

MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA UTILIZANDO MONOLITO C-18 PARA DETERMINAÇÃO DE MIOGLOBINA NA URINA

Renan Vitek¹; Fernando H. Nascimento²; Jorge C. Masini²

1 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT), Campus Avançado Sinop. Rua das Avencas, nº 2377, Setor Res. Sul, Sinop/MT.

2 Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Cidade Universitária (USP). Avenida Professor Lineu Prestes, nº 748, Butantã, São Paulo/SP

Palavras-Chave: Separação de proteínas, colunas monolíticas, extração em fase sólida

Introdução

O princípio dos métodos cromatográficos é empregado tanto nos processos de separação na forma de colunas como extração com o emprego da técnica de extração em fase sólida. O maior desafio para ambos os métodos é a busca por materiais que possuem interação com os analitos de interesse com a fase estacionária, visando a extração do analito da matriz e melhorar os parâmetros de separação cromatográfica. No desenvolvimento dos materiais, o emprego de monolitos para aplicações cromatográficas é um tema amplamente presente na literatura com inúmeros trabalhos de revisões demonstrando o seu potencial e suas aplicações em análises diversas áreas como farmacológica, alimentar, ambiental, saúde e dentre outras[1]–[3]

Os materiais monolíticos vêm sendo empregados ao longo dos últimos 30 anos como fases estacionárias e para além de separações cromatográficas são aplicados como adsorventes nos mais diversos processos de extração em fase sólida[4],[5]. Destaca-se a fácil preparação, o controle de porosidade, além de enorme flexibilidade para controlar as características químicas da superfície de seus poros e, conseqüentemente, controlar o mecanismo de retenção/separação[6],[7] buscando obter uma menor altura de pratos, aumentando assim resolução de picos nos cromatogramas[8].

Outro aspecto relevante é a versatilidade de monômeros disponíveis para a síntese, sendo possível sintetizar monolitos poliméricos (ou orgânicos), a base de sílica (ou inorgânicos) além dos híbridos que possuem monômeros das duas “classes”. As vantagens são inúmeras, pois de acordo com a finalidade pode-se produzir os monolitos com as características mais desejadas, como resistência a altos e baixos pH, tamanho dos poros, resistência ao fluxo, dentre outras[9].

Em se tratando da finalidade, essas de certa forma parecem ser infinitas. São inúmeros artigos de revisão sobre a aplicação dos materiais monolíticos [10]–[15]. No entanto algumas características são destacadas, como um maior número de trabalhos com aplicações de monolitos poliméricos para compostos orgânicos de alta massa molecular, ao exemplo de proteínas[16].

Assim, durante o desenvolvimento deste trabalho, foram desenvolvidas metodologias de preparo de monolitos com polimerização utilizando diferentes técnicas, como a ultravioleta (UV) e térmica para aplicações na forma de extração em fase sólida e colunas cromatográficas a fim de separar e quantificar a mioglobina urinária utilizando os métodos de cromatografia por injeção sequencial (SIC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Material e Métodos

Funcionalização das interfaces dos tubos Silcosteel® e ETFE

Todos os tubos foram lavados sequencialmente com etanol (EtOH), água, hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 mol/L, água, ácido clorídrico (HCl) 0,2 mol/L, água e EtOH.

Para os tubos de Silcosteel®, uma solução previamente sonificada e purgada em N₂ do reagente derivatizante, trimetóxisililpropilmetacrilado (TMSPM) a 20% (m/m) em etanol 95% (v v⁻¹, pH 5,0) foi injetada[17] e posteriormente selados e aquecidos a 60 °C por 2 horas. Finalmente, os tubos foram lavados com acetona e secos sob um fluxo de N₂.

Nos tubos de tetrafluoretileno (ETFE) o processo envolveu a lavagem prévia e a injeção de uma solução 20% em peso de benzofenona (BP) em MeOH. As extremidades foram fechadas e os tubos foram irradiados por 20 minutos sob 254 nm a 120 mJ/cm². Após nova lavagem os tubos foram fechados e uma solução de 30% em peso de EDMA em MeOH foi injetada, fechadas e irradiadas por 40 minutos (254 nm a 120 mJ/cm²) e lavados com MeOH.

