

UNIVERSIDADE ESTADUAL, DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

*Dissertação de Mestrado*

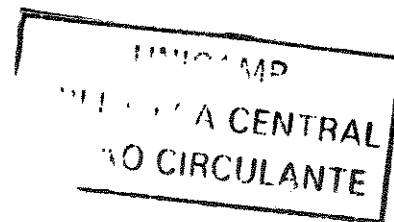
**USO DA ELETROFORESE CAPILAR NO ESTUDO DOS  
PEPTÍDEOS URINÁRIOS E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM A  
DIGESTÃO PROTÉICA**

**Lucía de la Hoz Urrejola**  
**Química**

*Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, PhD.*

*Orientador*

**Campinas-SP**  
**2001**



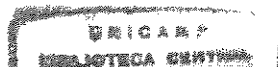
**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Lucía del Carmen de la Hoz Urrejola**, aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de outubro de 2001.

Campinas, 24 de outubro de 2001

  
Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán  
Presidente da Banca

00201352



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	H856u
V.	Ex.
TOMBO BC/	47151
PROC.	16-837/02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12-01-2002
N.º CPD	

CM00162415-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

H856u Hoz Urrejola, Lucía de la  
 Uso da eletroforese capilar no estudo dos peptídeos urinários e sua possível relação com a digestão protéica / Lucía de la Hoz Urrejola. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Jaime Amaya-Farfán  
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Absorção. 2. Peptídeos. 3. Dieta – Comportamento.  
 I. Amaya-Farfán, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

*Lucía de la Hoz Urrejola*

**USO DA ELETROFORESE CAPILAR NO ESTUDO DOS  
PEPTÍDEOS URINÁRIOS E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM A  
DIGESTÃO PROTÉICA**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em  
Alimentos e Nutrição*

*Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, PhD.*

*Orientador*

**Campinas -SP  
2001**

**BANCA EXAMINADORA**



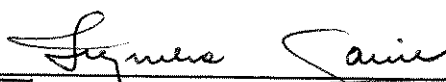
---

**Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, PhD.**  
Universidade Estadual de Campinas  
Orientador



---

**Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares**  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro



---

**Profa. Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva**  
Instituto Agronômico de Campinas  
Membro

---

**Profa. Dra. Flávia Maria Netto**  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro

*Em especial, dedico:*

**Às**

**MINHAS FILHAS**

*Por fazer com que tudo valga a pena*

**À**

**CRIANÇA AUTISTA**

*Que no seu mundo imaginário vive a  
sensação de uma realidade*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán, pela orientação e apoio constante que possibilitou meu retorno ao mundo da Ciência.

Às professoras membros da banca examinadora pelas acertadas e valiosas sugestões que contribuíram para o aprimoramento desta tese.

Ao Dr. César de Moraes, pela sua intervenção na seleção das crianças autistas que permitiu a obtenção de material para estudo.

Aos funcionários da Biblioteca da FEA, Creuza Nomura, Cláudia Romano e ao secretário de Pós-Graduação, Cosme Perota, pela especial atenção dispensada.

Aos funcionários e amigos do DEPAN, Chico, Carla, Cidinha, Fátima, Iná, pela disposição e colaboração constante.

Ao grupo de alunos do Laboratório de Fontes Protéicas, André, Beatriz, Érika, Fernanda, Flavinha, Florência, María Inés, Roberto, Vera, companheiros solidários, amigos permanentes com os quais redescobri a magia de ser estudante.

À Renata Padovani pelo tempo dispensado na discussão do tema dos autistas e pela sua colaboração na obtenção dos artigos sobre os mesmos.

Aos amigos, Lucila e Guillermo pelo constante apoio e encorajamento.

Às mães das crianças autistas pela sua disposição em colaborar e pelo exemplo de abnegação e dedicação no cuidado de seus filhos.

À minha família, Jorge, Cris, Carina e Mónica, pela compreensão, apoio e carinho.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o curso de mestrado.

## ÍNDICE

<b>Resumo.....</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Geral.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Proteínas alimentares de maior interesse.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1. Proteínas do leite.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.2. Proteínas do trigo.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Autismo.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.1. Base bioquímica do autismo.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.2. Hiperfuncionamento do sistema opióide cerebral?.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.3. Dieta-autismo.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Metabólitos urinários.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.1. Metabolismo e marcadores.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.2. Peptídeos urinários.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4. Absorção de peptídeos e proteínas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Métodos analíticos para peptídeos e outros metabólitos urinários....</b>	<b>21</b>
<b>3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....</b>	<b>21</b>
<b>3.5.2. Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE).....</b>	<b>22</b>
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Material.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.1. Amostras de urina.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.2. Reagentes e soluções para análise por HPCE.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.3. Reagentes e soluções para análise por HPLC.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Métodos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1. Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE).....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1.1. Desenvolvimento do procedimento.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2.1.2. Aplicação do procedimento.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....</b>	<b>31</b>

4.2.3. Perfil aminoacídico dos peptídeos.....	32
4.2.4. Determinação colorimétrica da creatinina.....	32
4.2.5. Análise estatística.....	32
5. Resultados e Discussão.....	33
5.1. Caracterização da urina.....	34
5.1.1. Medidas de pH urinário.....	34
5.1.2. Teor de creatinina por método colorimétrico Lab-Test.....	35
5.1.3. Análise por HPCE.....	35
5.1.3.1. Desenvolvimento do procedimento.....	35
5.1.3.2. Perfís eletroforéticos das urinas.....	44
5.1.3.3. Correlação entre os métodos para creatinina.....	54
5.1.3.4. Concentração de peptídeos urinários por HPCE.....	57
5.1.3.5. Verificação da "região peptídica" pelo aminograma....	64
5.1.4. Análise por HPLC.....	65
5.1.4.1. Perfís cromatográficos das urinas.....	65
5.1.4.2. Fracionamento por HPLC e verificação por HPCE.....	69
5.1.5. Comparação de resultados por HPCE e HPLC.....	70
5.2. Possíveis marcadores biológicos IAG e 5-HIAA.....	71
5.3. Características de outras bandas no eletroferograma.....	74
6. Conclusões.....	77
7. Referências Bibliográficas.....	80



***Resumo***

## ***Uso da eletroforese capilar no estudo dos peptídeos urinários e sua possível relação com a digestão protéica***

### ***Resumo***

O presente trabalho teve por objetivo testar a aplicabilidade da técnica de eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) no estudo dos possíveis peptídeos urinários em crianças autistas e normais. Estudos recentes têm mostrado que a (HPCE) é uma técnica alternativa e/ou complementar a outras técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na análise qualitativa e na separação de misturas de peptídeos. Baseados na técnica de HPLC, alguns autores têm proposto a hipótese de que o agravamento do quadro do comportamento autista é devido a efeito-opióide de peptídeos provenientes da dieta. Uma condição de hiperpeptidúria seria esperada na maioria das crianças autistas. Neste trabalho foram testadas diversas condições analíticas visando à obtenção dos perfis urinários por HPCE que melhor caracterizassem a presença de peptídeos. As condições analíticas mais adequadas foram assim definidas: capilar de sílica fundida de 72cm de comprimento efetivo e 75 $\mu$ m de diâmetro interno; tampão borato 50mM (pH 9,3), 20kV e 25°C e tempo de injeção de 4s. As áreas sob a curva dos picos mais representativos dentre os peptídeos nos eletroferogramas ("região peptídica") foram utilizadas para comparação com as áreas equivalentes nos cromatogramas por HPLC. Os resultados mostraram que as técnicas são comparáveis; que as quantidades de peptídeos na urina de alguns autistas estão aumentados mas, na média, não há diferenças significativas com relação aos normais. Nenhuma das técnicas apontou a presença dos peptídeos opióides esperados, que seriam a casomorfina e seus fragmentos. O sistema de detecção dos peptídeos por UV apresentou uma sensibilidade geral da ordem de 1 $\mu$ g/mL. Os dados obtidos indicam que há peptídeos presentes, mas trata-se de peptídeos pequenos, isentos de cromóforos fortes, limitando assim a sua detecção individual na urina por ambas as técnicas. Outros metabólitos urinários mais expressivos, creatinina, ácido hipúrico e ácido úrico foram

quantificados por HPCE sem qualquer dificuldade. Detectou-se nas urinas um pico, possivelmente o indolilacrilóiglicina (IAG), um marcador da permeabilidade intestinal, o qual se caracterizou pelos seus máximos de absorção no UV. A estrutura deste biomarcador, entretanto, não pôde ser confirmada por cromatografia gasosa e detecção de massa, devido à sua instabilidade no meio de separação por HPLC e à não disponibilidade comercial do padrão. Os resultados obtidos nas análises por HPCE e HPLC permitiram concluir que a hipótese de que os peptídeos opióides de origem alimentar estão envolvidos na síndrome autista, necessita ser revista, visto que, na eventualidade de eles estarem presentes na urina dos autistas, suas concentrações devem estar muito abaixo das faixas de concentração pesquisadas por nós e pelos autores que nos antecederam.

---

**Palavras-chave:** digestibilidade protéica; absorção de peptídeos; exorfinas; peptídeos bioativos; sulfotransferase; dieta e comportamento.

***Abstract***

## ***The use of capillary electrophoresis for the study of urinary peptides and their possible relevance to protein digestion***

### ***Abstract***

Through this work, an attempt was made to apply the technique of high performance zone-capillary electrophoresis (HPCE) to the study of possible urinary peptides from both autistic and normal children. Recent reports show that HPCE can be an alternate or complementary tool to high performance liquid chromatography (HPLC) in the analysis of peptide mixtures. Based on HPLC observations, researchers have proposed that the worsening of the autistic condition is related to a possible opioid effect from peptides derived from the diet. A hyperpeptiduria condition, should thus be expected from autistic children. A number of analytical parameters were tested here in order to best characterize the urinary profiles. The final electrophoretic conditions selected were: Fused silica capillary effective length, 72cm; internal diameter, 75 $\mu$ m; 50mM borate buffer (pH 9.3); 20kV at 25°C and injection time of 4s. The areas under the most representative peaks of the peptide regions were used as a criterion of comparison for the two analytical systems (electropherograms and chromatograms). Results showed that the two techniques were comparable for this purpose, and that the amounts of peptides in some of the autistic subjects were increased in relation to the normal counterparts, although the overall-sample means were not significantly different. Neither casomorphin nor its opioid fragments were detected by either of the analytical techniques. The general sensitivity of the UV detection system was of the order on 1 $\mu$ g/mL. The data gathered also indicated that the encountered peptides were of small molecular weight and free of strongly absorbing chromophores, thereby limiting their individual UV detection. Creatinine, hypuric and uric acids, major urinary metabolites, were easily quantified by HPCE. A peculiar peak, most likely the intestinal permeability biomarker indolylacryloylglycine (IAG), was found in both autistic and normal urine samples. This peak, that was quite elevated in one of the autistic

subjects, was recognized by its typical UV-absorption spectrum, but attempts to confirm the structure were unsuccessful due to its instability in the chromatographic mobile phase and the lack of commercial standards. It is concluded from our trials using both HPCE and HPLC techniques that the hypotheses about the involvement of opioid peptides of dietary origin in the autistic syndrome should be revised for if these are present in the urine, the levels ought to be much lower than previously thought.

---

**Keywords:** Protein digestibility; peptide absorption; exorphins; bioactive peptides; sulphotransferase; diet and behaviour.

## **1. Introdução**

A eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) é uma técnica que vem evoluindo consideravelmente nos últimos anos, mostrando-se como uma ferramenta analítica de grande potencialidade dada a diversidade de analitos aos quais pode ser aplicada. A sua aplicação abrange desde análises biológicas, análises em alimentos, até análises de fármacos e de drogas. Nos laboratórios clínicos, a HPCE veio substituir algumas técnicas clássicas que possuem metodologias geralmente muito laboriosas, proporcionando maior rapidez e menor custo nas análises. Recentemente, a eletroforese capilar tem chegado a ser um dos métodos mais citados para a separação de misturas de peptídeos (Novotny *et al.*, 1990).

Os peptídeos representam um grande e complexo grupo de biomoléculas que cumprem variadas funções de vital importância nos organismos vivos. Os peptídeos atuam, entre outros, como hormônios, neurotransmissores, imunomoduladores, coenzimas ou inibidores de enzimas, drogas, toxinas e antibióticos (Kasicka, 1999).

Grande interesse científico vem sendo dado aos peptídeos fisiologicamente ativos derivados das proteínas dos alimentos. Esses peptídeos são inativos quando ainda localizados dentro da seqüência da proteína precursora, mas uma vez liberados pela ação de enzimas proteolíticas, eles se tornam ativos (Korhonen, 1998).

A principal fonte conhecida de proteínas geradoras de peptídeos biologicamente ativos é o leite (Meisel & Schlimme, 1990). Os peptídeos estudados apresentam várias atividades fisiológicas como atividade opiácea, anti-hipertensiva, de imunomodulação, de bioconversão de íons metálicos ( $\text{Ca}^{++}$ ), atividade anti-trombótica e propriedades anti-bacterianas (Fiat *et al.*, 1993).

Diversos distúrbios metabólicos podem ser a causa de diferentes doenças, tendo como característica comum a presença de certas substâncias em concentração acima do normal no sangue e/ou na urina de seres humanos. Tais distúrbios metabólicos podem ser originados por problemas genéticos ou ambientais.



A análise da urina tem amplo significado clínico e por caracterizar-se como técnica não invasiva é extensamente utilizada para o diagnóstico de certas doenças, assim como para a monitoração de terapias. Vários estudos têm mostrado que os pacientes celíacos não tratados (Reichelt *et al.*, 1998) exibem excreção de peptídeos urinários aumentada (hiperpeptidúria), característica esta que também pode se manifestar em crianças autistas (Reichelt *et al.*, 1997).

O estudo dos metabólitos urinários foi ainda estimulado pelo relato desses autores de que o quadro de hiperpeptidúria em crianças autistas poderia estar relacionado com a dieta, uma vez que vários estudos apontaram uma melhoria no comportamento social, associada à diminuição dos peptídeos urinários, em pacientes que recebiam dietas livres de glúten e caseína (proteínas precursoras dos peptídeos opióides gliadinomorfinina e casomorfinina).

Assim, considerando a possibilidade de aplicar a técnica de eletroforese capilar (HPCE) à análise de peptídeos originados da alimentação e que a geração excessiva ou acúmulo de peptídeos tipo casomorfinina na urina de certos indivíduos tenha alguma relação com o diagnóstico do autismo, o presente trabalho teve como objetivo obter os perfis de peptídeos urinários em um grupo de crianças autistas e compará-los com os perfis de crianças normais.

## **2. Objetivos**

## **2.1. Geral**

- Utilizar a eletroforese capilar para o estudo do perfil de peptídeos presentes na urina como resultante da digestão protéica incompleta de crianças diagnosticadas com autismo.

## **2.2. Específicos**

- Obter um grupo de crianças clinicamente diagnosticadas como autistas e um grupo controle de crianças normais, com auxílio de profissional da área de psiquiatria.
- Aplicar a técnica de eletroforese capilar (HPCE) na caracterização do perfil de peptídeos urinários nos dois grupos de crianças e compará-la com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Estudar a relação entre a excreção de peptídeos urinários e o diagnóstico de autismo.
- Estudar a provável utilização destes peptídeos como biomarcadores da capacidade digestiva e absorptiva das crianças autistas.
- Estudar a possível influência das proteínas alimentares da dieta no perfil peptídico urinário do autista.

### ***3. Revisão Bibliográfica***

### **3.1. Proteínas alimentares de maior interesse**

Classicamente, tem se considerado que a função primária das proteínas da dieta é abastecer adequadamente o corpo de aminoácidos essenciais, não essenciais e outras formas de nitrogênio orgânico.

Mais de 99% dos produtos da digestão final das proteínas são absorvidos como aminoácidos livres, com somente escassa absorção de peptídeos e raramente, absorção de moléculas protéicas inteiras (Guyton & Hall, 1996).

De interesse especial para os pesquisadores tem sido o estudo dos peptídeos bioativos, presentes na seqüência aminoacídica de proteínas alimentares. Estes peptídeos, que se encontram inativos dentro da seqüência da proteína precursora, podem ser liberados por proteólise enzimática, por exemplo, durante a digestão gastrintestinal ou durante o processamento dos alimentos. Uma vez liberados no corpo, os peptídeos bioativos podem atuar como compostos reguladores com atividade do tipo hormonal (Meisel, 1997).

Proteínas de alguns alimentos como trigo, soja, milho e leite, quando submetidas a proteólise controlada originam peptídeos de tamanhos moleculares variáveis, alguns dos quais dotados de atividade biológica (Meisel & Schlimme, 1990).

#### **3.1.1. Proteínas do leite**

O leite é reconhecido universalmente como uma fonte de proteínas alimentares de alta qualidade nutricional, as quais possuem ampla funcionalidade, fundamentalmente devido à sua composição aminoacídica única e pelas características físico-químicas desejáveis (Harwalkar & McMahon, 1993).

As principais proteínas do leite são classificadas em caseínas, encontradas em concentrações aproximadas de 2,5 a 3,2%, perfazendo

aproximadamente 80% das proteínas totais, e as proteínas do soro, que respondem pelos 20% restantes.

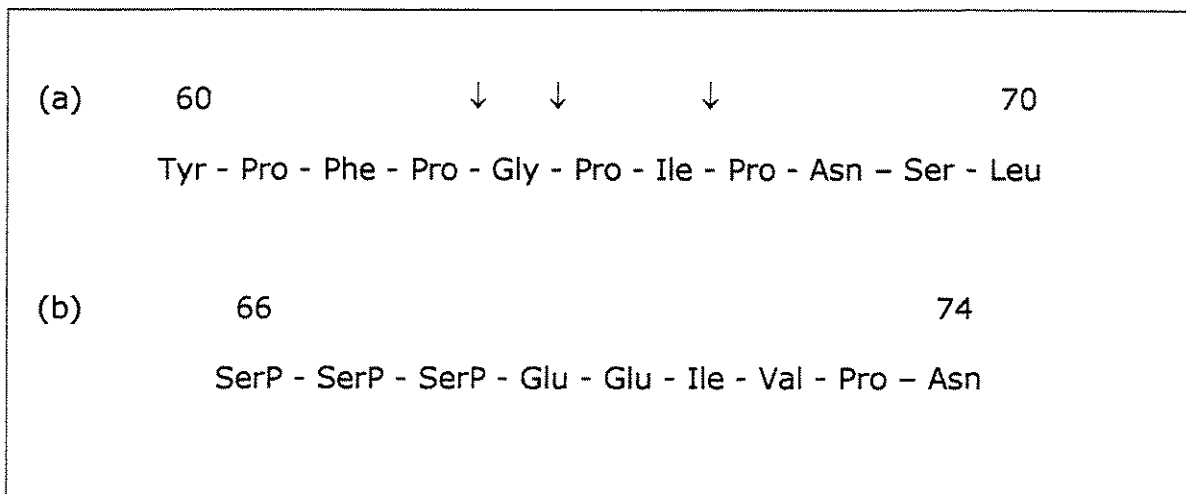
Uma porção de caseína (fosfoproteína) submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de uréia e mercaptoetanol, revela a presença de mais de 20 polipeptídeos diferentes. Três componentes principais são obtidos a partir da caseína:  $\alpha_1$  (53% do total),  $\beta$  (33%) e  $\kappa$  (15%), existindo ainda quantidade variável do componente  $\gamma$ . As duas principais proteínas do soro, a  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, perfazem 70-80% das proteínas do soro. Além dessas são encontradas as soralbuminas, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrinas, transferrinas e enzimas (Sgarbieri, 1996).

Além do papel nutricional, as proteínas do leite têm importância fisiológica e são fontes de peptídeos biologicamente ativos (Tabela 1, Meisel & Schlimme, 1990). Este aspecto tem sido estudado desde 1979, e numerosos peptídeos, dos quais as suas sequências e localização são conhecidas, apresentam várias atividades tais como atividade opiácea, anti-hipertensiva, de imunomodulação, de bio-conversão de íons metálicos, ( $\text{Ca}^{++}$ ), atividade antitrombótica, e propriedades antibacterianas (Fiat *et al.*, 1993).

**Tabela 1- Peptídeos bioativos derivados das proteínas de leite bovino**

Peptídeo bioativo	Proteína precursora	Bioatividade
casomorfina	$\alpha$ -, $\beta$ -caseína	agonistas opióides
casoxinas	$\kappa$ -caseína	antagonistas opióides
$\alpha$ -lactorfina	$\alpha$ -lactoglobulina	agonistas opióides
$\beta$ -lactorfina	$\beta$ -lactoglobulina	agonistas opióides
imuno-peptídeos	$\alpha$ -, $\beta$ -caseína	imunoestimulantes
caseinofosfo-peptídeos	$\alpha$ -, $\beta$ -caseína	carriadores de minerais

Os primeiros e mais estudados peptídeos biologicamente ativos da caseína foram os peptídeos opióides (com similaridade farmacológica ao ópio ou à morfina). Os peptídeos opióides derivados da caseína bovina são chamados de *casomorfina*s ou *casoxinas*, enquanto que os das proteínas do soro são chamados de *lactorfina*s. Tendo em vista que tais peptídeos se originam de fontes exógenas, e também exercem atividades opióides, eles são chamados de "*exorfina*s", para distingui-los dos peptídeos opióides de origem endógena (exemplo, encefalinas, endorfinas, e dinorfinas). Os principais peptídeos opióides, derivados do leite bovino são fragmentos da  $\beta$ -caseína (Figura 1).



**Figura 1** - Sequências de (a)  $\beta$ -casomorfina-11 e (b)  $\alpha$ 1-caseinafosfopeptídeo-9 isolados *in vivo* da  $\beta$ -caseína bovina e  $\alpha$ 1-caseína, respectivamente. As flechas em (a) indicam ligações que podem ser hidrolisadas para produzir os principais fragmentos opióides obtidos *in vitro* ou por síntese. (Fonte: Meisel & Schlimme, 1990).

Embora as casomorfina produzam analgesia e modulem o comportamento social após a administração intraventriculocerebral em animais experimentais, parece provável que seu principal papel fisiológico seja a produção de efeitos locais no trato gastrointestinal, prolongando o trânsito intestinal e exercendo ação antidiarréica (Daniel *et al.*, 1990; Schanbacher *et al.*, 1998).

Peptídeos derivados do leite foram já produzidos em escala industrial com aplicação como suplementos dietéticos em "alimentos funcionais" e como drogas (Meisel, 1997).

Peptídeos provenientes dos alimentos podem ter atividades fisiológicas no homem, é o que afirmam Chabance *et al.* (1998), após terem evidenciado, que dois peptídeos longos, o  $\kappa$ -caseinoglicopeptídeo e um peptídeo N-terminal de  $\alpha$ s1-caseína, foram absorvidos e detectados no plasma de humanos adultos após ingestão de leite ou iogurte.

A resistência à hidrólise enzimática é uma característica da maioria dos peptídeos bioativos, principalmente porque eles têm uma alta concentração de grupos fosfato ou resíduos de prolina (Meisel & Schlimme, 1990).

### **3.1.2. Proteínas do trigo**

O teor de proteína no grão de trigo é usualmente em torno de 12%, mas as características genéticas e as condições de cultivo exercem influência sobre essa concentração. São normalmente divididas em proteínas de reserva (glúten) e em proteínas solúveis em soluções salinas que são as globulinas e albuminas. As albuminas representam proteínas funcionais como enzimas, inibidores de proteases e amilases, lectinas, entre outras.

