).

O peso das amostras teciduais hidratadas e desidratadas, foi medido e anotado em gramas, em uma balança de precisão HM 3300 (HELMAC, São Paulo). O valor obtido para o peso das **amostras teciduais hidratadas** e das **amostras teciduais desidratadas** foi transferido para um quadro geral de tabulação dos dados.

A distribuição das amostras teciduais conforme o segmento do canal alimentar, o estado de hidratação, a técnica de processamento bioquímico à qual foram submetidas e o seu respectivo número, pode ser observada na tabela 1.

**Tabela 1**

Distribuição das amostras teciduais conforme o segmento do canal alimentar, o estado de hidratação, a técnica de processamento bioquímico à qual foram submetidas e a sua respectiva identificação

Segmento	Amostra tecidual Hidratada		Amostra tecidual Desidratada		
	Técnica	Fotocolorimétrica	Fluorimétrica	Fotocolorimétrica	Fluorimétrica
Duodeno		1-6ah	1-6bh	1-6ad	1-6bd
Jejuno		7-12ah	7-12bh	7-12ad	7-12bd
Colo desc.		13-18ah	13-18bh	13-18ad	13-18bd

ah = Técnica fotocolorimétrica com amostra tecidual hidratada; ad = Técnica fotocolorimétrica com amostra tecidual desidratada; bh = Técnica fluorimétrica com amostra tecidual hidratada; bd = Técnica fluorimétrica com amostra tecidual desidratada.

### 3.2.3.1 Análise do grau de desidratação das amostras teciduais desidratadas

Com base nos valores do peso hidratado das amostras e nos valores do peso após a desidratação das mesmas, calculou-se, individualmente, a **porcentagem de hidratação da amostra (%h)**, definida como a quantidade de água contida na amostra. A **porcentagem de peso desidratado da amostra (%d)** foi definida como a porcentagem de peso seco.

No decorrer do presente texto, as amostras serão identificadas apenas pelo seu número, quando a situação se referir à origem comum das amostras (ex: estudo da taxa de hidroxiprolina presente na amostra tecidual a partir da análise conjunta dos valores obtidos nas amostras hidratadas e desidratadas, da mesma peça; ex.: amostra tecidual nº 1); serão identificadas pelo seu número e pelo estado de hidratação [ex.: amostra tecidual nº 1h = amostra tecidual em estado hidratado (h)]; ou serão identificadas pelo número, pela técnica empregada e pelo estado de hidratação [ex.: amostra tecidual nº 1ad = amostra processada pela técnica fotocolorimétrica (a) a partir de seu estado desidratado (d)].

### 3.2.4 Obtenção das soluções-padrão e das soluções brancas

Em cada uma das técnicas utilizou-se como padrão conhecido, soluções-padrão de hidroxiprolina e soluções brancas (com ausência de hidroxiprolina). Para a obtenção das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, realizou-se a diluição prévia de um volume de solução-padrão de estoque de hidroxiprolina, da forma como segue:

Dissolveu-se 9 mg de hidroxiprolina (L-Hidroxiprolina, Código 4506, MERCK, Alemanha) em 10 ml de água destilada em frasco volumétrico de 25 ml. Adicionou-se 0,1 ml de HCl concentrado e diluiu-se até um volume final de 25 ml com água destilada, obtendo-se a solução-padrão de estoque de hidroxiprolina, contendo 36 mg/dl. Esta solução foi preparada no dia do processamento bioquímico das amostras de estudo.

### 3.2.4.1 Soluções-padrão utilizadas na técnica fotocolorimétrica

As soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, contendo 36, 18, 9 e 4,5  $\mu\text{g/ml}$  foram obtidas mediante a diluição de 1, 0,5, 0,25 e 0,125 ml, respectivamente, da solução-padrão de estoque de hidroxiprolina em um volume final de 10 ml (q.s.p.), com água destilada. Estas soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

Solução branca: para representar esta solução, utilizou-se água destilada.

A distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina com relação às suas concentrações e das soluções brancas bem como suas respectivas identificações numéricas na técnica fotocolorimétrica, podem ser observadas na tabela 2.

**Tabela 2**

Distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina nas diversas concentrações (em microgramas por mililitro) e das soluções brancas, bem como suas respectivas identificações numéricas, na técnica fotocolorimétrica

Solução	Concentração em $\mu\text{g/ml}$ de hidroxiprolina	Identificação da solução
Padrão de trabalho de hidroxiprolina	36	Pa1
	18	Pa2
	9	Pa3
	4,5	Pa4
Branca	(-)	Ba1

(-) = ausência de hidroxiprolina.

### 3.2.4.2 Soluções-padrão utilizadas na técnica fluorimétrica

Soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, contendo 144, 72, 36, 18,

9 e 4,5  $\mu\text{g/ml}$ : obteve-se estas soluções mediante a diluição de 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 ml, respectivamente, da solução-padrão de estoque de hidroxiprolina em 10 ml (q.s.p.), com água destilada. Estas soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

Solução branca: água destilada submetida a todas as etapas, à semelhança das demais amostras teciduais.

Água destilada, pura.

Solução de glicina a 5  $\mu\text{g/ml}$ : utilizou-se uma solução deste aminoácido primário (Código 4201, MERCK, Alemanha) para a simulação de um pico de leitura em um tempo distinto do das dosagens da hidroxiprolina.

Solução de fluorescamina em acetona: dissolveu-se 109,15 mg de fluorescamina (Código F-9015, Sigma Chemical CO., St. Louis, Estados Unidos da América) em 200 ml de acetona. Em seguida ajustou-se o pH a 9, com KOH 1N e 0,1N, completou-se o volume a 250 ml com acetona.

A distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina com relação às suas concentrações e das soluções brancas bem como suas respectivas identificações numéricas na técnica fluorimétrica, podem ser observadas na tabela 3.

**Tabela 3**

Distribuição das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina nas diversas concentrações (em microgramas por mililitro) e das soluções brancas, bem como suas respectivas identificações numéricas, na técnica fluorimétrica

Solução	Concentração em $\mu\text{g/ml}$ de hidroxiprolina	Identificação da solução
Padrão de trabalho de hidroxiprolina	144	Pb1
	72	Pb2
	36	Pb3
	18	Pb4
	9	Pb5
	4,5	Pb6
Branca	(-)	Bb1
Água destilada	(-)	Ab1
Glicina	(-)	Gb1
Fluorescamina	(-)	Fb1

(-) = ausência de hidroxiprolina.

Convencionou-se identificar ao conjunto formado pelas amostras teciduais, pelas soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina e pelas soluções brancas, pelo vocábulo isolado **amostras**.

### 3.3 Hidrólise ácida das amostras

Transferiu-se as amostras teciduais hidratadas e desidratadas, para tubos de vidro individuais e identificados. Utilizou-se tubos de vidro com tampa de rosca de teflon na especificação de 18 x 150 mm. Pipetou-se alíquotas de 1 ml de cada uma das soluções-padrão de hidroxiprolina nos tubos respectivos; pipetou-se um volume de 1 ml de água destilada em cada um tubos assinalados como brancos.

Realizou-se a hidrólise ácida mediante o adição de 2 ml de ácido clorídrico 6N em cada um dos tubos de vidro contendo as amostras. Fechou-se firmemente as tampas de rosca. Na seqüência, aqueceu-se estes tubos em estufa elétrica a 90°C durante 20 horas.

Completada a hidrólise, resfriou-se os tubos sob água de torneira corrente e realizou-se a centrifugação das amostras em centrífuga Donner CD100 a 4000rpm durante 5 minutos, para a separação de eventuais impurezas presentes sob forma de partículas sólidas.

#### 3.3.1 Preparo de reagentes

Para a realização da neutralização e diluição dos hidrolisados protéicos utilizou-se solução de fenolftaleína e soluções de hidróxido de potássio, como segue:

a. Hidróxido de potássio. Realizou-se três diluições do sal para a obtenção das concentrações 12N, 1N e 0,1N, como segue:

$\text{KOH } 12N = 168,3 \text{ g KOH} + 250 \text{ ml H}_2\text{O}$ ,

$\text{KOH } 1N = 14,02 \text{ g KOH} + 250 \text{ ml H}_2\text{O}$  e

$\text{KOH } 0,1N = 1,40 \text{ g KOH} + 250 \text{ ml H}_2\text{O}$ .

b. Fenolftaleína a 1%: dissolveu-se 1 g (Código 7233, MERCK, Alemanha) em 100 ml de etanol para a obtenção da solução de fenolftaleína.

### 3.3.2 Neutralização e diluição dos hidrolisados protéicos

Adicionou-se 1 gota da solução de fenolftaleína a cada um dos tubos do ítem 3.3. Em seguida, ajustou-se o pH para uma coloração rosada pela adição de 0,95 ml de KOH 12*N* seguida de 0,5 ml de KOH 1*N*, obtendo-se o ajuste final mediante a adição gota-a-gota de KOH 0,1*N*. A fenolftaleína é um indicador de pH e apresenta viragem para uma coloração rósea num pH básico entre 8,2 e 9,8. Diluíu-se os hidrolisados com água destilada, até a marca de 15 ml.

Transferiu-se alíquotas dos hidrolisados neutralizados destes tubos para duas novas séries de tubos de vidro 18 x 150, com tampa de rosca de teflon: volume de 3 ml para a técnica fotocolorimétrica e volume de 0,5 ml por amostra para a técnica fluorimétrica.

### 3.3.3 Amostras em pool

Para a constituição da amostra em pool hidratada (19h) e da amostra em pool desidratada (19d), transferiu-se alíquotas de 1 ml de cada um dos hidrolisados teciduais das amostras hidratadas e desidratadas respectivamente, para dois frascos de 50 ml. Após homogeneização, pipetou-se 3 ml das amostras 19h e 19d para processamento pela técnica fotocolorimétrica e 0,5 ml das amostras 19h e 19d para processamento pela técnica fluorimétrica.

Na seqüência, cada uma das séries de tubos contendo os hidrolisados teciduais neutralizados e diluídos foi utilizada para o processamento bioquímico mediante uma das técnicas em estudo (amostras 1ah-19ah e 1ad-19ad, técnica fotocolorimétrica; amostras 1bh-19bh e 1bd-19bd, técnica fluorimétrica).

### 3.4 Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fotocolorimétrica

A dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fotocolorimétrica foi realizada nas dependências dos laboratórios de Bioquímica e de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, Curitiba. Procedeu-se conforme metodologia proposta por IBBOTT (1974) e metodizada na Universidade Federal do Paraná por DIETZ (1993).

#### 3.4.1 Reagentes utilizados

Antes da execução do processamento bioquímico pela técnica fotocolorimétrica, realizou-se a preparação dos reagentes necessários. Os reagentes utilizados foram o tampão borato de potássio pH 8,7, a alanina 10%, a cloramina-T 0,2M, o tiosulfato de sódio 3,6M e o reativo de Ehrlich.

#### 3.4.2 Oxidação

Iniciou-se o processamento bioquímico da hidroxiprolina tecidual de amostras hidratadas e desidratadas pela técnica fotocolorimétrica a partir dos hidrolisados respectivos descritos no item 3.3.2, neutralizando-se a solução com KOH e saturando-se a solução com KCl. Em seguida acrescentou-se alanina e induziu-se o processo de oxidação com cloramina-T. Após 30 minutos, interrompeu-se a oxidação com tiosulfato de sódio e obteve-se a formação dos ácidos  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e pirrol-2-carboxílico.

### 3.4.3 Formação de pirrol

Cumprida a etapa de oxidação da hidroxiprolina em ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e ácido pirrol-2-carboxílico, realizou-se o aquecimento da solução para a transformação térmica dos referidos ácidos em pirrol, ao qual convencionou-se chamar de **cromóforo**. Realizou-se a extração do pirrol em tolueno, e finalmente, a reação formadora de cor mediante o acréscimo de solução de Ehrlich. Neste instante ocorreu a imediata formação de cor e à esta solução final convencionou-se chamar de **cromógeno**. Assim obteve-se os cromógenos das amostras teciduais e os cromógenos das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina.

### 3.4.4 Leitura em espectrofotômetro

Pipetou-se com micropipeta de precisão (CORNING<sup>®</sup>, Estados Unidos da América), 200  $\mu$ l dos cromógenos das amostras teciduais, bem como das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina e da solução branca, respectivamente, para uma microplaca (CORNING<sup>®</sup>, Estados Unidos da América). Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, com filtro de 590 nm, contra a solução branca. Utilizou-se o espectrofotômetro Bio-Tek Modelo BT-100 - Leitor de Microplaca (Embrabio, São Paulo).

### 3.4.5 Cálculo da taxa de hidroxiprolina

Para o cálculo final da quantidade de hidroxiprolina presente na amostra tecidual em miligramas de hidroxiprolina por grama de tecido (fórmula nº 3), utiliza-se a razão da quantidade de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de solução (fórmula nº 1), pelo peso da amostra tecidual em gramas de tecido por mililitro (fórmula nº 2).

a) Fórmula nº 1:

$$\text{mg total de hidroxiprolina / ml} = \frac{A_x - A_b}{A_p - A_b} \times 0,036$$

onde:

$A_x$  = Absorbância do cromógeno da amostra tecidual.

$A_p$  = Absorbância do cromógeno da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina.

$A_b$  = Absorbância da solução branca.

0,036 = constante referente à concentração da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina de  $36\mu\text{g/ml}$ .

b) Fórmula nº 2:

$$\text{Total de tecido / ml} = \frac{\text{peso em gramas da amostra}}{15 \text{ ml (diluição inicial)}}$$

c) Fórmula nº 3:

$$\text{mg de hidroxiprolina/g de tecido} = \frac{\text{mg de hidroxiprolina/ml}}{\text{g de tecido/ml}}$$

### 3.5 Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fluorimétrica

A determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual pela técnica fluorimétrica foi realizada conforme descrição de FELIX, TOOME e DeBERNARDO (1975) e adaptada às condições do Laboratório de Análise de Resíduos do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, Curitiba, onde foi executada.

#### 3.5.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel é o solvente que circula pela coluna do sistema de cromatografia líquida de alta pressão. Utilizou-se como fase móvel uma solução de metanol e água na proporção de 60:40. Adicionou-se 600 ml de metanol a 400 ml de água destilada. Realizou-se a ultrafiltração desta solução em filtro "milipore" de 45 $\mu$ m (Zetapor Membrane, NM 047-02-045SP, CUNO Inc., Estados Unidos da América), com sistema de bomba de vácuo. Em seguida, realizou-se a homogeneização da solução e a eliminação de minúsculas bolhas de ar, em misturador de ultra-som (BANDELIN/Sonorex Super RK510H, Alemanha), durante 15 minutos.

#### 3.5.2 Preparo dos reagentes

Antes da execução do processamento bioquímico pela técnica fluorimétrica, realizou-se a preparação dos reagentes necessários. Os reagentes utilizados são: ácido clorídrico a 0,1N, *N*-clorosuccinimida, hidróxido de potássio a 0,1N e fluorescamina e foram preparados da seguinte maneira:

a. Tampão citrato de sódio pH 2,4: para a obtenção desta solução, diluiu-se inicialmente as soluções A e B. Solução A: Ácido cítrico para análise a 0,1M ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , M = 210,14 g/mol, Artigo 244, Merck, Alemanha); dissolveu-se

21,01g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada. Solução B: Citrato de sódio, P.A. a 0,1M ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , PM 294,11, Reagen, Rio de Janeiro); dissolveu-se 29,41g de citrato de sódio em 1 litro de água destilada. Obteve-se a solução de tampão citrato de sódio mediante a adição de 30 ml da solução B a 465 ml da solução A.

b. Solução aquosa de *N*-clorosuccinimida  $4 \times 10^{-4}$  M em 0,05M de HCl ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{ClNO}_2$ , peso molecular = 133,5, Código C-0762, Lote 73H3705, Sigma Chemical CO., St. Louis, Estados Unidos da América). Esta solução foi preparada imediatamente antes de seu uso pela diluição de 13,35 mg de *N*-clorosuccinimida em 250 ml de água destilada, acrescentando-se ainda 0,45 g de HCl (0,38 ml de HCl concentrado). Colocou-se a solução em misturador de ultra-som por 5 minutos, para a sua completa homogeneização.

c. Hidróxido de potássio 0,1N (KOH,  $M = 56,11$  g/mol, Código 5021, MERCK, Alemanha): adicionou-se 1,40 g de KOH a 250 ml de água destilada.

d. Tampão borato de potássio com pH 8,7: dissolveu-se 6,18 g de ácido bórico e 22,5 g de KCl em 80 ml de água destilada. Ajustou-se o pH com um medidor de pH (pH-Metro B374, Micronal - SP) até 8,7, mediante adição gota-a-gota de KOH 12N e KOH 1N. Completou-se com água destilada até um volume final de 100 ml.

e. Fluorescamina ( $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{O}_4$ , peso molecular = 278,3, Código F-9015, Lote 83H4002, Sigma Chemical CO., St. Louis, Estados Unidos da América) diluída em acetona para cromatografia LiChrosolv® ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ , Código 20, MERCK, Alemanha), com pH 9: esta solução foi obtida dissolvendo-se 109,15 mg de fluorescamina em 200 ml de acetona. Em seguida ajustou-se o pH a 9 com KOH 1N e 0,1N, completou-se até 250 ml com acetona e homogeneizou-se a solução em misturador de ultra-som durante 5 minutos.