Síntese dos monolitos ancorados nos tubos

Uma mistura contendo 24% de estearil metacrilato (SMA), 16% de etileno glicol dimetacrilato (EDMA), 45,5% de 1-propanol e 14,5% de 1,4-butanodiol (% m/m) e iniciadores. Para UV usou-se 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPAP) e o azobisisobutironitrila (AIBN). O tubo de ETFE foi irradiado por 20 minutos sob 254 nm a 120 mJ/cm². Os tubos de Silcosteel® foram aquecidos a 50 °C por seis horas. As colunas foram lavadas e armazenadas com acetonitrila (ACN)

Análise de amostras

Amostras de urina foram coletadas dos membros do grupo de pesquisa antes e 10 minutos após uma hora de treinamento de força anaeróbico (cross-fit). As amostras foram tamponadas com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) na proporção volumétrica de 9:1 e filtradas através de filtros de seringa de 0,22 µm. Pouco antes dos experimentos de extração em fase sólida (SPE), as amostras de urina foram condicionadas em 0,1% (v v⁻¹) de ácido trifluoroacético (TFA).

A preparação das amostras para a SPE *offline* consistiu em carregar 2,0 mL das amostras filtradas e condicionadas com 0,1% de TFA nas colunas de ETFE de 50 × 1,50 mm de diâmetro interno, lavar com 5% de ACN em 0,1% de TFA e, em seguida, eluir com 0,50 mL de 60% de ACN em 0,1% de TFA. Uma alíquota da amostra de 5 µL foi analisada nas colunas monolíticas de SMA em CLAE, utilizando um gradiente com 0,1% de TFA na fase móvel A e partindo de 5% para 50% de ACN em 0,1% de TFA, conforme parâmetros descritos na figura 4.

Já o processo de análise por SIC está ilustrado na Fig. 1, e as análises das amostras seguiram um procedimento de 5 etapas (Tabela 1).

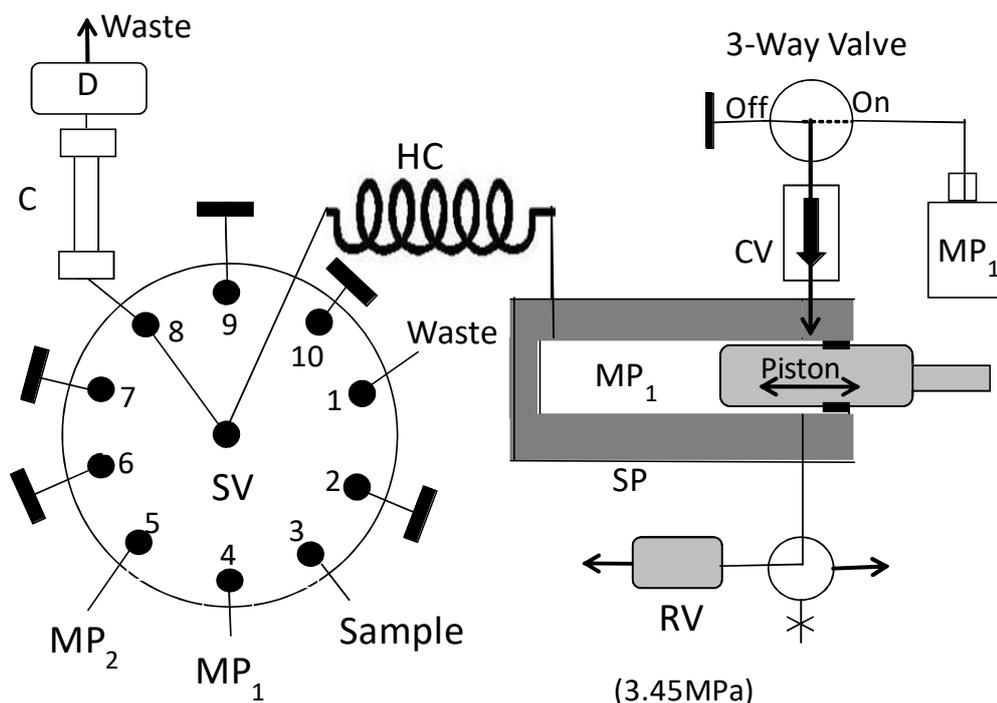


Figura 1. Esquema do equipamento de injeção sequencial (SIC) para a determinação da mioglobina. SP = seringa/processo, RV = 3.45 MPa relaxamento da válvula, CV = checagem da válvula, HC = bobina em hélice (4 m × 0.8 mm i.d.), SV = seleção da válvula, C = 50 × 1.50 mm poli(SMA-co-EDMA) coluna monolítica, D = Detector do espectrofotometro (400 nm) conectado a célula de fluxo, MP1 = 5% ACN em 0.1% TFA, MP2 = 60% ACN em 0.1% TFA. Todas as % em v v⁻¹.