As proteínas do glúten representam 80% das proteínas dos grãos e pertencem a duas classes: as gliadinas (prolaminas) e as gluteninas (glutelinas). As gliadinas constituem uma mistura de prolaminas que são insolúveis em água, mas solúveis em solução de etanol a 70%. As glutelinas, por sua vez, representam a fração menos solúvel das proteínas do trigo.

Foi detectada a presença de peptídeos opióides nos produtos da digestão enzimática do glúten do trigo, em estudo de Fukudome & Yoshikawa, (1992). Eles isolaram e caracterizaram quatro peptídeos que foram denominados exorfinas de glúten A5, A4, B5 e B4. A sequência da exorfina de



glúten A5 foi encontrada 15 vezes repetida na estrutura primária da glutenina de alto peso molecular e foi específica para receptores opióides  $\delta$ .

### **3.2. Autismo**

Atualmente, tanto a Classificação Internacional de Doenças - CID 10 como o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* - DSM IV, definem o autismo pela presença de um período de desenvolvimento anormal e/ou comprometido que se inicia antes da idade de 3 anos e pelo comprometimento de três áreas principais: interação social, comunicação e comportamento restrito e repetitivo.

Além destes aspectos fundamentais para o diagnóstico da síndrome, é comum a presença de outros sintomas considerados como secundários, tais como hiperatividade, fobias, perturbações do sono e alimentação, auto e heteroagressividade, déficit de concentração.

Componentes da dieta têm sido freqüentemente responsabilizados de ter um papel causativo ou agravante de vários desordens mentais, incluindo o autismo e a esquizofrenia. No entanto, falta conhecimento bioquímico e mecanismos fisiológicos para explicar a relação entre dieta e autismo ou esquizofrenia.

#### **3.2.1. Base bioquímica do autismo**

Muitos estudos têm mostrado alterações bioquímicas em crianças autistas, a maioria dos quais concentrando a atenção na análise de neurotransmissores, seus metabólitos e hormônios.

A serotonina é o neurotransmissor mais estudado pela sua importância na regulação do sono, temperatura corporal, senso-percepção, e sua implicação em formas de retardo mental, na modulação de estados afetivos, convulsões e distúrbios do movimento.

O autismo tem provavelmente muitas causas diferentes. Há evidência crescente de que o autismo tem um forte componente genético (Rodier, 2000). A serotonina (5-HT) tem sido suspeita de estar envolvida na patogênese da desordem autística. Crianças autistas tendem a ter níveis elevados de serotonina (5-HT) no sangue. Eles também tendem a excretar quantidades anormalmente altas de peptídeos de baixo peso molecular na urina (Keller *et al.*, 1999).

Aumentados níveis de 5-HT extracelular conduzem a sutis alterações no circuito cortical no cérebro em desenvolvimento; níveis de 5-HT extracelular persistentemente altos podem conduzir a dano neurotóxico no cérebro quando adulto, possivelmente através de peroxidação lipídica (Keller *et al.*, 1999).

Estudos recentes realizados por Pedersen *et al.* (1999) mostraram que 60% das crianças autistas apresentavam um aumento na quantidade de um tripeptídeo que estimula a captação de serotonina pelas plaquetas.

As catecolaminas também têm sido alvo dos estudos bioquímicos com crianças autistas. Uma diminuição na absorção da dopamina pode ser encontrada em algumas das crianças autistas. É possível que uma das casomorfina seja inibidor da absorção da dopamina (Reichelt *et al.*, 1991).

### **3.2.2. Hiperfuncionamento do sistema opióide cerebral?**

Estudos bioquímicos e farmacológicos da década de 90 têm reforçado a hipótese de que uma excessiva atividade opióide no indivíduo pode explicar, pelo menos em parte, a patologia comportamental no síndrome autista (Panksepp, 1979). Os opióides podem ser importantes no desenvolvimento do autismo porque eles modulam troficamente o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Zagon & McLaughlin, 1991). Entretanto, existe muito ceticismo no meio científico sobre a real

influência de peptídeos opióides liberados durante a alimentação do indivíduo na expressão da doença.

O cérebro produz peptídeos endógenos essenciais que podem ser pequenos ou de grande tamanho e que são necessários para controlar as funções do sistema nervoso. Estes peptídeos endógenos essenciais são chamados de neuropeptídeos. As endorfinas (alfa-, beta-, e gamaendorfina) e opióides (Met-enkefalina e Leu-enkefalina) são classificados como pequenos neuropeptídeos, e têm ação similar à de uma substância chamada morfina, um potente analgésico; enquanto os hormônios cerebrais são classificados como grandes neuropeptídeos. Depois de terem participado das funções do sistema nervoso, os pequenos e grandes neuropeptídeos são quebrados e deixam o corpo através da urina (Rantala, 1996).

Peptídeos exógenos com atividade opióide são aqueles de origem externa (alimentar) que, a exemplo das endorfinas, apresentam afinidade para os receptores do ópio e produzem efeitos semelhantes a ele, e que são revertidos por drogas, do tipo naloxone. Essas drogas e alguns peptídeos têm afinidade pelos receptores de ópio e apresentam efeitos anti-ópio, sendo portanto denominadas de "antagonistas de opióides".

Entre os efeitos fisiológicos dos peptídeos opióides têm-se os chamados efeitos centralizados: analgesia, catalepsia, sedação e torpor, depressão respiratória, hipotensão, regulação da temperatura corporal, regulação da ingestão de alimentos, supressão de secreção gástrica, aumento das concentrações de hormônio do crescimento (GH), hormônio liberador da prolactina (PRL), hormônio antidiurético (ADH), diminuição das concentrações do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio estimulador da tiróide (TSH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e regulação do comportamento sexual, e os efeitos periféricos: supressão da motilidade intestinal, potenciação da atividade do hormônio estimulador dos melanócitos (MSH) (Sgarbieri, 1996).

Há vários tipos de receptores opióides, localizados principalmente no sistema nervoso central, mas também em muitos tecidos

periféricos. Os principais tipos são:  $\mu$ ,  $\delta$ , e  $\kappa$ . Os receptores opióides pertencem à grande família de receptores específicos para a proteína 'G' (Teschmacher, 1997).

No raciocínio de alguns autores, o hiperfuncionamento do sistema opióide pode estar relacionado com o autismo. A hipótese do mecanismo pode ser entendida da página na Internet transcrita (tradução) a seguir:

A teoria proposta por Reichelt *et al.*, (1991, 1994, 1997)

*"relaciona o excesso de opióides com o comportamento autista. Isto baseado principalmente em observações anteriormente descritas por Panksepp (1979) quanto às similaridades entre os sintomas do autismo e os conhecidos efeitos dos opióides endógenos, em particular as beta-endorfinas. Reichelt et al. (1991, 1997), propuseram que as substâncias opióides podem ser derivadas da quebra incompleta de certas proteínas alimentares, em particular o glúten do trigo e outros cereais, e da caseína do leite e produtos lácteos. A sugestão é de que os peptídeos resultantes da quebra incompleta destas proteínas possam ter ação opióide direta ou atuar como ligandos nas enzimas que quebram os opióides endógenos, de modo que seus efeitos seriam aumentados significativamente."*

Os autores descrevem a utilização de um método por cromatografia líquida de alta eficiência, pelo qual peptídeos bioativos obtidos sinteticamente, semelhantes aos que se acredita estarem presentes em hidrolisados de glúten e caseína, aparecem nos cromatogramas após o ácido hipúrico. Entretanto, não tem sido evidenciada a suposição de que os peptídeos naturalmente derivados das proteínas alimentares de fato eluam na região peptídica das urinas, embora os compostos que ali cromatografam tenham características de peptídeos "semelhantes" aos que se esperaria das proteínas alimentares. Todavia, eles interpretam a presença do composto indolil-acrilóil-glicina (IAG), como sendo significativa, e de certa forma indicadora do grau de "vazamento" das membranas, e em particular, aquelas da parede intestinal e barreira hematoencefálica. Os níveis de "peptídeos" na urina são interpretados como indicativos dos níveis de substâncias com

atividade biológica, derivados dos alimentos, e por suposição, no suprimento do sangue para o corpo como um todo (Shattock & Savery, 1999).

Para complementar esta teoria, se fez necessário explicar a provável quebra incompleta de proteínas, junto com uma absorção facilitada concomitante com o aparecimento de peptidúria em alguns casos. Para tanto, Reichelt *et al.* (1991, 1994), propõem que a baixa capacidade de degradação dos peptídeos no intestino, deva ser causada por defeito estrutural de ao menos duas peptidases, ou inibição da atividade por *feed-back*, levando a uma exacerbada absorção dos mesmos e, por sua vez causando a peptidúria (Wright *et al.*, 1979, Griffith & Meister, 1979, Reichelt *et al.*, 1994). Uma outra idéia de Reichelt *et al.* (1997), é que a peptidúria possa ser devida também a um defeito na transulfatação, combinado com um defeito de peptidases, ou à deficiência de duas ou mais peptidases. Assim se explicaria a observação de que os perfis peptídicos de diversos indivíduos autistas difiram entre si. O defeito na sulfatação poderia causar um dano na formação das mucoproteínas sulfatadas (glicosaminoglicanas) que revestem a parede intestinal, o que levaria ao aumento da absorção através da mucosa.

### **3.2.3. Dieta-autismo**

De acordo com a teoria de Reichelt *et al.*, (1991, 1994, 1997), os peptídeos resultantes da quebra incompleta de certas proteínas como glúten e caseína podem exercer ação opióide direta ou atuar como ligandos nas enzimas que quebrariam os opióides endógenos, magnificando a sua ação. Qualquer que seja a natureza do mecanismo envolvido, este levaria a um aumento da atividade opióide, dentro e fora do sistema nervoso central (SNC) (Reichelt *et al.*, 1997).

Reichelt *et al.* (1991, 1994) e Knivsberg *et al.* (1990) propõem o tratamento dietético de crianças autistas e afirmam que a dieta deveria ser livre de proteínas de leite e de glúten. A razão para isto é provavelmente a notável similaridade que existe entre a gliadinomorfinina e casomorfinina:

casomorfina bovina (1-7): Y-P-F-P-G-P-I

opióide de  $\alpha$ -gliadina: Y-P-Q-P-Q-P-F

A dieta deveria ser estrita, pelo fato de que o efeito biológico causado é uma resultante tanto da potência quanto da quantidade. Uma molécula de glúten contém 15 seqüências opióides que podem ser liberadas por ação da tripsina, quimotripsina e secretina.

Mudanças positivas no comportamento das crianças autistas e diminuição dos peptídeos urinários foram observadas após tratamento com dieta ausente de caseína e glúten por períodos de 2 a 4 anos, e piora dos sintomas, em casos de abandono da dieta (Reichelt *et al.*, 1991, 1997, Knivsberg *et al.*, 1990).

A intervenção na dieta deve ainda ser considerada como experimental e não podem ser prometidos resultados positivos. No entanto, o uso da dieta pode ser menos prejudicial que outras intervenções médicas ou regimes terapêuticos (Lewis, 1994).

Há razão para acreditar que os opióides da dieta sejam importantes. O peptídeo imunoreativo  $\beta$ -casomorfina bovina 1-8 tem sido isolado de urina e fluído de diálise de esquizofrênicos e de autistas (Reichelt *et al.*, 1991), assim como também tem se encontrado freqüentemente mais alto conteúdo de anticorpos IgA anti-casomorfina do que o normal.

### **3.3. Metabólitos urinários**

#### **3.3.1. Metabolismo e marcadores**

Entre os principais metabólitos urinários encontram-se os constituintes orgânicos, creatinina, uréia (perfazendo a metade dos sólidos na urina normal), ácido úrico, ácido hipúrico, aminoácidos e os constituintes inorgânicos, cloretos e fosfatos de sódio, potássio e amônia. (Lange, 1973).

A creatinina é o produto de excreção da creatina, sendo que na urina, a mesma é eliminada em quantidade relativamente constante,

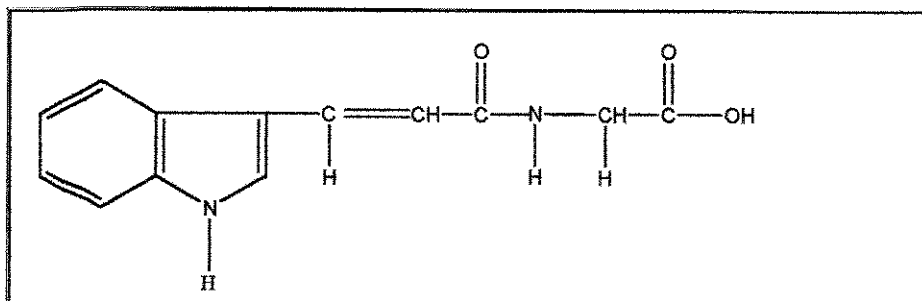
independente da dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico. É utilizada como parâmetro de referência na expressão da concentração dos outros metabólitos urinários.

Desordens metabólicas em humanos freqüentemente causam acúmulo de metabólitos específicos no soro sanguíneo e na urina. Tais metabólitos têm valor, na condição de biomarcadores, podendo auxiliar como meio de diagnóstico.

Indolil-acrilóil-glicina (IAG, ou IAcrGly) é um dos componentes fisiológicos da urina, ainda que sua fonte metabólica e papel no organismo humano não tem sido claramente estabelecido. Há possibilidade de existir mais de que um mecanismo de produção. Mudanças nos níveis de excreção de IAcrGly têm sido encontradas sob algumas condições fisiológicas e patológicas (fotodermatoses, distrofia muscular, cirrose hepática). Dados sobre níveis normais de excreção de IAcrGly são limitados e as razões bioquímicas para níveis elevados ainda não estão claras (Mills *et al.*, 1998).

A relevância e função deste composto não estão definidas, mas a sua associação com o autismo e desordens associadas parece inequívoca. A associação pode ser casual mas há um número de maneiras em que o composto pode estar envolvido na causa do autismo. O composto pode representar a versão destoxificada de um composto precursor que poderia ter profundos efeitos sobre a permeabilidade das membranas, em particular aquelas da mucosa do intestino e a barreira hemato-encefálica (Shattock & Savery, 1999).

O IAG é um provável marcador do grau de permeabilidade da mucosa a peptídeos de baixo peso molecular (EK *et al.*, 1999). Ele possui muitas, mas não todas as propriedades de um peptídeo. Os dois elementos principais da molécula estão unidos mediante união peptídica. Um dos elementos (glicina) é um aminoácido enquanto o outro elemento, a parte indol da molécula, ainda que quase certamente derivou do aminoácido triptofano não é, estritamente falando, um aminoácido. O composto é, por isso "similar à peptídeo" ou "peptóide" por natureza.



**Figura 2** - Indolil-acrilóil-glicina

O triptofano pertence aos aminoácidos com mais alto número de metabólitos e rotas de degradação metabólicas alternativas. Além das principais rotas do catabolismo, há outras menores e menos investigadas: uma delas conduz ao ácido indolilacrílico (IAcrA).

Um mecanismo proposto para a formação do IAG é que o triptofano é convertido a ácido indol-3-propiónico pela flora intestinal e que o ácido indol-3-propiónico é em seguida convertido a ácido indol-3-acrílico (indolilacrílico, IAcrA) e conjugado à glicina no fígado ou rins (Smith *et al.*, 1968, citado por Mills *et al.*, 1998).

Marklová & Fojtásková (1996), afirmam ter encontrado IAcrGly na urina de porquinhos *germ-free* certificados, o que indica que o triptofano possa ser convertido em IAcrA, sem a intervenção de microorganismos intestinais.

### **3.3.2. Peptídeos urinários**

A fonte dos peptídeos no sangue e, conseqüentemente na urina, é largamente desconhecida. No entanto, Noguchi *et al.* (1982), sugeriram que a principal delas é o catabolismo de proteínas dos tecidos (não só colágeno como tem se admitido), e que uma contribuição menor vem da ingestão dietética. A ordem de grandeza desta última parcela ainda não está clara, mas são fortes as indicações de que é suficientemente grande e consistente para justificar uma investigação mais completa: isto é fundamental



para a hipótese de que os peptídeos que surgem das proteínas da dieta cumprem um papel na fisiopatologia das desordens mentais e de comportamento.

Ainda que os peptídeos urinários não façam parte dos metabólitos principais, estes são indicadores de variadas anormalidades metabólicas no indivíduo. Vários estudos apontam para a existência de uma maior quantidade de peptídeos na urina de crianças autistas e da possibilidade destes provirem da dieta. Níveis aumentados de peptídeos urinários têm sido encontrados em diversos grupos de crianças autistas (Reichelt *et al.*, 1991, 1997).

Deficiência de prolidase é caracterizada por excreção urinária maciça de imidodipeptídeos X-prolina (X-Pro) e X-hidroxi-prolina (X-Hip) (Zanaboni *et al.*, 1996).

Quando a rede de fibra elástica é destruída, peptídeos que contêm desmosina (DES) e isodesmosina (IDES), dois aminoácidos com ligações cruzadas (*cross-linkings*) específicos da elastina, são excretados na urina em quantidade proporcional ao grau de destruição. A monitoração de DES e IDES urinária em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e fumantes é essencial, pois a maioria dos investigadores aceitam a idéia de que a destruição irreversível das fibras elásticas dentro do interstício do pulmão é central ao desenvolvimento do enfisema pulmonar (Viglio *et al.*, 1998).

### **3.4. Absorção de peptídeos e proteínas**

$\beta$ -casomorfina, um peptídeo opióide do leite, foi detectado no intestino delgado de humanos adultos, após a ingestão de leite bovino (Svedberg *et al.*, 1985).

$\kappa$ -caseinoglicopeptídeo e um peptídeo N-terminal de  $\alpha$ s1-caseína, foram absorvidos e detectados no plasma de humanos adultos após ingestão de leite ou iogurte (Chabance *et al.*, 1998).

Parece provável que o aumento de peptídeos na urina em quase 90% das crianças autistas possa ser devida às proteínas da dieta. Entre os peptídeos encontra-se a casomorfina bovina (Reichelt *et al.*, 1991).

A passagem de proteínas intactas da dieta ao leite de nutrízes foi investigada. Ovoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina foram detectadas em amostras de leite humano em mais da metade de um grupo de 29 mulheres, após a ingestão de um ovo cru e 250 mL de leite de vaca, variando em quantidades de 100 pg/mL a 6 ng/mL (Kilshaw & Cant, 1984).

Em pacientes celíacos, a mucosa do intestino está danificada e a absorção de peptídeos e proteínas através do intestino está aumentada (Reichelt *et al.*, 1998).

Permeabilidade intestinal, num contexto clínico, principalmente, se refere à permeação de moléculas com massa molecular  $>150$  Da, e não de íons tais como sódio ou cloreto, aos quais o termo *permeabilidade de membrana* é aplicado (Travis & Menzies, 1992). A absorção de peptídeos através da mucosa intestinal poderia estar ocorrendo *via paracelular* mas bem que *transcelular*. Propõe-se que a via paracelular possa permitir a passagem de moléculas de massa maior que 150 Da, como os peptídeos, através das junções de oclusão.

O teste de permeabilidade intestinal (IPT) é reconhecido por ser um teste não invasivo e adequado para a monitoração de danos na mucosa do intestino delgado em crianças. O procedimento está baseado na administração oral simultânea de dois açúcares com pesos moleculares e rotas de absorção diferentes, e a estimativa da recuperação urinária de cada molécula (D'Eufemia *et al.*, 1996). Este teste foi realizado num grupo de crianças autistas por D'Eufemia *et al.*, (1996) e foi encontrado que em 40% dos casos havia permeabilidade intestinal alterada, sendo proposto que isto poderia representar um possível mecanismo da passagem aumentada de peptídeos derivados de alimentos através da mucosa do intestino com as conseqüentes anormalidades no comportamento. O estudo mostrou que alguns pacientes autistas com dano nas junções de oclusão, como evidenciado pelo teste IPT,

ocorre em ausência de desordens gastrointestinais estabelecidos. A ocorrência de permeabilidade intestinal aumentada numa fração dos pacientes autistas pode refletir a patogênese multifatorial da doença.

Devido ao fato de que os peptídeos são excelentes inibidores de peptidases (La Bella *et al.*, 1985), muitos dos efeitos dos peptídeos podem ser indiretos. Isto se reflete nos peptídeos urinários, que parecem abranger ambos peptídeos exógenos e endógenos (Reichelt *et al.*, 1991, 1997).

### **3.5. Métodos analíticos para peptídeos e outros metabólitos urinários.**

#### **3.5.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A análise dos peptídeos urinários utilizando cromatografia líquida foi introduzida por Bolhen *et al.* (1980), propondo a separação de peptídeos dos aminoácidos e sais mediante o uso de colunas C-18 de fase reversa.

O teor e perfil dos peptídeos urinários de crianças autistas de sete países, e o efeito da intervenção na dieta foi determinado por Reichelt *et al.* (1997), mediante a utilização da cromatografia líquida de fase reversa.

A análise rápida de baixos níveis de IAG, - metabólito urinário aumentado em vários tipos de enfermidades - foi realizada por Mills *et al.* (1998) utilizando HPLC.

A liberação de peptídeos da caseína e sua passagem para o sangue humano durante a digestão de leite ou iogurte foi determinada num estudo realizado por Chabance *et al.* (1998), utilizando a técnica de HPLC e colunas de fase reversa. Reichelt *et al.* (1998), por sua vez, também utilizaram a técnica de HPLC no estudo do perfil peptídico da urina de pacientes com doença celíaca. Posteriormente, a cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada por Ek *et al.* (1999) na determinação do teor de peptídeos urinários em crianças com doença celíaca submetidos à dieta sem glúten e caseína.

### **3.5.2. Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE)**

A eletroforese capilar (CE) vem servir de complementação às análises de amostras biológicas realizadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, compartilhando com ela a vantagem da automatização, proporcionando uma separação rápida, além de ser somente necessária uma pequena quantidade de amostra.

Como ferramenta analítica, a CE oferece várias vantagens nos laboratórios clínicos. Além da sua alta resolução, a facilidade de modificação da seletividade pela simples adição de moduladores orgânicos ao tampão permite que misturas complexas de analitos em amostras biológicas sejam facilmente resolvidas. Os fatores em defesa do uso já difundido da CE no presente momento são simplicidade, velocidade, alta resolução, e baixo custo de operação (Shihabi, 2000).

A CE tem sido considerada como um dos mais importantes métodos para a separação de misturas de peptídeos (Jorgenson & Lukacs, 1981). Entre os vários modos de separação, a eletroforese capilar por zona (CZE) é certamente a melhor opção para se obter resolução de moléculas eletricamente carregadas (Langenhuizen & Janssen, 1993).

Pacientes fenilcetonúricos submetidos a controle de dieta podem ser monitorados por CE (Tagliaro *et al.*, 1994).

O acompanhamento da excreção de creatina e creatinina na urina, em função do tempo pós-ingestão de creatina monoidratada como auxiliar ergogênico, foi realizado por eletroforese capilar (Burke *et al.*, 1999).

Zanaboni *et al.* (1996) relataram a aplicabilidade da técnica de CZE na determinação de imidodipeptídeos em urina de pacientes com deficiência de prolidase. A deficiência de prolidase é uma desordem grave caracterizada pela excreção maciça de uma família de metabólitos de estruturas semelhantes, os imidodipeptídeos X-Pro e X-Hip. Utilizando eletroforese capilar no modo de separação MEC (cromatografia eletrocínética

micelar), Grimm *et al.* (1997) determinaram as condições experimentais para a melhor separação desses imidodipeptídeos.

A desmosine (DES) e isodesmosina (IDES), dois aminoácidos específicos da elastina, podem ser usados como indicadores da degradação da elastina madura quando presentes na urina, e sua determinação efetuada por eletroforese capilar utilizando a versão MEC (Viglio *et al.*, 1998).