### 3.5.3 Descrição da coluna

Utilizou-se uma coluna de aço inoxidável Hibar® Pre-Packed Column RT 250-4 (n° de série 211957, LiChrosorb® RP-18, tamanho das partículas da resina de  $7\mu\text{m}$ , Catálogo 50394.0001, MERCK, Alemanha), com comprimento de 250

mm e diâmetro interno de 4 mm.

#### 3.5.4 Descrição do equipamento de cromatografia líquida de alta pressão

O equipamento de cromatografia líquida de alta pressão utilizado no presente estudo é constituído por três unidades distintas: uma bomba injetora, um espectrofluorômetro e um integrador de dados.

Utilizou-se uma bomba injetora para cromatografia líquida Jasco PV-980 Intelligent HPLC Pump (JASCO Corporation, Japão).

O espectrofluorômetro utilizado foi o Jasco 821-FP Intelligent Spectrophluorometer (JASCO Corporation, Japão).

A integração e análise dos dados foi realizada mediante uso de integrador HP3396A (Hewlett Packart, Estados Unidos da América). Este integrador realizou o registro dos resultados, segundo três parâmetros principais: primeiro, o tempo relativo de saída do complexo fluoróforo da coluna; segundo, a representação gráfica da quantidade de fluoróforo contida no eluato, em forma de uma curva, onde o eixo X corresponde ao tempo relativo e o eixo Y à intensidade de fluorescência (proporcional à quantidade de fluoróforo), com cálculo correspondente de sua área (cálculo da área de um triângulo); e terceiro, a representação em porcentagem, da área de cada um dos picos em relação ao total de 100%.

#### 3.5.5 Condições da cromatografia

Taxa de eluição: 0,800 ml/min, representando a velocidade de fluxo programada no sistema.

Pressão: 165-168 kg/cm<sup>2</sup>. A pressão está em relação direta com a taxa de eluição, o solvente da fase móvel e o tipo de coluna empregado.

Tamanho da amostra: 10 µl. Corresponde ao volume de fluoróforo passado pela bomba injetora para o sistema de cromatografia.

Tempo de retenção: aproximadamente 6 minutos.

Coeficiente de atenuação: 6. Característica da filtragem do sinal fluorescente pelo integrador, a fim de melhorar a qualidade da leitura. Quanto maior o coeficiente de atenuação, menor o pico de leitura.

Ampliação do sinal: 10 vezes. Representa a quantidade de ampliação da sensibilidade de detecção do sinal fluorescente pelo espectrofluorômetro.

### 3.5.6 Descarboxilação da hidroxiprolina em amina primária

Utilizou-se a *N*-clorosuccinimida para a descarboxilação da hidroxiprolina em uma amina primária. O procedimento foi:

Acrescentou-se às alíquotas de 0,5 ml das amostras 1bh a 18bh e 1bd a 18bd da etapa 3.3.2, 2,0 ml da solução de tampão citrato de sódio 0,1M, seguida de 0,5 ml da solução de *N*-clorosuccinimida, à temperatura ambiente. Realizou-se agitação mecânica com misturador de vórtex (Modelo AT-65, Phoenix, São Paulo). Neste instante ocorre a descarboxilação oxidativa da hidroxiprolina em uma imina, a qual é hidrolisada em uma amina primária.

### 3.5.7 Derivação da amina primária com fluorescamina

Acrescentou-se à solução do ítem 3.5.6, 2 ml de solução de KOH 0,1N, seguida de 1,0 ml de solução de tampão borato e, finalmente, 0,5 ml da solução de fluorescamina; num intervalo de frações de segundo ocorre a formação do fluoróforo, o qual é o composto fluorescente.

### 3.5.8 Leitura em equipamento de cromatografia líquida de alta pressão

Após dois minutos de repouso da solução, injetou-se 10  $\mu$ l desta solução final (fluoróforo) na bomba injetora do sistema de cromatografia líquida de alta pressão e procedeu-se à leitura e registro da fluorescência emitida em 480 nm, à uma excitação de 390 nm, em forma gráfica e numérica, mediante o uso do

integrador de dados.

### 3.5.9 Cálculo da taxa de hidroxiprolina

Para o cálculo final da quantidade de hidroxiprolina presente na amostra tecidual em miligramas de hidroxiprolina por grama de tecido (fórmula nº 3), utiliza-se a razão da quantidade de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de solução (fórmula nº 1), pelo peso da amostra tecidual em gramas de tecido por mililitro (fórmula nº 2), à semelhança do item 3.4.5.

a. Fórmula nº 1:

$$\text{mg total de hidroxiprolina / ml} = \frac{AA_x - AA_b}{AA_p - AA_b} \times 0,036$$

onde:

$AA_x$  = Área absoluta do fluoróforo da amostra tecidual.

$AA_p$  = Área absoluta do fluoróforo da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina.

$AA_b$  = Absorbância da solução branca.

0,036 = constante referente à concentração da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina de  $36\mu\text{g/ml}$ .

b. Fórmula nº 2:

$$\text{Total de tecido / ml} = \frac{\text{peso em gramas da amostra}}{15 \text{ ml (diluição inicial)}}$$

c. Fórmula nº 3:

$$\text{mg de hidroxiprolina/g de tecido} = \frac{\text{mg de hidroxiprolina/ml}}{\text{g de tecido/ml}}$$

### 3.6 Análise regressiva dos dados

a. O **índice de regressão ao peso desidratado das amostras hidratadas** (IRd) foi definido como a correlação entre os valores das taxas de hidroxiprolina tecidual determinadas nas amostras desidratadas e hidratadas, respectivamente, e seu resultado deve aproximar-se da porcentagem de peso seco (%d) da amostra desidratada correspondente:

$$\text{IRd} = \frac{x(\text{ab})\text{h} \times 100}{x(\text{ab})\text{d}}$$

onde:

x = número da amostra tecidual.

(ab)h = taxa de hidroxiprolina em mg/g (tecido hidratado), na técnica fotocolorimétrica ou na técnica fluorimétrica.

(ab)d = taxa de hidroxiprolina em mg/g (tecido desidratado), na técnica fotocolorimétrica ou na técnica fluorimétrica.

b. Calculou-se o **índice de regressão à taxa de hidratação das amostras desidratadas** (IRh), através da subtração do IRd do valor numérico 100:

$$\text{IRh} = 100 - \text{IRd}.$$

c. Determinou-se o **índice de correlação** (IC) entre os valores das taxas de hidroxiprolina tecidual das amostras hidratadas e desidratadas mediante a seguinte equação:

$$\text{IC} = \frac{\%h \times 100}{100 - \text{IRh}}$$

onde:

%h = porcentagem de hidratação da amostra.

IRh = índice de regressão à taxa de hidratação das amostras desidratadas.

### 3.7 Avaliação estatística

Em função da natureza dos dados, aplicou-se o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) de Pearson<sup>1</sup> para a análise de relação estatística entre os valores de leitura espectrofotométrica e fluorométrica, respectivamente, obtidos para as respectivas diluições das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina e suas concentrações em ambas as técnicas.

Para a comparação das médias, utilizou-se o programa estatístico CSS:Statistica<sup>2</sup>, mediante os testes do qui-quadrado, de Fisher para avaliação de assimetria das distribuições e o teste de homogeneidade das variâncias de Bartlett, considerando-se as restrições impostas por Cochran. Para todos os testes fixou-se 0,05 ou 5,00% como nível de rejeição da hipótese de nulidade. Os valores estatisticamente significantes foram assinalados com um asterisco (\*).

---

<sup>1</sup>BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1988. p.93.

<sup>2</sup>Programa estatístico CSS:Statistica 3.1, STATSOFT Inc., 74104 Tulsa OK, Estados Unidos da América. Versão 1992.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Peso das amostras teciduais

#### 4.1.1 Peso das amostras teciduais hidratadas (h)

A distribuição do peso das amostras teciduais hidratadas demonstrou homogeneidade entre as amostras estudadas, variou de 0,09g a 0,20g, apresentando um peso médio de 0,1361g, com desvio-padrão  $s = 0,0331$ . O peso individual de cada uma das amostras teciduais hidratadas, bem como o seu peso médio estão demonstrados, em gramas, na tabela 4.

**Tabela 4**

Identificação das amostras teciduais hidratadas (n<sup>o</sup>) e seu respectivo peso em gramas

n <sup>o</sup>	Peso	n <sup>o</sup>	Peso	n <sup>o</sup>	Peso
1h	0,17	7h	0,20	13h	0,10
2h	0,16	8h	0,19	14h	0,12
3h	0,17	9h	0,17	15h	0,12
4h	0,12	10h	0,13	16h	0,12
5h	0,13	11h	0,09	17h	0,11
6h	0,12	12h	0,09	18h	0,14

Média = 0,1361g;  $s = 0,0331$ ; n<sup>o</sup> = número da amostra tecidual.

#### 4.1.2 Peso das amostras teciduais desidratadas (d)

A distribuição do peso das amostras teciduais desidratadas (obtidas a partir das amostras teciduais) demonstrou homogeneidade entre as mesmas, à semelhança do observado para as amostras teciduais hidratadas.

O peso hidratado médio das amostras teciduais submetidas à desidratação foi de 0,1305g, variando entre 0,10g e 0,20g, com desvio-padrão  $s = 0,0297$ . Após o processo de desidratação, o peso médio das amostras teciduais desidratadas foi de 0,0391, variando de 0,063g a 0,030g, com desvio-padrão  $s = 0,0091$ .

As amostras teciduais apresentaram uma redução de peso (porcentagem de hidratação da amostra, %h) em média de 69,98% (desvio-padrão  $s = 1,7885$ ) durante o processo de desidratação, variando de 67,00% a 74,62%. O peso individual de cada uma das amostras teciduais desidratadas, antes e após o processo de desidratação bem como as porcentagens de peso desidratado e de hidratação podem ser observados na tabela 5.

**Tabela 5**

Distribuição do peso hidratado e desidratado das amostras teciduais submetidas à desidratação (em gramas), a porcentagem do peso desidratado das amostras e a porcentagem de hidratação das amostras, conforme as suas identificações

n°	Peso hidratado	Peso desidratado	%d	%h
1d	0,20	0,063	31,50	68,50
2d	0,16	0,049	30,62	69,38
3d	0,17	0,052	30,58	69,42
4d	0,13	0,039	30,00	70,00
5d	0,13	0,033	25,38	74,62
6d	0,15	0,045	30,00	70,00
7d	0,16	0,043	26,87	73,13
8d	0,14	0,043	30,71	69,29
9d	0,15	0,043	28,67	71,33
10d	0,13	0,039	30,00	70,00
11d	0,10	0,033	33,00	67,00
12d	0,10	0,030	30,00	70,00
13d	0,10	0,030	30,00	70,00
14d	0,11	0,033	30,00	70,00
15d	0,10	0,033	33,00	67,00
16d	0,12	0,036	30,00	70,00
17d	0,10	0,030	30,00	70,00
18d	0,10	0,030	30,00	70,00
m	0,1305	0,0391	30,02	69,98
s	0,0297	0,0091	1,7885	1,7885

n° = número da amostra tecidual; %d = porcentagem de peso desidratado da amostra; %h = porcentagem de hidratação da amostra; m = valor médio; s = desvio-padrão.

#### 4.1.3 Análise regressiva dos dados

As amostras teciduais submetidas à desidratação apresentaram uma porcentagem de peso desidratado médio das amostras ( $\%d_m$ ) igual a 30,02%, com

desvio-padrão  $s = 1,7885$ , com valores variando de 25,38% a 33,00%. Por analogia, obteve-se a média da porcentagem de hidratação das amostras ( $\%h_m$ ) igual a 69,98%, com desvio-padrão  $s = 1,7885$ , variando de 67,00% a 74,62%. A média do índice de regressão ao peso desidratado das amostras teciduais hidratadas ( $IRd_m$ ) foi de 31,57, com desvio-padrão  $s = 18,6551$ , variando de 9,98% a 65,08%. A média do índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas ( $IRh_m$ ) foi de 68,43 com desvio-padrão  $s = 18,6551$ , variando de 34,92% a 90,02%. Estes valores podem ser analisados, para cada amostra individualmente, na tabela 6.

**Tabela 6**

Correlação entre o número da amostra ( $n^\circ$ ), a porcentagem do peso desidratado da amostra ( $\%d$ ), a porcentagem de hidratação da amostra ( $\%h$ ), o índice de regressão ao peso desidratado das amostras teciduais hidratadas ( $IRd$ ) e o índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas ( $IRh$ )

$n^\circ$	$\%d$	$\%h$	$IRd$	$IRh$
1	31,50	68,50	16,57	83,43
2	30,62	69,38	19,71	80,29
3	30,58	69,42	54,56	45,44
4	30,00	70,00	16,51	83,49
5	25,38	74,62	50,37	49,63
6	30,00	70,00	17,67	82,33
7	26,87	73,13	52,23	47,77
8	30,71	69,29	9,98	90,02
9	28,67	71,33	45,06	54,94
10	30,00	70,00	17,68	82,32
11	33,00	67,00	11,93	88,07
12	30,00	70,00	14,72	85,28
13	30,00	70,00	65,08	34,92
14	30,00	70,00	18,78	81,22
15	33,00	67,00	37,56	62,44
16	30,00	70,00	43,07	56,93
17	30,00	70,00	18,88	81,12
18	30,00	70,00	57,94	42,06
	= $\%d_m$	= $\%h_m$	= $IRd_m$	= $IRh_m$
m	30,02	69,98	31,5722	68,4277
s	1,7885	1,7885	18,6551	18,6551

$\%d_m$  = média da porcentagem dos pesos desidratados das amostras teciduais;  $\%h_m$  = média da porcentagem de hidratação das amostras teciduais;  $IRd_m$  = média do índice de regressão ao peso desidratado das amostras teciduais hidratadas;  $IRh_m$  = média do índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas; m = Taxa média; s = desvio-padrão.

O índice de correlação (IC) entre a média da porcentagem de hidratação das amostras teciduais estudadas ( $\%h_m$ ) e o índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas (IRh) encontrados, foi de 102,26% (Tabela 7).

**Tabela 7**

Correlação entre a média da porcentagem de hidratação das amostras teciduais estudadas ( $\%h_m$ ), o índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas (IRh) e o índice de correlação (IC) correspondente, em porcentos

	$\%h_m$	IRh	IC
Média	69,98	68,43	102,26

## 4.2 Técnica fotocolorimétrica

### 4.2.1 Soluções-padrão

Os valores de leitura espectrofotométrica de referência obtidos para as diversas diluições da solução padrão de estudo foram os seguintes: solução a  $36\mu\text{g/ml}$ , 0,695; solução a  $18\mu\text{g/ml}$ , 0,663; solução a  $9\mu\text{g/ml}$ , 0,648; e solução a  $4,5\mu\text{g/ml}$ , 0,635.

Analisou-se os valores de absorvância obtidos para as diluições das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina em relação às concentrações das mesmas, para o estudo do índice de correlação (r) dos dados. Obteve-se um valor de correlação (r) de 0,9970. Como a maior correlação de linearidade possível é obtida para o valor absoluto 1,000, o índice encontrado no presente estudo pode ser considerado como altamente satisfatório. Extrapolando-se estes dados para a

fórmula de uma reta ( $y=ax+b$ ), obteve-se para o coeficiente angular (a) um valor de 0,6290 e para o coeficiente linear (b) um valor de 0,0018.

A correlação entre o volume de diluição da solução padrão de estoque de hidroxiprolina e estes valores pode ser observada na tabela 8.

**Tabela 8**

Correlação entre o volume da solução padrão de estoque de hidroxiprolina, a concentração das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina e os valores de absorbância obtidos pela leitura espectrofotométrica

	Volume	Concentração	Absorbância
Pa1	1,000ml	36 $\mu$ g/ml	0,695
Pa2	0,500ml	18 $\mu$ g/ml	0,663
Pa3	0,250ml	9 $\mu$ g/ml	0,648
Pa4	0,125ml	4,5 $\mu$ g/ml	0,635

A figura 1 ilustra a correlação entre as diversas concentrações da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina e os respectivos valores de absorbância. A figura 2 demonstra a microplaca com os cromógenos.