Tabela1 – Procedimento para determinação de Mioglobina em amostras de urina por SIC.

Etapa	SV	comando SP (Fluxo)	Comentário
1	9	Aspirar 1500 μL ($50 \mu\text{Ls}^{-1}$)	Preencher a seringa da bomba com MP1
2	5	Aspirar 500 μL ($50 \mu\text{Ls}^{-1}$)	Aspirar MP2 para a bobina (eluição do analito)
3	4	Aspirar 500 μL ($50 \mu\text{Ls}^{-1}$)	Aspirar o MP1 para a bobina (etapa de lavagem – SPE)
4	3	Aspirar 1000 μL ($50 \mu\text{Ls}^{-1}$)	Aspirar a amostra
5	8	Esvaziar ($10 \mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)	Injeção da amostra, lavagem (MP1), eluição (MP2) e acondicionamento (MP1) através da coluna e detector

SV: seleção da válvula; SP: seringa/processo; MP1: Fase Móvel 1 (5% Acetonitrila em 0.1% ácido trifluoroacético), MP2: Fase Móvel 2 (60% Acetonitrila em 0.1% ácido trifluoroacético)

Resultados e Discussão

O desafio na utilização de tubos de ETFE ou outros suportes plásticos fluorados é a sua hidrofobicidade e baixa reatividade, que torna difícil a conexão entre a fase estacionária com a parede interna do tubo sem deixar espaços vazios que podem afetar a performance da separação[19]. Para ancorar o monolito na parede interna através de uma ligação covalente,

um procedimento de vinilização em duas etapas foi utilizado, proposto primeiramente por Stachowiak *et al.*[20] para uso de tubos de polipropileno e posteriormente adaptado por Catalá-Icardo *et al.*[21] para tubos de ETFE.

O procedimento consistiu basicamente em duas etapas simples. A primeira delas é a fotossensibilização da BP no tubo de ETFE para criar uma superfície fotoiniciadora. A primeira modificação não altera as características físicas do tubo, mantendo sua aparência transparente. Na segunda etapa, o iniciador media a fotopolimerização de uma camada fina de poli(EDMA) entrelaçada, formando assim uma variedade de grupos vinílicos terminais para ancorar o monólito dentro do invólucro. Após essa segunda modificação e lavagem do tubo com metanol, observa-se a olho nu uma camada densa e branca de poli(EDMA) aderida à superfície interna.

A imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de uma seção radial do tubo ETFE com 1,5 mm de diâmetro interno mostra uma superfície homogênea do monólito de poli(SMA-co-EDMA) polimerizado por UV (Fig. 1a). A Figura 1b destaca a interface funcionalizada entre a parede interna do ETFE e o monólito. As ligações duplas de poli(EDMA) não reativas copolimerizam com SMA e EDMA na presença de solventes porogênicos, ancorando assim o monólito de poli(SMA-co-EDMA). O núcleo dos monólitos preparados nos tubos não apresentam diferenças significativas, sugerindo que as polimerizações UV com 20 minutos a 254 nm e 120 mJ cm⁻² foram suficientes para produzir uma estrutura uniforme de microesferas de 2 a 3 µm intercaladas por poros de fluxo de 5 a 10 µm interconectados.

A Figura 1c mostra a interface do tubo Silcosteel® ancorando o monólito de poli(SMA-co-EDMA), enquanto a Fig. 1d mostra o núcleo do monólito obtido por polimerização térmica de 24 horas. As imagens de MEV sugerem que o monólito produzido termicamente mantém os grandes poros de fluxo de 5 a 10 µm, mas com glóbulos maiores do que aqueles obtidos pela fotopolimerização.