## **4. Material e Métodos**

## **4.1. Material**

### **4.1.1. Amostras de urina**

Urinas foram coletadas de um grupo de 11 crianças autistas cadastradas na ADACAMP (Associação dos autistas de Campinas) e outro grupo de 11 crianças normais da Pré-Escola e do PRODECAD da Unicamp, todos na faixa de idade de 6-9 anos. A amostragem se fez com a participação totalmente voluntária das mães e dos doadores sem compromisso algum de ambas as partes, pesquisadores e voluntários. Não houve intervenção na alimentação dos doadores, mas foi recomendada a coleta de urina após 2-3 horas de uma refeição contendo leite ou produtos derivados e/ou também massas de trigo. As urinas foram mantidas congeladas a  $-15^{\circ}\text{C}$  enquanto não utilizadas. Para dar início às análises elas foram descongeladas rapidamente em água corrente e centrifugadas a 4000 g (centrífuga Sigma Leborzentrifugen GmbH, Melsungen, GE.), a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 10 min. Uma vez separada a urina límpida sobrenadante dos sólidos, foi medido seu pH. De cada urina foram separadas duas porções de 1,5 mL para serem utilizadas, uma, no estudo por eletroforese capilar e outra para determinação colorimétrica da creatinina. O volume restante foi liofilizado (liofilizador VIRTIS, modelo 10-146MR-BA) e armazenado sob refrigeração, para posteriormente ser utilizado na coleta de frações por eletroforese capilar e para análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise de aminoácidos.

Todas as amostras de urina foram filtradas em membrana Millipore de  $0,22\ \mu\text{m}$  (GSWP01300) e sonicadas (ultrassom, Ultrasonic Cleaner USC 700; Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, Brasil), antes de serem injetadas no capilar para análise por HPCE ou na coluna cromatográfica na análise por HPLC.

#### **4.1.2. Reagentes e soluções para análise por HPCE**

A água ultra-pura (18.2 M $\Omega$ ) que foi utilizada para a preparação de soluções padrão foi obtida em purificador Maxima ultra pure water, Elga (Elga; High Wycombe, England).

Utilizaram-se soluções tampão com electrólitos padrão (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), 50mM fosfato (pH 2,5), 50mM fosfato (pH 7,0), 50mM borato (pH 9,3). Foi testada a adição do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) e modificador orgânico acetonitrila (Merck, Darmstadt, Germany).

Os aminoácidos, Tyr, Phe, Trp, Gly, Cys, Glu, Asp e os padrões de peptídeo opióide, casomorfinina bovina (1-7) e fragmento (1-3) eram da Sigma (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). Foram também utilizados o padrão de peptídeos (Sigma H-2016,) contendo: Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, acetato de Metionina-encefalina [Tyr-Gly-Gly-Phe-Met], Leucina-encefalina [Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu], acetato de angiotensina II [Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe] e o padrão de peptídeos para CE, Sigma P-2693, contendo bradiquinina, fragmento de bradiquinina (1-5), substância-P, [Arg-vasopressina, hormônio liberador do hormônio luteinizante, bombesina, Leu-encefalina, Met-encefalina e oxitocina. As soluções aquosas de aminoácidos e peptídeos a várias concentrações foram preparadas utilizando água ultra-pura (18.2 M $\Omega$ ).

Foi usado um padrão de ácido hipúrico (Sigma H-9380; Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA), um padrão de creatinina (Merck 5206; Merck, Darmstadt, Germany) e um de ácido úrico (padrão do Kit de Lab-Test). Soluções aquosas de diferentes concentrações destes padrões foram preparadas com água ultra-pura.

Toda solução padrão aquosa e solução tampão aquosa de electrólito base utilizada foi filtrada em membrana MF-Millipore de 0,22  $\mu$ m (GSWP01300) e sonicada. A solução de electrólito base contendo acetonitrila foi filtrada em membrana MF-Millipore de 0,22  $\mu$ m (GVWP01300).



### **4.1.3. Reagentes e soluções para análise por HPLC**

Para a preparação das fases móveis foram utilizados acetonitrila e ácido trifluoroacético (TFA) de grau cromatográfico Merck (Merck, Darmstadt, Germany) e água ultra-pura. As fases móveis foram filtradas a vácuo utilizando filtro Schleicher & Schüll de 0,45 µm (membrana filtrante ME 25 para sistema aquoso e RC 55 para a fase solvente) e sonicadas 12 minutos.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE)**

#### **4.2.1.1. Desenvolvimento do procedimento**

Foi utilizado o método de eletroforese capilar de zona (CZE) também chamado método de eletroforese capilar em solução livre (FSCE), onde o capilar é simplesmente preenchido com um eletrólito, injeta-se nele uma amostra e aplica-se um campo elétrico nos eletrodos ocorrendo a migração diferenciada dos componentes face às diferentes mobilidades eletroforéticas e à mobilidade eletrosmótica.

Devido à falta de procedimentos padronizados para as análises de urina por eletroforese capilar, vários testes preliminares foram feitos para adquirir informação sobre as condições eletroforéticas mais adequadas na obtenção dos perfis urinários que caracterizassem a presença de peptídeos. Para a definição das condições de operação do método utilizado, foram considerados os seguintes itens:

- Escolha do capilar
- Determinação do eletrólito base
- Teste dos parâmetros, temperatura, voltagem e tempo de injeção
- Efeitos da adição de SDS e acetonitrila ao eletrólito base

- **Escolha do capilar.** Foram testados capilares de sílica fundida, sem revestimento, diâmetro interno (DI) de 75  $\mu\text{m}$  e janela estendida, proporcionando um *light path* efetivo de 200  $\mu\text{m}$ . Os capilares testados tinham comprimento de 51,5 e 80,5 cm, sendo 43,0 e 72,0 cm seus respectivos comprimentos efetivos. Comprimento efetivo do capilar é a distância entre o ponto de injeção da amostra e a janela de detecção. Para os testes acima foram injetadas urinas nos dois tipos de capilar, a temperaturas de 20 e 25 °C e voltagem de 20 e 25 kV, utilizando solução de borato 50 mM (pH 9,3) como eletrólito base.
- **Determinação do eletrólito base.** As soluções de eletrólito base testadas foram: solução fosfato 50 mM (pH 2,5), fosfato 50 mM (pH 7,0), e solução borato 50 mM (pH 9,3). Com o objetivo de se obter o melhor perfil urinário, várias urinas foram testadas nos três eletrólitos de diferentes pH, à temperatura de 25 °C e 20 kV de voltagem.
- **Teste dos parâmetros temperatura, voltagem e tempo de injeção.** Foram feitos testes combinando temperatura e voltagem sistematicamente, variando a temperatura em intervalos de 5 graus na faixa de 15 a 35 °C, e a voltagem em intervalos de 5 kV entre 10 e 30 kV. A introdução da amostra de urina no capilar foi feita por injeção hidrodinâmica por um tempo definido utilizando pressão de 50 mbar. Os tempos de injeção testados foram 4, 8 e 12 segundos. O eletrólito base utilizado foi uma solução de borato 50 mM (pH 9,3).
- **Efeitos da adição de dodecilsulfato de sódio (SDS) e acetonitrila ao eletrólito base.** A adição do agente tensoativo aniônico, SDS, ao eletrólito base, dá origem à conhecida técnica de eletroforese capilar micelar (MEC) que promove a separação dos compostos neutros, principal limitação da eletroforese capilar em solução livre (FSCE). A partição diferenciada de solutos neutros entre as fases micelar e a do eletrólito, é responsável pela seletividade de separação (Tavares, 1997). O SDS foi utilizado numa concentração de 50 mM no eletrólito base. O uso da acetonitrila, assim como outros aditivos ao eletrólito base, visa a alterar algum dos efeitos,

como mobilidade do soluto, fluxo eletrosmótico, solubilização de compostos na matriz da amostra ou redução da interação de certos solutos com a parede do capilar (Tavares, 1997). Foi utilizada uma solução do eletrólito base de borato 50 mM (pH 9,3) contendo 10% de acetonitrila.

#### **4.2.1.2. Aplicação do procedimento**

As urinas dos dois grupos de crianças foram analisadas num Sistema de Eletroforese Capilar de Alta Eficiência (HPCE), marca HP3D (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), com detector UV e arranjo de diodos. O sistema possui um HP ChemStation para controle do sistema e para análise e coleta de dados.

Foi utilizado capilar de sílica fundida, com janela estendida (Hewlett-Packard) de 80,5cm de comprimento (72cm efetivos), 75 $\mu$ m de DI (diâmetro interno) e um *light path* efetivo de 200  $\mu$ m. Como eletrólito base, foi usada uma solução tampão de borato 50 mM de pH 9,3.

As condições de operação eletroforética utilizadas foram:

- Temperatura do capilar: 25°C
- Separação por voltagem de 20kV entre os eletrodos
- Polaridade positiva (injeção no eletrodo positivo ânodo)
- Injeção da amostra por pressão de 50 mbar durante 4s
- A detecção dentro do capilar foi realizada com detector de arranjo de diodos por medida da absorção a 200, 215, 280 e 326nm. Além disso, o espectro foi registrado em paralelo, no intervalo 190-400nm.
- Capilares novos, foram pré-condicionados lavando-se, na seqüência, com NaOH 1N durante 1min, água ultra-pura (18,2 MHz) por 8 min e eletrólito base por 5 min, utilizando uma pressão de 990 mbar.

Para cada corrida de amostra se fez um pré e um pós-condicionamento do capilar.

- Pré-condicionamento: Lavagem com NaOH 0,1 N durante 2 min; água ultra-pura por 2 min e electrólito base tampão borato 50 mM por 3 min, usando uma pressão de 990 mbar.
- Pós-condicionamento: Lavagem com água ultra-pura durante 3 min seguida de lavagem com solução base tampão borato 50 mM por 2 min., sempre com pressão de 990 mbar.

O método de eletroforese capilar foi utilizado para:

- Obter o perfil eletroforético das urinas
- Identificar e quantificar os principais metabólitos urinários
- Determinar o nível de possíveis peptídeos urinários, incluindo a determinação da sensibilidade do método para detecção de peptídeos opióides e coleta de frações da região peptídica, para posterior análise de aminoácidos.

Para separar a região peptídica das urinas, 5 ou 10 vezes concentradas, previamente liofilizadas, foi programada uma coleta por voltagem das frações eluentes no extremo negativo (cátodo), na saída do capilar. Nesta região se encontram os picos do intervalo aproximado entre 10 e 21 minutos do eletroferograma, os quais fazem parte da denominada "região peptídica", o seja, que migram entre a creatinina e o ácido hipúrico. Foi definida uma *collection width* entre 5 e 20% dos picos reconhecidos pelo instrumento, dependendo do perfil da amostra. As frações foram recolhidas em microvials contendo solução de ácido acético 2%. Foram coletadas num mesmo microvial, 50 frações da região peptídica de 5 crianças autistas e em outro microvial, 50 frações da região peptídica de 5 crianças normais. Estas frações foram utilizadas para determinação dos aminoácidos componentes em analisador de aminoácidos. Cada *pool* foi dividido em duas metades, sendo uma injetada diretamente no analisador e a outra, submetida a hidrólise com HCl 6N, a 110°C por 22 horas, antes da análise.

#### **4.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Para as análises cromatográficas foi utilizado um Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) marca Varian, equipado de bomba (9012), forno para coluna tipo Mistral, software gerenciador Star Chromatography Workstation, e detector de comprimento de onda variável UV-Visível (9050) (Varian, Walnut Creek, Ca, USA)..

Foi seguido o método empregado por Reichelt *et al.* (1997) e Reichelt *et al.* (1998) para o estudo do nível de peptídeos urinários em crianças autistas e celíacos, respectivamente. Estes procedimentos cromatográficos estão baseados na separação de peptídeos dos aminoácidos e sais introduzida por Bohlen *et al.* (1980).

Foi utilizada uma coluna de fase reversa de 250 x 4,6 mm (Vydac C-18; Vydac, Hesperia, CA, USA), e uma pré-coluna do mesmo material. As fases móveis foram, fase A: ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água e fase B: TFA 0,1% em acetonitrila 95% e 4,9% água.

As condições de operação utilizadas foram:

- Fluxo: 1 mL/min
- Temperatura do forno: 30°C
- Início isocrático: 15 min com 99% fase A, 1% fase B (para eluição dos aminoácidos e sais )
- Gradiente: 60 min, de 1% a 40% fase B
- Gradiente: 05 min, de 40% a 60% fase B
- Isocrático: 09 min, com 60% fase B
- Gradiente: 05 min, de 60% a 1% fase B (volta ao estado inicial)
- Isocrático: 16 min, 1% fase B (para reequilibrar o sistema).
- Volume de amostra injetada: 20 µL, utilizando injetor manual com *loop de 20µL*.

#### **4.2.3. Perfil aminoacídico dos peptídeos**

As amostras utilizadas para análises de aminoácidos foram as frações coletadas da região de interesse, denominada de "região peptídica" do perfil eletroforético urinário. A coleta foi efetuada segundo procedimento descrito no item 4.2.1.2.

A determinação do perfil peptídico da fração da região peptídica da eletroforese capilar e dos seus aminoácidos, após hidrólise, foi realizada através de cromatografia de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina (Spackman *et al.*, 1958), utilizando analisador de aminoácidos (Thermo-Separation Products, Vacuum Membrane Degasser P4000, reactor PCX 3100, da Pickering Laboratories, Riviera Beach, FL, USA).

#### **4.2.4. Determinação colorimétrica da creatinina**

Para a determinação colorimétrica da creatinina utilizou-se o kit Lab-Test (LABTEST Diagnóstica S.A.), com padrão e reagentes para a análise colorimétrica, efetuando as leituras de absorbância no espectrofotômetro UV-Visível (BECKMAN DU-70, Fullerton, CA, USA). O princípio utilizado pelo Lab-Test é o da reação de Jaffé, onde a creatinina forma um composto âmbar pela adição de picrato alcalino, o que permite a medição colorimétrica a 560 nm.

#### **4.2.5. Análise estatística**

Para análise estatística dos resultados, foram utilizados cálculos de média, desvio padrão e coeficiente de variação. Para comparação das médias entre os diferentes grupos, com o mesmo número de indivíduos em cada grupo, foi usado o teste de Tukey e para grupos com número diferente usou-se o teste de Tukey para N desigual (Cockran & Cox, 1957), adotando para ambos o valor de  $P < 0,05$  como critério de diferença estatística, (programa STATISTICA para sistema Windows, versão 6.0; StaSoft, Inc.).

## ***5. Resultados e Discussão***

## **5.1. Caracterização da Urina**

### **5.1.1. Medidas de pH urinário**

O pH das urinas de um grupo de crianças autistas (n=11) variou em uma faixa de valores de 5,40 a 7,98, sendo o seu valor médio de  $6,49 \pm 0,74$  e o intervalo de confiança (IC 95%) de 0,44. No grupo de crianças normais (n=11) o pH médio foi de  $5,82 \pm 0,47$  numa faixa de valores entre 5,15 e 6,68, sendo o IC 95% de 0,28. O valor médio do pH urinário nas crianças autistas foi mais alto que nas normais, mostrando diferença significativa ( $P=0,02$ ) ao aplicar o teste de Tukey. Reichelt *et al.* (1997) encontraram valores de pH mais altos na urina de crianças autistas, (pH médio de  $6,66 \pm 0,69$ ), quando comparados aos valores encontrados em crianças normais (pH médio de  $5,72 \pm 0,37$ ), afirmando ser possível que o pH urinário mais alto reflita um defeito no manejo do sulfato pelo organismo. Isto significa, que existiria um defeito na reação de fenol-transulfatação, mediada por uma possível diminuição da atividade da enzima fenolsulfotransferase (Waring & Ngong, 1993). É possível que na deficiência enzimática, as aminas fenólicas, do tipo catecolamina e/ou outras aminas biogênicas provenientes dos alimentos, não sejam convertidas à forma sulfatada e excretadas (destoxificadas). Diminuição na sulfatação poderia elevar os níveis circulantes destes compostos, até a sua lenta eliminação como aminas livres.

Uma diminuição na sulfatação dos glicosaminoglicanos (GAGs) presentes no revestimento da mucosa intestinal, contribuiria para o aumento da permeabilidade, isto é um aumento do transporte intestinal (Waring & Ngong, 1993). Devido à sua natureza hidrofílica, os GAGs formam géis de grande volume que ajudam a manter a turgidez e a estrutura tridimensional da parede intestinal. Os GAGs sulfatados altamente aniônicos são responsáveis pela carga negativa da membrana. Moléculas com carga negativa teriam restrição eletrostática na sua passagem pela membrana ao contrario das moléculas neutras ou carregadas positivamente e de igual tamanho (Murch *et al.*, 1993). É provável então que, aceitando a hipótese de que no autismo haja uma condição de deficiência digestiva, os peptídeos acumulados venham a ter



a sua absorção facilitada, dada a falta de cargas negativas dos GAGs sulfatados nas membranas dos enterócitos. Isto é, a condição de baixa atividade peptídica e baixo grau de sulfatação da parede intestinal, poderia facilitar a absorção de peptídeos (Reichelt *et al.*, 1994, 1997).

### **5.1.2. Teor de creatinina por método colorimétrico Lab-Test**

Foi determinado o teor de creatinina em 15 amostras de urina de autistas e em 6 amostras de crianças normais. Os valores de creatinina variaram entre 0,08 e 3,19 mg/mL de urina.

### **5.1.3. Análise por HPCE**

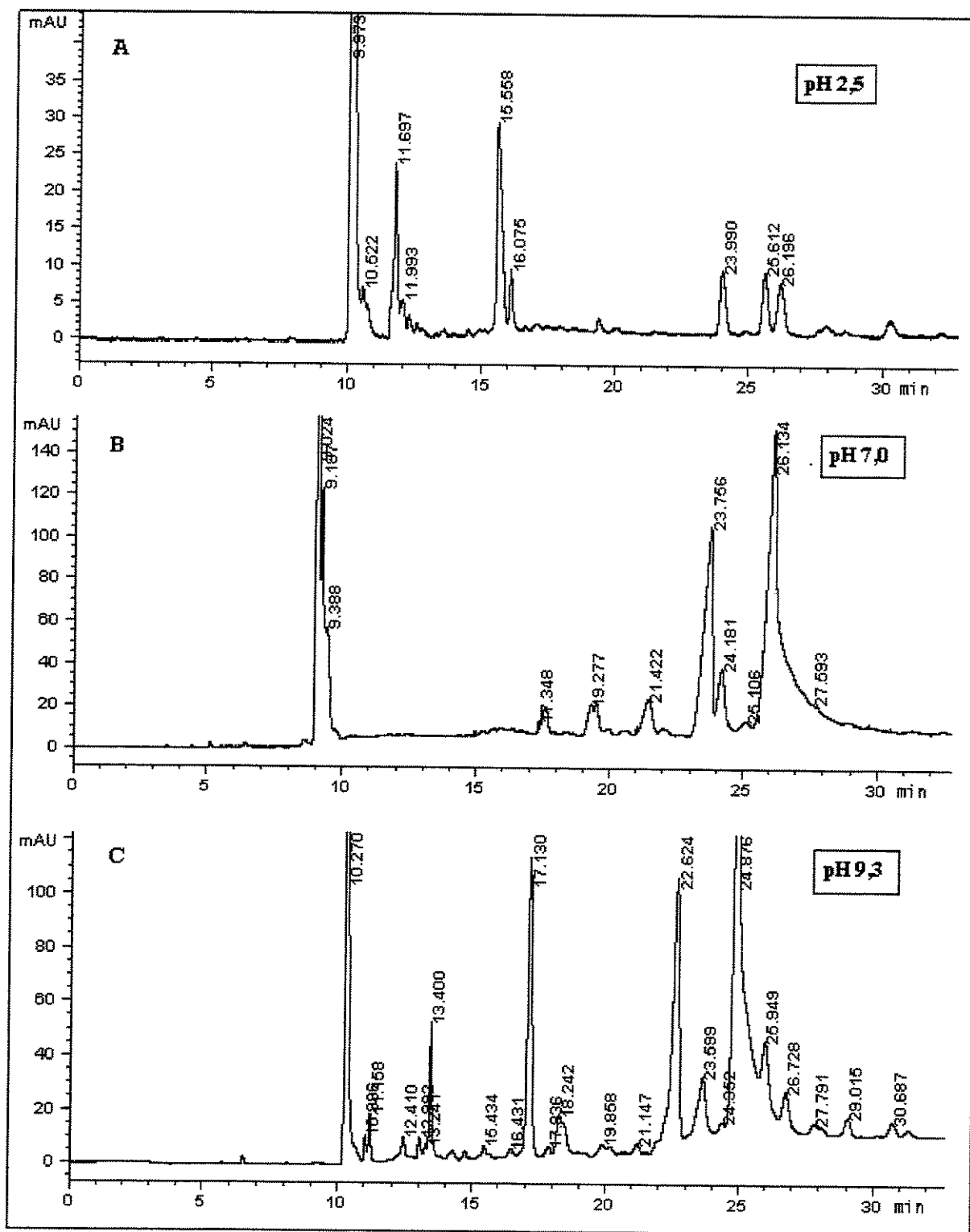
#### **5.1.3.1. Desenvolvimento do procedimento**

##### **➤ Escolha do capilar**

Entende-se que a maior desvantagem na quantificação de analitos por HPCE, especialmente em relação à HPLC, utilizando em ambos o detector UV, são os altos limites mínimos de detecção proporcionados na técnica HPCE devido ao pequeno *path-length* do detector e da pequena quantidade de amostra injetada. No intuito de diminuir as diferenças em sensibilidade entre ambos os métodos, foi escolhido o capilar de maior diâmetro interno disponível, 75  $\mu\text{m}$  e janela estendida, o que proporcionava um *light path* efetivo de 200  $\mu\text{m}$ . Foram testados capilares de 75  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 56 e 72 cm de comprimento efetivo, tendo como resultado uma melhor separação dos analitos quando utilizado o de 72 cm.

##### **➤ Determinação do eletrólito base**

Foram testados três diferentes soluções de eletrólitos ou tampões de corrida: solução fosfato 50 mM (pH 2,5), fosfato 50 mM (pH 7,0), e borato 50 mM (pH 9,3).



**Figura 3** - Análise de uma mesma urina por CE, em função do pH dos tampões de corrida, detecção a 215 nm; capilar de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo e 75  $\mu$ m DI; 20 kV; 25°C; utilizando em **A** tampão fosfato 50 mM (pH 2,5), **B** tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e **C** tampão borato (pH 9,3). A quantidade de amostra injetada corresponde a uma injeção por pressão de 50 mbar durante 4s.

A Figura 3 mostra os eletroferogramas da mesma urina analisada nos três pH diferentes. Observa-se que no eletroferograma **C** o número de picos foi maior, com melhor resolução do que em **A** e **B**, e com intensidade de absorção três vezes maior que em **A** e equivalente à de **B**. Quando utilizado o tampão pH 7,0 raramente se obtiveram dados reprodutíveis.