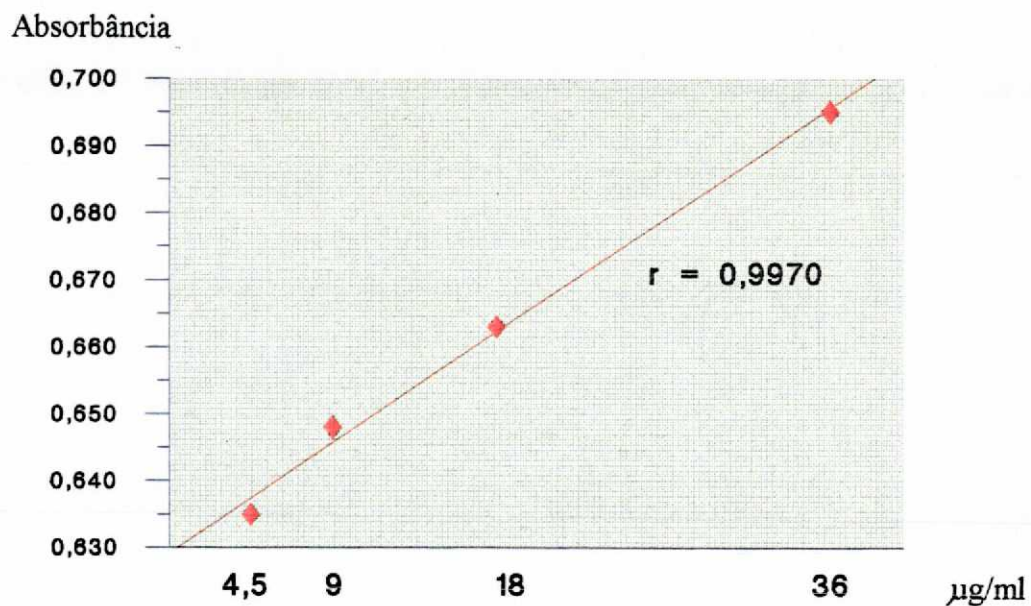


Figura 1 - Correlação (r) das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina, na técnica fotocolorimétrica.

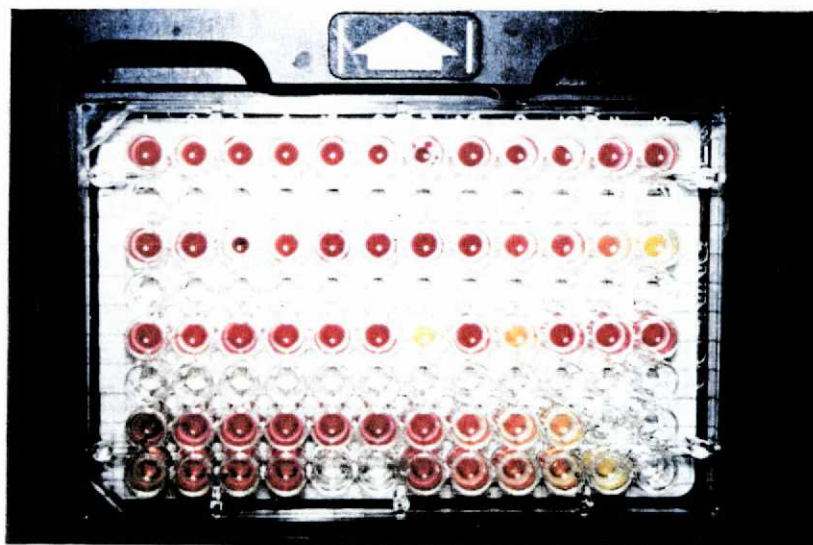


Figura 2 - Microplaca com os cromógenos, pronta para a realização da leitura espectrofotométrica.

#### 4.2.2 Solução branca

A absorbância obtida pela leitura espectrofotométrica da amostra denominada de branca apresentou o valor numérico de 0,620.

### 4.2.3 Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido hidratado

Obteve-se para as amostras teciduais hidratadas uma taxa de hidroxiprolina tecidual média igual a 3,3034 mg/g, com um desvio-padrão  $s = 1,7748$ . Estes valores podem ser avaliados, individualmente, na tabela 9.

**Tabela 9**

Relação entre o número da amostra tecidual hidratada ( $n^\circ$ ), seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância de seu cromógeno (Abs), a diferença entre a absorbância do cormógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cormógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15) e a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras teciduais hidratadas pela técnica fotocolorimétrica

$n^\circ$	g	Abs	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
1ah	0,17	0,658	0,038	0,0182	0,0113	1,610
2ah	0,16	0,672	0,052	0,0249	0,0106	2,349
3ah	0,17	0,688	0,068	0,0326	0,0113	2,884
4ah	0,12	0,651	0,031	0,0148	0,0080	1,850
5ah	0,13	0,687	0,067	0,0321	0,0086	3,732
6ah	0,12	0,674	0,054	0,0259	0,0080	3,237
7ah	0,20	0,694	0,072	0,0345	0,0133	2,593
8ah	0,19	0,669	0,049	0,0235	0,0126	1,865
9ah	0,17	0,689	0,069	0,0331	0,0113	2,929
10ah	0,13	0,661	0,041	0,0196	0,0086	2,279
11ah	0,09	0,649	0,029	0,0139	0,0060	2,316
12ah	0,09	0,646	0,026	0,0124	0,0060	2,067
13ah	0,10	0,732	0,112	0,0537	0,0066	8,136
14ah	0,12	0,678	0,058	0,0278	0,0080	3,475
15ah	0,12	0,736	0,116	0,0556	0,0080	6,950
16ah	0,12	0,687	0,067	0,0321	0,0080	4,012
17ah	0,11	0,654	0,034	0,0163	0,0073	2,232
18ah	0,14	0,716	0,096	0,0460	0,0093	4,946

Taxa média =  $3,3034 \pm 1,7748$

#### 4.2.4 Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido desidratado

Obteve-se para as amostras teciduais desidratadas uma taxa de hidroxiprolina tecidual média igual a 12,1933 mg/g, com um desvio-padrão  $s = 4,8474$ . Estes valores podem ser avaliados, individualmente, na tabela 10.

**Tabela 10**

Relação entre o número da amostra tecidual desidratada ( $n^\circ$ ), seu peso em gramas (g), a leitura da absorbância de seu cromógeno (Abs), a diferença entre a absorbância do cormógeno da amostra tecidual e a absorbância da solução branca (Abs-b), a taxa de hidroxiprolina em miligramas por mililitro de cormógeno (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual e o volume de diluição do hidrolisado (g/15) e a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras desidratadas pela técnica fotolorimétrica

$n^\circ$	g	Abs	Abs-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
1ad	0,063	0,705	0,085	0,0408	0,0042	9,714
2ad	0,053	0,707	0,087	0,0417	0,0035	11,914
3ad	0,043	0,651	0,031	0,0148	0,0028	5,285
4ad	0,023	0,655	0,035	0,0168	0,0015	11,200
5ad	0,033	0,654	0,034	0,0163	0,0022	7,409
6ad	0,033	0,704	0,084	0,0403	0,0022	18,318
7ad	0,043	0,649	0,029	0,0139	0,0028	4,964
8ad	0,043	0,724	0,109	0,0523	0,0028	18,678
9ad	0,043	0,658	0,038	0,0182	0,0028	6,500
10ad	0,053	0,714	0,094	0,0451	0,0035	12,885
11ad	0,033	0,709	0,089	0,0427	0,0022	19,409
12ad	0,043	0,702	0,082	0,0393	0,0028	14,035
13ad	0,043	0,693	0,073	0,0350	0,0028	12,500
14ad	0,033	0,705	0,085	0,0407	0,0022	18,500
15ad	0,033	0,705	0,085	0,0407	0,0022	18,500
16ad	0,053	0,688	0,068	0,0326	0,0035	9,314
17ad	0,043	0,689	0,069	0,0331	0,0028	11,821
18ad	0,043	0,670	0,050	0,0239	0,0028	8,535

Taxa média = 12,1933  $\pm$  4,8474.

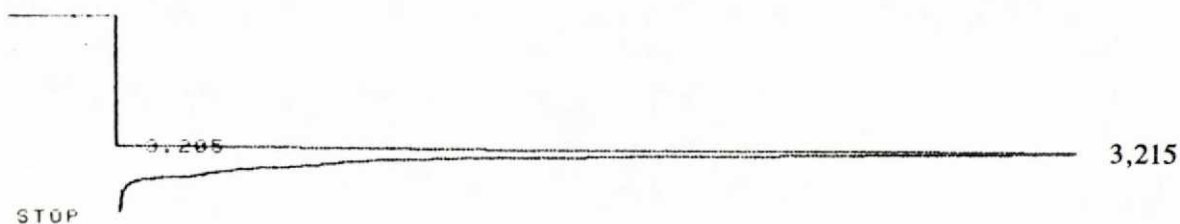
#### 4.2.5 Amostras em pool

A amostragem processada pela técnica fotocolorimétrica mediante mistura equivalente e homogênea de alíquotas iguais dos hidrolisados protéicos das amostras teciduais hidratadas e desidratadas, corresponde a um peso hidratado médio de 0,135 g e a um peso desidratado médio de 0,0391 g. A taxa de hidroxiprolina tecidual na amostragem correspondente às amostras hidratadas foi de 3,889 mg/g e nas amostras desidratadas foi de 12,500 mg/g. A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras hidratadas em relação à amostra em pool hidratada (nº 19h) foi de 114,6%. A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras desidratadas em relação à amostragem desidratada (nº 19d) foi de 101,8%.

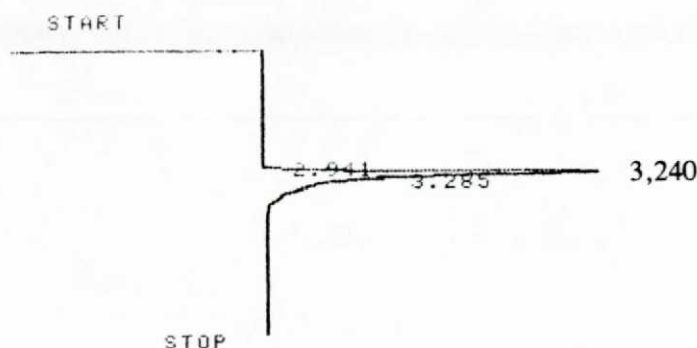
### 4.3 Técnica fluorimétrica

#### 4.3.1 Soluções-padrão

As áreas de referência obtidas para as leituras fluorométricas das diversas diluições da solução padrão de estudo de hidroxiprolina foram os seguintes: solução a 144 $\mu$ g/ml, 13.479.080; solução a 72 $\mu$ g/ml, 7.942.942 (Figura 3); solução a 36 $\mu$ g/ml, 3.539.596; solução a 18 $\mu$ g/ml, 2.249.437; solução a 9 $\mu$ g/ml, 1.177.150 (Figura 4); e solução a 4,5  $\mu$ g/ml, 592.001.



**Figura 3** - Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente à concentração de 72  $\mu$ g/ml, liberada pela coluna, em função do tempo relativo (x).



**Figura 4** - Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente à concentração de  $9 \mu\text{g/ml}$ , liberada pela coluna, em função do tempo relativo (x).

A correlação entre o volume de diluição da solução padrão de estoque de hidroxiprolina, a sua concentração, o tempo de retenção na coluna bem como suas áreas absoluta e relativa podem ser observados na tabela 11.

**Tabela 11**

Correlação entre o volume da solução padrão de estoque de hidroxiprolina, a concentração das soluções padrão de trabalho de hidroxiprolina, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta obtida pela leitura fluorimétrica e a área relativa da curva

	Volume	Concentração	Tempo	Área absoluta	Área relativa
Pb1	4,000ml	$144 \mu\text{g/ml}$	3,299	13.479.080	100,00
Pb2	2,000ml	$72 \mu\text{g/ml}$	3,215	7.942.942	99,99
Pb3	1,000ml	$36 \mu\text{g/ml}$	3,249	3.539.596	99,53
Pb4	0,500ml	$18 \mu\text{g/ml}$	3,283	2.249.437	100,00
Pb5	0,250ml	$9 \mu\text{g/ml}$	3,240	1.177.150	76,39
Pb6	0,125ml	$4,5 \mu\text{g/ml}$	3,115	592.001	99,50

Analisou-se os valores das áreas obtidos para as diluições das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina em relação às concentrações das mesmas,

para o estudo do índice de correlação ( $r$ ) dos dados. Obteve-se um valor de correlação ( $r$ ) de 0,9962. Como a maior correlação de linearidade possível é obtida para o valor absoluto 1,000, o índice encontrado no presente estudo pode ser considerado como altamente satisfatório. Extrapolando-se estes dados para a fórmula de uma reta ( $y=ax+b$ ), obteve-se para o coeficiente angular ( $a$ ) um valor de 436.209 e para o coeficiente linear ( $b$ ) um valor de 92.991.

A figura 5 ilustra a correlação entre as diversas concentrações da solução-padrão de trabalho de hidroxiprolina e as respectivas áreas obtidas.

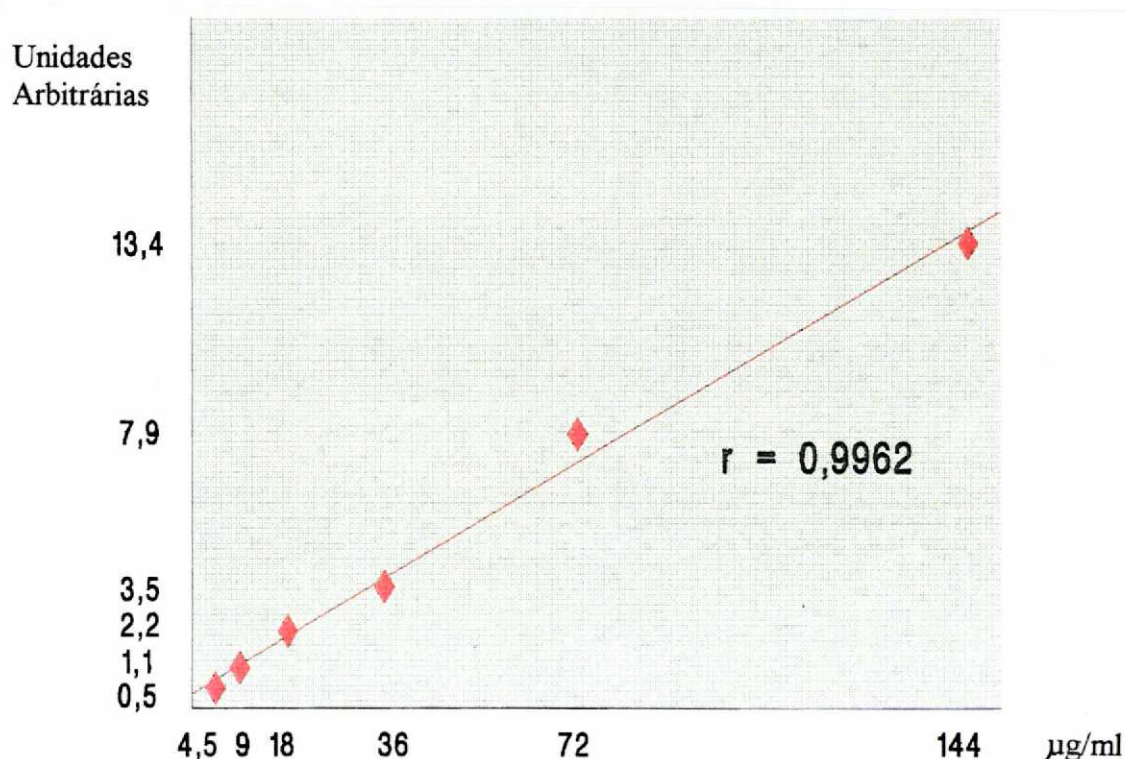
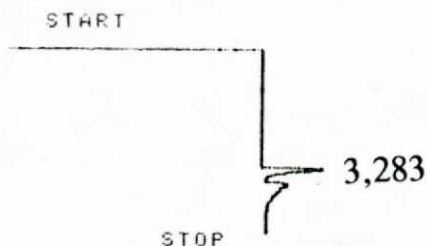


Figura 5 - Correlação ( $r$ ) das soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina na técnica fluorimétrica.

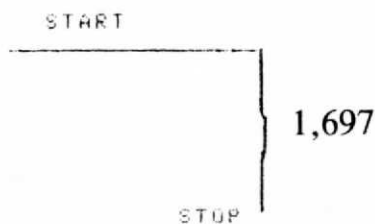
#### 4.3.2 Solução branca, água destilada, glicina e fluorescamina

A área obtida pela leitura fluorimétrica da amostra denominada de branca foi de 294.838 e surgiu no tempo relativo de 3,283, correspondendo a 29,12% da área do gráfico formado (Figura 6).



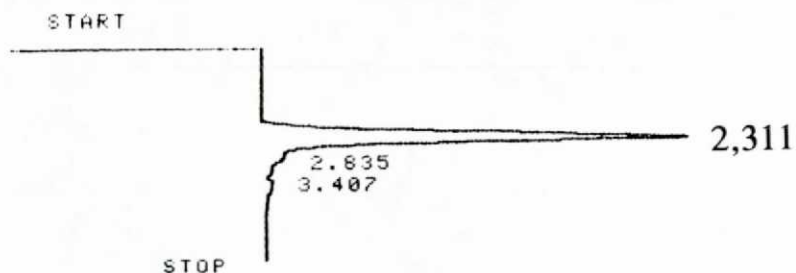
**Figura 6** - Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à amostra branca, em função do tempo relativo (x).

O pico gráfico encontrado para a água destilada foi observado no tempo relativo de 1,697, com uma área de 8.449, correspondente a 97,07% (Figura 7).