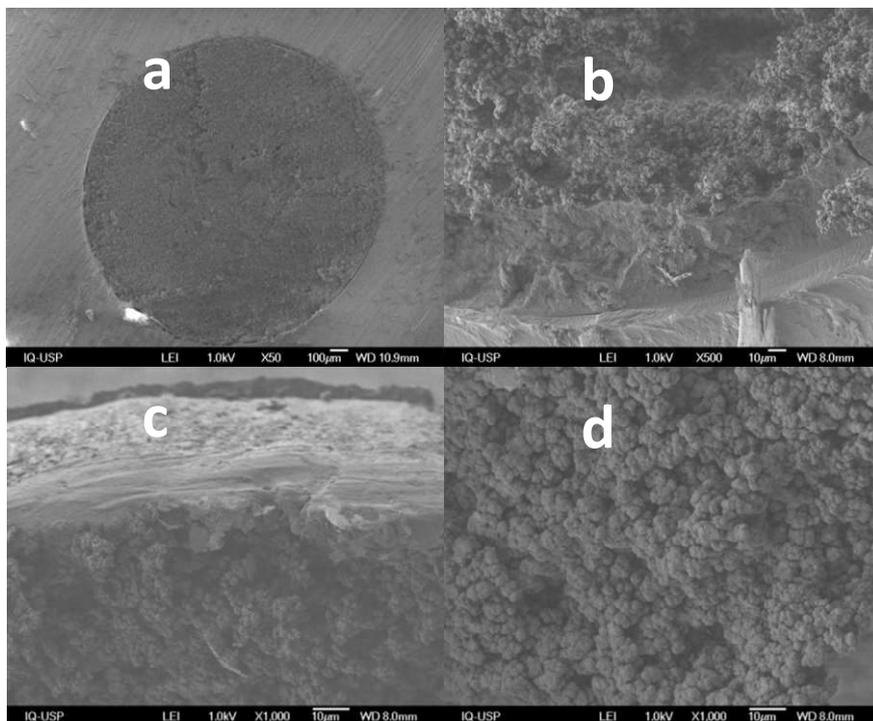


Figura 2. Imagens de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) de uma seção transversal dos monólitos de poli(SMA-co-EDMA) mostrando: (a) o monólito alojado em um tubo ETFE com 1,5 mm de diâmetro interno; (b) a interface entre o tubo ETFE e o monólito ancorado em uma camada de poli(EDMA), indicada pelas setas; (c) a interface entre o tubo Silcosteel® vinilizado e o monólito; e (d) o núcleo do monólito preparado dentro do tubo Silcosteel® por polimerização térmica.

Os espectros de infravermelho (ATR-FTIR) dos monolitos de poli(SMA-co-EDMA) mostram as bandas típicas em 2850 e 2925 cm^{-1} devido ao estiramento C-H e ao estiramento simétrico de CH_3 , respectivamente (Fig. 3). As bandas em 1465 e 1390 cm^{-1} correspondem à curvatura CH_2 e CH_3 na cadeia C18. A banda em 1725 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C=O, enquanto a banda em 1145 cm^{-1} vem do estiramento das ligações C-O nas estruturas de metacrilato. A banda fraca em 1640 cm^{-1} devido ao estiramento C=C confirma a reação de polimerização através das funcionalidades vinílicas, como confirmado pela comparação do ATR-FTIR da poli(SMA-co-EDMA) com os espectros IR dos monômeros mostrados na literatura.