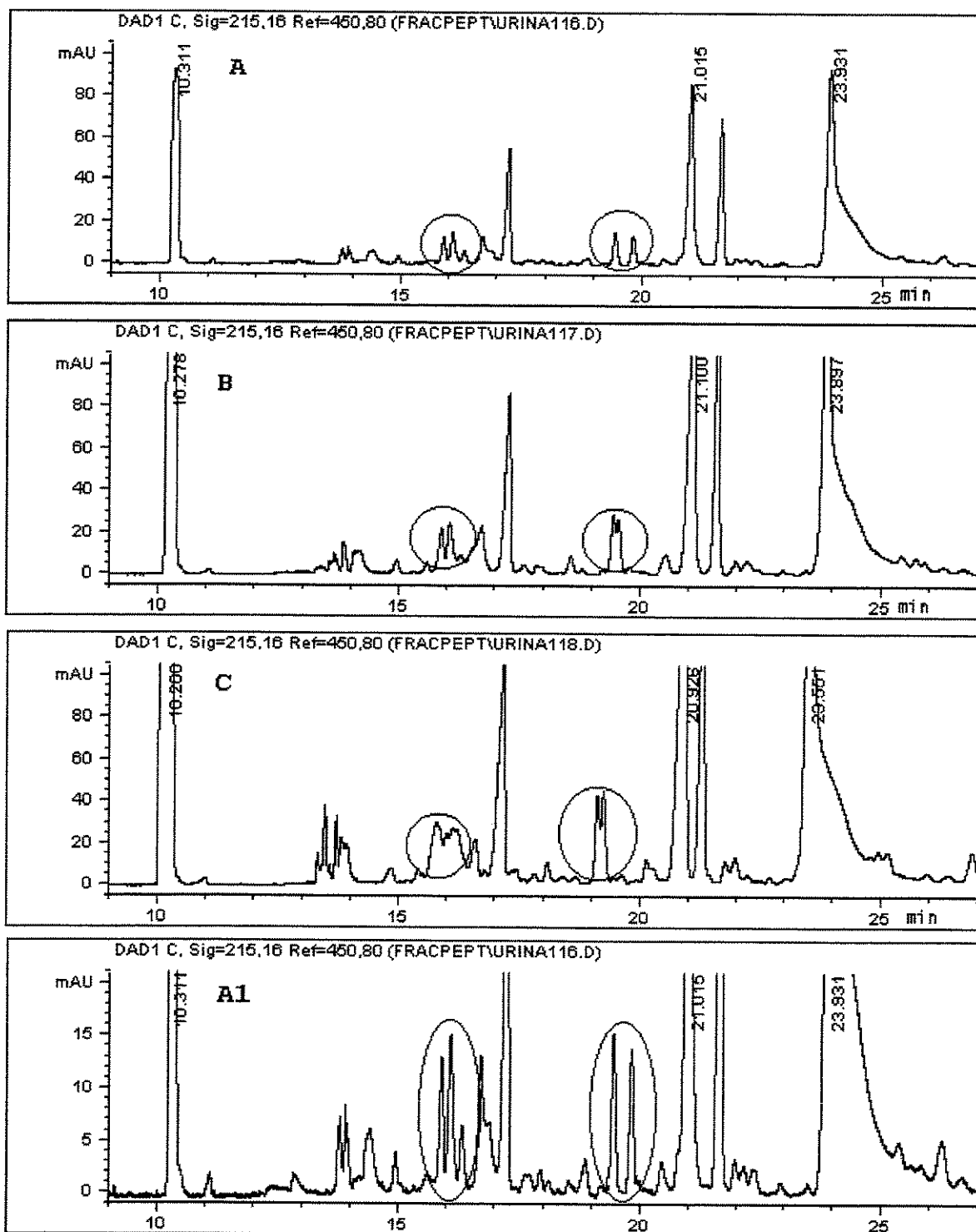
➤ **Teste dos parâmetros temperatura, voltagem e tempo de injeção**

Foram testadas diferentes temperaturas no capilar, entre 15 e 35 °C combinadas com diferentes voltagens aplicadas aos eletrodos, entre 10 e 30 kV. Verificou-se que à maior temperatura e maior voltagem o tempo de migração dos analitos diminuía resultando em uma corrida eletroforética mais curta, mas, com pior resolução. Determinou-se que 25 °C e 20 kV foram as condições que mostraram um eletroferograma com melhor definição.

A amostra foi introduzida no capilar por injeção hidrodinâmica utilizando-se uma pressão de 50 mbar. Foram testados diferentes tempos de injeção, 4, 8 e 12 segundos, variando assim o volume de amostra a ser analisada.

O volume de injeção (sempre na ordem de nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é geralmente mais precisa que a eletrocinética porque é baseada estritamente na transferência de volume e é preferida em aplicações de eletroforese de zona em solução livre e micelar (Tavares, 1996).

Os eletroferogramas que mostram o efeito dos diferentes tempos de injeção estão na Figura 4, onde se pode observar que com um tempo maior que 4s (Figura 4, B e C), a resolução de alguns picos como os assinalados com um círculo se mostra notoriamente diminuída. Definiu-se então que 4s seria o tempo de injeção a ser adotado no nosso método eletroforético.



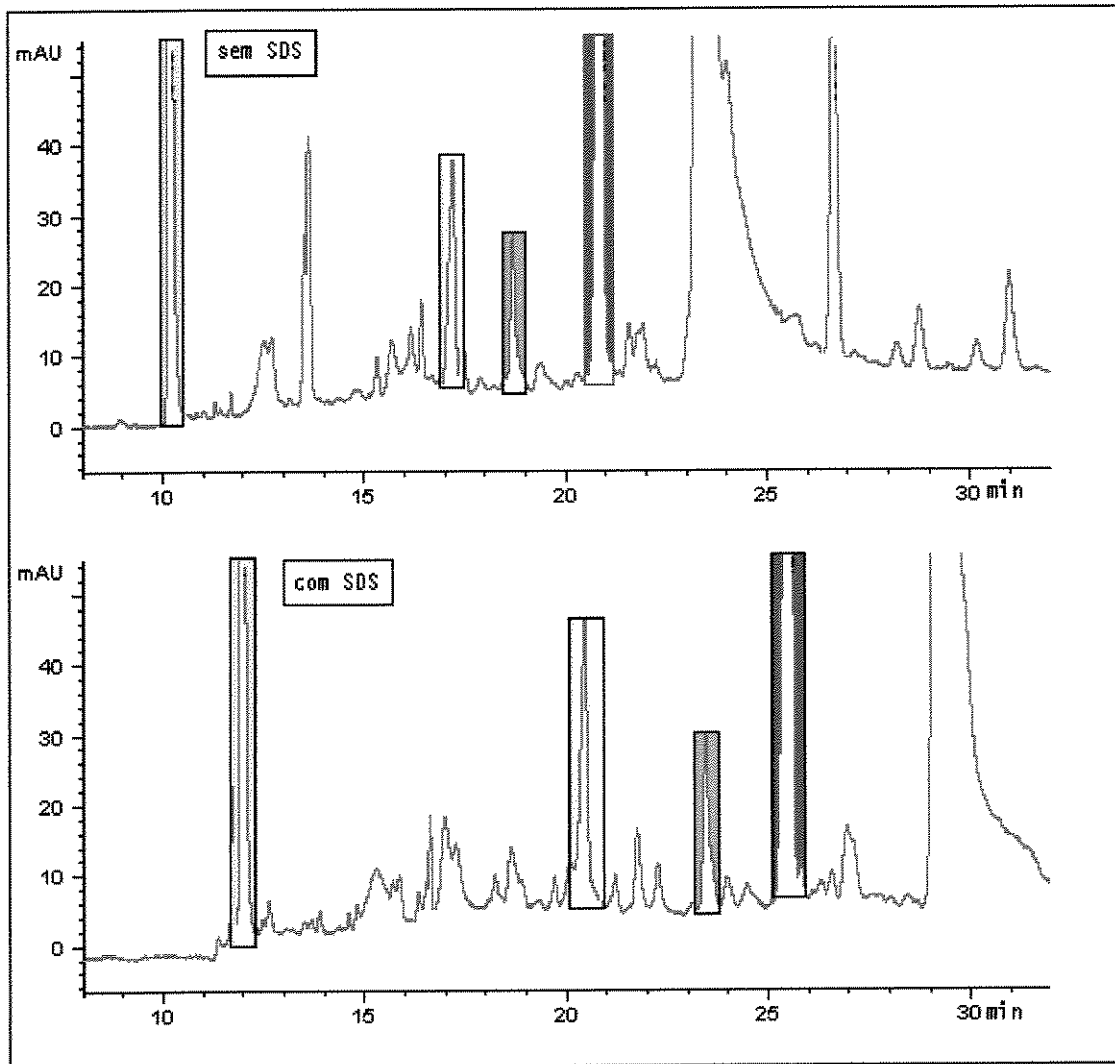
**Figura 4** - Análise de urina por CE, utilizando quantidade variável de amostra dada por diferentes tempos de injeção, **A**:4s, **B**:8s e **C**:12s, com pressão de 50 mbar. **A1** = **A** em escala amplificada. Capilar de sílica de 72 cm de comprimento efetivo e 75  $\mu$ m DI; 20 kV; 25°C; tampão borato 50 mM (pH 9,3). Nos círculos mostra-se o efeito da quantidade da amostra na resolução dos picos.

➤ **Efeitos da adição de dodecilsulfato de sódio (SDS) e acetonitrila no eletrólito base.**

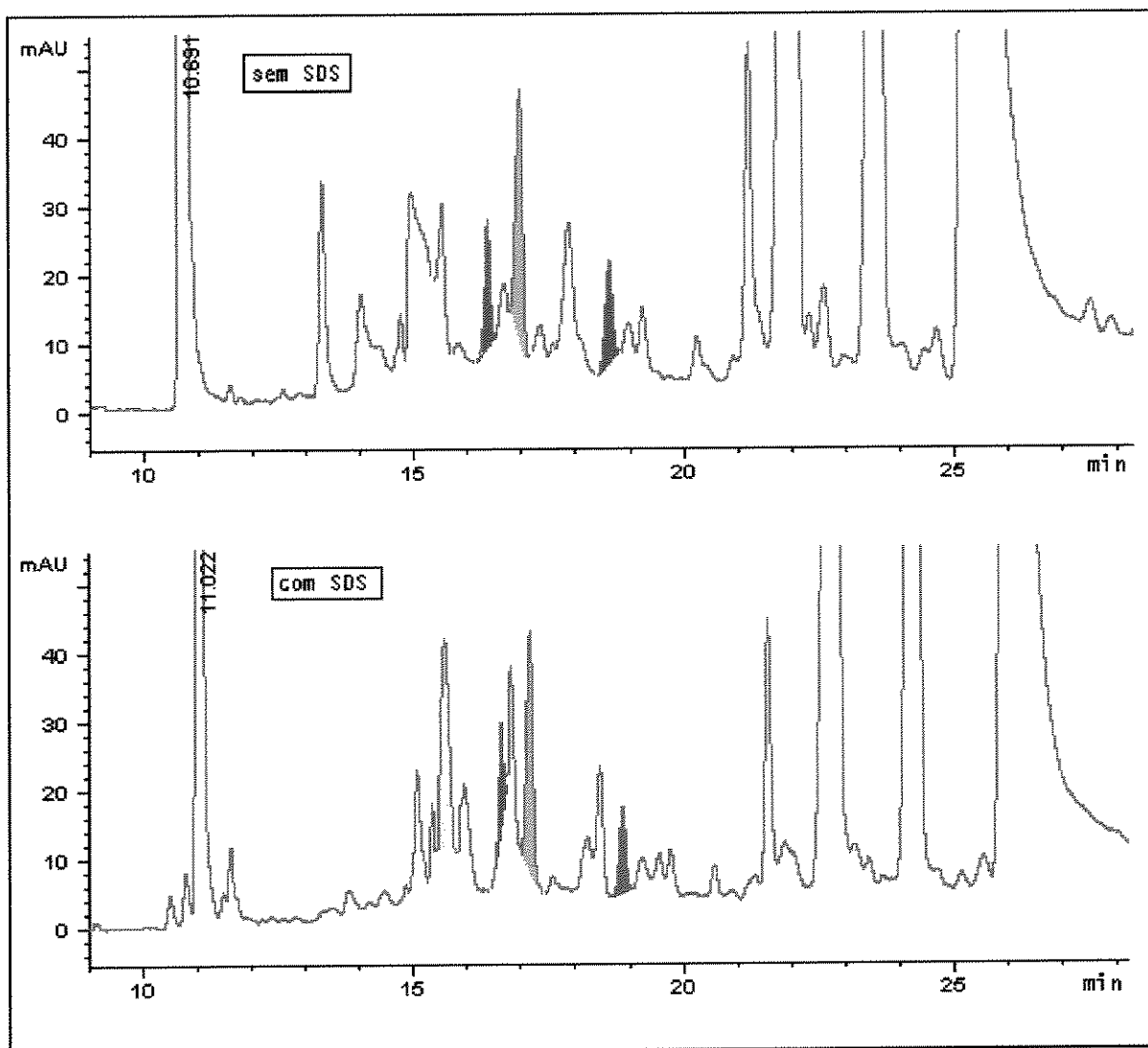
O efeito produzido com a adição de SDS numa concentração de 50 mM no eletrólito base de borato de sódio pH 9,3 foi basicamente a formação de micelas, o que pode ser ilustrado nos perfis obtidos na Figura 5a e 5b. Observou-se que o número de picos aumentou e o tempo de migração dos analitos, em geral, foi alterado, sendo comprovado por similaridade de espectros que alguns deles migraram em tempos maiores.

Em pH 9,3, o fluxo eletrosmótico EOF é grande e os peptídeos estão negativamente carregados. Apesar da migração eletroforética dos peptídeos até o polo positivo, ânodo, o EOF é grande o suficiente para eles se movimentarem e migrarem até o eletrodo negativo ou cátodo. Na presença de SDS no eletrólito base - técnica micelar (MECC) - a fração do analito não incorporada às micelas migrou em direção ao eletrodo negativo com velocidade inferior ao fluxo eletrosmótico, produzindo assim diferenças maiores na mobilidade entre os componentes e melhorando a separação. Mas, devido à complexa matriz urinária observada nos eletroferogramas, é ainda difícil de se obter uma clara resolução dos picos.

A utilização de um outro agente tensoativo aniônico, como o pentanosulfonato de sódio, poderá apresentar uma maior constante de distribuição entre a fase micelar e a fase aquosa que o SDS, talvez melhorando a seletividade e a resolução dos picos dos peptídeos. Devido à sua cadeia mais longa, o SDS deve interagir mais fortemente com os peptídeos que os pentasulfonatos. A diferença em resolução está provavelmente associada à natureza do grupo hidrofílico surfactante sendo este um dos parâmetros importantes que afetam a seletividade (Grimm *et al.*, 1997).



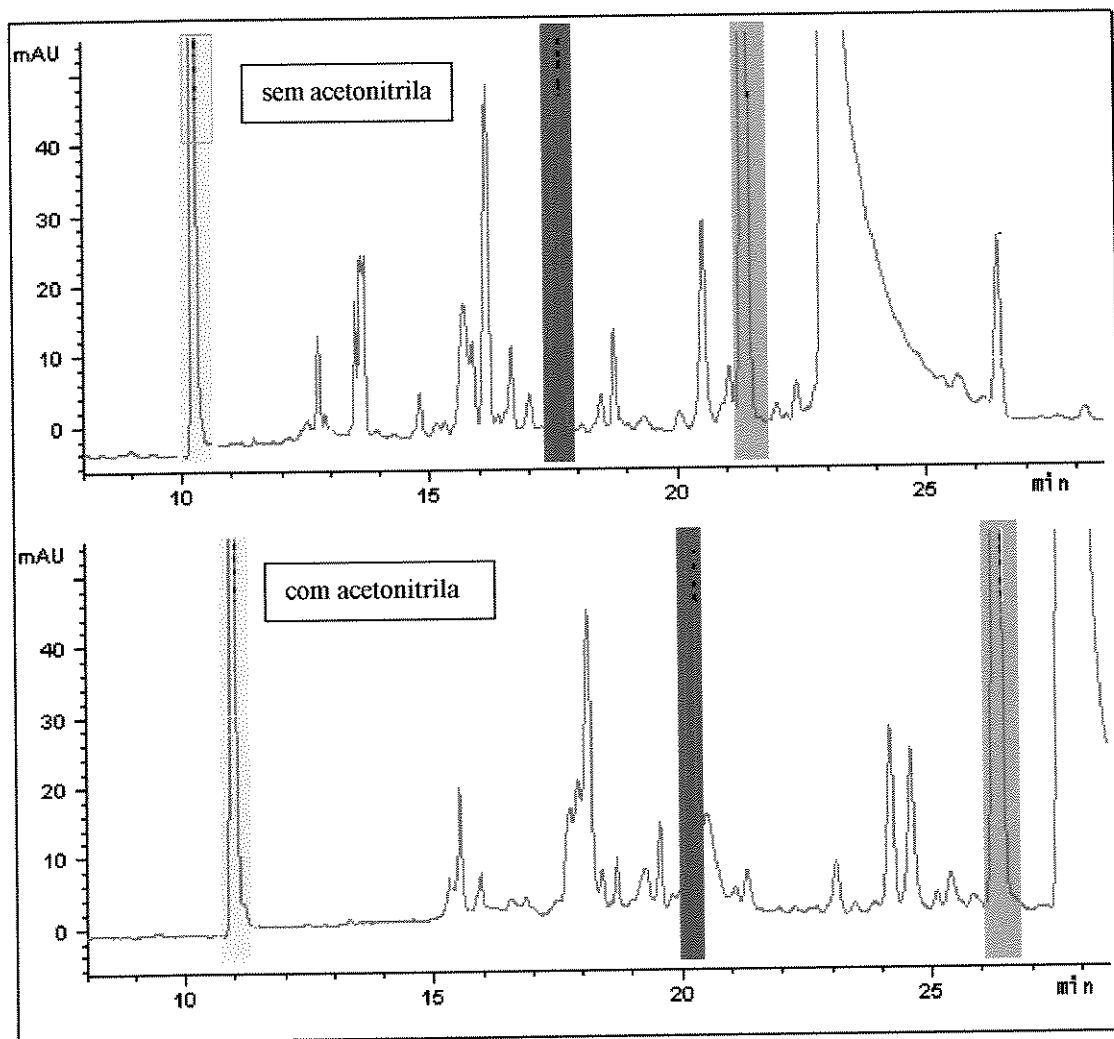
**Figura 5a** - Efeito no tempo de migração de alguns componentes urinários ao adicionar SDS 50 mM à solução tampão. Eletroferogramas obtidos por CE, detecção a 215 nm, utilizando capilar de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo e 75 $\mu$ m de DI, solução tampão de borato 50 mM (pH 9,3), 20 kV e 25°C. Tempo de injeção 4s.



**Figura 5b** - Efeito na resolução de alguns picos dos componentes urinários ao adicionar SDS à solução tampão. Eletroferogramas de urina obtidos por CE, nas condições experimentais da Figura 5a. Os picos coloridos foram identificados por seus respectivos espectros de absorção em UV, e ilustram o efeito produzido quando há formação de micelas.

A adição de alguns solventes orgânicos como acetonitrila e metanol ao tampão de corrida com o objetivo de maximizar a resolução entre dos picos e também a sua forma tem sido sugerida em vários estudos, entre outros para determinar desmosina e isodesmosina na urina (Viglio *et al.*, 1998). No nosso estudo, a adição de acetonitrila a 10% no tampão originou uma mudança no perfil eletroforético das urinas do tipo mostrado na Figura 6. Nela pode-se observar aumento dos tempos de migração com alguma alteração, também, na ordem de saída, mas em geral não houve vantagem na sua resolução. Os tempos de migração aumentam principalmente pelo fato de que os solventes orgânicos contribuem para diminuir o fluxo eletrosmótico (EOF).

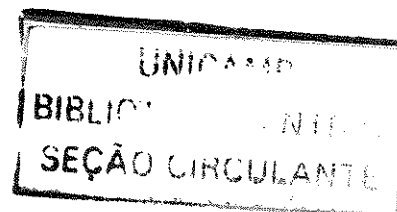


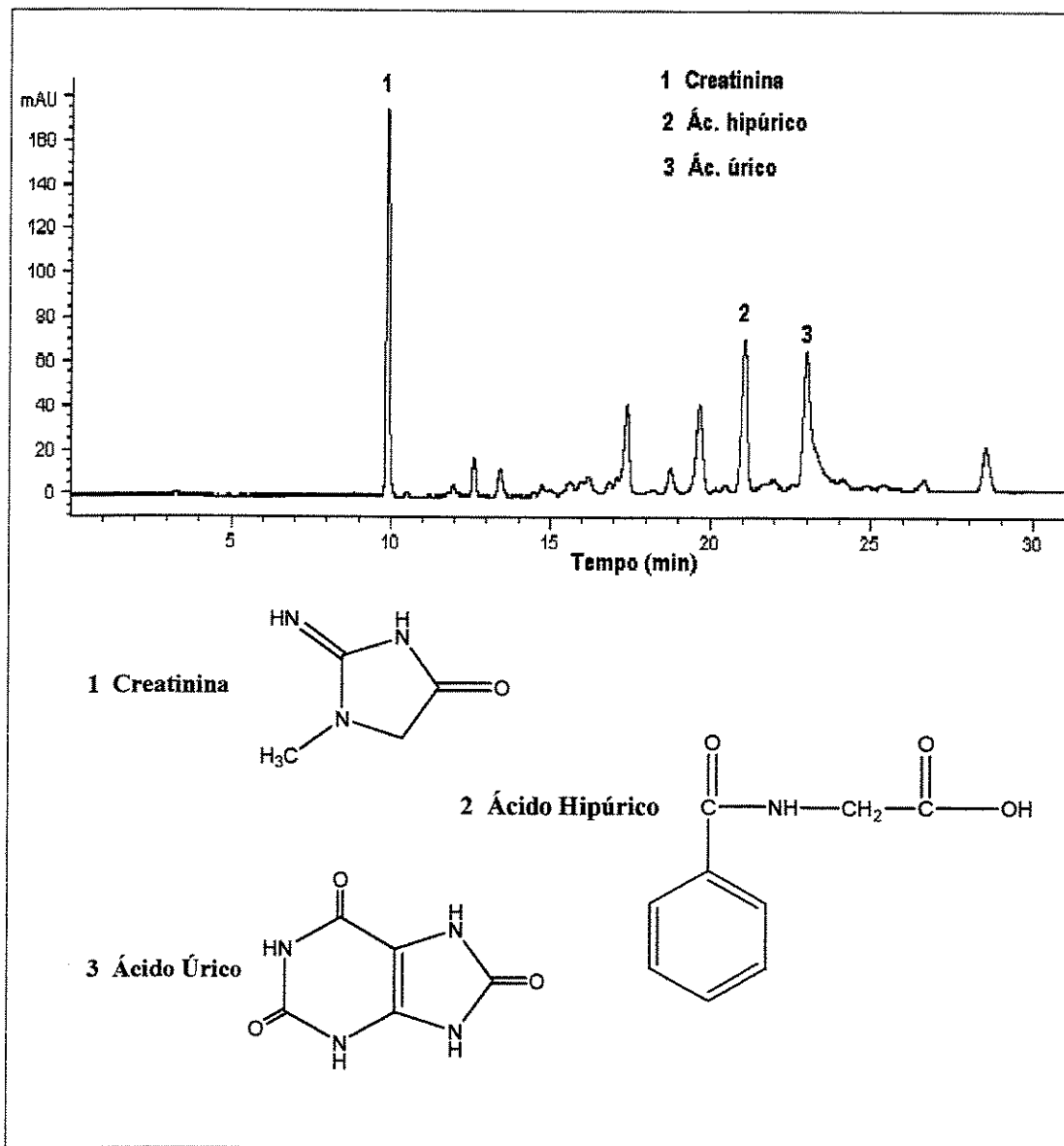


**Figura 6** - Efeito no tempo de migração e na resolução dos picos de componentes urinários ao adicionar 10% de acetonitrila na solução tampão. Eletroferogramas de urina obtidos nas condições de operação da Figura 5a.