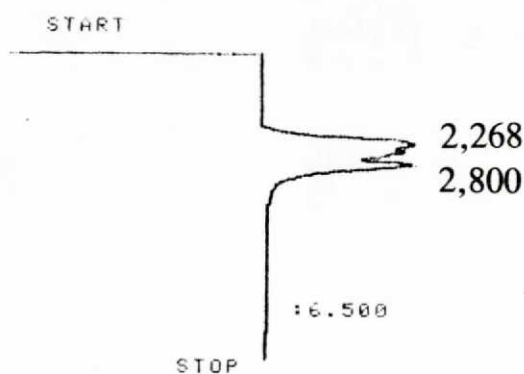
**Figura 7** - Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à água destilada, em função do tempo relativo (x).

O tempo relativo de saída da solução de glicina da coluna, foi de 2,311, mediante um pico principal que correspondeu a 93,89% da área relativa (área absoluta = 3.383.346), um segundo pico no tempo relativo de 2,835 com 3,75% da área relativa (área absoluta = 135.343) e um terceiro pico no tempo relativo de 3,407 com 2,35% de área relativa (área absoluta = 84.692) (Figura 8).



**Figura 8** - Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à solução de glicina, em função do tempo relativo (x).

A leitura fluorimétrica da solução de fluorescamina apresentou diversos picos entre os tempos relativos de 2,268 a 2,800, correspondendo estes na sua somatória a uma área de 3.486.917 (100,00%) (Figura 9).



**Figura 9** - Representação gráfica da leitura de fluorescência (y) correspondente à solução de fluorescamina, em função do tempo relativo (x).

#### 4.3.3 Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido hidratado

O tempo relativo médio de saída das amostras da coluna de cromatografia foi de 3,2584, variando de 3,200 a 3,315, com desvio-padrão  $s = 0,0422$ . A área absoluta referente às concentrações individuais das amostras foi em média

de 3.709.518, variando de 1.646.130 a 10.770.638, com desvio-padrão  $s = 2.179.514$ . A área relativa referente às concentrações das amostras foi em média de 99,14%, variando de 99,96% a 95,56%, com desvio-padrão  $s = 1,0781$ . Estes valores individuais bem como suas médias podem ser observados na tabela 12.

**Tabela 12**

Correlação entre as amostras teciduais hidratadas, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta da curva e a área relativa da curva (%)

Amostra	Tempo	Área absoluta	Área relativa
1h	3,220	1.784.285	99,95
2h	3,200	10.770.638	99,90
3h	3,234	3.312.215	99,96
4h	3,210	3.305.491	99,93
5h	3,217	4.447.486	99,96
6h	3,303	1.794.674	99,11
7h	3,310	3.246.877	98,56
8h	3,234	2.893.399	99,95
9h	3,306	3.493.334	99,59
10h	3,225	6.056.797	98,51
11h	3,310	2.111.925	98,31
12h	3,283	3.151.502	99,19
13h	3,250	2.131.687	98,48
14h	3,251	5.451.981	99,60
15h	3,209	4.830.490	99,57
16h	3,260	4.103.112	99,81
17h	3,315	1.646.130	95,56
18h	3,315	2.239.298	98,72
m	3,2584	3.709.518	99,14
s	0,0422	2.179.514	1,0781

Obteve-se para as amostras teciduais hidratadas uma taxa de hidroxiprolina tecidual média igual a 4,2817 mg/g, variando de 1,460 mg/g a 10,962 mg/g, com um desvio-padrão  $s = 2,4800$ . Estes valores podem ser avaliados, individualmente, na tabela 13.

Tabela 13

Relação entre o número da amostra tecidual hidratada ( $n^{\circ}$ ), seu peso em gramas (g), a sua área absoluta, a diferença entre a área absoluta das amostras e a área absoluta da solução branca (Área-b), a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por mililitro de eluato (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual desidratada e o volume de diluição do hidrolisado e a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras teciduais hidratadas pela técnica fluorimétrica

$n^{\circ}$	g	Área absoluta	Área-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
1bh	0,17	1.784.285	1.489.447	0,0165	0,0113	1,460
2bh	0,16	10.770.638	10.475.800	0,1162	0,0106	10,962
3bh	0,17	3.312.215	3.017.377	0,0334	0,0113	2,955
4bh	0,12	3.305.491	3.010.653	0,0334	0,0080	4,175
5bh	0,13	4.447.486	4.152.648	0,0460	0,0086	5,348
6bh	0,12	1.794.674	1.499.836	0,0166	0,0080	2,075
7bh	0,20	3.246.877	2.952.039	0,0327	0,0133	2,458
8bh	0,19	2.893.399	2.598.561	0,0288	0,0126	2,285
9bh	0,17	3.493.334	3.198.496	0,0354	0,0113	3,132
10bh	0,13	6.056.797	5.761.959	0,0639	0,0086	7,430
11bh	0,09	2.111.925	1.817.087	0,0201	0,0060	3,350
12bh	0,09	3.151.502	2.856.664	0,0316	0,0060	5,266
13bh	0,10	2.131.687	1.836.849	0,0203	0,0066	3,075
14bh	0,12	5.451.981	5.157.143	0,0575	0,0080	7,187
15bh	0,12	4.830.490	4.535.652	0,0503	0,0080	6,287
16bh	0,12	4.103.112	3.808.274	0,0422	0,0080	5,275
17bh	0,11	1.646.130	1.351.292	0,0149	0,0073	2,041
18bh	0,14	2.239.298	1.944.460	0,0215	0,0093	2,311

Taxa média =  $4,2817 \pm 2,4800$ .

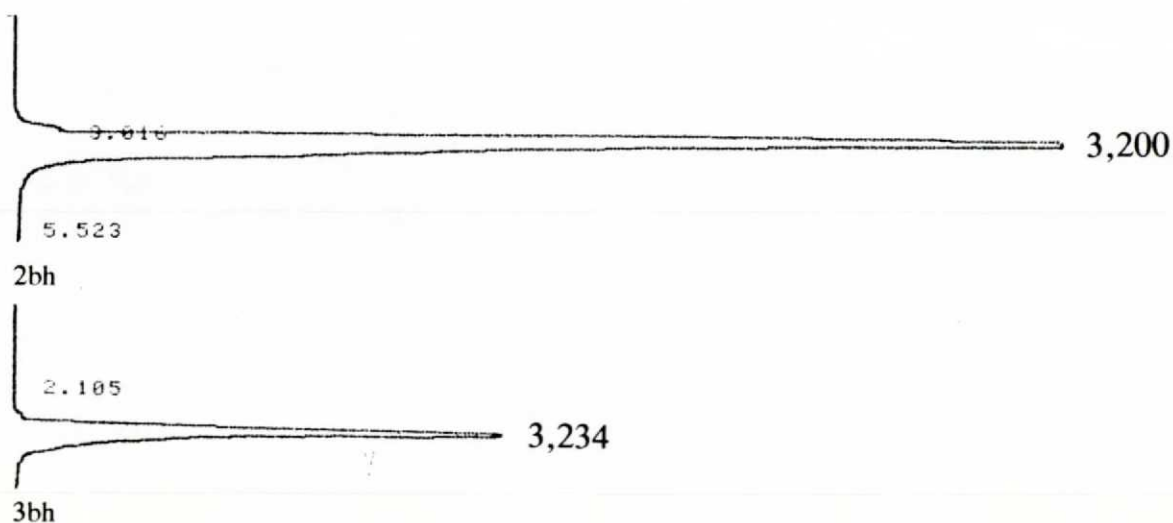


Figura 10 - Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente às amostras 2bh e 3bh, liberadas pela coluna, em função do tempo relativo (x).

#### 4.3.4 Concentração da taxa de hidroxiprolina em miligramas por grama de tecido desidratado

O tempo relativo médio de saída das amostras da coluna de cromatografia foi de 3,2402, variando de 3,016 a 3,320, com desvio-padrão  $s = 0,0923$ . A área absoluta referente às concentrações individuais das amostras foi em média de 3.556.627, variando de 1.087.982 a 13.819.986, com desvio-padrão  $s = 2.811.845$ . A área relativa referente às concentrações das amostras foi em média de 97,29%, variando de 80,63% a 100,00%, com desvio-padrão  $s = 5,2571$ . Estes valores individuais bem como suas médias podem ser observados na tabela 14.

**Tabela 14**

Correlação entre as amostras teciduais desidratadas, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta da curva e a área relativa da curva (%)

Amostra	Tempo	Área absoluta	Área relativa
1bd	3,265	2.351.533	100,00
2bd	3,016	13.819.986	99,90
3bd	3,235	2.962.926	99,54
4bd	3,187	2.937.424	99,97
5bd	3,297	2.552.826	99,26
6bd	3,317	1.845.451	98,84
7bd	3,026	(-)	(-)
8bd	3,296	4.052.352	99,14
9bd	3,320	4.549.496	80,63
10bd	3,321	2.948.024	99,29
11bd	3,315	2.582.982	99,04
12bd	3,305	2.351.798	98,69
13bd	3,255	2.151.545	98,94
14bd	3,194	4.902.773	99,96
15bd	3,229	3.709.026	99,97
16bd	3,257	2.780.452	99,66
17bd	3,306	2.896.069	88,76
18bd	3,183	1.087.982	92,38
m	3,2402	3.556.627	97,29
s	0,0923	2.811.845	5,2571

m = taxa média; s = desvio-padrão; (-) erro de leitura.

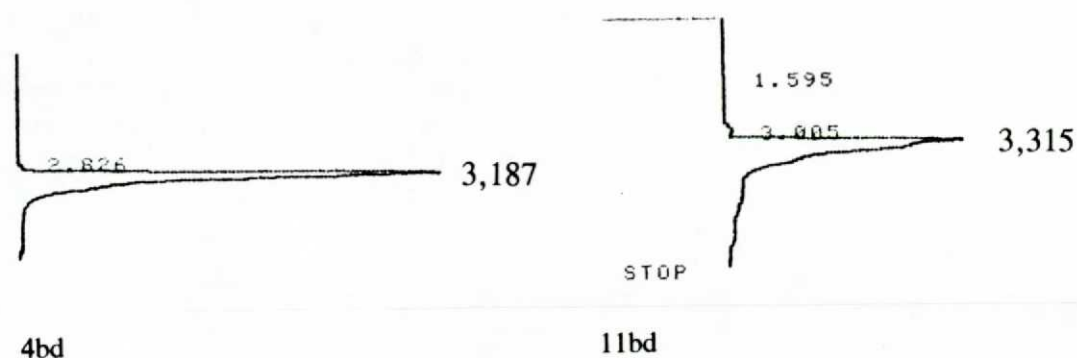
Obteve-se para as amostras teciduais desidratadas uma taxa de hidroxiprolina tecidual média igual a 12,018 mg/g, variando de 3,107 mg/g a 23,227 mg/g, com um desvio-padrão  $s = 5,767$ . Estes valores podem ser avaliados, individualmente, na tabela 15.

**Tabela 15**

Relação entre o número da amostra tecidual desidratada ( $n^{\circ}$ ), seu peso em gramas (g), a sua área absoluta, a diferença entre a área absoluta das amostras e a área absoluta da solução branca (Área-b), a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por mililitro de eluato (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual desidratada e o volume de diluição do hidrolisado e a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para as amostras teciduais desidratadas pela técnica fluorimétrica

$n^{\circ}$	g	Área absoluta	Área-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
1bd	0,063	2.351.533	2.056.695	0,0228	0,0042	5,428
2bd	0,053	13.819.986	13.525.148	0,1500	0,0035	20,857
3bd	0,043	2.962.926	2.668.088	0,0296	0,0028	10,571
4bd	0,023	2.937.424	2.642.586	0,0293	0,0015	19,533
5bd	0,033	2.552.826	2.257.988	0,0250	0,0022	11,363
6bd	0,033	1.845.451	1.550.613	0,0172	0,0022	7,818
7bd	0,043	(-)	(-)	(-)	0,0028	(-)
8bd	0,043	4.052.352	3.757.514	0,0416	0,0028	14,857
9bd	0,043	4.549.496	4.254.658	0,0472	0,0028	16,857
10bd	0,053	2.948.024	2.653.186	0,0294	0,0035	8,400
11bd	0,033	2.582.982	2.288.144	0,0253	0,0022	11,500
12bd	0,043	2.351.798	2.056.960	0,0228	0,0028	8,142
13bd	0,043	2.151.545	1.856.707	0,0205	0,0028	7,321
14bd	0,033	4.902.773	4.607.935	0,0511	0,0022	23,227
15bd	0,033	3.709.026	3.414.188	0,0378	0,0022	17,181
16bd	0,053	2.780.452	2.485.614	0,0275	0,0035	7,857
17bd	0,043	2.896.069	2.601.231	0,0288	0,0028	10,285
18bd	0,043	1.087.982	793.144	0,0087	0,0028	3,107

Taxa média =  $12,018 \pm 5,767$ . (-) erro de leitura.



**Figura 11** - Representação gráfica da quantidade de fluoróforo (y) correspondente às amostras 4bd e 11bd, liberadas pela coluna, em função do tempo relativo (x).

#### 4.3.5 Amostras em pool

As amostragens processadas pela técnica fluorimétrica mediante mistura equivalente e homogênea de alíquotas iguais dos hidrolisados protéicos das amostras teciduais hidratadas e desidratadas (pool), corresponde a um peso hidratado médio de 0,135g e a um peso desidratado médio de 0,0391g. Estes resultados podem ser observados na tabela 16.

**Tabela 16**

Correlação entre os pools das amostras teciduais hidratadas e desidratadas, o tempo relativo de saída da coluna, a área absoluta da curva e a área relativa da curva (%)

Amostra	Tempo	Área absoluta	Área relativa
19bh	3,320	2.429.848	99,96
19bd	3,189	3.466.469	100,00

A taxa de hidroxiprolina tecidual na amostragem correspondente às amostras hidratadas foi de 2,622 mg/g e de 13,500 mg/g, correspondente às amostras desidratadas. Estes valores podem ser observados na tabela 17.

**Tabela 17**

Relação entre o número da amostra tecidual (n°), seu peso em gramas (g), a sua área absoluta, a diferença entre a área absoluta das amostras e a área absoluta da solução branca (Área-b), a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por mililitro de eluato (mg/ml), a razão entre o peso da amostra tecidual desidratada e o volume de diluição do hidrolisado e a taxa de hidroxiprolina tecidual em miligramas por grama de tecido (mg/g) obtida para os pools de amostras teciduais hidratadas e desidratadas

n°	g	Área absoluta	Área-b	mg/ml	g/15ml	mg/g
19bh	0,1350	2.429.848	2.135.010	0,0236	0,0090	2,622
19bd	0,0391	3.466.469	3.171.631	0,0351	0,0026	13,500

A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras hidratadas (taxa média) em relação à sua amostragem em pool (n° 19bh) é de 61,24%. A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras desidratadas (taxa média) em relação à sua amostragem em pool desidratada (n° 19bd) é de 112,33%.

#### 4.4 Resultados comparativos

##### 4.4.1 Taxa de hidroxiprolina tecidual

A análise comparativa entre as taxas de hidroxiprolina tecidual obtidas nas técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica, nas amostras hidratadas e desidratadas, respectivamente, pode ser observada na tabela 18.

Tabela 18

Taxa de hidroxiprolina tecidual das amostras hidratadas e desidratadas, em miligramas por grama de tecido, processadas pelas técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica

Número da amostra	Hidratada		Desidratada	
	Fotocolorimétrica	Fluorimétrica	Fotocolorimétrica	Fluorimétrica
1	1,610	1,460	9,714	5,428
2	2,349	10,962	11,914	20,857
3	2,884	2,955	5,285	10,571
4	1,850	4,175	11,200	19,533
5	3,732	5,384	7,409	11,363
6	3,237	2,075	18,318	7,818
7	2,593	2,458	4,964	(-)
8	1,865	2,285	18,678	14,857
9	2,929	3,132	6,500	16,857
10	2,279	7,430	12,885	8,400
11	2,316	3,350	19,409	11,500
12	2,067	5,266	14,035	8,142
13	8,136	3,075	12,500	7,321
14	3,475	7,187	18,500	23,227
15	6,950	6,287	18,500	17,181
16	4,012	5,275	9,314	7,857
17	2,232	2,041	11,821	10,285
18	4,946	2,311	8,535	3,107
Média	3,303	4,281	12,193	12,018

(-) erro de leitura.

Amostras hidratadas, técnica fotocolorimétrica X técnica fluorimétrica:

$$\chi^2 = 1,819, p = 0,178$$

Teste de Fisher: 0,182, p = 0,052

Teste de Bartlett:  $F_{calc} = 1,872$  ( $F_{crítico} = 4,410$ )  $\therefore F_{calc} < F_{crítico}$

Amostras desidratadas, técnica fotocolorimétrica X técnica fluorimétrica:

$$\chi^2 = 0,482, p = 0,488$$

Teste de Fisher: 0,010, p = 0,923

Teste de Bartlett:  $F_{calc} = 0,497$  ( $\therefore F_{calc} < F_{crítico}$ )

Técnica fotocolorimétrica, amostras hidratadas X amostras desidratadas:

$$\chi^2 = 14,45, p < 0,0001^*$$

Teste de Fisher: 53,38, p < 0,0001\*

Teste de Bartlett:  $F_{calc} = 14,87^*$  ( $\therefore F_{calc} > F_{crítico}$ )

Cochran:  $G(2,18) = 0,882, p = 0,010^*$

Técnica fluorimétrica, amostras hidratadas X amostras desidratadas:

$$\chi^2 = 10,40, p < 0,001^*$$

Teste de Fisher: 27,10, p < 0,0001\*

Teste de Bartlett:  $F_{calc} = 10,71^*$  ( $\therefore F_{calc} > F_{crítico}$ )

Cochran:  $G(2,17) = 0,844, p = 0,010^*$

#### 4.4.2 Análise regressiva

Na técnica fotocolorimétrica, a taxa de hidroxiprolina tecidual média esperada das amostras teciduais desidratadas, em função de da porcentagem de peso desidratado médio das amostras ( $\%d_m$ ) é de 11,002 mg/g em comparação com 12,193 mg/g encontrados (aproximação de 90,23%); na técnica fluorimétrica, a taxa de hidroxiprolina tecidual média esperada das amostras teciduais desidratadas, em função de da porcentagem de peso desidratado médio das amostras ( $\%d_m$ ) é de 14,023 mg/g em comparação com 12,018 mg/g encontrados (aproximação de 116,68%).