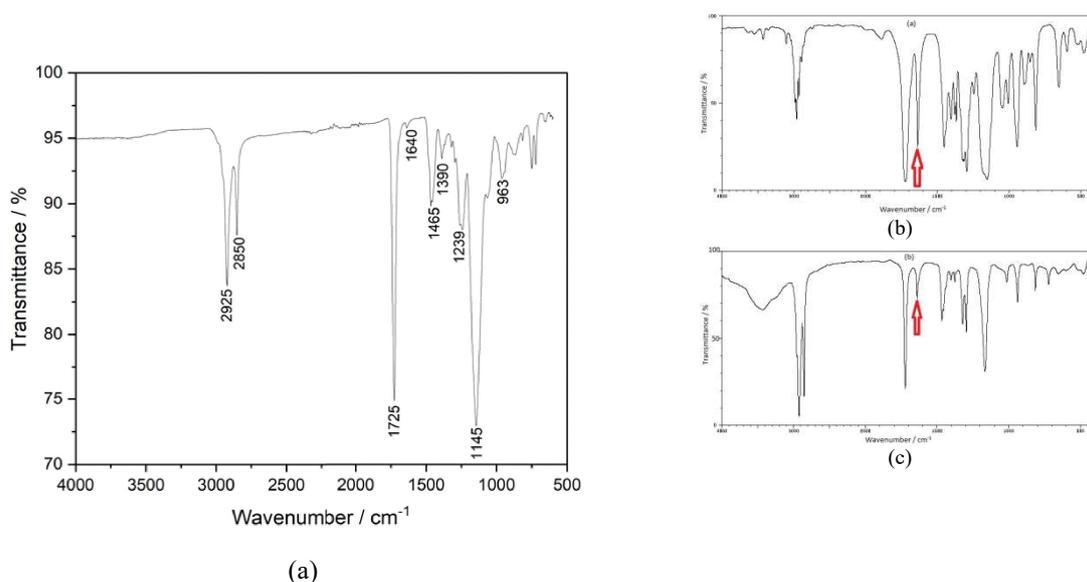


Figure 3. ATR-FTIR do monolito de poli(SMA-co-EDMA); (b) ATR-FTIR para o EDMA e (c) ATR-FTIR para o SMA).

A coluna preparada no tubo Silcosteel® de 1,0 mm de diâmetro interno exibiu o melhor desempenho na separação de linha de base das três proteínas (Fig. 5). Assim, a aplicação do método CLAE para análises de urina envolveu a coluna ETFE de 1,5 mm de diâmetro interno para SPE e a coluna Silcosteel® como coluna analítica.

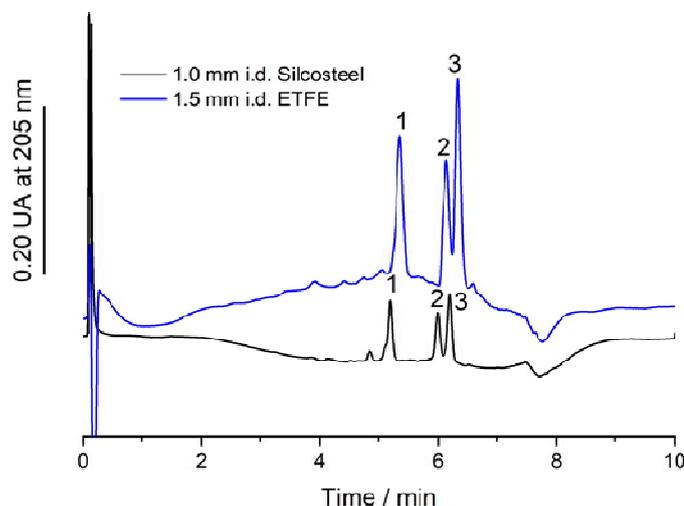


Figura 4. Cromatogramas extraídos do branco de uma mistura contendo (1) lisozima, (2) mioglobina e (3) anidrase carbônica (todos na concentração de 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nas condições descritas na seção 2.8. Os volumes de amostra injetados foram 5,0 e 20,0 μL para os as colunas de 1,0, e 1,5 mm i.d. respectivamente. O fluxo para ambas as colunas foi de 1,0 mL min^{-1} e temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método SIC foram calculados como $LOD = (3S(y/x)/m)$ and $LOQ = (10S(y/x)) / m$ [22], onde m é a inclinação da curva de calibração usando medições de altura de pico para as concentrações de 5,0, 10, e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, resultando em 1,1 e 3,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Este LOD é adequado para a medição dos níveis de concentração relatados em casos de trauma por esmagamento (32,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$)[23], treinamento militar (6,4 to 410 $\mu\text{g mL}^{-1}$)[24], corredores de maratonas (52 $\mu\text{g mL}^{-1}$)[25], competidores de rúgbi (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)[26] e infarto do miocárdio (3,0 mg mL^{-1})[27].