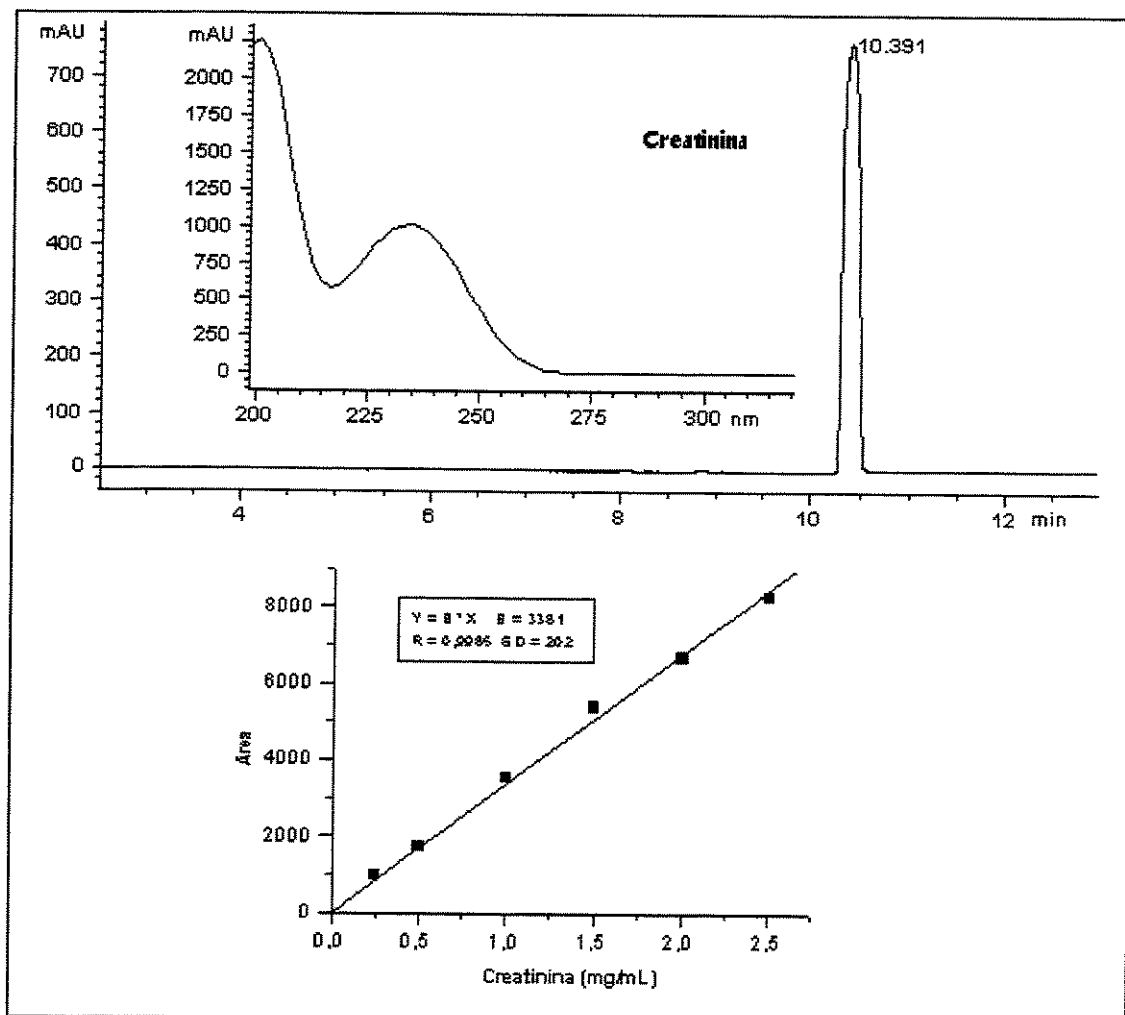
### **5.1.3.2. Perfis eletroforéticos das urinas.**

Os eletroferogramas das urinas de crianças autistas e normais mostram um perfil bastante heterogêneo na sua composição, apresentando no entanto, três picos em comum. Estes picos foram identificados por co-cromatografia e por comparação do seus espectros de absorção no UV com os correspondentes espectros de padrões autênticos, como creatinina, ácido hipúrico e o ácido úrico, correspondentes a tempos de migração aproximados de 10, 20 e 24 minutos respectivamente (Figura 7). Devido ao fato de serem metabólitos que estão presentes na urina em concentrações já conhecidas, optou-se por realizar determinações quantitativas rápidas, com a utilização de padrões para fins meramente comparativos. Curvas de calibração foram obtidas efetuando-se corridas eletroforéticas de soluções conhecidas de cada metabólito em água ultra-pura e plotando-se a área dos picos (mAU\*s) versus a concentração em mg/mL. As relações foram lineares de zero até a concentração máxima utilizada, que é a da faixa normal do metabólito encontrada em diversas amostras sem nenhuma diluição (Figuras 8, 9, e 10). Os metabólitos identificados foram relevantes para estabelecer uma comparação rápida entre os diferentes perfis, além de servirem como padrões internos e indicadores de possíveis alterações no condicionamento do capilar. Esta última propriedade era indicada rapidamente por mudanças nos tempos de migração dos padrões. A possibilidade de determinar principalmente creatinina endógena como padrão interno e outros analitos numa só corrida, é um modo de monitorar a performance do sistema CE. Assim, qualquer distúrbio que pudesse resultar em mudança das áreas dos picos observados, e que conduziriam a erros na quantificação, também seriam refletidos em mudanças do padrão interno.

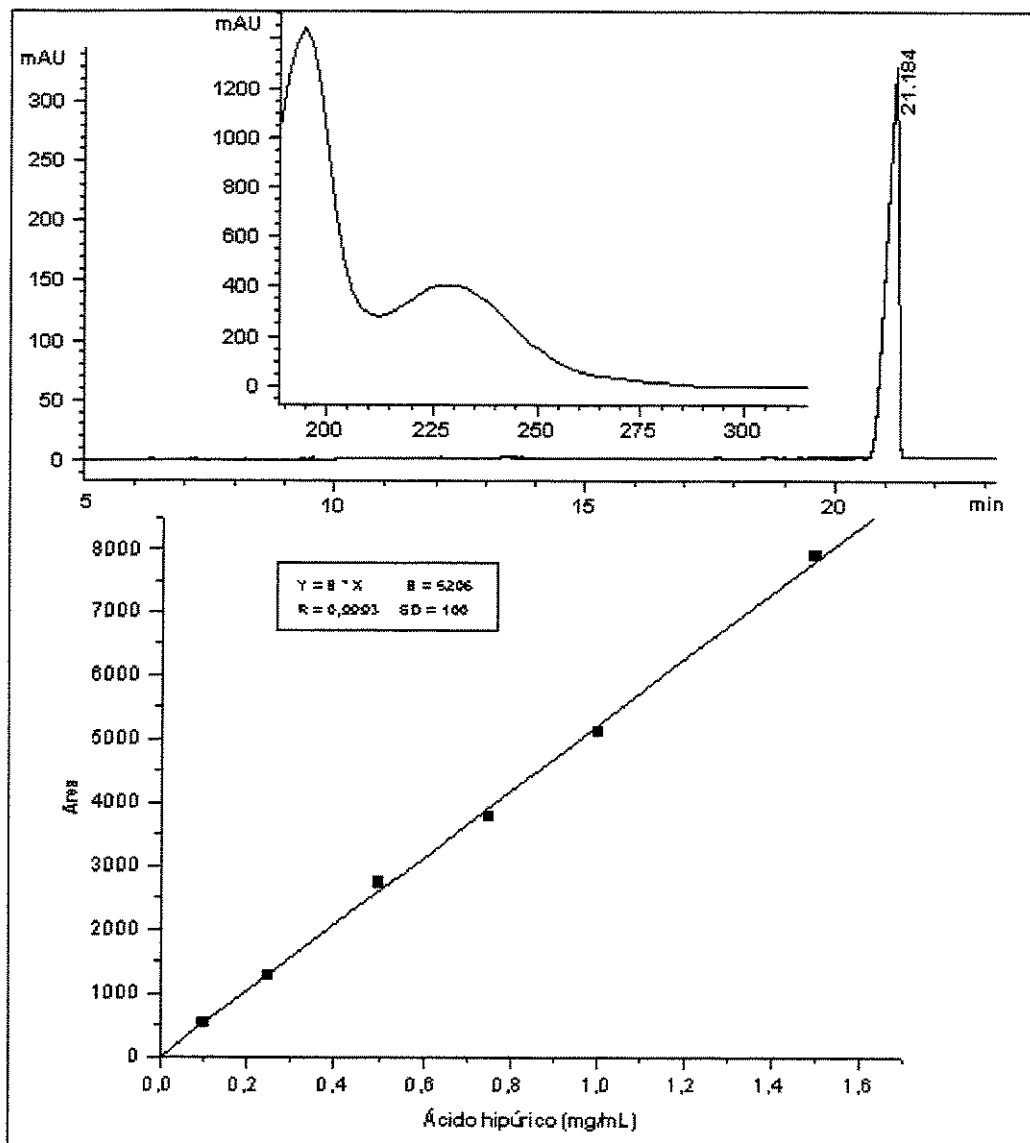




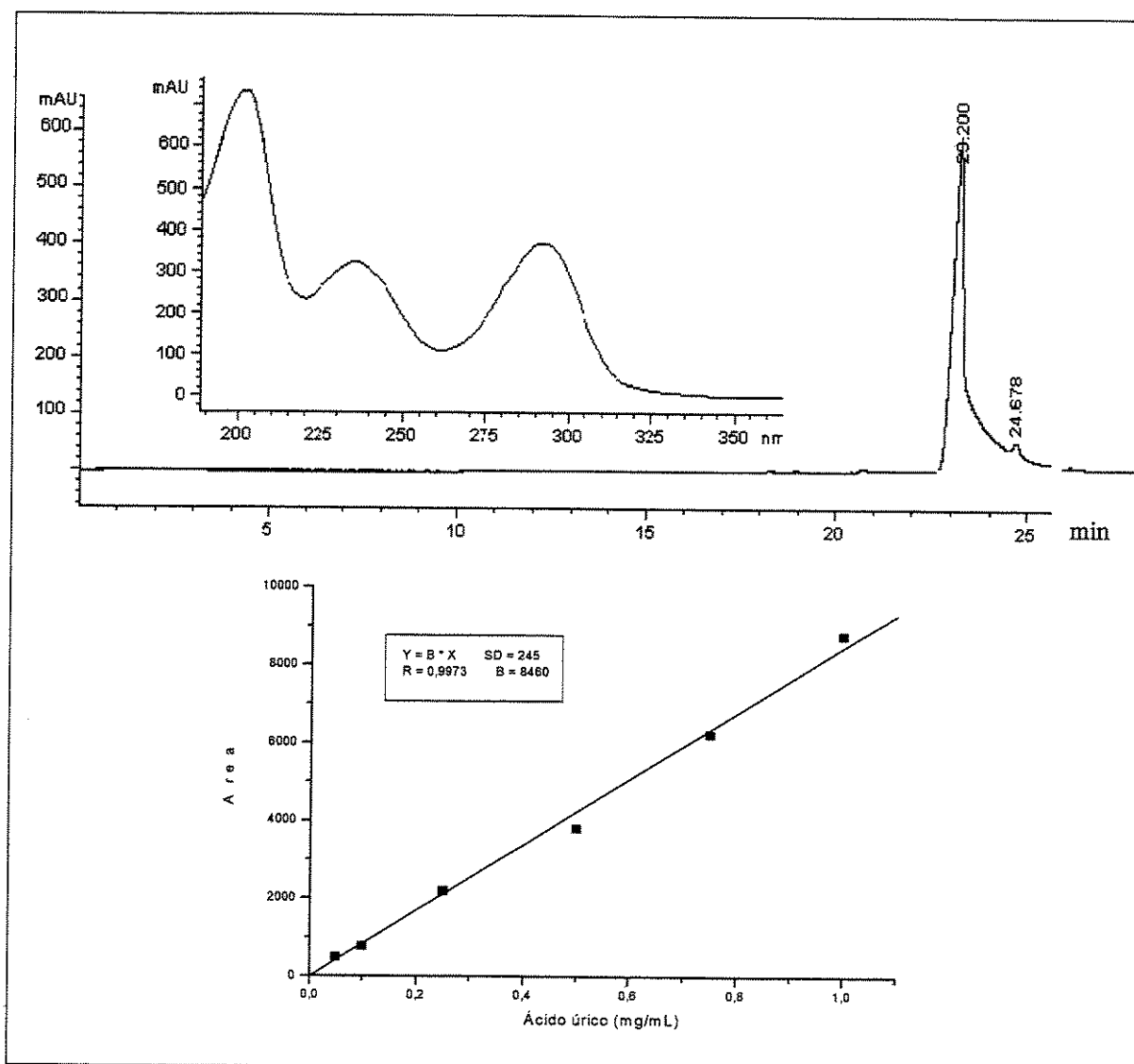
**Figura 7** - Análise de urina por CE, detecção a 215 nm. Separação efetuada em capilar de sílica fundida de 72 cm de comprimento efetivo e 75 $\mu$ m DI; tampão borato 50 mM, pH 9,3; 20 kV; 25 $^{\circ}$ C. Injeção hidrodinâmica por aplicação de pressão de 50 mbar, durante 4s. Os compostos endógenos: **1** creatinina, **2** ácido hipúrico e **3** ácido úrico, foram identificados por co-cromatografia e comparação de seus espectros de absorção no UV com padrões sintéticos.



**Figura 8** - Análise por CE, arranjo de diodos e detecção a 215nm de padrão de creatinina. Na parte superior o eletroferograma nas condições de operação da Figura 7, mostrando o tempo de migração da creatinina e o seu espectro de absorção no UV. Na parte inferior, aparece a curva de calibração obtida de eletroferogramas de soluções aquosas de diferentes concentrações do padrão creatinina.



**Figura 9** - Análise por CE, arranjo de diodos e detecção a 215 nm do ácido hipúrico padrão. Na parte superior, o eletroferograma obtido nas condições de operação da Figura 7, mostrando o tempo de migração do ácido hipúrico e o seu espectro de absorção no UV. Na parte inferior, a curva de calibração obtida dos eletroferogramas de soluções aquosas de diferentes concentrações do padrão.



**Figura 10** - Análise por CE, arranjo de díodos e detecção a 215 nm do ácido úrico padrão. Na parte superior, o eletroferograma obtido nas condições de operação da Figura 7, mostrando o tempo de migração do ácido úrico e o seu espectro de absorção no UV. Na parte inferior, a curva de calibração obtida dos eletroferogramas de soluções aquosas de diferentes concentrações do padrão.

Na Tabela 2 estão descritos os valores dos metabólitos mais expressivos determinados nas urinas do grupo de crianças autistas e na Tabela 3 os valores do grupo dos normais.

**Tabela 2 - Valores da concentração de alguns metabólitos na urina de crianças autistas**<sup>1</sup>

Doador autista	Creatinina mg/mL urina	Ác. hipúrico mg/mg creatinina	Ác. úrico mg/mg creatinina
1	0,32 ± 0,44	0,64 ± 0,62	1,70 ± 0,68
2	0,81 ± 0,61	0,69 ± 0,39	1,43 ± 0,42
3	1,70 ± 0,02	0,34 ± 0,19	0,80 ± 0,12
4	1,11 ± 0,73	1,04 ± 1,25	0,94 ± 0,43
5	0,92 ± 0,24	0,38 ± 0,08	0,89 ± 0,26
6	0,82 ± 0,30	0,40 ± 0,00	1,01 ± 0,20
7	1,51 ± 0,12	0,33 ± 0,13	0,69 ± 0,14
8	1,43 ± ---- <sup>2</sup>	0,71 ± ---- <sup>2</sup>	0,51 ± ---- <sup>2</sup>
9	1,52 ± 0,87	0,97 ± 1,06	1,28 ± 1,39
10	1,37 ± ---- <sup>2</sup>	0,51 ± ---- <sup>2</sup>	0,38 ± ---- <sup>2</sup>
11	1,62 ± 0,19	0,36 ± 0,04	0,76 ± 0,32
Média ± DP	1,19 ± 0,43	0,58 ± 0,25	0,94 ± 0,39

<sup>1</sup> Valores em cada coluna são médias de determinações individuais em número variável de amostras tomadas de cada doador, dependendo da disponibilidade de cada um.

<sup>2</sup> Amostra única.

Transformando os valores médios encontrados de ácido hipúrico e ácido úrico por mg de creatinina, em mg/mL de urina, teremos os valores de 0,69 mg/mL e 1,12 mg/mL, respectivamente.

**Tabela 3 - Valores das concentrações dos metabólitos na urina de crianças normais <sup>1</sup>**

Doador normal	Creatinina (mg/mL de urina)	Ácido hipúrico (mg/mg creatinina)	Ácido úrico (mg/mg creatinina)
1	1,71	0,50	0,39
2	1,50	0,31	0,63
3	0,43	1,08	1,06
4	1,82	0,44	0,53
5	1,78	0,33	0,60
6	1,25	0,65	0,61
7	1,20	0,32	1,00
8	1,78	0,14	0,75
9	1,94	0,30	1,13
10	1,38	0,43	0,55
11	0,95	0,75	0,86
Média±DP	1,43 ± 0,45	0,48 ± 0,26	0,74 ± 0,24

<sup>1</sup>Valores em cada coluna são determinações individuais de amostra única.

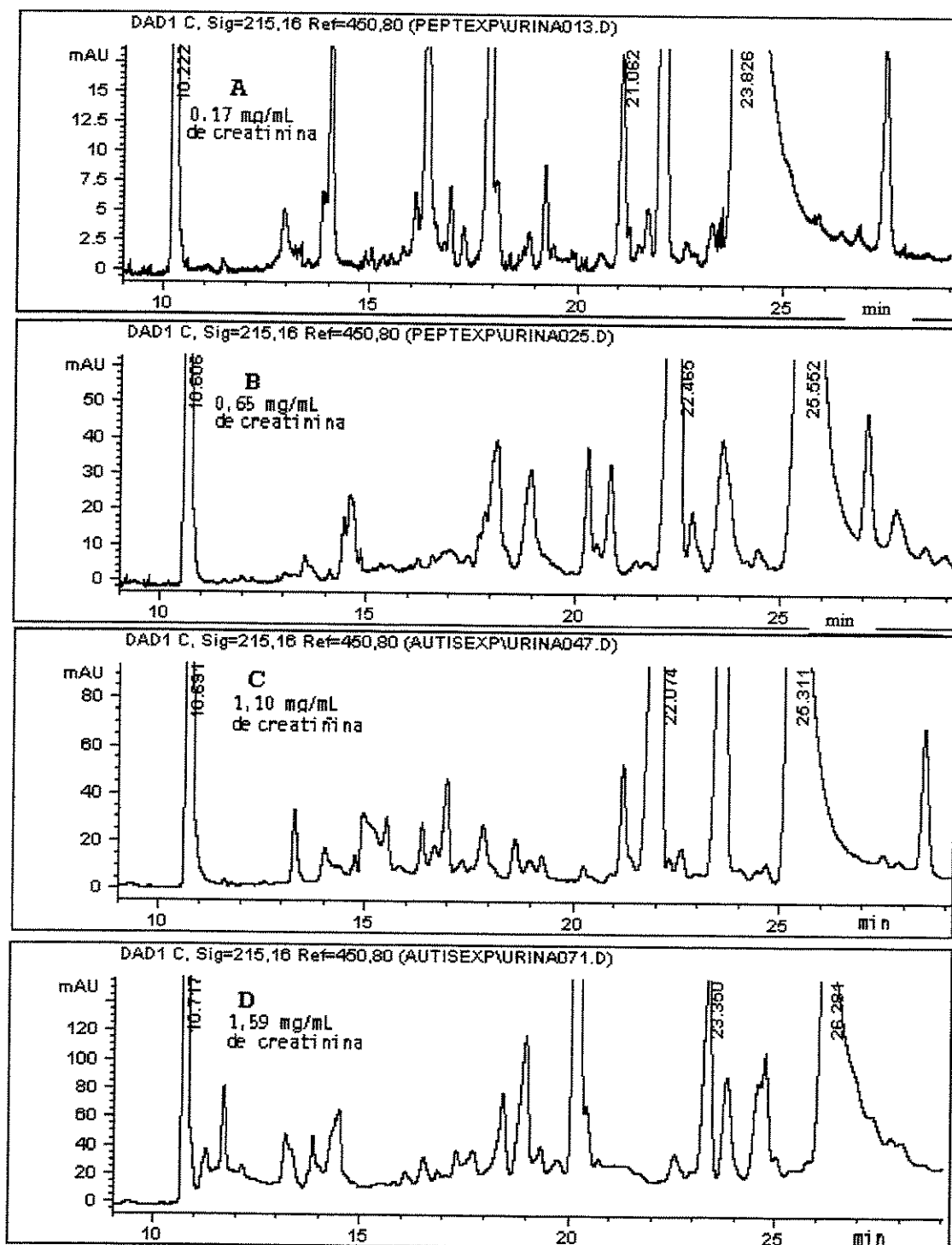
Os valores médios obtidos de ácido hipúrico e ácido úrico, expressos em termos de mg/mg de creatinina transformados para mg/mL de urina, resultaram em valores de 0,69 mg/mL e 1,06 mg/mL, respectivamente.



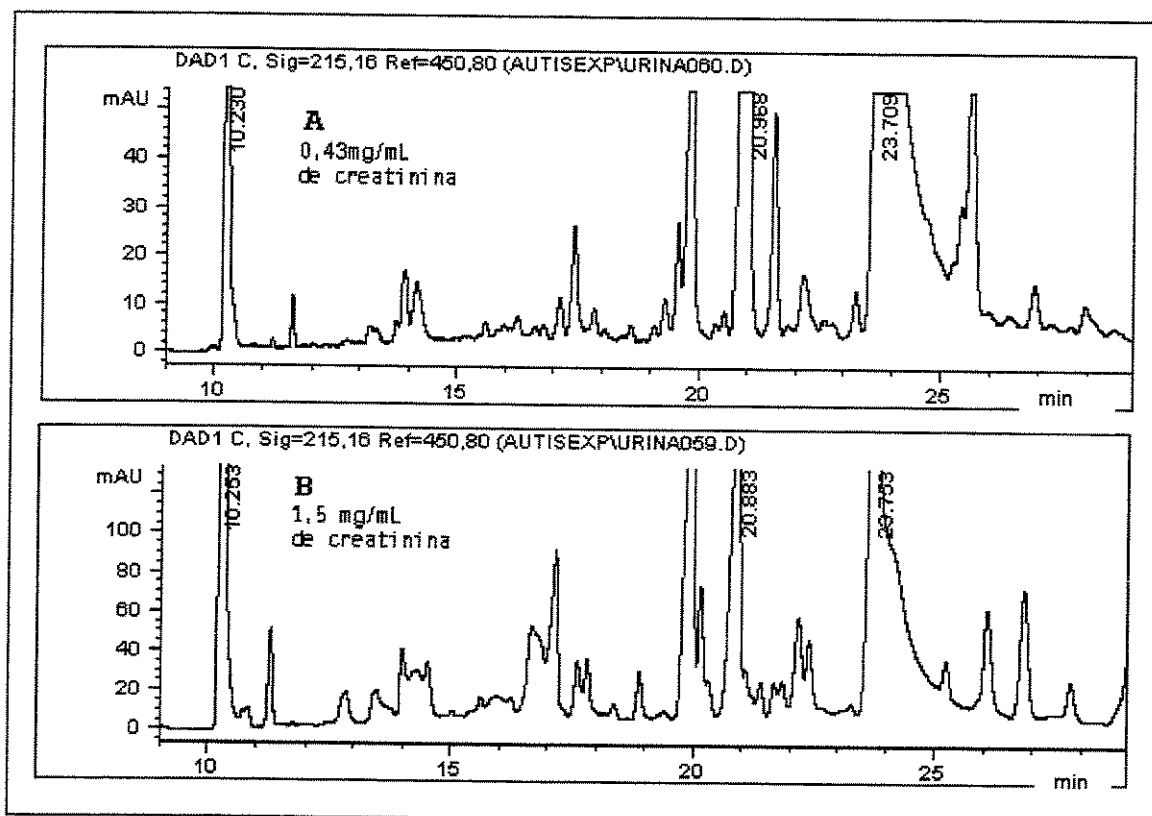
Os valores encontrados na literatura (Lange, 1973) para a excreta de 24 h, estão na faixa de: 1-1,8g de creatinina, 0,1-1g ácido hipúrico e 0,5-0,8g de ácido úrico. Considerando um volume total de urina médio de 1200 mL por dia estes valores seriam 0,83-1,50 mg/mL, 0,08-0,83 mg/mL e 0,42-0,67 mg/mL de cada metabólito respectivamente.