## 5 DISCUSSÃO

Neste capítulo confronta-se as informações levantadas na literatura com os resultados elaborados no presente estudo, obedecendo-se à ordem dos subítens dos capítulos de Material e Método e de Resultados.

### 5.1 Generalidades

A técnica pioneira para a identificação de hidroxiprolina presente na gelatina, descrita por FISCHER em 1902, apud DAKIN (1920), consiste no estudo do resíduo obtido após a esterificação dos aminoácidos convencionais da amostra. FISCHER encontrou 3% de hidroxiprolina na gelatina: a inespecificidade de sua técnica pioneira, pode ser avaliada no fato de atualmente aceitar-se uma participação de 13,5 - 14% da hidroxiprolina na constituição do colágeno. DAKIN, em 1920, procurou melhorar a sensibilidade desta técnica original, porém poucos anos mais tarde foram introduzidos princípios revolucionários na abordagem bioquímica desta questão e a dosagem da hidroxiprolina presente em hidrolisados passou a uma fase mais objetiva e menos empírica: passou ao domínio da colorimetria e da fluorimetria.

SAMEJIMA, KAWASE, SAKAMOTO, OKADA e ENDO (1976) ressaltam que diversas amins podem apresentar propriedades químicas muito semelhantes entre si, o que pode acarretar em dificuldades de identificação individual. Para SEILER (1977), uma etapa de separação dos derivados (formadores de cor ou fluorescentes) deve sempre ser realizada, pois normalmente ocorre a formação de produtos derivados afins, dos quais a clivagem hidrolítica do reagente é o mais comum. Dentre as técnicas de

separação, pode-se utilizar extrações em solventes, trocas iônicas ou colunas de cromatografia.

A demonstração inicial de que o hipoclorito transforma a prolina em *n*-pirrolina e em analogia a oxiprolina em *n*-oxipirrolina coube a LANGHELD (1909), apud LANG (1933). Baseadas nestes novos conceitos, surgiram reações colorimétricas para a determinação da hidroxiprolina, mediante reações produtoras de cor com a isatina, a ninidrina e o reativo de Ehrlich. A rica diversidade em relação às fases intermediárias necessárias para a dosagem bioquímica colorimétrica da hidroxiprolina de hidrolisados protéicos diversos (de urina, de amostras teciduais do canal alimentar, etc.) envolvida na reação produtora de cor mediante o uso de reativo de Ehrlich, justifica a procura por técnicas alternativas. Mais recentemente, após a demonstração inicial por WEIGELE, DeBERNARDO e LEIMGRUBER (1973) da transformação da hidroxiprolina em uma amina primária, tornou-se possível a sua reação com a fluoresceína e o *o*-ftalaldeído, permitindo desta forma a determinação fluorométrica mediante cromatografia líquida de alta performance.

## 5.2 Obtenção das amostras teciduais

Os fragmentos teciduais foram colocados em frascos individuais e armazenadas em solução fisiológica a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante um período de 24 horas. Sabe-se que é viável manter-se proteínas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante várias horas e congeladas durante meses ou até anos. PIKKARAINEN (1968) armazena suas amostras em gelo. Tratamento semelhante das peças é relatado por NARESSE et al. (1988), que armazenam suas peças em congelador para processamento bioquímico posterior. DEBUS (1989) armazena suas peças em nitrogênio líquido: este é provavelmente o melhor processo de armazenamento de amostras biológicas. O acondicionamento dos fragmentos teciduais em congelador, nas condições aplicadas neste estudo, mostrou ser satisfatório e de fácil execução. Da mesma forma, não ocorreram perdas de fragmentos teciduais por desnaturação protéica.

### 5.2.1 Estado de hidratação das amostras teciduais

Em artigo de revisão sobre delineamentos experimentais em anastomoses de colo, KORUDA e ROLANDELLI (1990) ressaltam as diversas maneiras de se expressar a taxa de hidroxiprolina tecidual em estudos experimentais, podendo estas serem unidades arbitrárias (JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT, 1978), concentração por peso tecidual úmido, concentração por peso tecidual desidratado, concentração pela área da anastomose ou ainda concentração pela taxa de nitrogênio.

Encontra-se na literatura relativo descaso em se descrever o estado de hidratação e o peso inicial das amostras teciduais. Para alguns, parece ser óbvio, que o estado ideal seja o hidratado (MARTENS e HENDRIKS, 1991; POLONIO, 1992; CZECHKO, 1992; e JIBORN et al., 1978); outros, defendem de maneira igualmente óbvia, que o peso seco seja mais representativo do conteúdo protéico (CRONIN et al., 1968; ); já outros nem sequer mencionam esta questão (PROCKOP e UDENFRIEND, 1960; WOESSNER Jr., 1961; STEGEMANN e STALDER, 1967; NARESSE et al., 1988).

MARTENS e HENDRIKS (1991) processaram amostras teciduais em estado hidratado, procedendo à incubação das amostras em meio contendo prolina radioativa. Da mesma forma POLONIO (1992) e CZECHKO (1992) determinaram a taxa de hidroxiprolina tecidual em amostras hidratadas do reto de cães para estudo comparativo de técnicas de anastomose; DIETZ (1993) realizou dosagens bioquímicas para determinar a taxa de hidroxiprolina no canal alimentar de cães não operados, partindo de amostras hidratadas, ressaltando que "esta é uma das relações de concentração que propicia um melhor entendimento do resultado por parte do médico, pois refere-se objetivamente ao tecido, tal qual o mesmo é manipulado, na intimidade, pelo cirurgião".

Para evitar o que alguns autores denominam de efeito diluidor da eventual presença de edema, GRUNBAUM e GLICK (1956); CRONIN, JACKSON e DUNPHY (1968); JIBORN et al. (1978); e DEBUS (1989) determinam a taxa de hidroxiprolina a partir de amostras teciduais desidratadas. Como se realiza esta desidratação das amostras teciduais? GRUNBAUM e GLICK (1956) realizam a desidratação por congelamento de fragmentos microtomizados de tecido.

CRONIN et al. (1968) e JIBORN et al. (1978) e DEBUS (1989) sugerem a desidratação pelo calor, a 110°C, até que se obtenha um peso constante. Já BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977) realizam a desidratação com acetona e em câmara de vácuo.

WOESSNER Jr. (1961), utilizando "pequenos fragmentos de proteínas, tecidos e fluidos, submetidos ao processamento bioquímico sem qualquer tipo de purificação", não define o estado de hidratação das amostras e permite assim a interpretação de que tenha utilizado amostras teciduais em estado original, hidratado. NARESSE et al. (1988) não discriminam o estado de hidratação das amostras teciduais, fazendo referências apenas à técnica bioquímica empregada.

Neste estudo as amostras teciduais foram obtidas após o descongelamento dos fragmentos teciduais, mediante recorte de uma área aproximada de 2 x 4 mm. De cada fragmento tecidual recortou-se amostras teciduais para estudo da sua taxa de hidroxiprolina em dois estados de hidratação: o primeiro, a partir de seu peso úmido e o segundo, a partir de seu peso seco. Cada amostra apresentou assim uma área equivalente de todas as camadas do órgão, com preservação da sua espessura normal, desde a túnica mucosa até a túnica serosa, contendo quantidade proporcional do colágeno, constituinte principal da tela submucosa.

### 5.2.2 Peso das amostras teciduais

O peso inicial das amostras teciduais pode parecer de importância relativa e necessário apenas para preencher requisitos de cálculos de concentração. Não encontrou-se na literatura menção específica a esta questão, porém durante a realização de centenas de dosagens da taxa de hidroxiprolina tecidual, realizadas pelo autor durante os últimos três anos, observou-se que as técnicas de dosagem, colorimétrica e fluorimétrica, são muito sensíveis, sendo capazes de identificar taxas de hidroxiprolina minúsculas em amostras protéicas (GRUNBAUM e GLICK, 1956; DIETZ, 1993). Desta forma, amostras teciduais de peso hidratado maior do que 0,25-0,30 gramas, acarretam reações colorimétricas e fluorimétricas muito intensas, excedendo a capacidade de leitura em espectrofotômetro e em espectrofluorômetro, sendo freqüentemente necessárias diluições dos cromóforos

e fluoróforos. Estes procedimentos de diluição podem ser da ordem de uma a quatro vezes, relativando assim os resultados, pois amostras distintas recebem assim tratamentos diferenciados.

Neste estudo, utilizou-se amostras teciduais provenientes de duodeno, jejuno e colo descendente de cães e, paralelamente, processou-se uma amostra denominada de pool, contendo frações de cada uma das amostras individualmente (Tabela 1). A opção pela escolha de amostras teciduais de origens distintas (no âmbito do canal alimentar da cão) deveu-se à necessidade de inclusão no estudo de amostras com concentrações de hidroxiprolina diferentes, a fim de se avaliar comparativamente, as técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica, na análise de amostras com concentrações altas e baixas do aminoácido. Um conjunto de amostras mais heterogêneas tem a vantagem de trazer à luz, com mais evidência, diferenças nos resultados e limitações na análise deste tipo de resultados. Não foi objetivo deste estudo a definição da taxa de hidroxiprolina tecidual em cada um dos segmentos estudados, individualmente: esta análise foi objeto de estudo anterior (DIETZ, 1993), utilizando-se apenas a técnica fotocolorimétrica. Da mesma forma, poder-se-ia ter optado por amostras teciduais de outras origens (ratos, camundongos, coelhos, etc.) para a análise comparativa das técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica na determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual, pois a origem do tecido estudado é de importância secundária no presente estudo.

Avaliou-se a amostra pool, para comparar-se o seu valor final com o valor médio de todas as determinações das amostras teciduais, individualmente. As amostras teciduais hidratadas apresentaram pesos iniciais que variaram entre 0,09 e 0,20g (média de 0,1361g, desvio-padrão de 0,0331)(Tabela 4). As amostras teciduais desidratadas apresentaram um peso hidratado, prévio à desidratação, variando entre 0,10 e 0,20g (média de 0,1305g, desvio-padrão de 0,0297) e um peso desidratado variando de 0,030 a 0,063g (média de 0,0391g, desvio-padrão de 0,0091); a porcentagem de peso desidratado destas amostras variou de 25,38 a 33,00% (média de 30,02%, desvio-padrão de 1,7885) e uma porcentagem de hidratação variando de 67,00 a 74,62% (média de 69,98%, desvio-padrão de 1,7885)(Tabela 5). O peso médio das amostras desidratadas processadas neste estudo corresponde ao das de MARTENS e HENDRIKS (1991), os quais utilizaram amostras teciduais com peso desidratado variando de

0,035 a 0,070g; e foi inferior ao das amostras teciduais desidratadas utilizadas por DEBUS (1989), com peso médio de 0,080g.

### 5.2.3 Soluções-padrão de hidroxiprolina

A análise das soluções-padrão, paralelamente à análise das amostras teciduais, irá permitir a correlação entre os resultados obtidos para as amostras teciduais e um padrão preestabelecido de concentração. A análise de diferentes concentrações da solução-padrão em função de sua leitura espectrofotométrica ou fluorimétrica, irá permitir a correlação destes dados e a determinação de seu coeficiente de linearidade, segundo Pearson. Quanto mais próximo do valor absoluto 1,000 se aproximar este coeficiente, maior a probabilidade de que haja uma correlação estabelecida, não devida ao acaso, entre as concentrações de hidroxiprolina e as leituras quantitativas, respectivamente.

NEUMAN e LOGAN (1950); GRUNBAUM e GLICK (1956); BERGMAN e LOXLEY (1963); BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977); confeccionaram curvas de calibração, sem contudo determinarem o seu coeficiente de linearidade. Estas curvas de calibração permitem que se proceda à leitura da concentração da taxa de hidroxiprolina, sobrepondo-se o valor de leitura da absorvância/emissão de fluorescência sobre a curva.

#### 5.2.3.1 Na técnica fotocolorimétrica

Na técnica fotocolorimétrica, utilizaram-se soluções-padrão nas concentrações de 4,5, 9, 18 e 36  $\mu\text{g/ml}$ , pois nas condições deste protocolo a maior parte das leituras espectrofotométricas corresponde a estas concentrações (IBBOTT, 1974; DIETZ, 1993)(Tabela 2). Os valores de absorvância, obtidos a 590 nm, para as quatro soluções-padrão foram de 0,695 (36  $\mu\text{g/ml}$ ), 0,663 (18  $\mu\text{g/ml}$ ), 0,648 (9  $\mu\text{g/ml}$ ) e 0,635 (4,5  $\mu\text{g/ml}$ ), calculando-se um valor de correlação (r) de 0,9970, altamente significativa na correlação entre os dados. Os

valores de leitura variam conforme o tipo de equipamento usado e o índice de correlação deste estudo é semelhante ao encontrado por ANGELELI, BURINI e OLIVEIRA (1982). Conhecendo-se os valores obtidos para o coeficiente angular (a) igual a 0,6290 e o coeficiente linear (b) igual a 0,0018, e sendo (x) o valor da absorbância obtido pela leitura espectrofotométrica, pode-se calcular (y), que é a concentração de hidroxiprolina em miligramas por mililitro.

#### 5.2.3.2 Na técnica fluorimétrica

Na técnica fluorimétrica, utilizou-se um número maior de diluições da solução-padrão, por ser esta técnica mais sensível e a fidedignidade dos resultados estar relacionada diretamente à necessidade da leitura das amostras estar compreendida dentro dos limites da curva de calibração estabelecida. Diluíram-se soluções-padrão nas concentrações de 4,5, 9, 18, 36, 72 e 144  $\mu\text{g/ml}$  (Tabela 3). Os valores das áreas dos picos gráficos correspondentes à emissão de fluorescência obtidos para estas amostras, determinados em unidades arbitrárias, foram de 13.479.080 (144 $\mu\text{g/ml}$ ), 7.942.942 (72 $\mu\text{g/ml}$ , Figura 3), 3.539.596 (36 $\mu\text{g/ml}$ ), 2.249.437 (18 $\mu\text{g/ml}$ ), 1.177.150 (9 $\mu\text{g/ml}$ , Figura 4) e 592.001 (4,5  $\mu\text{g/ml}$ ), calculando-se um valor de correlação (r) de 0,9962, altamente significativo na correlação entre os dados. Sabendo-se os valores obtidos para os coeficientes angular (a=436.209) e linear (b=92.991) e, sendo (x) o valor da absorbância obtido pela leitura espectrofotométrica, pode-se calcular (y), que é a concentração de hidroxiprolina em miligramas por mililitro. Os valores de correlação entre os dados das curvas de calibração das soluções-padrão de hidroxiprolina obtidos nas duas técnicas, podem ser considerados semelhantes entre si e ilustram o intervalo de confiança destes resultados. Estes valores estão de acordo com o índice de linearidade descrito por DIETZ (1993) para a técnica fotocolorimétrica (r=0,9875) e discretamente abaixo do descrito por ANGELELI et al. (1982), que obtiveram r=0,9997.

### 5.3 Hidrólise ácida das amostras

O processo de hidrólise corresponde à decomposição química, em que uma substância é fragmentada em componentes mais simples pela adição ou retirada de água. As proteínas são formadas por aminoácidos que são unidos por meio de ligações peptídicas que no processo de hidrólise são quebradas pela adição de moléculas de água, em meio ácido ou alcalino. O aquecimento de polipeptídios com HCl 6*N* em excesso, a uma temperatura que varia entre 100 e 120°C, durante 10 a 24 horas, em tubo fechado, é o processo usual para a hidrólise completa de proteínas. Nessas condições ocorre pouca ou nenhuma racemização dos aminoácidos.

LANG (1933) era da opinião de que seria indiferente o tipo de hidrólise a que deveria-se submeter a amostra protéica em análise, se ácida ou alcalina. Posteriormente demonstrou-se que o triptofano, a serina e a treonina são parcialmente destruídos pela hidrólise ácida, enquanto que a cisteína, a cistina a serina e a treonina são destruídas pela hidrólise alcalina, a qual concomitantemente leva à racemização de todos os aminoácidos. Desta forma, autores como NEUMAN e LOGAN (1950); PROCKOP e UDENFRIEND (1960); WOESSNER Jr. (1961); BERGMAN e LOXLEY (1963); KIVIRIKKO, LAITINEN e PROCKOP (1967); STEGEMANN e STALDER (1967); CRONIN et al. (1968); IBBOTT (1974); BUTCHER e LOWRY (1976); BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977) e DIETZ (1993) utilizam a hidrólise ácida para a separação das moléculas de hidroxiprolina do colágeno.