Já as análises por CLAE resultaram em uma curva de calibração para concentrações de mioglobina entre 1,0 e 7.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ resultou num ajuste para a equação linear $\text{Área}_{\text{pico}} = (111 \pm 7)C_{\text{myo}} - (0.01 \pm 0.03)$ com $R^2 = 0.989$ e $S_{y/x} = 0.0048$, resultando em $LOD = 0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $LOQ = 0,43 \mu\text{g mL}^{-1}$. A proporção da inclinação das curvas de calibração com SPE e sem SPE implicou uma FE de 2,3 e um aumento de 10 vezes na detectabilidade. Esse limite de detecção é cerca de 2 vezes menor do que o relatado por Lyndsay *et al.*[28] e cerca de 4 vezes menor do que o relatado por Al-Rimawi[29], ambos usando métodos RP-HPLC.

As concentrações encontradas após o treinamento são apresentadas na Tabela 2. A amostra de urina do Indivíduo 1 apresentou concentração de mioglobina de $6,0 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, concentração próxima ao LOQ do método CLAE. Após o protocolo SPE, foi encontrado um valor de concentração indistinguível, mostrando a precisão do método (Fig. 5a). Já o indivíduo 2 apresentava um valor expressivo sem a pré-concentração e no indivíduo 3, foi possível quantificar após o procedimento de SPE.

Tabela 2. Concentração de mioglobina urinária em amostras, antes e depois do SPE (n = 3)

Sample	Sem SPE ^a / $\mu\text{g L}^{-1}$	Com SPE / $\mu\text{g L}^{-1}$
1	6.0 ± 0.4	6.0 ± 0.5
2	28 ± 1	Não requerido
3	<LOQ ^b	2.3 ± 0.4

^a Solid phase Extraction; ^b Limite de Detection

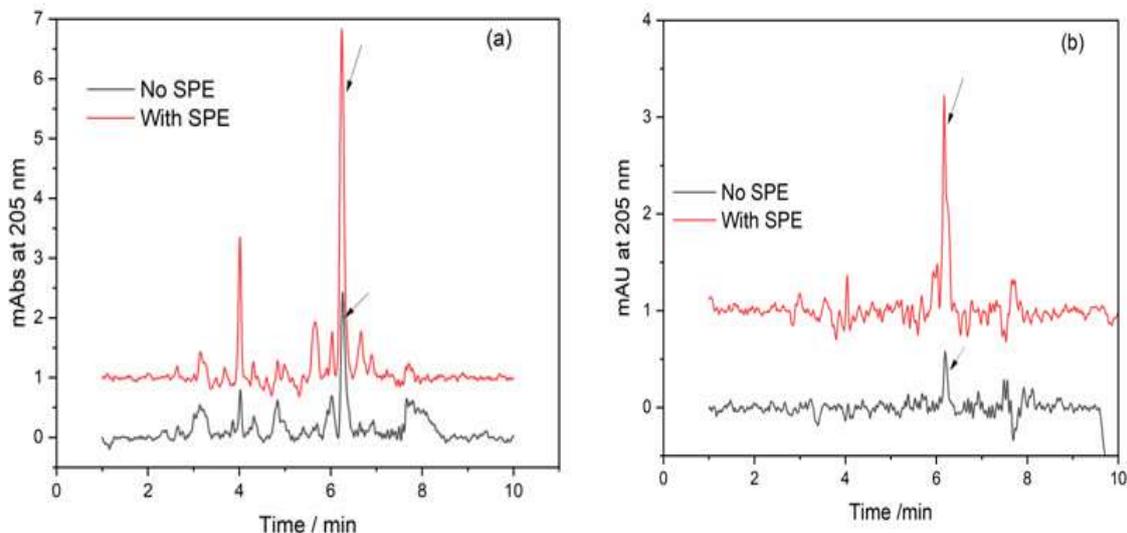


Figura 5. Cromatogramas subtraídos do branco de amostras de urina do indivíduo 1 (a) e indivíduo 3 (b) antes e depois do SPE com as colunas poli(SMA-co-EDMA). As setas indicam o pico da mioglobina. As condições cromatográficas foram descritas na seção 2.8; Volume da amostra = 5 μL , temperatura = 60 $^{\circ}\text{C}$.