Os valores médios de creatinina e ácido hipúrico obtidos para ambos os grupos, autistas e normais, estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura. Já os teores de ácido úrico foram superiores nos dois grupos, sendo que no grupo de autistas o valor médio foi mais alto do que nos normais, como resultado de valores elevados em três crianças autistas, 1,70, 1,43 e 1,28 mg/mL. Reichelt *et al.* (1994), encontraram que, em 50% das crianças de um grupo de autistas, os teores de ácido úrico estavam elevados.

Os eletroferogramas das Figuras 11 e 12 mostram alguns perfis urinários de crianças autistas e crianças normais, respectivamente. Tais perfis mostram que as urinas são qualitativa e quantitativamente diferentes quanto aos seus componentes sensíveis à detecção por UV.



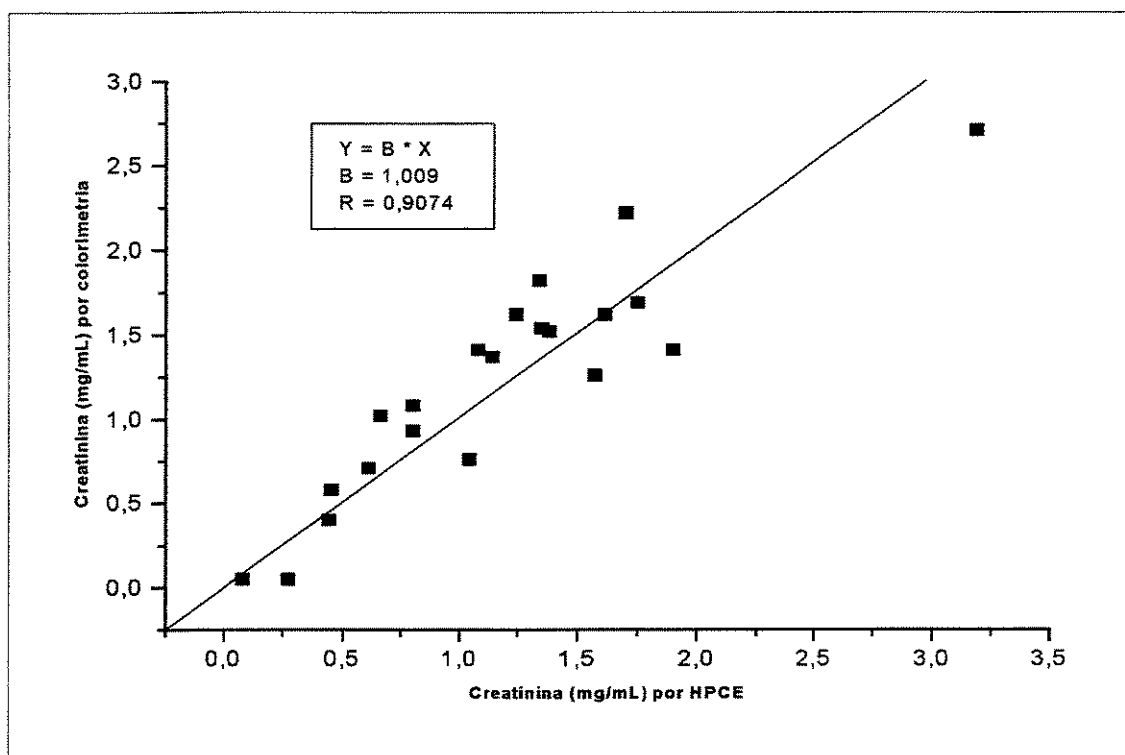
**Figura 11** - Eletroferogramas de urina de quatro crianças autistas **A**, **B**, **C** e **D**, obtidos nas condições de operação da Figura 7. Escala em mAU amplificada e ajustada para comparação direta dos perfis de urinas que se encontram em diferente grau de diluição (Ver o teor de creatinina). Os picos mostrando o tempo de migração são de esquerda para a direita: creatinina, ácido hipúrico e ácido úrico.



**Figura 12** - Eletroferogramas **A** e **B** de urina de crianças normais, obtidos nas condições de operação da Figura 7. Escala em mAU, amplificada e ajustada para comparação direta dos perfis das urinas em A e B contendo 0,43 e 1,5 mg/mL de creatinina respectivamente.

### **5.1.3.3. Correlação entre os métodos para creatinina.**

A quantificação da creatinina obtida por colorimetria foi comparada à obtida por HPCE. A regressão linear aplicada a estes resultados é mostrada na Figura 13. O coeficiente de correlação foi 0,91. Pelos resultados obtidos concluiu-se que o método por HPCE foi satisfatório para a determinação de creatinina, sendo este último mais simples, rápido e menos sujeito a erro experimental do que o colorimétrico. Sendo assim, o método para a determinação de creatinina por HPCE foi utilizado nas análises de urina, o que proporcionou uma rápida informação sobre o teor deste e de outros componentes da urina, todos normalizados em relação à ela. A pureza do pico de creatinina excedeu o limite mínimo calculado (90.1%, utilizando 93% do espectro), segundo a análise do software HP-ChemStation.



**Figura 13** - Correlação entre as concentrações de creatinina urinária obtidas por colorimetria e HPCE.

Visto que a performance de uma técnica analítica é avaliada em termos de exatidão, precisão, reprodutibilidade e faixa dinâmica, foi de interesse determinar a precisão do método de eletroforese capilar em termos do tempo de migração e da área dos picos de creatinina. A Tabela 4 mostra que a precisão do método foi satisfatória ao se fazerem seis injeções consecutivas da mesma amostra de urina coletada de um doador.

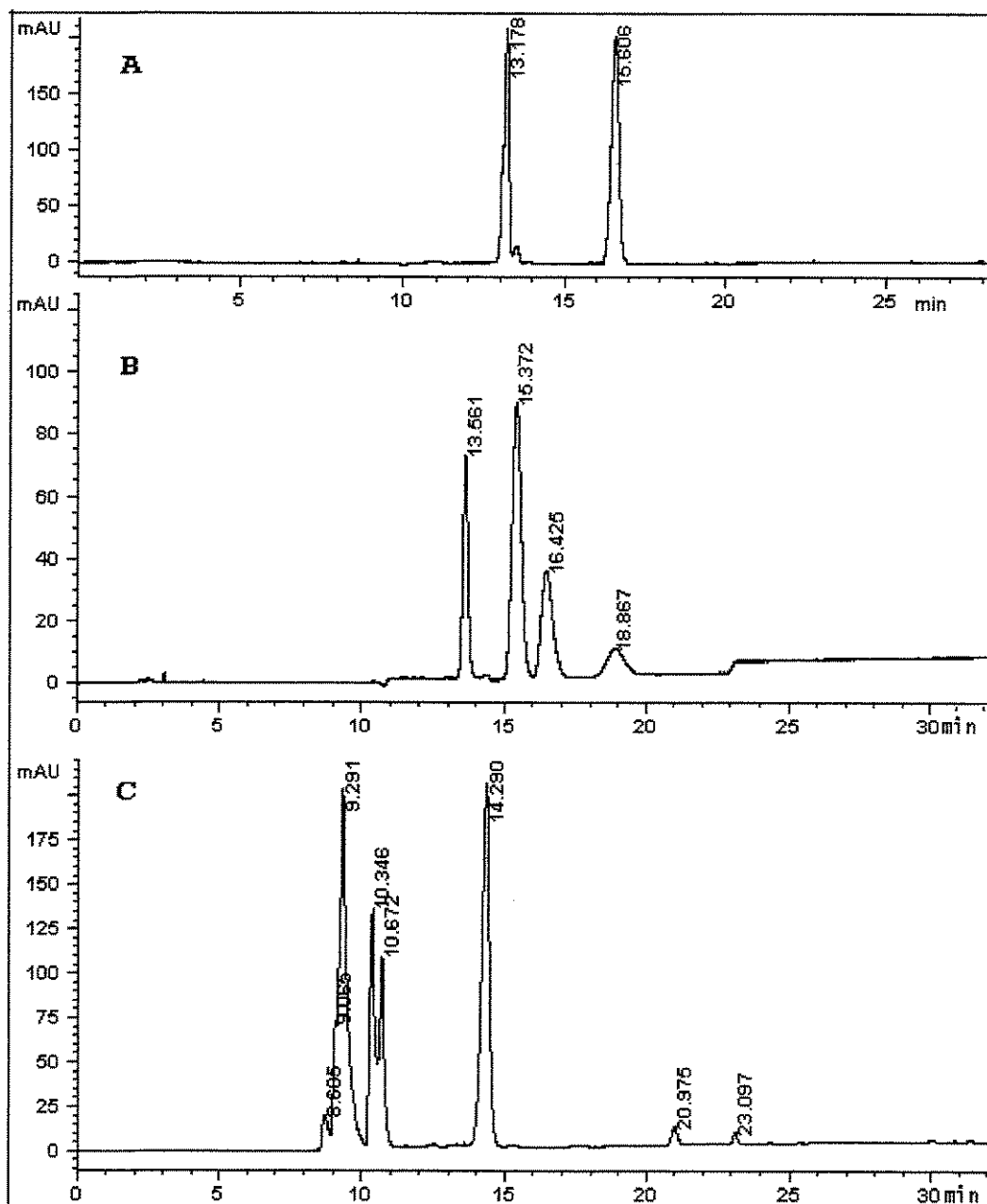
**Tabela 4 - Precisão das áreas e tempos de migração da creatinina em amostra de urina contendo 0,75mg/mL de creatinina**

Número de corrida	Área do pico creatinina (mAU*s)	Tempo migração (min)
1	2400	10,10
2	2369	10,12
3	2464	10,11
4	2429	10,13
5	2525	10,13
6	2472	10,08
Média	2443	10,11
Desvio Padrão ( $\pm$ )	55,73	0,019
Coefficiente de variação (%)	2,28	0,19

#### **5.1.3.4. Concentração de peptídeos urinários por HPCE**

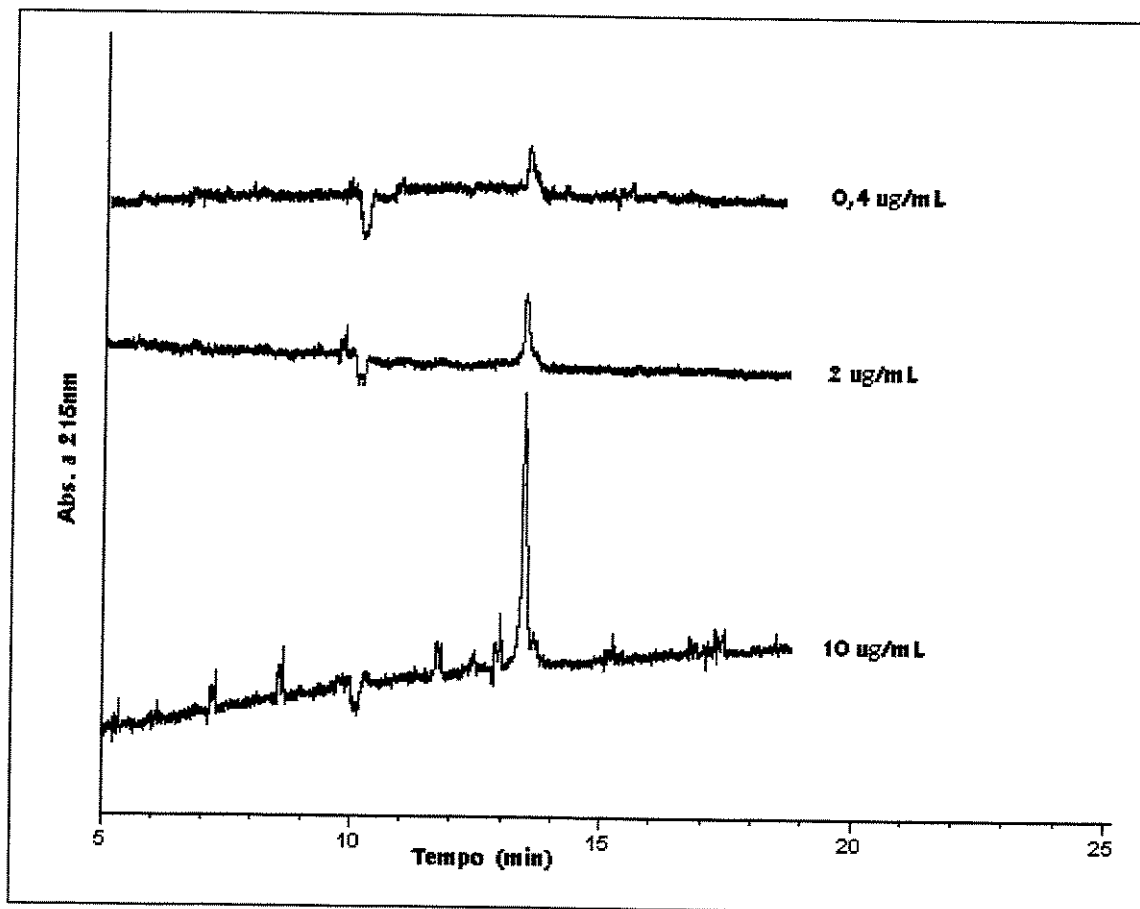
Ao efetuar a eletroforese de padrões de peptídeos nas condições de operação adotadas para as análises, verificou-se que os peptídeos tinham tempo de migração compreendido entre aquele da creatinina e o do ácido hipúrico no eletroferograma (Figura 14). Os padrões utilizados possuíam de 2 a 8 aminoácidos. Entre eles, se encontravam dois padrões de peptídeos opióides  $\beta$ -casomorfinina bovina (1-7) e fragmento  $\beta$ -casomorfinina (1-3), apropriados para a comparação com os peptídeos procurados na urina. Com a finalidade de assegurarmos de que estávamos escolhendo a região típica dos peptídeos foi injetada uma amostra de peptídeos de soro de leite, os quais eluíram em sua grande maioria nesta região.

De especial interesse era a verificação da presença de algum peptídeo opióide na urina, motivo pelo qual foi feita uma avaliação prévia do limite de detecção injetando soluções do padrão  $\beta$ -casomorfinina (1-7) em diluições sucessivas, sendo determinado que 0,4  $\mu\text{g/mL}$  era a menor quantidade detectável, o que correspondia a aproximadamente três vezes o valor da amplitude do ruído do equipamento. Os eletroferogramas que mostram a sensibilidade na detecção da  $\beta$ -casomorfinina (1-7) são apresentados na Figura 15. Os limites de detecção para peptídeos pequenos que não contêm cromóforos fortes estão na faixa de  $\mu\text{g/mL}$ , como é o caso das  $\beta$ -casomorfinas. Lembrando das afirmações de Reichelt *et al.*, (1991, 1997) sobre o aparecimento dos peptídeos urinários característicos e em quantidades elevadas em pacientes autistas, era de se esperar uma presença considerável de peptídeos do tipo  $\beta$ -casomorfinina, especialmente em crianças que sabidamente consumiram alimentos contendo caseína. Embora não esteja nos objetivos, o nosso intuito era o de detectar picos de peptídeos que pudessem diferenciar a urina de um autista da urina de uma criança normal.



**Figura 14** - Eletroferogramas de padrões de peptídeos em solução aquosa obtidos nas condições de operação da Figura 7. Em **A**: foi analisada uma mistura do padrão  $\beta$ -casomorfina 1-7 (13,17 min) e fragmento  $\beta$ -casomorfina 1-3 (15,60 min), em **B**: uma mistura de Gly-Tyr, Val-Tyr-Val, Met-enkefalina, Leu-enkefalina e angiotensina II e em **C**: um padrão de peptídeos contendo bradiquinina, fragmento de bradiquinina 1-5, substância P, Arg-vasopressina, hormônio liberador do hormônio luteinizante, bombesina, Leu-enkefalina, Met-enkefalina e oxitocina. Detecção a 215 nm.

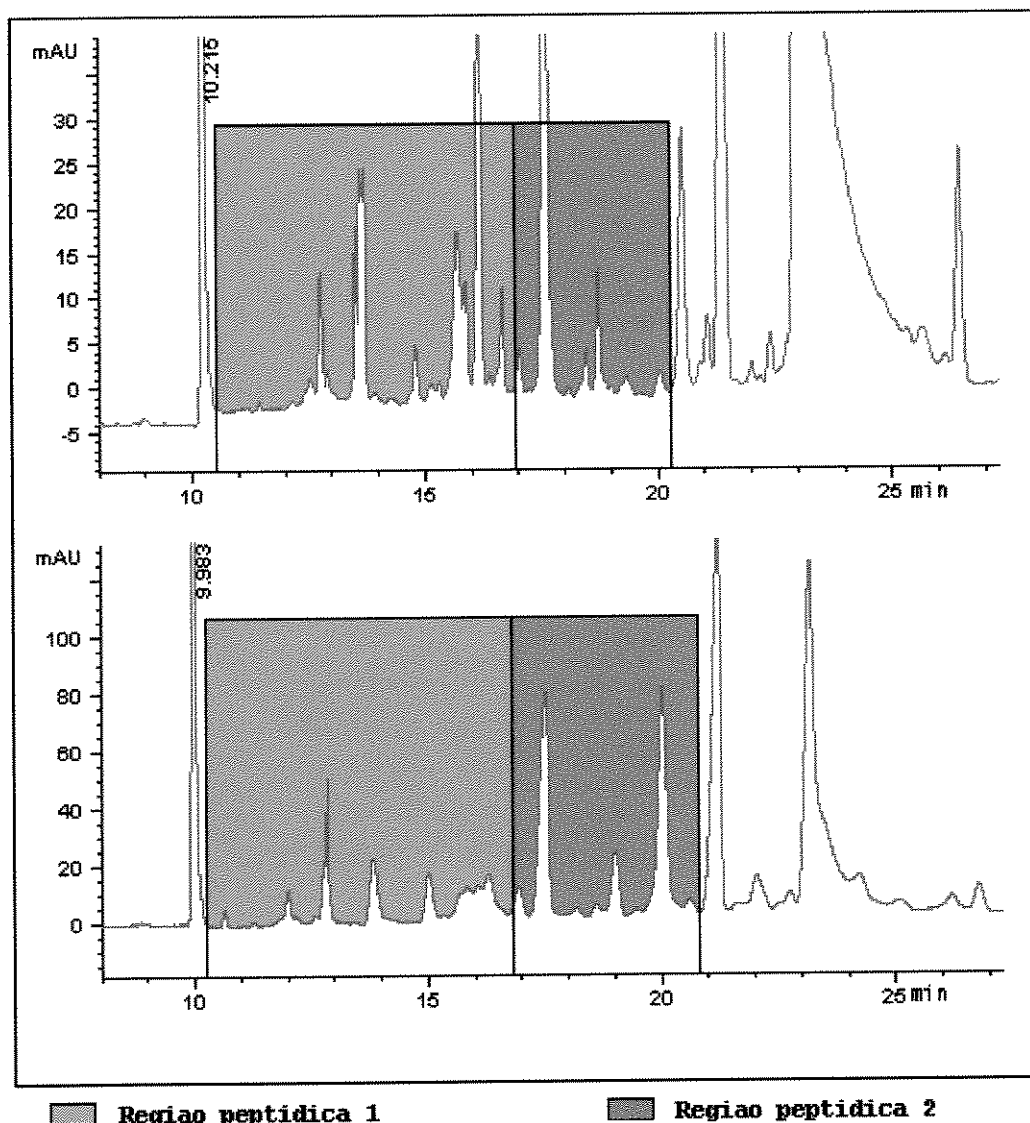




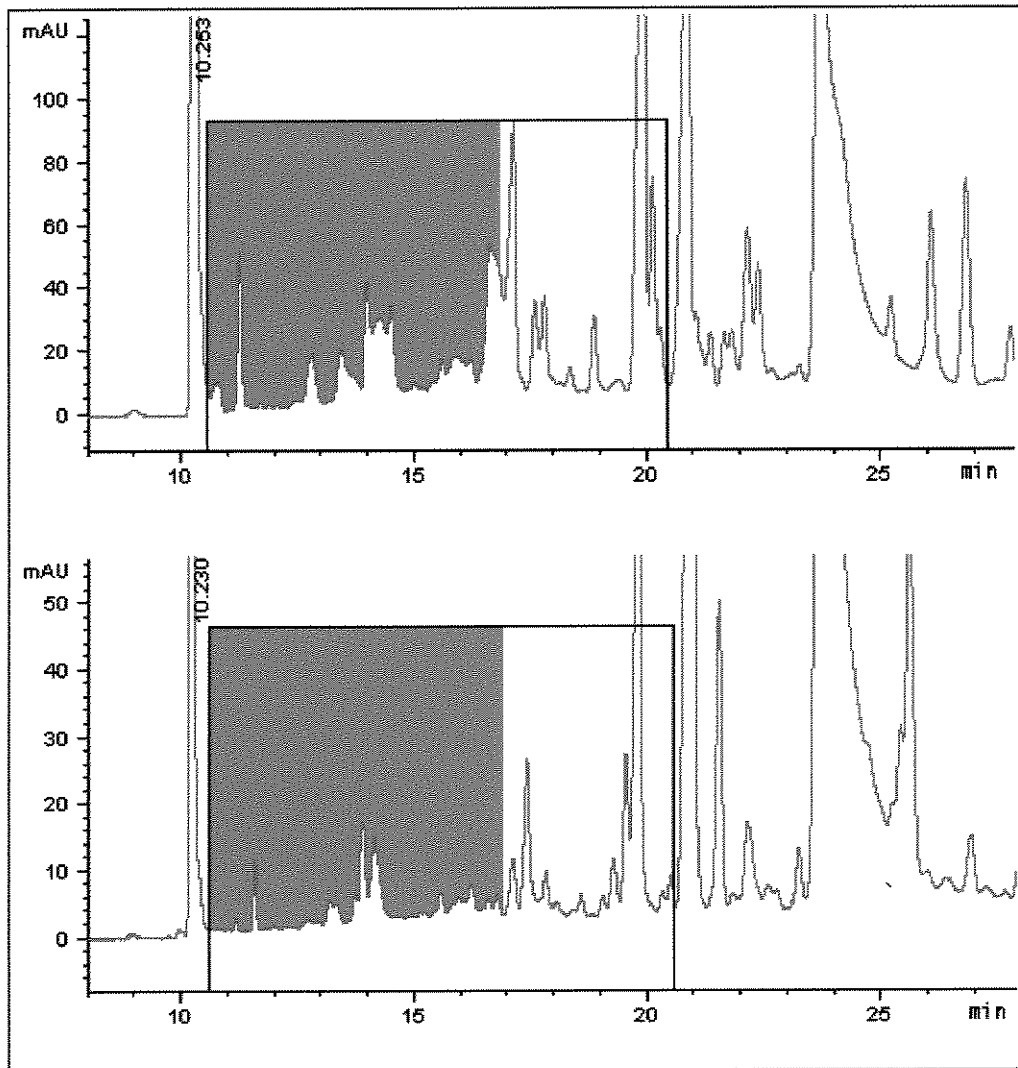
**Figura 15** - Sensibilidade na análise por CE do peptídeo  $\beta$ -casomorfina 1-7. Capilar: sílica fundida 72 cm comprimento efetivo, 75 $\mu$ m DI; tampão borato 50 mM (pH 9,3); modo de injeção por pressão: 4s a 50 mbar; temperatura: 25 $^{\circ}$ C; voltagem: 20 kV; detetor: UV a 215 nm.