A relação entre o tempo de hidrólise e a temperatura sob a qual se processa a reação apresenta uma proporcionalidade indireta: aumentando-se a temperatura pode-se reduzir o tempo da reação e aumentando-se o tempo, pode-se reduzir a temperatura da reação. Assim, NEUMAN e LOGAN (1950); GRUNBAUM e GLICK (1956); WOESSNER Jr. (1961); e JIBORN et al. (1978), utilizam temperaturas elevadas (entre 130 - 170°C) e um tempo de reação em torno de 3 horas. Já autores como LANG (1933); BERGMAN e LOXLEY (1963); KIVIRIKKO et al. (1967); IBBOTT (1974); BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977); e ANGELELI et al. (1982) lançam mão de uma temperatura menor, entre 100 - 110°C, e um tempo de hidrólise ácida maior, entre 16 - 24

horas. No presente estudo obteve-se uma hidrólise completa das amostras teciduais, em 14 horas a 100°C e com o uso de apenas 1 ml do ácido.

#### 5.4 Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fotocolorimétrica

A metodologia empregada para a determinação colorimétrica da hidroxiprolina baseia-se na técnica descrita originalmente por KIVIRIKKO et al. (1967), adaptada por IBBOTT (1974) e DIETZ (1993). Sumariamente pode-se dividir a análise bioquímica em duas etapas distintas, quais sejam: a) oxidação da hidroxiprolina em ácido pirrol-2-carboxílico; e b) formação e extração do pirrol, com a reação colorimétrica e a quantificação da cor formada por meio de espectrofotometria.

##### 5.4.1 Oxidação

A oxidação corresponde ao processo da combinação de uma substância com o oxigênio. LANGHELD (1909), apud LANG (1933), foi o primeiro a sugerir que o hipoclorito transforma por oxidação a prolina em *n*-pirrolina e em analogia a oxiprolina em *n*-oxipirrolina. Da mesma forma, LANG propõe o tratamento da hidroxiprolina com hipoclorito de sódio, para dar origem à formação de *n*-oxipirrolina. WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI (1934), numa análise crítica à técnica proposta por LANG (1933), sugerem que o elemento produtor de cor (cromóforo) na reação de oxidação da hidroxiprolina seja o pirrol e não a *n*-oxipirrolina. RADHAKRISHNAN e MEISTER (1957) confirmam a opinião de WALDSCHMIDT-LEITZ e AKABORI, demonstrando que a hidroxiprolina pode ser oxidada em ácido pirrol-2-carboxílico apresentando na reação um componente intermediário que provavelmente é o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico.

As duas substâncias mais citadas para a oxidação da hidroxiprolina são o peróxido de hidrogênio ou de sódio e a cloramina-T. Sobre o peróxido de

hidrogênio, BERGMAN e LOXLEY (1963) ressaltam que a formação de cor da reação depende diretamente da concentração do peróxido e da concentração de hidroxiprolina. McFARLANE e GUEST (1939); NEUMAN e LOGAN (1950); GRUNBAUM e GLICK (1956); e WOESSNER Jr. (1961) utilizam o processo de oxidação pelo peróxido em suas técnicas de determinação quantitativa da hidroxiprolina.

PROCKOP e UDENFRIEND (1960); BERGMAN e LOXLEY (1963); STEGEMANN e STALDER (1967); KIVIRIKKO et al. (1967); IBBOTT (1974); e BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977), utilizam a cloramina-T como reativo oxidante da hidroxiprolina, conforme proposto originalmente por STEGEMANN em 1958, apud PROCKOP e UDENFRIEND (1960). Segundo BERGMAN e LOXLEY (1970) e IBBOTT (1974), o pirrol (cromóforo originado pela oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T) é mais estável do que a 1,2-dihidrohidroxiprolina (cromóforo originado pela oxidação da hidroxiprolina pelo peróxido). BLUMENKRANTZ e HANSEN (1977) ressaltam que uma discreta acidez da solução não interfere com a oxidação, porém a presença de alcalinidade pode reduzir a intensidade final de cor formada, quando se usa a cloramina-T. IBBOTT (1974) interrompe a etapa da oxidação após 25 minutos pela adição de tiosulfato de sódio.

O pirrol formado pela oxidação da hidroxiprolina pela cloramina-T é altamente estável e praticamente não sofre alterações pela presença de outros produtos de oxidação ou mesmo pela presença de altas concentrações de cloramina-T. Além do mais, enquanto faz-se premente a retirada dos vestígios do peróxido de hidrogênio da solução antes da etapa de formação de cor, a cloramina-T não se constitui em fator interferente nesta fase. Desta forma, adotou-se no presente protocolo experimental a cloramina-T como agente oxidante. Deve-se ressaltar que a obtenção da solução de cloramina-T não oferece maiores dificuldades e a mistura imediata da solução à medida em que se acrescenta a mesma à amostra em estudo, garante uma oxidação eficiente.

Finalmente, a utiliza-se a presença intencional de alanina na etapa da oxidação da hidroxiprolina, o que é, segundo PROCKOP e UDENFRIEND (1960), uma forma de diminuir-se a interferência da presença de outros aminoácidos ou substâncias afins ao mesmo tempo em que não se influi sobre a quantidade do pirrol formado. DEBUS (1989) também relata o uso de alanina

nesta fase da oxidação.

#### 5.4.2 Formação e extração do pirrol

Cumprida a etapa da oxidação da hidroxiprolina à temperatura ambiente, obtém-se a formação do ácido pirrol-2-carboxílico (RADHAKRISHNAN e MEISTER, 1957). Nesta etapa, pode-se lançar mão de uma forma muito efetiva de retirada de impurezas: realiza-se a extração das mesmas pelo tolueno, pois o ácido  $\Delta^1$ -pirrol-4-hidroxi-carboxílico e o ácido pirrol-2-carboxílico não são extraídos pelo processo por não serem solúveis em tolueno (PROCKOP e UDENFRIEND, 1960; KIVIRIKKO et al., 1967; e IBBOTT, 1974). É necessária assim uma próxima etapa para a origem de pirrol (cromóforo): esta transformação ocorre aquecendo-se a amostra durante 30 minutos em banho-maria com água fervente. Na fase seguinte, após o período de aquecimento, realiza-se a extração do pirrol em tolueno, o qual, por ser solúvel, passará a fazer parte do extrato. No presente estudo, observou-se que esta etapa de aquecimento é de fundamental importância e valor decisivo para o desenvolvimento posterior de coloração rósea pela reação com o reativo de Ehrlich. Na ausência de condições ótimas de temperatura, isto é, banho-maria com água fervente por 30 minutos, não ocorre a transformação termocatalisada do cromóforo, podendo-se obter resultados falso-negativos.

O tempo dispensado para o processamento bioquímico das amostras até esta fase, é de um dia para o preparo e a hidrólise das amostras, um dia para o preparo das soluções e vidrarias a serem utilizadas e um dia para a realização das reações bioquímicas. Há nesta fase um gasto de importantes volumes de reagentes.

#### 5.4.3 Leitura espectrofotométrica

Por intermédio da leitura espectrofotométrica realiza-se a quantificação

da cor formada pela reação do pirrol com o reativo de Ehrlich. BERGMAN e LOXLEY (1963); KIVIRIKKO et al. (1967); IBBOTT (1974); e DEBUS (1988) ressaltam que a leitura espectrofotométrica deve ser realizada em 560 nm, WOESSNER Jr. (1961) em 557 nm. ANGELELI et al. (1982) não observaram diferenças nos resultados obtidos por leituras de amostras iguais realizadas em diversos aparelhos de espectrofotometria; para os autores, os picos de absorção máxima situam-se entre 558 e 562 nm. O valor obtido pela leitura espectrofotométrica é definido em unidades arbitrárias.

WOESSNER jr., em 1961, preocupou-se com a qualidade do cromógeno conforme, reportando que conseguiu mantê-lo estável por pelo menos uma hora. A leitura da cor formada pela reação do pirrol com o reativo de Ehrlich, segundo preconizado por KIVIRIKKO et al. (1967), deverá ser feita aproximadamente 30 minutos após. A estabilidade da cor é frágil, pois observou-se no presente estudo, uma nítida perda de sua intensidade com o passar de horas. Segundo STEGEMANN e STALDER (1967) e BERGMAN e LOXLEY (1970), um aumento na concentração do reativo de Ehrlich não aumenta a estabilidade do cromógeno formado, porém sugerem que a substituição do éter monometílico de etilenoglicol pelo *n*-propanol ou isopropanol, pode conferir-lhe estabilidade por vários anos. Esta variável não foi avaliada no presente trabalho.

Procedeu-se à leitura da absorbância espectrofotométrica em leitor de placas de Elisa, por este equipamento permitir a leitura de até 96 amostras, em um curto espaço de tempo, necessitando apenas de 250  $\mu$ l de cada cromógeno. Em estudos anteriores (DIETZ, 1993) utilizando-se fotocolorímetro de fluxo contínuo, este volume de análise variou de 1-3 ml por amostra de cromógeno, limitando a possibilidade de repetição de leituras, por esgotamento do volume de cromógeno. Sobre a microplaca empregada, observou-se que ocorre uma interação entre o solvente de cromógeno e a resina da placa, após decorridos aproximadamente 15 minutos do início de seu contato, havendo precipitação de macromoléculas, que interferem na leitura dos resultados. Como a leitura dos resultados requer uma fração de tempo muito inferior, na ordem de 3 minutos, não observou-se interferência deste fato sobre os resultados elaborados, fato este controlado por leituras seqüenciais e repetidas, em novas microplacas. É de se esperar que microplacas de vidro possam evitar esta precipitação, permitindo estudos sobre a estabilidade do cromógeno no decorrer do tempo. O tempo

dispensado para todo o ciclo de etapas envolvidas na determinação da taxa de hidroxiprolina pela técnica fotolorimétrica, do preparo dos reagentes à leitura espectrofotométrica, foi de 10 horas. A maior fração de tempo foi dispensada nas diversas etapas do processamento bioquímico, sendo o tempo dispensado para a leitura final, incluindo-se o pipetamento das alíquotas, de apenas 15 minutos.

#### 5.4.4 Taxas de hidroxiprolina tecidual

Calculou-se a taxa de hidroxiprolina tecidual das amostras em estudo com base no valor de absorvância encontrado para a solução-padrão de hidroxiprolina com a concentração de 36  $\mu\text{g/ml}$ . Esta correlação surge na fórmula de cálculo (Fórmula nº 1, item 3.4.5) sob a forma da constante 0,036, em unidade de miligramas. Assim, mediante a fórmula nº 1 obteve-se a quantidade de hidroxiprolina por mililitro de hidrolisado. Na fórmula nº 2 definiu-se a relação de diluição da quantidade de tecido inicial, em gramas, pelo volume de diluição de 15 ml aplicado (referente ao primeiro parágrafo do item 3.3.2). Finalmente a razão do resultado obtido pela fórmula nº 1 (miligramas totais de hidroxiprolina por mililitro) pelo resultado obtido através da fórmula nº 2 (total de tecido por mililitro) definiu a quantidade de hidroxiprolina, em miligramas, pelo peso em gramas, da amostra tecidual. Este procedimento de cálculo corresponde ao proposto por IBBOTT (1974), adotado por POLONIO (1992) e CZECHKO (1992) e pelo autor em trabalho anterior (DIETZ, 1993).

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina média de 3,3034 mg/g de tecido (desvio-padrão de 1,7748) para as análises processadas a partir de amostras teciduais hidratadas (ah), pela técnica fotolorimétrica. A amostra definida como pool (19ah) apresentou taxa de hidroxiprolina tecidual equivalente a 3,889 mg/g de tecido, considerando-se como peso da amostra tecidual a média dos pesos de todas as amostras teciduais hidratadas (média de 1ah a 18ah). A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras hidratadas em relação à amostra em pool hidratada (19ah) é de 114,6%. Assim, apesar de uma diferença menor do que um desvio-padrão entre a média dos valores individuais e o valor do pool, há uma diferença de mais de 5,00%

nestes resultados, não havendo correlação segura entre eles. Os valores finais não serão discutidos individualmente, para cada procedência das amostras, se duodeno, jejuno ou colo descendente, pois não foi objetivo deste estudo estabelecer valores normais para cada órgão; isto foi objeto de estudo anterior realizado pelo autor (DIETZ, 1993).

A opção pela escolha de amostras teciduais, com origens diferentes, se fundamenta na necessidade de se obter uma população de amostras até certo ponto heterogêneas, para uma melhor caracterização de diferenças e limitações entre ambas as técnicas avaliadas, comparativamente. A taxa de hidroxiprolina média encontrada neste estudo ( $3,3034 \pm 1,7748$  mg/g) aproxima-se em menos de um desvio-padrão da taxa média encontrada para estes órgãos no estudo de DIETZ (1993), que foi de 4,019 mg/g de tecido. Não encontrou-se na literatura estudada outros valores em segmentos normais do canal alimentar de cães, para a análise comparativa.

Para as amostras teciduais processadas a partir de seu estado desidratado, pela técnica fotolorimétrica, encontrou-se o valor médio de 12,1933 mg/g de tecido, com desvio-padrão de 4,8474. A amostra processada como pool (19ad) apresentou taxa de hidroxiprolina média de 12,500 mg/g de tecido, considerando-se como peso da amostra a média dos pesos individuais das amostras desidratadas (média de 1ad a 18ad). A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras desidratadas em relação à amostra em pool desidratada (19ad) é de 101,8%. Os resultados da média das amostras, individualmente, e das amostras em pool, equivalem-se, considerando-se menos de um desvio-padrão como intervalo de confiança. Os autores pesquisados na literatura não fazem menção a resultados semelhantes.

## **5.5 Dosagem da hidroxiprolina tecidual pela técnica fluorimétrica**

A metodologia empregada para a determinação fluorimétrica da hidroxiprolina fundamenta-se na descarboxilação oxidativa da hidroxiprolina em uma amina primária (WEIGELE et al., 1973) e na reação formadora de fluorescência mediante o uso de fluorescamina (WEIGELE, BLOUND, TENGI,

CZAJKOWSKI e LEIMGRUBER, 1972a). Realizou-se processo de separação mensuração da quantidade de fluoróforo mediante uso de equipamento de cromatografia líquida de alta pressão. Na seqüência discutir-se-á os princípios e cada uma das etapas envolvidas neste processo.

### 5.5.1 Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) representa uma variável técnica do princípio da separação baseado na cromatografia de troca iônica, desenvolvido inicialmente por HAMILTON e ANDERSON (1955), apud MOORE, SPACKMAN e STEIN (1958). Na cromatografia de troca iônica as moléculas contidas em um soluto são diferenciadas em função de seu comportamento ácido-básico diverso.

O processo consiste de uma coluna preenchida com grânulos de resina sintética, a qual por sua vez contém grupos com cargas iônicas específicas e conhecidas. Assim, as resinas podem ser de duas ordens: trocadoras de cátions ou de ânions. Aminoácidos são geralmente separados em colunas de troca de cátions, preenchidas com resina poliestirênica sulfonada, equilibrada previamente com uma solução de hidróxido de sódio. Esta forma sódica da resina tem a finalidade de carregar os grupos sulfônicos dos aminoácidos com  $\text{Na}^+$ . Os aminoácidos possuem naturalmente uma carga efetiva positiva, assim, quando estão em solução ácida (pH 3,0) em uma coluna, eles passam a deslocar os íons  $\text{Na}^+$  de suas ligações com a resina, ficando assim eletricamente fixos à mesma. Cada aminoácido é peculiar em suas características químicas; assim, diferentes aminoácidos passam a ligar-se com forças eletrostáticas também diferentes, às moléculas da resina. Quando se faz fluir cloreto de sódio pela coluna, ao mesmo tempo em que se eleva o seu pH, há um deslocamento (um desprendimento) dos aminoácidos da resina da coluna. Assim, um determinado aminoácido irá se desprender da coluna antes do que outro, conseqüentemente saindo da coluna mais precocemente do que o outro, em função direta de suas características eletrostáticas. O ácido glutâmico, que é o mais aniônico dos aminoácidos, desloca-se primeiramente pela coluna, ao passo que o mais catiônico dos

aminoácidos, a lisina, aparece em último lugar a deixar a coluna. Analisando-se inúmeras pequenas frações da solução que deixa a coluna, o eluato, e promovendo a sua reação com a fluorescamina, pode-se determinar cada um dos aminoácidos contidos na solução, considerando-se o tempo que cada um permaneceu na coluna, ou, em outras palavras, o tempo que cada um levou para se deslocar pela coluna. Ao término da avaliação de uma amostra de um hidrolisado protéico, obtém-se um gráfico contendo vários picos seqüenciais: cada um destes picos corresponde a um aminoácido específico. A identificação individual do aminoácido se dará pela comparação do tempo de retenção na coluna apresentado pela solução-padrão conhecida. JACKSON (1956) apud SAMEJIMA et al. (1976) foi o primeiro pesquisador a desenvolver o princípio de separação em colunas resinadas.