A precisão do método CLAE foi investigada adicionando 10, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ às amostras, resultando em recuperações de 105, 98 e 99%, respectivamente, com um RSD < 12% para a concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Conclusões

A preparação simples e fácil de colunas monolíticas poliméricas em diferentes dimensões e moldes permitiu o desenvolvimento de métodos cromatográficos de fase reversa para determinar a mioglobina urinária, utilizando o método de SPE conforme necessidade. Ambos os métodos SIC e CLAE foram beneficiados com o emprego das colunas monolíticas. Embora o SIC não tenha sido capaz de fornecer separação de fase reversa de lisozima, mioglobina e anidrase carbônica, ele automatiza todas as etapas do SPE de condicionamento da coluna, carregamento de amostra, lavagem e eluição/detecção. Para esta aplicação específica, a seletividade foi alcançada pela detecção em 400 nm, comprimento de onda seletivo para a mioglobina. As limitações de contrapressão do SIC exigiram o uso de uma coluna com $50 \times 1,50$ mm de diâmetro interno. No entanto, esta coluna foi construída em tubo de ETFE por fotopolimerização, sendo a sua síntese rápida e reprodutível. A análise por HPLC se beneficiou da separação eficiente de proteínas em um gradiente de ACN em 0,1% de TFA fornecido pela coluna poli(SMA-co-EDMA) construída em tubo Silcosteel®. A combinação da análise SPE e CLAE proporcionou um fator de enriquecimento de 2,3, com uma melhoria de 10 vezes na detectabilidade, atingindo LOD e LOQ de 1,3 e 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Estes valores são baixos o suficiente para detectar aumentos prejudiciais de mioglobina na urina, resultando assim em um material com potencial aplicação em diagnóstico médico.

Agradecimentos

JCM agradece o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 306674/2021-1). A FHN e Renan Vitek agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas (Contrato 88882.315696/2019-01) e (Contrato 88887.499941/2020-00).

Referências

- [1] M. Wang, H. Yan, Y. Yuan, and Y. Han, "Pipette-tip solid-phase extraction by use of a sol-gel hybrid adsorbent: a new pretreatment strategy for rapid screening of cucumbers for cyanazine and atrazine," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 4, pp. 1231–1239, 2015.
- [2] O. G. Potter and E. F. Hilder, "Porous polymer monoliths for extraction: Diverse applications and platforms," *J. Sep. Sci.*, vol. 31, no. 11, pp. 1881–1906, 2008.
- [3] W. Ji *et al.*, "Selective solid phase extraction of chloroacetamide herbicides from environmental water samples by amphiphilic magnetic molecularly imprinted polymers," *Talanta*, vol. 170, pp. 111–118, 2017.
- [4] F. Svec and J. M. J. Fréchet, "Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media," *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 7, pp. 820–822, 1992.
- [5] J. C. Masini, F. H. do Nascimento, and R. Vitek, "Porous monolithic materials for extraction and preconcentration of pollutants from environmental waters," *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, vol. 29, 2021.
- [6] F. Svec, "Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 841, no. 1–2, pp. 52–64, 2006.
- [7] F. Svec, "Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 6, pp. 902–924, 2010.