Nos estudos cromatográficos de Reichelt *et al.* (1991), uma banda foi identificada como sendo  $\beta$ -casomorfina (1-8), mediante imunorreacção. Em análises de urina de autistas realizadas por HPLC (Reichelt *et al.*, 1997), foi verificada a presença do peptídeo do tipo  $\beta$ -casomorfina (1-8), por co-cromatografia com o padrão sintético.

Para comparação da quantidade total de peptídeos urinários entre o grupo de autistas e o grupo normal, utilizou-se a somatória das áreas dos picos que migram nesta região, entre a creatinina e o ácido hipúrico. Denominou-se de "região peptídica 1" (RP1), aquela que começava logo após a creatinina, compreendendo até o tempo de 17 min. Esta região corresponde à migração dos peptídeos opióides como  $\beta$ -casomorfina (1-7) e fragmento (1-3). A "região peptídica 2" (RP2), foi então aquela que iniciava aos 17 min e avançava até o tempo de migração do ácido hipúrico. As Figuras 16a e 16b mostram as "regiões peptídicas 1 e 2" dos perfis eletroforéticos de urina de crianças autistas e normais, respectivamente, e os valores da soma das áreas dos seus picos são apresentados na Tabela 5.



**Figura 16a** - Eletroferogramas de urina de autistas obtidos nas condições experimentais da Figura 7. As regiões coloridas abrangem os tempos principais de migração de peptídeos como determinado em análise mostrada nos eletroferogramas da Figura 14.



■ Regiao peptidica 1      □ Regiao peptidica 2

**Figura 16b** - Eletroferogramas de urina de crianças normais obtidos nas condições experimentais da Figura 7. As regiões coloridas abrangem os tempos principais de migração de peptídeos como determinado em análise mostrada nos eletroferogramas da Figura 14.

**Tabela 5- Nível de peptídeos urinários expresso como áreas relativas à creatinina nas regiões denominadas como "região peptídica 1" e "região peptídica 2" nos eletroferogramas de HPCE**

Autistas			Normais		
Doador	reg pept 1 <sup>1</sup>	reg pept 2 <sup>1</sup>	Doador	reg pept 1 <sup>1</sup>	reg pept 2 <sup>1</sup>
1	0,52	0,42	1	0,21	0,97
2	0,32	0,75	2	0,54	0,97
3	0,70	0,99	3	0,32	0,92
4	0,48	0,93	4	0,28	0,56
5	0,31	0,69	5	0,22	0,94
6	0,63	0,62	6	0,56	0,79
7	0,44	1,60	7	0,45	0,69
8	0,27	1,55	8	0,52	0,39
9	0,37	0,52	9	0,30	0,40
10	0,32	0,45	10	0,35	0,64
11	0,42	0,87	11	0,40	0,84
Média ± DP	0,44 ± 0,14	0,85 ± 0,40	Média ± DP	0,38 ± 0,13	0,74 ± 0,22
CV (%)	31,82	47,06	CV (%)	34,21	29,73

<sup>1</sup>Unidades de área (mAU\*s) relativa a área (mAU\*s) de creatinina

A média das áreas de ambas as regiões peptídicas nos autistas foi maior que a média dos normais, mas esta diferença não mostrou ser significativa ( $P=0,32$ , para RP1 e  $P=0,41$ , para RP2) quando aplicado o teste Tukey. Observa-se uma variação maior nos valores da RP2 do grupo autista, (CV = 47,06%) o que é consistente com o fato de alguns indivíduos mostrarem níveis elevados. Isto é, dentro da população autista amostrada, dois doadores mostraram concentração aproximadamente duas vezes maior de

peptídeos na RP2 do que pode ser considerado normal. Entretanto se considerarmos a somatória dos valores de ambas as "regiões peptídicas" (RP1 + RP2) do subgrupo de quatro autistas (doadores 3,4,7,8) com maior área e compararmos com o subgrupo dos normais (doadores 2,3,6,11) com maior área, as diferenças são significativas ( $P=0,03$ ).

#### **5.1.3.5. Verificação da "região peptídica" pelo aminograma**

Injeções de padrões de aminoácidos livres foram feitas no HPCE, mostrando que os mesmos aparecem também na região designada como peptídica. Com o objetivo de confirmar que aminoácidos e peptídeos urinários eletroferografam nesta região, foi necessário coletar esta fração repetidas vezes, juntar em *pool* próprio de autistas e não-autistas e determinar o aumento na concentração de aminoácidos após sua hidrólise ácida. Para isto, foram coletadas frações segundo procedimento descrito em Material e Métodos, item 4.2.1.2.

Os resultados mostraram a presença de aminoácidos livres nas frações de urina correspondentes às "regiões peptídicas 1 e 2" coletadas no HPCE, tanto de autistas como de normais. Na análise das frações submetidas a hidrólise verificou-se ainda o aumento de alguns aminoácidos, indicando que eles provinham de peptídeos urinários. No grupo de autistas os aminoácidos de maior relevância liberados após a hidrólise foram Asp, Glu, Gly, Ser, Ala, Lys, e Arg. Considerando que a área total sensível à ninidrina após a hidrólise duplicou, conclui-se que tenha havido predominância de dipeptídeos na urina. Os peptídeos de natureza opióide não estariam presentes pois em geral possuem acima de 3 resíduos de aminoácidos. Nas frações hidrolisadas das urinas de crianças normais verificou-se um aumento dos aminoácidos, Asp, Glu, Gly, Ala e Ser, mas em proporção muito menor se comparados às dos autistas. Em ambas as frações hidrolisadas houve similar e substancial aumento na quantidade de amônia liberada, significando que os aminoácidos livres, e talvez também os peptídeos, se encontravam amidados. Nas determinações de aminoácidos não foi detectado aumento dos aminoácidos Tyr e Phe, característicos da composição dos peptídeos opióides.

Em estudo realizado por Reichelt *et al.* (1998), com crianças celíacas, foi observado que após a hidrólise da urina houve aumento dos aminoácidos Asp, Glu, Gly, Ser, Ala e Pro.

#### **5.1.4. Análise por HPLC**

##### **5.1.4.1. Perfis cromatográficos das urinas**

Obteve-se o perfil cromatográfico da Figura 17 ao fazer injeção de uma amostra de urina equivalente a 250 nmol de creatinina. Os diferentes perfis obtidos (Figuras 17 e 18), mostram a heterogeneidade das urinas quanto ao número de picos e à quantidade do analito representada pelos diferentes níveis de absorbância no UV. Em estudo com autistas e celíacos Reichelt *et al.* (1997 e 1998) determinaram que a região peptídica começava logo em seguida ao ácido hipúrico, que migra ao redor de 25-26 min até aproximadamente o tempo de 70 min, nas mesmas condições de análise cromatográfica de nosso estudo. Nós definimos a região peptídica após identificação do pico do ácido hipúrico por co-cromatografia com padrão sintético. Os valores encontrados na Tabela 6 representam a somatória das áreas dos picos da região.

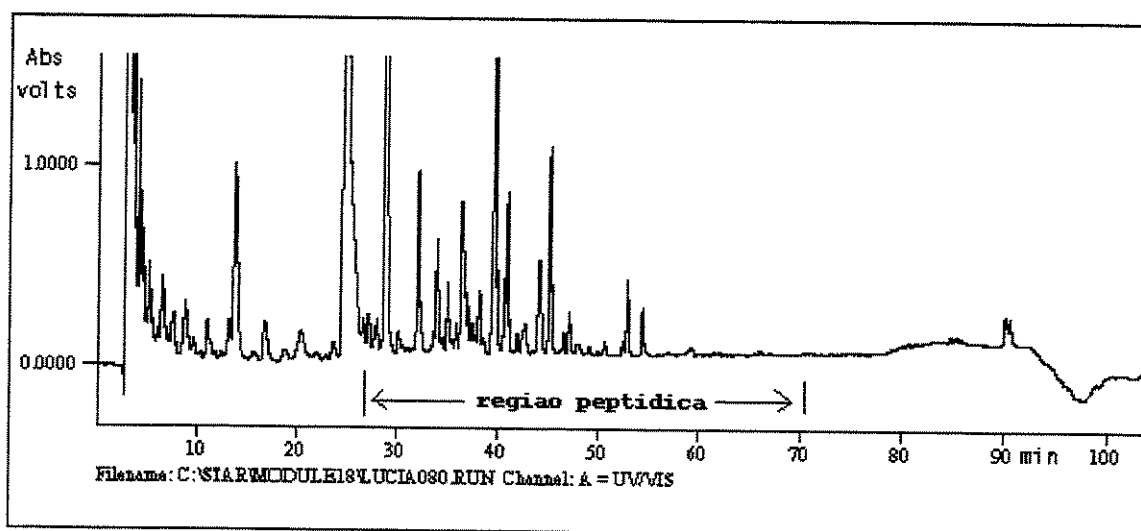
**Tabela 6 - Nível de peptídeos nas urinas, expresso em termos da área dos picos da região peptídica principal nos cromatogramas de HPLC**

Autistas		Normais	
Doador	Área (unidades relativas) <sup>(1)</sup>	Doador	Área (unidades relativas) <sup>(1)</sup>
8	2832	2	1158
6	1819	4	980
7	1490	5	851
3	1469	3	701
11	1235		
2	1226		
5	969		
1	676		
4	664		
Média ± DP	1376 ± 665	Média ± DP	923 ± 323
CV (%)	48,33	CV (%)	34,99

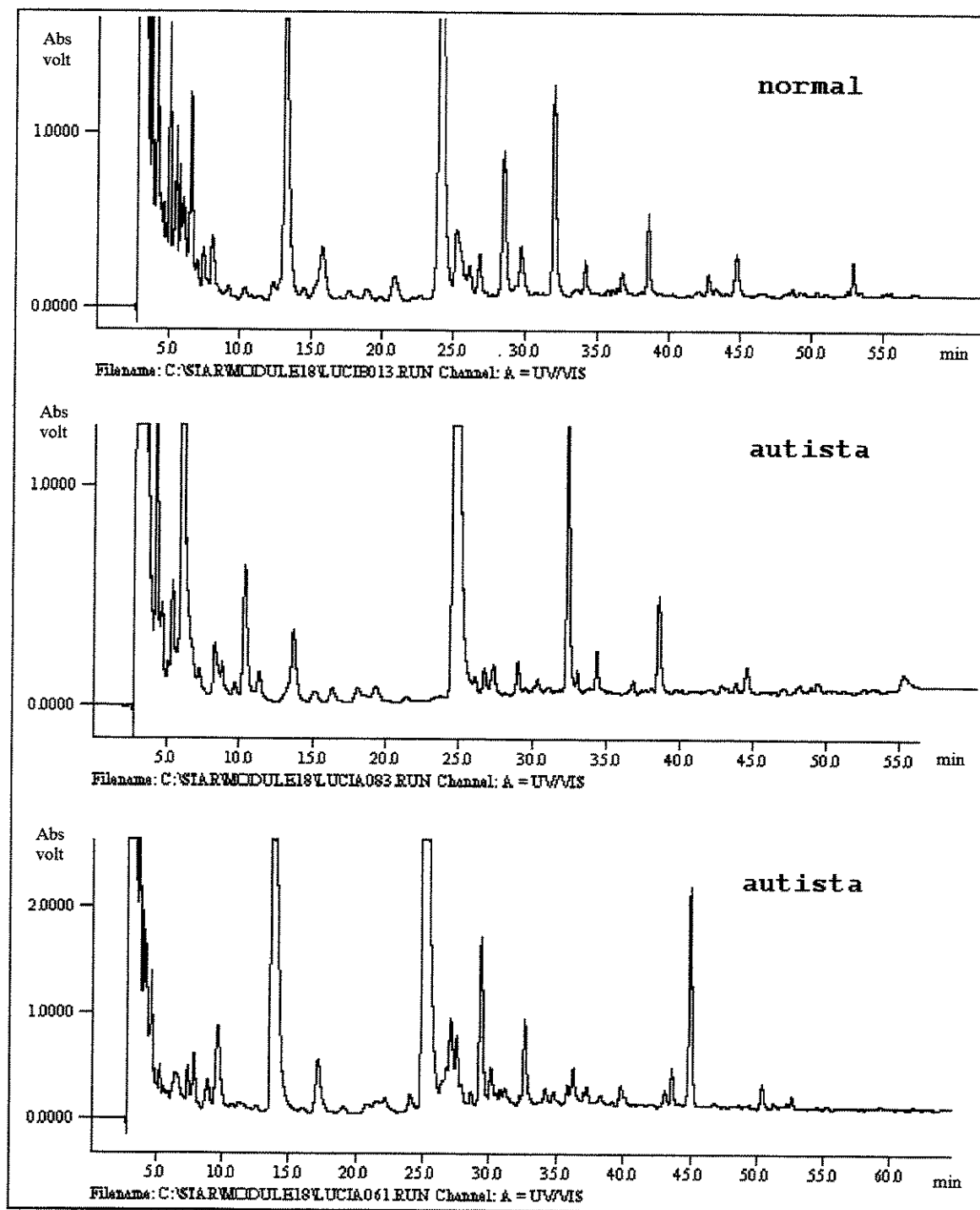
<sup>(1)</sup>Área correspondente a uma injeção com 250nmol de creatinina.

A média das áreas da "região peptídica" nos autistas foi maior que a média dos normais, mas esta diferença não mostrou ser significativa ( $p=0,29$ ) quando aplicado o teste de Tukey para N desigual. Considerando os quatro doadores autistas com maior área e os quatro normais analisados, as áreas dos dois grupos se mostraram significativamente diferentes ( $p= 0,026$ ).





**Figura 17** - Análise por HPLC de urina de autista, utilizando coluna C18 de fase reversa, com gradiente de acetonitrila de 1-60 % como especificado em Material e Métodos. Mostra-se no cromatograma a região entre 26 e 70 min onde eluem preferencialmente os peptídeos, a chamada "região peptídica".



**Figura 18** - Cromatogramas de três urinas analisadas por HPLC em coluna C18 de fase reversa e gradiente de acetonitrila como especificado em Material e Métodos.

#### **5.1.4.2. Fracionamento por HPLC e verificação por HPCE**

Após obtenção dos perfis cromatográficos de algumas urinas de crianças autistas e normais, foram coletadas frações dos picos mais expressivos dentro da região peptídica com o propósito de serem analisadas por eletroforese capilar e verificar se migravam também na região peptídica no eletroferograma. As frações foram colhidas manualmente durante um período de 0,5 a 1,3 minutos aproximadamente, dependendo do tamanho e forma do pico. Isto correspondeu também a um volume de 0,5 a 1,3 mL, uma vez que o fluxo da fase móvel foi mantido constante na taxa de 1mL/min. Após a coleta, as frações foram evaporadas em secador a vácuo, contendo pastilhas de NaOH. Após evaporação da fase móvel, as frações foram redissolvidas em 40µL de água ultra-pura e colocadas em microvials para serem sonicadas e injetadas no aparelho de CE.

Nas análises por eletroforese capilar das frações coletadas no HPLC, foi verificado que: 1) Ao redor de 90% dos analitos recolhidos migraram na região denominada de "peptídica" no eletroferograma. 2) Uma banda coletada no HPLC deu origem, na maioria dos casos, a duas ou três, na análise por HPCE, indicando se tratar de bandas cromatográficas contendo mais que um componente. 3) A fração coletada da banda no cromatograma aos 32-33 min, foi reconhecida como sendo Triptofano por comparação de espectro (99,7% de superposição) e por co-cromatografia com padrão. Este aminoácido, diferentemente dos outros, migra na região peptídica e mostra uma grande absorbância no UV, podendo ter sido considerado erroneamente como peptídeo expressivo nesta região nas análises feitas em estudo de Reichelt *et al.* (1997), e Ek *et al.* (1998).

### **5.1.5. Comparação de resultados por HPCE e HPLC**

A comparação de resultados eletroforéticos com os cromatográficos foi feita em relação ao nível de peptídeos urinários, representados nas "regiões peptídicas", da seguinte maneira: as "regiões peptídicas 1 e 2" dos eletroferogramas e a "região peptídica" única dos cromatogramas. Como essas áreas estão expressas em unidades arbitrárias, que são próprias de cada software, a comparação foi feita elaborando um "ranking" dentro de cada sistema analítico segundo a magnitude das áreas peptídicas totais do grupo autista. O número de crianças seleccionadas para esta comparação foi limitado a nove (das 11 iniciais) dado o número de análises obtidas nos dois sistemas. Desses nove doadores, cinco das amostras com maior área, conforme método cromatográfico, resultaram ser também as cinco primeiras pelo método eletroforético (Tabela 7). Isto é, houve concordância entre os dois métodos quanto à avaliação da "região peptídica". Uma das amostras mais expressivas pelo cromatograma de HPLC (2ª da Tab. 7), não demonstrou estar nessa posição do ranking pela eletroforese, visto que um dos picos de maior área cromatográfica se dividiu na eletroforese em picos que caíram fora da "região peptídica". As amostras que mostraram baixa área total pelo método de HPLC, também mostraram baixa área total pelo método de HPCE.

Cabe assinalar que um certo erro está embutido nessa comparação, pois na "região peptídica" do eletroferograma houve a presença de aminoácidos livres. Isto, entretanto, ocorreu na cromatografia líquida apenas com o triptofano, que eluiu, dentro da região peptídica do cromatograma (aprox. aos 32 min). A influência desse erro na comparação das áreas pelos dois métodos foi minimizado pelo fato de este aminoácido possuir a maior absorvidade e estar presente nos perfis obtidos por ambos os métodos.

**Tabela 7 – Comparação das magnitudes das áreas peptídicas totais obtidas pelos sistemas analíticos HPLC e HPCE, dentro do grupo dos autistas.**

	HPLC	HPCE
Magnitude decrescente	Doador	Doador
1º	8 (1)	7 (2)
2º	6 (1)	8 (1)
3º	7 (2)	3 (4)
4º	3 (1)	11 (3)
5º	11 (1)	6 (2)
6º	2 (2)	4 (2)
7º	5 (3)	2 (4)
8º	1 (1)	5 (3)
9º	4 (1)	1 (5)

Entre parêntese está o número de amostras analisadas para cada doador.

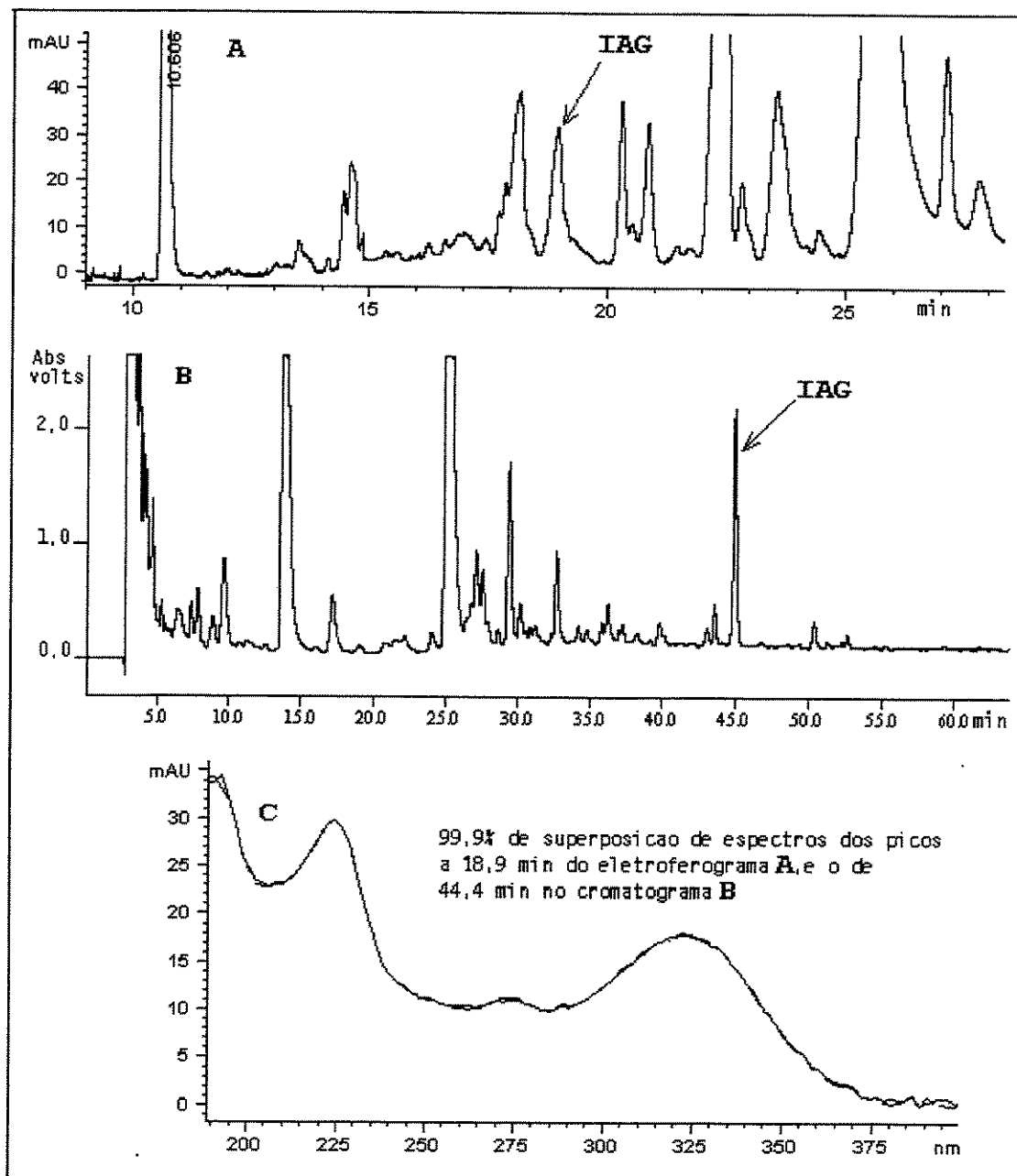
### **5.2. Possíveis marcadores biológicos IAG e 5-HIAA**

Devido a não haver disponibilidade no mercado de um padrão de indolilacriloilglicina (IAG), usamos os dados publicados em estudo feito por Mills *et al.* (1998) da análise por HPLC, quanto aos máximos de absorção em UV apresentado por este composto sintetizado por eles, a saber, 220, 270 e 324 nm. Com a ajuda do detector de UV com arranjo de diodos, foi possível detectar a presença de um único composto com máximos de absorção aproximados de, 222, 272, e 324 nm. Este composto também foi identificado nos cromatogramas apresentando-se claramente maior numa das crianças autistas. O perfil urinário desta criança obtido por análise de HPLC e HPCE, mais o espectro de absorção do composto identificado estão na Figura 19. Esta

criança (doador 2) ficou em sexto lugar entre nove autistas, pela ordem decrescente de área média da "região peptídica" por HPLC e em sétimo, na análise por HPCE. A presença deste composto foi detectada em 5 das 11 crianças autistas e 5 do grupo de 11 crianças normais, migrando entre os tempos de 18,2 e 18,9 min aproximadamente no eletroferograma das urinas.