Com a finalidade de reduzir o tempo de análise de cada amostra e otimizar o processo, as colunas de troca iônica disponíveis são curtas e os tampões de eluição são forçados a por elas passarem com alta pressão. Os antigos analisadores de aminoácidos necessitavam de tempos de análise que variavam de 4 a 7 horas por amostra. GEORGIADIS e COFFEY (1973) mantém o tempo de análise por amostra em limites razoáveis, variando apenas o fluxo de eluição em coluna de aço inoxidável. Segundo estes mesmos autores, uma opção seria o uso de soluções eluentes de alta força iônica, porém durante o processamento de aminoácidos mediante o uso de fluorescamina em acetona, estes não podem ser utilizados por ocorrer a precipitação indesejada de sais. Assim, dispõe-se atualmente de sofisticados equipamentos de cromatografia líquida de alta pressão (**High-Pressure Liquid Chromatography - HPLC**), capazes de realizarem a análise de cada amostra em 5 a 30 minutos.

A unidade de tempo adotada pelo integrador usado neste estudo é definida em unidades relativas centesimais, sem relação com a mensuração de tempo cronométrico (minutos). Da mesma forma, a definição da área do gráfico de leitura impresso pelo integrador, é dada em unidades relativas e não em milímetros quadrados ou medida semelhante. A estimativa do tempo dispensado para a realização das análises foi realizada mediante uso de cronômetro comum.

Neste estudo, o tempo cronométrico médio dispensado para a análise de cada amostra, individualmente, foi de aproximadamente 6 minutos, não se observando a liberação de nenhum fluoróforo da coluna a partir deste tempo até

o tempo de 20 minutos. Como a coluna de análise não foi substituída durante todo o procedimento de leituras, na hipótese teórica de haver substâncias de liberação muito mais tardia, observar-se-ia no decorrer da análise seqüencial das amostras o aparecimento de picos de leitura em tempos relativos atípicos. Não observou-se no decorrer deste estudo o surgimento de nenhum pico de leitura atípico, que pudesse sinalizar a presença de impureza ou contaminação na análise.

### 5.5.2 Derivação pré-colunar

No presente estudo realizou-se a derivação pré-colunar da amina primária, originada pela descarboxilação oxidativa da hidroxiprolina, com fluorescamina. FELIX e TERKELSEN (1973a); GEORGIADIS e COFFEY (1973); e FELIX, TOOME, De BERNARDO e WEIGELE (1975) realizam a derivação pós-colunar da hidroxiprolina mediante um sistema complexo de bombas injetoras. Segundo BIDLINGMEYER, COHEN e TARVIN (1984) a derivação pré-colunar é mais eficiente e necessita de equipamentos mais simples do que a derivação pós-colunar. Este procedimento também é utilizado por McHUGH, SANDMANN e HANEY (1976); SAMEJIMA et al. (1976); LINDROTH e MOPPER (1979) em estudo com *o*-phtalaldialdeído; INGLES e GALLIMORE (1985); e HILL, WALTERS, WILSON e STUART (1979) os quais realizaram estudo comparativo entre a eficiência de ninidrina, ninidrina mais *o*-phenilacetaldeído, fluorescamina ou *o*-phtalaldialdeído mais mercaptoetanol na separação de aminoácidos. Neste estudo, a realização da derivação pré-colunar mostrou-se efetiva e de fácil execução, permitindo com que as leituras fluorométricas fossem realizadas num equipamento de HPLC com apenas uma bomba.

### 5.5.3 Fluorescamina e aminas secundárias

Segundo SEILER (1977), a importância dos derivados fluorogênicos na

determinação quantitativa de aminoácidos reside na sua grande sensibilidade de detecção, bem como no limite amplo de linearidade entre a quantidade da substância e a intensidade da fluorescência gerada.

A sistematização da análise fluorimétrica de aminoácidos primários recebeu um incentivo importante com os trabalhos de ROTH (1971), que demonstrou que a reação do *o*-phtalaldialdeído com aminoácidos, em meio alcalino e na presença de substâncias redutoras, dá origem a componentes fluorescentes. Até esta data, as reações quantitativas para aminoácidos envolviam a reação com a ninidrina. Nesta mesma época, coube a WEIGELE et al. (1972a) a demonstração da estrutura dos componentes fluorescentes resultantes da reação da ninidrina com aminas primárias. Posteriormente WEIGELE, DeBERNARDO, TENGI e LEIMGRUBER (1972b) demonstraram que as propriedades oxidantes da ninidrina podem ser responsáveis por efeitos adversos limitantes para estas reações, e apresentaram uma nova substância fluorescente para reações com aminas primárias, a espirolactona 10. Posteriormente, UDENFRIEND, STEIN, BÖHLEN, DAIRMAN, LEIMGRUBER e WEIGELE (1972) denominaram esta substância de fluorescamina e demonstraram que os fluoróforos formados pela sua reação com aminas primárias são estáveis por várias horas. Um ano mais tarde, WEIGELE et al. (1973) deram um passo importante, ampliando o espectro de reação da fluorescamina para aminoácidos secundários, ao demonstrarem que estes podem ser transformados em aminas primárias pela descarboxilação oxidativa com agentes oxidantes, como por exemplo a *N*-clorosuccinamida.

McHUGH et al. (1976) ressaltam que a forma veloz com que se processa a reação fluorimétrica da fluorescamina com aminas, à temperatura ambiente e originando compostos altamente fluorescentes, é responsável pela grande aceitação desta substância na análise bioquímica. NAKAMURA e PISANO (1976) aplicaram a fluorescamina às reações de fluorescência em finas placas. Coube a SAMEJIMA et al. (1976) a demonstração da aplicação da fluorescamina na separação de aminoácidos através de sistema de cromatografia líquida de alta velocidade, analisando amostras biológicas procedentes de fígado de ratos, soro humano e urina humana. SCHILTZ, SCHNACKERZ e GRACY (1977) demonstraram a utilidade da fluorescamina na análise de aminoácidos e peptídeos em cromatografia de finas placas, comparando-a à ninidrina e ao *o*-phtalaldialdeído.

A fluorescamina é hidrossolúvel e deve ser diluída em solvente não hidroxílico (DeBERNARDO et al., 1974). Neste estudo realizou-se a diluição da fluorescamina em acetona, com preconizado por GEORGIADIS e COFFEY (1973). DeBERNARDO et al. (1974) ressaltam que a acetona possui uma quantidade mínima de impurezas e demonstraram, por outro lado, que a fluorescamina diluída em dioxane é menos estável.

#### 5.5.4 Procedimentos bioquímicos para a fluorimetria

Segundo LEHNINGER (1976), os aminoácidos possuem três grupamentos funcionais, através dos quais ocorrem as reações orgânicas: os grupos carboxílicos, os  $\alpha$ -aminogrupos e os grupos funcionais. As reações dos grupamentos carboxílicos levam à formação de amidas, ésteres e ácidos halogênicos. O  $\alpha$ -aminogrupos pode ser acilado, e é comumente utilizado para as reações de quantificação colorimétricas, como com a ninidrina por exemplo. Finalmente, os grupos funcionais (grupos R-) podem também originar reações colorimétricas, porém estas muito menos intensas do que as reações com o  $\alpha$ -aminogrupos. A hidroxiprolina, assim como a prolina, não possuem o  $\alpha$ -aminogrupos (Figura 12).

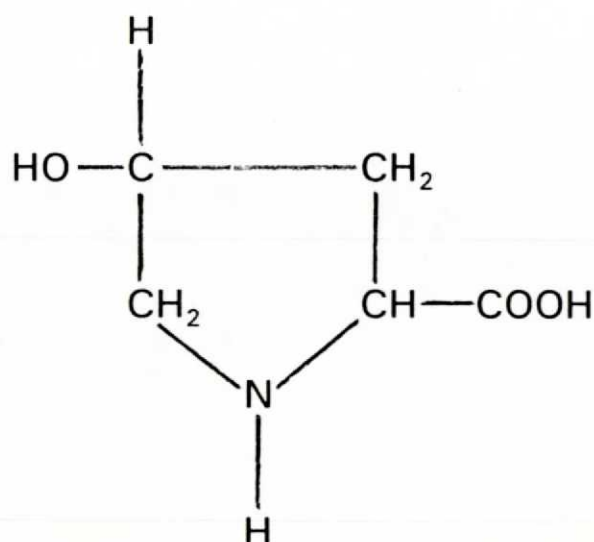


Figura 12 - Fórmula estrutural da hidroxiprolina.

Segundo SEILER (1977) e CASTELL, CERVERA e MARCO (1979) a fluorescamina reage com componentes que possuem grupamentos funcionais nucleofílicos (aminas primárias e secundárias, álcoois, água, etc.), porém apenas aminas primárias formam produtos fluorescentes com a fluorescamina. A etapa da transformação da hidroxiprolina em uma amina primária pode ser obtida pela sua descarboxilação oxidativa mediante uso de agentes halogenantes (WEIGELE et al., 1973) e é necessária para a reação produtora de fluorescência com a fluorescamina. Discutir-se-á, na seqüência, a descarboxilação oxidativa e a reação fluorimétrica.

#### 5.5.4.1 Descarboxilação oxidativa

WEIGELE et al. (1973) foram os primeiros estudiosos a demonstrarem que a oxidação de soluções ácidas de aminoácidos secundários (prolina e hidroxiprolina) pela *N*-clorosuccinamida (ou outras fontes de agentes halogenantes) propicia que as mesmas reajam com a fluorescamina para produzirem intensa fluorescência, com excitação a 390nm e emissão a 475nm.

A condição básica para que a descarboxilação oxidativa ocorra é o meio ácido. WEIGELE et al. (1973) referem apenas a necessidade do meio ácido, sem menção ao pH ideal. Para FELIX e TERKELSEN (1973a) a oxidação da prolina e da hidroxiprolina ocorre melhor em pH 2. Neste estudo observou-se a manutenção de um pH entre 2 e 2,4. A solução de *N*-clorosuccinamida deve ser preparada diariamente, por ocorrer sua lenta decomposição em solução aquosa (FELIX e TERKELSEN, 1973a).

Utilizou-se neste estudo a concentração da solução de *N*-clorosuccinamida conforme estabelecida por FELIX e TERKELSEN (1973a,b) como sendo  $1,0 \times 10^{-4}$ M em solução a 0,05M de HCl.

#### 5.5.4.2 Reação fluorimétrica

DeBERNARDO, WEIGELE, TOOME, MANHART e LEIMGRUBER (1974) realizaram uma revisão criteriosa das variáveis que podem interferir sobre a reação formadora de fluorescência da fluorescamina. Para os autores, os solventes hidrofílicos mais apropriados para a diluição da fluorescamina são a acetona e o dioxane, referindo a importância do pH do meio, o qual deve estar entre 8 e 9,5. Segundo DeBERNARDO et al. (1974) e CASTELL et al. (1979), pH mais baixos levam à protonação da amina e pH mais elevados causam hidrólise da reação. SEILER (1977) concorda com estes autores, que para a reação fluorescente com aminas alifáticas, a fluorescamina necessita de um pH entre 8 e 8,5 e com excitação a 390nm e emissão a 475nm. Para FROEHLICH e CUNNINGHAM o pH ideal é 8,5; já INGLES e GALLIMORE (1985) admitem um entre pH 8 e 9; e para FELIX e TERKELSEN (1973a) e FELIX et al. (1975) o pH ideal é entre 8,5 e 9. Observa-se em todos a preocupação em manter-se um pH alcalino. CASTELL et al. (1979) ressaltam a importância do pH e sugerem que em pH abaixo de 6 ocorre a formação do anel lactona, o qual será responsável pela perda de fluorescência da reação. Para estes autores, a reação de fluorescência pode ocorrer entre pH 6 e 11, contudo concordam com INGLES e GALLIMORE (1985) em que o pH ótimo situa-se próximo a 8.

Neste estudo observou-se que variações pequenas de pH próximos a 7,0 ou a 10,0 diminuem a formação da fluorescência esperada. Da mesma forma observou-se que o volume de 1 ml de hidrolisado apresentava, em função de sua grande concentração em hidroxiprolina, uma fluorescência final muito elevada, excedendo a capacidade de leitura do espectrofluorômetro. A busca de uma solução para este problema foi concentrada inicialmente em fazer-se diluições sucessivas dos hidrolisados das amostras em estudo, porém esta condição passou a introduzir inúmeras variáveis de cálculo e análise. Finalmente, observou-se que um volume de 0,5 ml de hidrolisado da amostra em estudo, apresentou, nas condições do estudo, uma intensidade de fluorescência facilmente mensurável. Após esta constatação, foi necessário que se refizesse toda a curva de calibração das soluções padrão de hidroxiprolina, para que as condições de estudo fossem mantidas homogêneas.

O tempo total dispensado para a determinação fluorométrica das taxas de hidroxiprolina individuais das amostras foi de aproximadamente 14 horas. O preparo dos reagentes e a derivação pré-colunar das amostras ocupou a menor fração de tempo, aproximadamente 2 horas. A leitura e o registro gráfico de cada amostra, individualmente, consumiu a maior fração do tempo, ou seja, 12 horas. Deve-se ressaltar que parte deste tempo foi gasto no equilíbrio da coluna pela passagem da fase móvel, isoladamente, até a estabilidade das condições de cromatografia; outra fração de tempo considerável foi aplicada na elaboração de uma curva de calibração adequada.

#### 5.5.6 Taxas de hidroxiprolina tecidual

Com a finalidade de diferenciar-se o tempo de saída dos fluoróforos da coluna, considerando-se a presença de eventuais outros aminoácidos ou impurezas, ou mesmo fluorescência devida a substâncias brancas, procedeu-se à análise da solução branca, de água destilada, da solução de glicina e da solução pura de fluorescamina em acetona. A solução branca apresentou uma saída da coluna num tempo relativo de 3,283; a água destilada apresentou pico gráfico no tempo relativo de 1,697, com área de 8.449; o tempo relativo de saída da glicina foi de 2,311, com um pico principal correspondente a 93,89% de uma área relativa de 3.383.346; finalmente, a leitura fluorométrica da solução pura de fluorescamina apresentou seus picos gráficos no tempo relativo de 2,268 a 2,800. Os tempos de saída da coluna destas soluções diferem nitidamente dos tempos de saída das amostras teciduais contendo a hidroxiprolina, que se cituaram entre 3,200 e 3,315 unidades relativas de tempo. CASTELL et al. (1979) observaram fluorescência mínima em soluções brancas, fato que vem a determinar o limite de sensibilidade da técnica. Os autores encontraram, em ordem crescente, fluorescência em soluções de água, tampões e acetona, porém ressaltam que segundo análises comparativas, esta fluorescência dos brancos é menos intensa do que quando se utiliza o *o*-phtalaldialdeído. No presente estudo os resultados obtidos para a solução branca concordam com CASTELL et al. (1979).

Obteve-se uma taxa de hidroxiprolina média de 4,281 mg/g de tecido

(desvio-padrão de 2,480) para as análises processadas a partir de amostras teciduais hidratadas (bh), pela técnica fluorimétrica. A amostra definida como pool (19bh) apresentou taxa de hidroxiprolina tecidual equivalente a 2,622 mg/g de tecido, considerando-se como peso da amostra tecidual a média dos pesos de todas as amostras teciduais hidratadas (média de 1bh a 18bh). A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras hidratadas em relação à amostragem hidratada (19bh) é de 61,24%. Assim, ambos os resultados são diferentes e não se pode aceitar a hipótese de que a amostra em pool substitui a determinação das taxas de hidroxiprolina individuais.

Para as amostras teciduais processadas a partir de seu estado desidratado, pela técnica fluorimétrica, encontrou-se o valor médio de 12,018 mg/g de tecido, com desvio-padrão de 5,767. A amostra processada como pool (19bd) apresentou taxa de hidroxiprolina média de 13,500 mg/g de tecido, considerando-se como peso da amostra a média dos pesos individuais das amostras desidratadas (média de 1bd a 18bd). A correlação entre a taxa de hidroxiprolina média encontrada a partir das dosagens individuais das amostras desidratadas em relação à amostragem desidratada (19bd) é de 112,33%. Os resultados da média das amostras, individualmente, e do pool de amostras, apresentam uma diferença maior do que 5,00% entre si e não podem ser considerados semelhantes.

## **5.6 Análise regressiva dos dados**

Na análise regressiva, avaliando-se os pesos hidratado e desidratado das amostras teciduais submetidas à desidratação, pressupõe-se uma correlação entre a taxa de hidroxiprolina tecidual encontrada e o estado de hidratação. Isto é, uma amostra tecidual desidratada possuirá uma taxa de hidroxiprolina tecidual por miligramas de peso maior do que a mesma amostra avaliada em estado hidratado, na mesma proporção da sua variação de peso durante o processo de desidratação. Para a determinação destes índices, pode-se utilizar os resultados individuais de uma das duas técnicas, fotolorimétrica ou fluorimétrica, como descrito no ítem 3.6.a. Neste estudo utilizou-se os resultados da técnica fotolorimétrica.