- [8] K. Mistry and N. Grinberg, "Application of monolithic columns in high performance liquid chromatography," **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, vol. 28, no. 7–8, pp. 1055–1074, 2005.
- [9] F. Svec and Y. Lv, "Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography," **Anal. Chem.**, vol. 87, no. 1, pp. 250–273, Jan. 2015.
- [10] A. Siouffi, "Silica gel-based monoliths prepared by the sol – gel method: facts and figures," **J. Chromatogr. A**, vol. 1000, pp. 801–818, 2003.
- [11] L. He and C. S. Toh, "Recent advances in analytical chemistry - A material approach," **Anal. Chim. Acta**, vol. 556, no. 1, pp. 1–15, 2006..
- [12] G. Guiochon, "Monolithic columns in high-performance liquid chromatography," **J. Chromatogr. A**, vol. 1168, no. 1–2, pp. 101–168, 2007..
- [13] C. Aydoğan, A. Gökaltun, A. Denizli, and Z. El-Rassi, "Organic polymer-based monolithic capillary columns and their applications in food analysis," **J. Sep. Sci.**, vol. 42, no. 5, pp. 962–979, 2019.
- [14] J. C. Masini and F. Svec, "Porous monoliths for on-line sample preparation: A review," **Anal. Chim. Acta**, vol. 964, pp. 24–44, 2017.
- [15] R. Vitek, F. H. do Nascimento, and J. C. Masini, "Polymer monoliths for the concentration of viruses from environmental waters: A review," **J. Sep. Sci.**, no. June, pp. 1–15, 2021.
- [16] X. Wang *et al.*, "Preparation of a poly(styrene-co-DPHA-co-EDMA) monolith and its application for the separation of small molecules and biomacromolecules by HPLC," **Talanta**, vol. 165, pp. 339–345, 2017..
- [17] J. C. Masini, "Semi-micro reversed-phase liquid chromatography for the separation of alkyl benzenes and proteins exploiting methacrylate- and polystyrene-based monolithic columns," **J. Sep. Sci.**, vol. 39, no. 9, pp. 1648–1655, 2016..
- [18] M. Rigobello-Masini and J. C. Masini, "Improvements in the separation capabilities of sequential injection chromatography: Determination of intracellular dissolved free amino acid profiles in three taxonomic groups of microalgae," **Phytochem. Anal.**, vol. 24, no. 3, pp. 224–229, 2013..
- [19] M. Iacono, D. Connolly, and A. Heise, "Fabrication of a GMA-co-EDMA monolith in a 2.0 mm i.d. polypropylene housing," **Materials (Basel)**, vol. 9, no. 4, pp. 1–10, 2016..
- [20] T. B. Stachowiak *et al.*, "Fabrication of porous polymer monoliths covalently attached to the walls of channels in plastic microdevices," **Electrophoresis**, vol. 24, no. 21, pp. 3689–3693, 2003..
- [21] M. Catalá-Icardo, S. Torres-Cartas, S. Meseguer-Lloret, E. F. Simó-Alfonso, and J. M. Herrero-Martínez, "Photografted fluoropolymers as novel chromatographic supports for polymeric monolithic stationary phases," **Talanta**, vol. 187, pp. 216–222, 2018..
- [22] James N. Miller and Jane C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th ed. London: **Pearson Education Limited**, 2005.
- [23] A. Genthon and S. R. Wilcox, "Crush syndrome: A case report and review of the literature," **J. Emerg. Med.**, vol. 46, no. 2, pp. 313–319, 2014..
- [24] R. F. Smith, "Exertional Rhabdomyolysis in Naval Officer Candidates," **Arch. Intern. Med.**, vol. 121, no. 4, pp. 313–319, 1968..
- [25] H. B. Schiff, E. T. M. McSearraigh, J. C. Kallmeyer, H. B. Schiff, E. T. M. McSearraigh, and J. C. Kallmeyer, "Myoglobinuria, rhabdomyolysis and marathon running," **Q. J. Med.**, vol. 47, no. 4, pp. 463–472, 1978..
- [26] A. Lindsay *et al.*, "Impact-induced muscle damage and urinary pterins in professional rugby: 7,8-dihydroneopterin oxidation by myoglobin," **Scand. J. Med. Sci. Sport.**, vol. 26, no. 3, pp. 329–337, 2016.
- [27] S. C. Powel, E. R. Friedlander, and S. Z.K., "Myoglobin determination by high-performance liquid chromatography," **J. Chromatogr.**, vol. 317, pp. 87–92, 1984.
- [28] A. Lindsay, S. Carr, N. Draper, and S. P. Gieseg, "Urinary myoglobin quantification by high-performance liquid chromatography: An alternative measurement for exercise-induced muscle damage," **Anal. Biochem.**, vol. 491, pp. 37–42, 2015..
- [29] F. Al-Rimawi, "Development and Validation of HPLC-UV Method for Determination of Bovine Serum Albumin and Myoglobin Proteins," **Int. Res. J. Pure Appl. Chem.**, vol. 4, no. 6, pp. 585–593, 2014.



63º Congresso Brasileiro de Química
05 a 08 de novembro de 2024
Salvador - BA

Passos, L. M. L.; Souza-Sartori, J. A.; Bergamin-Lima, R.; Zocca, T. N.; Baptista, A. S.; Aguiar, C. L. Extração de proteína total e atividade antioxidante de torta de filtro de cana de açúcar. **Revista de Química Industrial**, 741, 22-28, 2013.

Böck, F.C.; Helfer, G. A.; Costa, A.B.; Dessuy, M. B.; Ferrão, M. F. Rapid Determination of Ethanol in Sugarcane Spirit Using Partial Least Squares Regression Embedded in Smartphone. **Food Analytical Methods**, 11(4), 1951-1957, 2018.