Foi coletada a fração correspondente ao composto IAG separado por HPLC. A fração foi evaporada em secador a vácuo contendo pastilhas de soda e re-dissolvida em acetonitrila. Em seguida foi tentada a sua identificação utilizando a técnica de cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa. A análise foi dificultada pelo fato de não ter sido possível eliminar completamente, e de forma rápida, o ácido trifluoroacético (TFA) proveniente da fase móvel. Segundo relatado na literatura (Mills *et al.* 1998) ácidos orgânicos fortes como o TFA degradam facilmente o IAG. No intento de purificar a fração e eliminar o TFA e acetonitrila mais rapidamente, a fração foi aquecida a aproximadamente 45 °C, verificando-se que após seco o composto apresentava uma cor avermelhada, característica da reação de decomposição ácida deste composto, conhecida como de "uroroseína" (Milne *et al.*, 1960).

A investigação da presença do metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) era importante por existir dados na literatura que este estaria diminuído em algumas das crianças diagnosticadas com autismo, comparadas às normais. A presença deste metabólito ajudaria relacionar o autismo ao sistema serotoninérgico. Com a ajuda de um padrão de HIAA e o detector com arranjo de diodos em eletroforese capilar pudemos evidenciar a presença deste metabólito em urinas de algumas crianças autistas (5 de 11) e normais (2 de 11), mas, em nenhum dos casos foi possível a sua quantificação devido à baixa concentração presente frente ao limite de detecção do método.



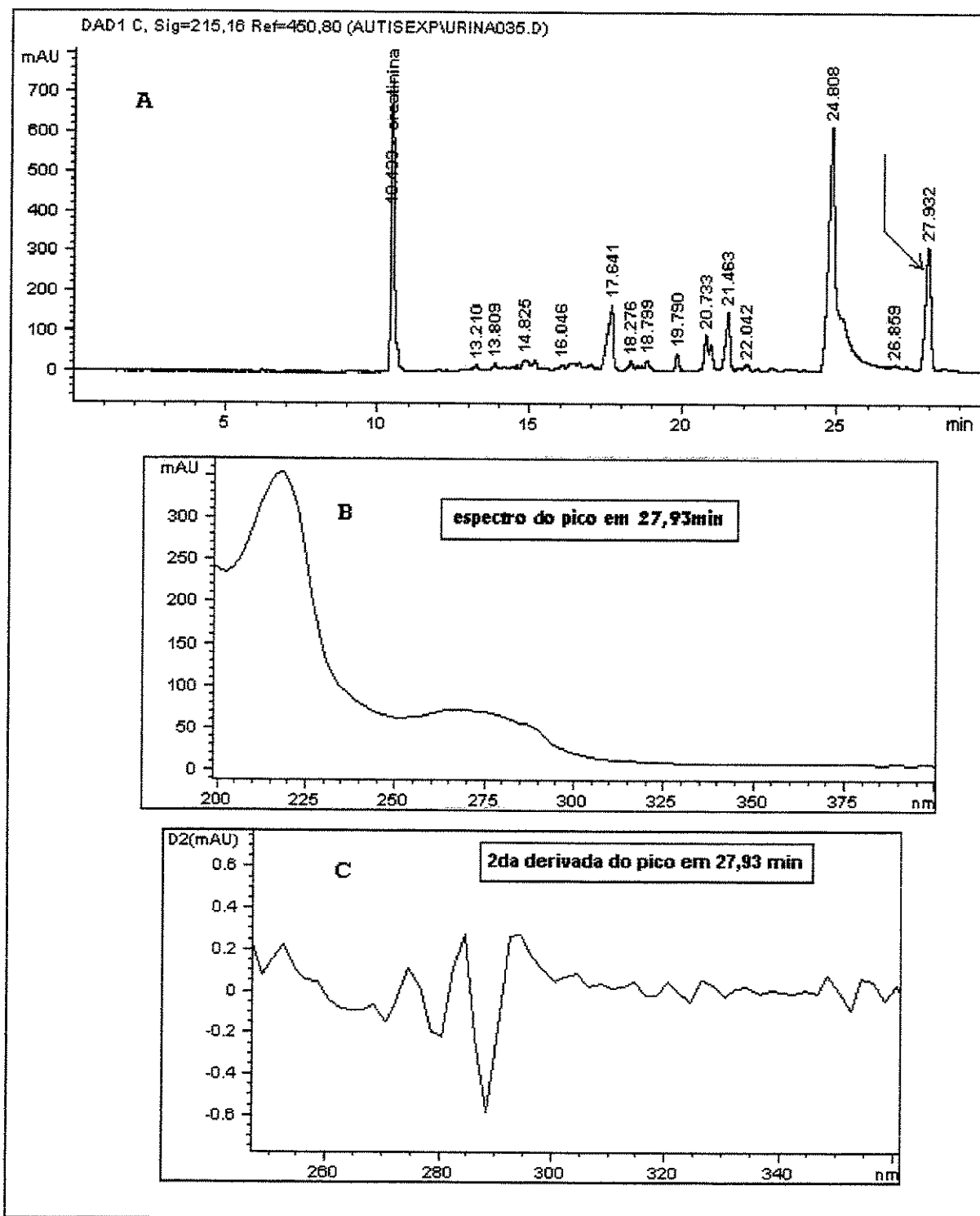
**Figura 19 - A:** eletroferograma da urina de criança autista obtido por HPCE, nas condições experimentais da Figura 7. Mostra-se o pico correspondente ao composto IAG. **B:** cromatograma da urina da mesma criança obtido por HPLC em condições de operação especificadas no Material e Métodos. **C:** superposição dos espectros dos picos de IAG em A e B.

### **5.3. Características de outros picos nos eletroferogramas**

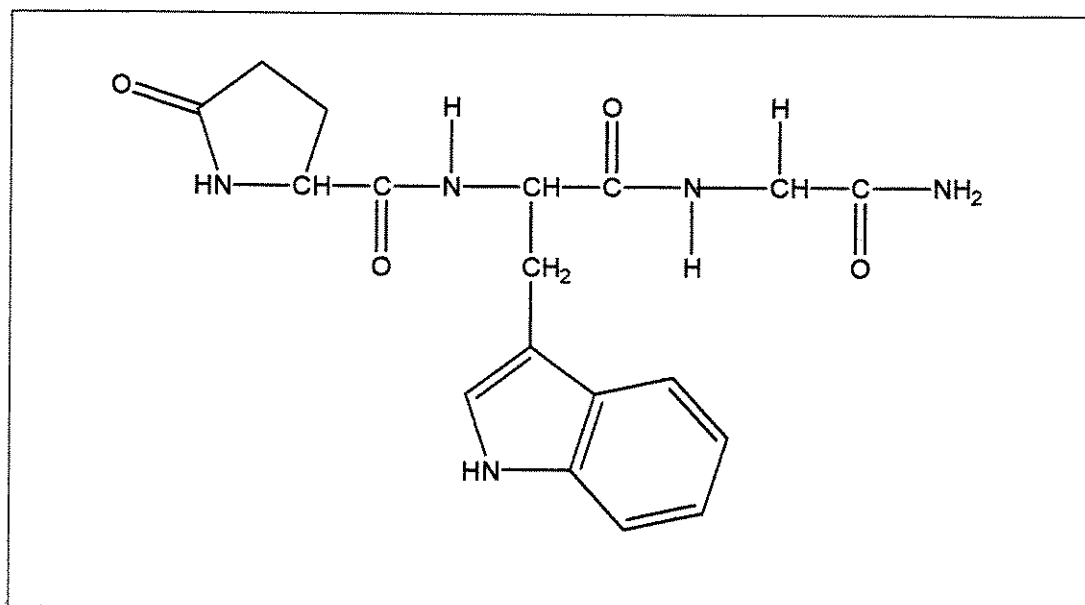
Observou-se um pico, eluindo logo após o ácido úrico, que estava presente praticamente em todas as urinas, tanto dos autistas como dos normais e que apresentava um espectro de absorvância (de ordem zero) típico do triptofano, o que foi inclusive confirmado pela segunda derivada do espectro. O pico poderia também ser indicativo da presença de um grupo indol, o que faz pensar que poderia se tratar de um metabólito da serotonina, como o 3-indoxil-sulfato. A carga negativa deste sal em pH 9,3, justificaria a sua presença neste tempo de migração dentro do eletroferograma (Figura 20).

Em estudo de Pedersen *et al.* (1998) relata-se que o tripeptídeo piroglutamiltriptofanilglicina (pEWG) encontrado no plasma de indivíduos normais e em algumas urinas de autistas, estimula a captação de serotonina pelas plaquetas. Quando analisadas as urinas de um grupo de crianças diagnosticadas com autismo detectou-se um pico em HPLC do tripeptídeo, o que co-cromatografou com um padrão sintético. Esse mesmo pico se apresentou aumentado em perto de 60% em crianças autistas. Este tripeptídeo (Figura 21), por conter triptofano, ser um peptídeo N-substituído, apresentar o grupo piroglutamil na sua estrutura e ainda não mostrar caráter excessivamente aniônico (Pedersen *et al.*, 1998), seria um analito de características compatíveis para migrar logo após o ácido úrico na eletroforese. A falta de padrões comerciais, entretanto, impediu a sua identificação.





**Figura 20 - A:** Eletroferograma de urina de autista obtido nas condições experimentais da Figura 7. **B:** Espectro UV de primeira ordem do pico em 27,93 min. **C:** Segunda derivada do espectro do pico em 27,93 min., com um mínimo em 288nm, característico do Triptofano.



**Figura 21** - Estrutura do piroglutamiltriptofanilglicina

## **6. Conclusões**

## **Conclusões**

Observando os resultados obtidos e ainda após comparação das análises cromatográficas e eletroforéticas das excretas urinárias das crianças autistas objeto desta pesquisa, chegou-se às seguintes conclusões:

1. As metodologias eletroforética e cromatográfica, quando aplicadas à análise da fração peptídica das urinas, mostraram-se comparáveis. A eletroforese capilar, entretanto, apresentou vantagens quanto à facilidade de preparo, injeção e eluição da amostra e interpretação dos resultados. O pico do padrão interno (creatinina) foi facilmente destacável do resto dos picos nos eletroferogramas, mas não nos cromatogramas. Por estas razões, a técnica de análise por HPCE aparece como sendo de utilidade na análise de metabólitos peptídicos e não peptídicos na urina.
2. As quantidades de peptídeos totais encontrados nas urinas de crianças autistas não atingiram os elevados níveis, segundo o relatado na literatura. Isto sugere não haver quantidades apreciáveis de peptídeos resultantes de uma digestão incompleta seguida de absorção anormal, que pudessem aparecer na urina.
3. Considerando o número total de amostras em cada grupo, a área total sob os picos de peptídeos dos doadores autistas não diferiu significativamente da dos doadores normais. Entretanto, a diferença entre as áreas dos subgrupos autistas e normais com as maiores áreas, foi significativa.
4. Vista a ampla variabilidade das áreas peptídicas dentre os autistas, não se descarta a possibilidade de que o critério utilizado para diagnosticar as crianças estudadas neste experimento deva ser aprimorado, no sentido de melhor associar as observações aqui apresentadas com o quadro clínico definido como autismo.
5. A presença do aminoácido triptofano em urinas de autistas, pode ter levado outros autores a concluir que o nível de peptídeos urinários no autista fosse muito elevado.

6. Não foi possível afirmar que o Indolilacrilóilglicina (IAG) se apresente tipicamente elevado na urina da criança autista, no entanto um composto de espectro semelhante ao IAG foi localizado tanto no HPLC quanto no HPCE.
7. Nenhum dos peptídeos opióides conhecidos foi identificado nas urinas de crianças autistas ou normais.

### ***Sugestões para pesquisas futuras***

1. Pelo fato de que alguns dos indivíduos autistas mostraram concentrações urinárias expressivamente mais elevadas de compostos de natureza peptídica e, ainda considerando que essa manifestação esteja relacionada com a condição autista, existe a possibilidade de utilizar a técnica de eletroforese capilar como ferramenta de monitoração na aplicação de qualquer intervenção alimentar ou medicamentosa.
2. Devido à não exigência de um excessivo tratamento da amostra de urina, a técnica analítica por eletroforese capilar poderia ser utilizada para o estudo de alergias alimentares que tenham repercussão no processo digestivo, com aparecimento de metabólitos anormais na urina.

## ***7. Referências Bibliográficas***

BÖHLEN, P.; CASTILLO, F.; LING, N.; GUILLEMIN, R. Purification of peptides: An efficient procedure for the separation of peptides from amino acids and salt. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v.16, p.306-310, 1980.

BURKE, D. G.; MACLEAN, P. G.; WALKER, R. A.; DEWAR, P. J.; SMITH-PALMER, T. Analysis of creatine and creatinine in urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.732, p.479-485, Sept., 1999.

CHABANCE, B.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J. C.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; BOYNARD, M.; PERROTIN, P.; GUILLET, R.; JOLLÈS, P.; FIAT, A. M. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. **Biochimie**, v.80, n.2, p.155-165, Feb., 1998.

COCKRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental Design**. 2.ed., New York: John Wiley, 1957, 611p.

DANIEL, H.; VOHWINKEL, M.; REHNER, G. Effect of casein and  $\beta$ -casomorphins on gastrointestinal motility in rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.120, n.3, p.252-257, Feb., 1990.

D'EUFEMIA, P.; CELLI, M.; FINOCCHIARO, R.; PACIFICO, L.; VIOZZI, L.; ZACCAGNINI, M.; CARDI, E.; GIARDINI, O. Abnormal intestinal permeability in children with autism. **Acta Paediatrica**, Oslo, v.85, p.1076-1079, 1996.

EK, J.; STENSRUD, M.; REICHELT, K. L.; Gluten-Free Diet Decreases Urinary Peptide Levels in Children with Celiac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v.29, p.282-285, Sept., 1999.

FIAT, A. M.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; JOLLÈS, P.; DROUET, L.; BAL DIT SOLLIER, C.; CAEN, J. P. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.1, p.301-310, Jan., 1993.

FUKUDOME, S.; YOSHIKAWA, M. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v.296, n.1, p.107-111, Jan., 1992.

GRIFFITH, O, W.; MEISTER, A. Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase as a discrete step in the  $\gamma$ -glutamyl cycle: Glutathionuria after inhibition of transpeptidase. **Proceedings of the National Academy Science**, Washington, v.76, n.1, p.268-272, 1979.

GRIMM, R.; ZANABONI, G.; VIGLIO, S.; DYNE, K. M.; CETTA, G.; IADAROLA, P. Effect of different surfactants on the separation by micellar electrokinetic chromatography of a complex mixture of dipeptides in urine of prolidase-deficient patients. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.698, n.1/2, p.47-57, Sept., 1997.

GUYTON , A. C. & HALL J. E. **Textbook of Medical Physiology**, Philadelphia Pennsylvania, ninth edition, W. B. Saunders Company, 1996, 1148p.

HARWALKAR V. R. & MCMAHON, D. J., Symposium: Biological and Food Functional Characteristics Of Milk Protein Hydrolysis Products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.1, p.300-300, Jan., 1993.

JORGENSON, J. W.; LUKACS, K. D. High-Resolution separations based on Electrophoresis and Electroosmosis. **Journal of Chromatography**, v.218, p.209-216, 1981.

KASICKA, V. Capillary electrophoresis of peptides. **Electrophoresis**, Weinheim, v.20, p.3084-3105, 1999.

KELLER, F.; LESCH, K. P.; REICHEL, K. L.; GUIMÉNEZ-AMAYA, J. M; CORTESE, R. Impact of autism related peptides and 5-HT system manipulations on cortical development and plasticity, 1999, 6p. Disponível em: <<http://research.unicampus.it/biomed2/default.htm>> Acesso em [25/01/00].

KILSHAW, P. J.; CANT, A. J. The Passage of Maternal Dietary Proteins into Human Breast Milk. **International of Archives of Allergy and Applied Immunology**, v.75, n.1, p.8-15, 1984.



- KNIVSBERG, A-M.; WIIG, K.; LIND, G.; NODLAND, M.; REICHEL, K. L. Dietary Intervention in Autistic Syndromes. **Brain Dysfunction**, v.3, p.315-327, 1990.
- KORHONEN, H.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A.; RANTAMÄKI, P.; TUPASELA, T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v.9, n.8/9, p.307-319, Aug/Sept.,1998.
- LA BELLA, F. S.; GEIGER, J. D.; GLAVIN, G. B. Administered peptides inhibit the degradation of endogenous peptides: The dilemma of distinguishing direct from indirect effects. **Peptides**; v.6 p.645-660, 1985.
- LANGE, N. A. **Physician's Handbook** , 17<sup>a</sup> ed., New York, McGraw-Hill, 1973.
- LANGENHUIZEN, M. H. J. M. & JANSSEN, P. S. L. Capillary Zone Electrophoresis of Pharmaceutical Peptides. **Journal of Chromatography**, v.638, n.2, p 311-318, May, 1993.
- LEWIS, L. S. The use of gluten and casein free diets with people with autism. On: Understanding and implementing a gluten & casein free diet, 1994, 13p. Disponível em: <<http://www.princeton.edu/~lisas/gfpak.html>>. Acesso em: [16/09/00].
- MARKLOVÁ, E.; FOJTÁSKOVÁ, A. High-performance liquid chromatographic profiling of indolylacryloylglycine and its possible precursors in body fluids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.730, n.1/2, p.133-137, Apr., 1996.
- MEISEL, H. & SCHLIMME, E. Milk proteins: precursors of bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, Aug., p.41-43, 1990.
- MEISEL, H. Biochemical Properties of Regulatory Peptides Derived from Milk Proteins. **Biopolymers**, New York, v.43, n.2, p.119-128, 1997.
- MILLS, M. J.; SAVERY, D.; SHATTOCK, P. E. G. Rapid analysis of low levels of indolyl-3-acryloylglycine in human urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.712, n.1/2, p.51-58, Aug., 1998.

MURCH, S. H.; MACDONALD, T. T.; WALKER-SMITH, J. A.; LEVIN, M.; LIONETTI, PKLEIN, N. J. Disruption of sulphated glycosaminoglycans in intestinal inflammation. **The Lancet**, London, v.341, p.711-714, Mar., 1993.

NOGUCHI, T., OKIYAMA, A., NAITO, H. KONEKO, K.; KOIKE, G. Some Nutritional and Physiological Factors Affecting the Urinary Excretion of Acid Soluble Peptides in Rats and Women. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.46, n.11, p.2821-2828, 1982.

NOVOTNY, M.; COBB, K. A.; LIU, J. P. Recent advances in capillary electrophoresis of proteins, peptides and aminoacids. **Electrophoresis**, v.11, n.9, p.735-749, 1990.

PANKSEPP, J. A. Neurochemical Theory of Autism. **Trends in Neuroscience**, v.2, n.7, p.174-177, 1979.

PEDERSEN, O. S.; LIU, Y.; REICHELT, K. L. Serotonine uptake stimulating peptide found in plasma of normal individuals and in some autistic urines. **Journal of Peptides Research**, v.53, n.6, p.641-646, 1999.

RANTALA, T. Autism and Nutritional Therapy. In: Nutrition Clinic Biopterin, 1996, 7p. Disponível em: <<http://www.sci.fi/~biopteri/>> Acesso em: [24/01/99].

REICHELT, K. L.; KNIVSBERG, A. M.; LIND, G.; NODLAND, M. Probable Etiology and Possible Treatment of Childhood Autism. **Brain Dysfunction**, v.4, p.308-319, 1991.

REICHELT, K.L.; KNIVSBERG, A. M.; NODLAND, M.; LIND, G. Nature and consequences of hiperpeptiduria and bovine casomorphins found in autistic syndromes. **Developmental Brain Dysfunction**, Oslo, v.7, p.71-85, 1994.

REICHELT, W. H.; KNIVSBERG, A. M.; NODLAND, M.; STENSRUD, M.; REICHELT, K. L. Urinary Peptide Levels and Patterns in Autistic Children from Seven Countries, and the Effect of Dietary Intervention after 4 Years. **Developmental Brain Dysfunction**, Oslo, v.10, p.44-55, 1997.

REICHELT, W. H.; EK J; STENSRUD, M.; REICHELT, K. L. Peptide excretion in celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v.26, p.305-309, Mar., 1998.

RODIER, P. M. The Early Origins of Autism. **Scientific American**, p.38-45, Feb., 2000.

SCHANBACHER, F. L.; TALHOUK, R. S.; MURRAY, F. A.; GHERMAN L. I.; WILLETT, L. B. Milk-borne bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Ohio, v.8, n.5/6, p.393-403, 1998.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. 1ª ed., São Paulo, Livraria Varela, 1996, 517p.

SHATTOCK, P., SAVERY, D. Evaluation of Urinary Profiles Obtained from People with Autism and Associated Disorders. Part 1: Classification of Subgroups, 1999, 8p. Disponível em: <<http://osiris.sunderland.ac.uk/autism/ps9/.htm>>. Acesso em: [03/08/00].

SHIHABI Z. K. Review of applications of capillary electrophoresis for clinical analysis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v.23, n.1, p.79-95, 2000.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.3, p.1190-1206, Jun., 1958.

SVEDBERG, J; DE HAAS, J.; LEIMENSTOLL, G.; PAUL, F.; TESCHEMACHER, H. Demonstration of  $\beta$ -casomorphin immunoreactive materials *in vitro* digest of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. **Peptides**, v.6, p. 825-830, 1985.

TAGLIARO F.; MORETTO, S.; VALENTINI, R.; GAMBARO, G.; ANTONIOLI, C.; MOFFA, M.; TATÒ, L. Capillary zone electrophoresis determination of phenylalanine in serum: A rapid, inexpensive and simple method for the diagnosis of phenylketonuria. **Electrophoresis**, Weinheim, v.15, p.94-97, 1994.

TAVARES, M. F. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, São Paulo, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, São Paulo, v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TESCHEMACHER, H.; KOCH, G.; BRANTL, V. Milk Protein-Derived Opioid Receptor Ligands. **Biopolymers**, v.43, p.99-117, 1997.

TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clinical Science**, Great Britain, v.82, p.471-488, 1992.

VIGLIO, S.; ZANABONI, G.; LUISETTI, M.; TRISOLINI, R.; GRIMM, R.; CETTA, G.; IADAROLA, P. Micellar electrokinetic chromatography for the determination of urinary desmosine and isodesmosine in patients affected by chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Chromatography B**, v.714, p.87-98, 1998.

WARING, R. H. & NGONG J. M. Sulphate metabolism in allergy-induced autism: Relevance to the disease aetiology. In **The Autism Research Unit** (ed): **Biological Perspectives in Autism**, Sunderland, University Press, p 25-33, 1993.

WRIGHT, E. C.; STERN, J.; ERSSER, R.; PATRICK, A. D. Glutathionuria: Gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v.2, p.3-7, 1979.

ZAGON I. S. & MCLAUGHLIN, P. J. Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system. **Brain Research**, v.542, p.318-323, 1991.

ZANABONI, G.; GRIMM, R.; DYNE, K. M.; ROSSI, A.; CETTA, G.; IADAROLA, P. Use of capillary zone electrophoresis for analysis of imidodipeptides in urine of prolidase-deficient patients. **Journal of Chromatography B**, v.683, p.97-107, 1996.