O índice de regressão ao peso desidratado das amostras hidratadas (IRd) correlaciona as taxas de hidroxiprolina tecidual encontradas para uma amostra tecidual de mesma origem, e avaliada nos estados hidratado e desidratado. O valor final deste índice, deve aproximar-se da porcentagem do peso desidratado da amostra tecidual (%d) processada na forma desidratada. O valor médio do IRd ( $IRd_m$ ) encontrado na técnica fotolorimétrica foi de 31,57%, em comparação com uma média da porcentagem de peso desidratado das amostras teciduais ( $\%d_m$ ) de 30,02%. O índice de regressão à taxa de hidratação das amostras desidratadas (IRh) complementa estes resultados, apresentando-os da ótica do tecido desidratado. Obteve-se um índice de regressão à taxa de hidratação das amostras teciduais desidratadas médio ( $IRh_m$ ) de 68,42%, para uma taxa média da porcentagem de hidratação das amostras teciduais ( $\%h_m$ ) de 69,98%. Estes resultados demonstram em primeiro lugar, que o processo de desidratação utilizado neste estudo permitiu a obtenção de uma retirada efetiva da taxa hídrica das amostras, e em segundo lugar estabelece uma correlação entre os resultados obtidos em ambos os estados de hidratação, isto é, a diferença na taxa de hidroxiprolina tecidual encontrada nas amostras teciduais hidratadas e desidratadas é proporcional à taxa de hidratação e desidratação das mesmas.

O índice de correlação (IC) permite calcular a aproximação (em porcentagem) dos resultados dos valores das taxas de hidroxiprolina tecidual das amostras hidratadas e desidratadas. O IC calculado foi de 102,26%, valor este que se aproxima, em menos do que 5,00%, do valor ideal que seria 100%, demonstrando a correlação entre estes resultados.

Finalmente, transferindo-se o valor da taxa de hidroxiprolina tecidual encontrada em cada uma das técnicas para uma regra de três simples, considerando-se a porcentagem do peso desidratado médio das amostras ( $\%d_m$ ), pode-se calcular a taxa de hidroxiprolina tecidual média esperada para as amostras desidratadas. Este cálculo apresentou um valor de aproximação de 90,23% na técnica fotolorimétrica e de 116,68% na técnica fluorimétrica. Estes resultados demonstram que a estimativa matemática destes dados é inferior em significância, do que a determinação bioquímica individual dos valores, pois em ambas as técnicas esta diferença foi maior do que 5,00%.

Uma avaliação global destes índices e dados regressivos permite dizer que: há uma correlação entre a taxa de hidratação ou desidratação de uma

amostra tecidual e a taxa de hidroxiprolina tecidual encontrada em ambos os estados, em função da variação de peso da amostra, como demonstrado pelo IC. Por outro lado, estes índices não permitem que se realize a extrapolação de resultados esperados, sinalizando a importância da determinação individual dos valores. Não encontrou-se na literatura estudada menção a estas correlações.

### **5.7 Análise comparativa das taxas de hidroxiprolina tecidual em ambas as técnicas estudadas**

A análise comparativa entre os valores obtidos para a taxa de hidroxiprolina tecidual para as amostras hidratadas e desidratadas processadas pelas técnicas fotolorimétrica e fluorimétrica não apresentou diferenças significantes. A taxa de hidroxiprolina das amostras hidratadas foi de 3,303 mg/g de tecido na técnica fotolorimétrica e de 4,281 mg/g de tecido na técnica fluorimétrica ( $p = 0,178$ ). Da mesma forma, a taxa de hidroxiprolina não diferiu significativamente entre as duas técnicas estudadas, para as amostras teciduais desidratadas ( $p = 0,488$ ), sendo 12,193 mg/g de tecido na técnica fotolorimétrica e 12,018 mg/g de tecido na técnica fluorimétrica. Assim, ficou evidente de que entre as duas técnicas estudadas houve uma equivalência satisfatória dos resultados e não se observou superioridade de uma das técnicas em relação à outra quanto aos resultados finais. Não encontrou-se na literatura estudada, estudo comparativo semelhante.

Finalmente, este estudo abre a perspectiva de continuidade, na busca de técnicas mais simples e menos dispendiosas em tempo, para a determinação da taxa de hidroxiprolina tecidual. Neste sentido, há relatos na literatura de substâncias formadoras de fluorescência que reagem primariamente e seletivamente com aminas secundárias (JONES, HOMAN, FAVELL e HITCHCOCK, 1986). Da mesma forma, a busca da otimização das condições de cromatografia poderá estender a aplicabilidade e a praticidade desta sofisticada técnica (STRATFORD, WATFA, MURRAY e MARTIN, 1990). As diversas opiniões expressas na literatura específica quanto ao estado de hidratação das

amostras teciduais, merecem uma reavaliação criteriosa mediante o estudo de amostras cicatriciais. Uma análise satisfatória para a obtenção mais objetiva para esta questão, deverá incluir parâmetros de quantificação de edema tissular. Isto poderá ser realizado associando-se uma etapa de determinação da transudação de albumina no sítio cicatricial, como preconizado por CORVALÁN (1994).

*Wohl hat die moderne Wissenschaft ein hohes Recht, sich ein für ihre Zwecke restlos verwendbares Verständigungsmedium zu schaffen, aber sie weiß, daß daraus nie Wort, das gesprochen wird, entstehen kann.* (Certamente a ciência moderna tem o direito de criar um meio de comunicação de aplicação ilimitada para seus propósitos, porém ela sabe, que desta comunicação jamais poderá surgir palavra a ser falada). *Martin Buber, 1878-1965.*

## 6 CONCLUSÕES

Sobre a execução das técnicas bioquímicas:

1. A análise comparativa das curvas-padrão, através do cálculo de seus coeficientes de linearidade, demonstrou equivalência entre as técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica, com respeito à relação linear entre os valores de leitura e concentração das soluções-padrão.

2. O tempo necessário para a execução dos procedimentos bioquímicos foi maior na técnica fluorimétrica. Nesta técnica, o pico de leitura relativo à hidroxiprolina surgiu no integrador no tempo relativo médio de 3,2584 unidades arbitrárias.

Sobre os resultados das concentrações de hidroxiprolina obtidas:

3. As taxas de hidroxiprolina tecidual encontrados nas amostras hidratadas foi semelhante entre as duas técnicas estudadas ( $p = 0,178$ ). Da mesma forma, não houve diferença significativa nas taxas de hidroxiprolina tecidual das amostras desidratadas, em ambas as técnicas ( $p = 0,488$ ).

4. A relação da taxa de hidroxiprolina entre as amostras hidratadas e desidratadas foi proporcional à taxa de hidratação ou desidratação das amostras (Índice de Correlação = 102,26%).

5. A análise de um pool das amostras não se equivaleu à análise individual das mesmas.

### Sobre a elaboração da análise final:

6. Considerando-se a praticidade na execução dos procedimentos bioquímicos, a principal desvantagem da técnica fotolorimétrica foi o grande número de etapas bioquímicas e a manipulação de grande volume de reagentes e tubos de vidro. Na técnica fluorimétrica a principal desvantagem foi o tempo gasto para a realização das leituras e a necessidade de reagentes e equipamentos sofisticados.

7. Ambas as técnicas demonstraram as mesmas características de sensibilidade. Quanto à execução, a técnica fotolorimétrica demonstrou maior simplicidade na realização da leitura final, sendo a mais indicada para o uso em laboratório convencional de bioquímica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELELI, A.Y.; BURINI, R.C.; OLIVEIRA, J.E.D. Padronização da metodologia para determinação das frações da hidroxiprolina na urina. **Rev. Bars. Pat. Clín.**, Rio de Janeiro, v.18, n.5, p.124-127, 1982.
- BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxiprolina. **Anal. Chem.**, Washington, v.35, n.12, p.1961-1965, 1963.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.336, p.93-104, 1984.
- BLUMENKRANTZ, N.; HANSEN, G.A. Methods for analysis of connective-tissue macromolecules by determination of ceratin constituents. **Methods of Biochemical Analysis**, New York, v.24, p.39-91, 1977.
- BUTCHER, E.C.; LOWRY, O.H. Measurement of nanogram quantities of protein by hydrolysis followed by reaction with orthophthalaldehyde or determination of glutamate. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.76, p.502-523, 1976.
- CASTELL, J.V.; CERVERA, M.; MARCO, R. A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A reexamination of the conditions of reaction. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.99, p.379-91, 1979.
- CORVALÁN, Ana Cristina Bordón de. **Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para a determinação de azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos Wistar**. Curitiba, 1994. Tese (Mesdrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

- CRONIN, K.; JACKSON, D.S.; DUNPHY, J.E. Changing bursting strenght and collagen content of the healing colon. **Surg. Gynecol. & Obstet.**, Chicago, v.126, p.747-753, abr. 1968.
- CZECZKO, Nicolau Gregori. **Estudo comparativo entre as anastomoses colorretais mecânicas com grampeador e com anel biofragmentável no reto extraperitoneal de cães.** Curitiba, 1992. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- DAKIN, H.D. Amino-acids of gelatin. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.44, p.499-529, 1920.
- De BERNARDO, S.; WEIGELE, M.; TOOME, V.; MANHART, K.; LEIMGRUBER, W. Studies on the reaction of fluorecamine with primary amines. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.163, p.390-399, 1974.
- DEBUS, Eike Sebastian. **Untersuchungen in vivo zur Wirkung der gezielten Minderdurchblutung und Nahtmaterialimplantation auf den Kollagenstoffwechsel im Kolon des Kaninchens.** Kiel, 1989. Dissertação (Doutorado em Medicina) - Abteilung Allgemeine Chirurgie im Zentrum Operative Medizin I, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- DIETZ, Ulrich Andreas. **Estudo da taxa de hidroxiprolina tecidual nos diversos segmentos do canal alimentar normal do cão pelo método fotocolorimétrico utilizando o reativo de Ehrlich.** Curitiba, 1993. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- FELIX, A.M. & TERKELSEN, G. Determination of hydroxiproline in fluorometric amino acid analysis with fluoresceine. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.56, p.610-5, 1973a.
- FELIX, A.M. & TERKELSEN, G. Total fluorometric amino acid analysis using fluorecamine. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.157, p.177-82, 1973b.
- FELIX, A.M.; TOOME, V.; De BERNARDO, S.; WEIGELE, M. Colorimetric amino acid analysis using fluorecamine. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.168, p.601-8, 1975.
- FROELICH, P.M. & CUNNINGHAM, T.D. The enhancement of the fluorescence of fluorecamine derivates in mixed dimethylsulfoxide-water solvents. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.84, p.427-30, 1976.

- GEORGIADIS, A.G. & COFFEY, J.W. Single column analysis of amino acids in protein hydrolyses utilizing the fluorescamine reaction. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.56, p.121-8, 1973.
- GRUNBAUM, B.W.; GLICK, D. Studies in histochemistry. XLV. Determination of hydroxyproline in microgram amounts of tissue. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.65, p.260-7, 1956.
- HILL, D.W.; WALTERS, F.H.; WILSON, T.D.; STUART, J.D. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. **Anal. Chem.**, Washington, v.51, n.8, p.1338-41, 1979.
- IBBOTT, F.A. Amino acids and related substances. In: HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMANN, J.W. **Clinical Chemistry - Principles and Technics**. 2nd. ed., New York, Harper & Row Publishers, 1974. p. 608-14.
- INGLES, D.L. & GALLIMORE, D. High-performance liquid chromatography of fluorescamine-labeled amines in acid solvents. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.325, p.346-52, 1985.
- JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses: The effect of suture technic on collagen concentrations in the colonic wall. **Am. J. Surg.**, New York, v.135, p.333-40, mar. 1978.
- JONES, A.D.; HOMAN, A.C.; FAVELL, D.J.; HITCHCOCK, C.H.S. High-performance liquid chromatographic column switching method for the determination of hydroxyproline in meat and meat products. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.353, p.153-61, 1986.
- KIVIRIKKO, K.I.; LAITINEN, O.; PROCKOP, D.J. Modification of a specific assay for hydroxyproline in urine. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.19, p.249-55, 1967.
- KORUDA, M.J.; ROLANDELLI, R.H. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. **J. Surg. Res.**, New York, v.48, n.5, p.504-515, 1990.
- LANG, K. Eine Mikromethode zur Bestimmung des Prolins und des Oxyprolins. **Z. phys. Chem.**, Wiesbaden, v.219, p.148-154, 1933.
- LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. São Paulo, Edgard Blücher LTDA, 1976. p.110-8.

- LINDROTH, P. & MOPPER, K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. **Anal. Chem.**, Washington, v.51, n.11, p.1667-74, 1979.
- MARTENS, M.F.W.C. & HENDRICKS, Th. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. **Gut**, London, v.32, p.1482-1487, 1991.
- McFARLANE, W.D.; GUEST, G.H. A new colorimetric method for the determination of hydroxyproline and its application to gelatin hydrolizates. **Can. J. Res.**, Ottawa, v.17, sec.B, p.139-142, 1939.
- McHUGH, W.; SANDMANN, R.A.; HANEY, W.G. Characterization of selected fluorescamine-amino acid reaction products by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.124, p.376-80, 1976.
- MOORE, S.; SPACKMAN, D.H.; STEIN, W.H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **Anal. Chem.**, Washington, v.30, n.7, p.1185-90, 1958.
- NAKAMURA, H. & PISANO, J.J. Detection of compounds with primary amino groups on thin-layer plates by dipping in a fluorescamine solution. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.121, p.79-81, 1976.
- NARESSE, L.E.; LUCCHIARI, P.H.; ANGELELI, A.Y.; BURINI, R.C.; RODRIGUES, M.A.M.; CURI, P.R.; KOBAYASI, S. Estudo comparativo de anastomoses no intestino delgado de cão: estudos da força de ruptura, hidroxiprolina tecidual e anatomopatológico. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.3, p.106-112, out./dez. 1988.
- NEUMAN, R.E.; LOGAN, M.A. The determination of collagen and elastin in tissues. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.186, p.549-556, 1950a.
- PIKKARAINEN, J. The molecular structures of vertebrate skin collagens. A comparative study. **Acta Phys. Scand.**, Stockholm, Suppl. 309, n.23, p.4-63, 1968.
- POLONIO, Benur. **Estudo comparativo entre as anastomoses colorretais em plano único extramucoso e com anel biofragmentável em reto extraperitoneal de cães.** São Paulo, 1992. Tese (Mestrado) - Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Escola Paulista de Medicina.

- ROTH, M. Fluorescence reaction for amino acids. **Anal. Chem.**, Washington, v.43, n.7, p.880-2, 1971.
- PROCKOP, D.J.; UDENFRIEND, S. A specific method for the analysis of Hydroxyproline in Tissues and urine. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.1, p.228-239, 1960.
- RADHAKRISHNAN, A.N.; MEISTER, A. Conversion of hydroxyproline to pyrrole-2-carboxylic acid. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.226, p.559-571, 1957.
- SAMEJIMA, K.; KAWASE, M.; SAKAMOTO, S.; OKADA, M.; ENDO, Y. A sensitive fluorometric method for the determination of aliphatic diamines and polyamines in biological materials by high-speed liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.76, p.392-406, 1976.
- SCHILTZ, E.; SCHNACKERZ, K.D.; GRACY, R.W. Comparison of ninhydrin, fluorescamine, and *o*-phthaldialdehyde for the detection of amino acids and peptides and their effects on the recovery and composition of peptides from thin-layer fingerprints. **Anal. Biochem.**, Duluth, v.79, p.33-41, 1977.
- SEILER, N. Chromatography of biogenic amines. I. Generally applicable separation and detection methods. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.143 p.221-46, 1977.
- STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.18, p.267-273, 1967.
- STRATFORD, M.R.L.; WATFA, R.R.; MURRAY, J.C.; MARTIN, S.G. Determination of collagen and protein turnover by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.526, p.383-95, 1990.
- UDENFRIEND, S.; STEIN, S.; BÖHLEN, P.; DAIRMAN, W.; LEIMGRUBER, W.; WEIGELE, M. Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. **Science**, Washington, v.178, n.11, p.871-72, 1972.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos**. 2ª edição, Curitiba, Editora da Universidade Federal do Paraná, 1992. 8v.:il.

- WAIDSCHMIDT-LEITZ, E. e AKABORI, S. Bestimmung von Oxyprolin. Zur Methode nach K. Lang. **Z. phys. Chem.**, Wiesbaden, v.224, p.187-192, 1934.
- WEIGELE, M.; BLOUND, J.F.; TENGI, J.P.; CZAJKOWSKI, R.C.; LEIMGRUBER, W. The fluorogenic ninhydrin reaction. Structure of the fluorescent principle. **J. Am. Chem. Soc.**, v.94, n.11, p.4052-4, 1972a.
- WEIGELE, M.; DeBERNARDO, S.L.; TENGI, J.O.; LEIMGRUBER, W. A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. **J. Am. Chem. Soc.**, v.94, n.16, p.5927-8, 1972b.
- WEIGELE, M.; DeBERNARDO, S.L.; LEIMGRUBER, W. Fluorometric assay of secondary amino acids. **Biochem. Biophys. Res. Comun.**, v.50, n.2, p.352-6, 1973.
- WOESSNER Jr., J.F. The determination of hydroxiprolin in tissues and protein samples containing small proportions of this imino acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.93, p.440-447, 1961.